



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

CARRERA DE BIOLOGÍA

**Efecto del bloqueo de los receptores del Péptido Intestinal  
Vasoactivo en el ovario de la rata con Síndrome del Ovario  
Poliquístico, sobre la regulación de la secreción de  
progesterona y estradiol**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**MARÍA ISABEL RAMÍREZ SIXTOS**

**DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. LETICIA MORALES LEDESMA**



**MÉXICO D.F. Septiembre 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

CARRERA DE BIOLOGÍA

**Efecto del bloqueo de los receptores del Péptido Intestinal Vasoactivo en el ovario de la rata con Síndrome del Ovario Poliquístico, sobre la regulación de la secreción de progesterona y estradiol**

**Tesis que presenta:**

MARÍA ISABEL RAMÍREZ SIXTOS

**DIRECTORA DE TESIS:**

DRA. LETICIA MORALES LEDESMA

Realizada en el Laboratorio de Fisiología Reproductiva de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción. UMIEZ, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

UNAM

Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo financiero de UNAM-DGAPA-PAPIIT, clave: IN211813





UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MÉXICO

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **RAMÍREZ SIXTOS MARÍA ISABEL**, con número de cuenta **305021076**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **9 de septiembre de 2014** a las **18:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** Dra. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN

**VOCAL** Dra. LETICIA MORALES LEDESMA

**SECRETARIO** Dra. PATRICIA ROSAS SAUCEDO

**SUPLENTE** M. en IBSH ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ

**SUPLENTE** M. en C. CATALINA MACHUCA RODRÍGUEZ

El título de la tesis que presenta es: **Efecto del bloqueo de los receptores del péptido intestinal vasoactivo en el ovario de la rata con síndrome del ovario poliquístico, sobre la regulación de la secreción de progesterona y estradiol.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**A T E N T A M E N T E**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
 México, D. F. a 30 de julio de 2014.

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
**DIRECTOR**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
 ZARAGOZA  
**DIRECCIÓN**

RECIBÍ  
 OFICINA DE EXÁMENES  
 PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
 M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
 JEFE DE CARRERA

## **AGRADECIMIENTOS**

A los miembros del jurado:

**Dra. María Esther Cruz Beltrán**

**Dra. Leticia Morales Ledesma**

**Dra. Patricia Rosas Saucedo**

**M. en IBSH Angélica Flores Ramírez**

**M. en C. Catalina Machuca Rodríguez**

Por el tiempo invertido en la revisión de este proyecto, así como sus valiosos comentarios, correcciones y críticas constructivas para hacer de este trabajo una mejor tesis, Gracias.

A la Dra. **Leticia Morales Ledesma** por la oportunidad de formar parte de su laboratorio, me dio las herramientas necesarias para poder guiar el desarrollo y culminación de este trabajo, tiempo, sabiduría, paciencia y apoyo, Muchas gracias.

A **Gaby Rosas** por permitirme formar parte de su proyecto, enseñarme lo práctico y lo teórico para la realización de esta tesis, además de brindarme su conocimiento, apoyo y paciencia, Muchas gracias.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: **Isa, Aly, Noé, Aldo, Gaby, Rosa, Deyra, Ely, Azu, Juanito, Hazael, Caro** y los mas pequeños Cesar, Daniel y Liss, gracias a ustedes aprendí muchas cosas he hicieron del laboratorio un ambiente agradable.

A la **Dra. Adriana, Dra. Elizabeth, Dr. Román** y al personal técnico del bioterio de la FES-Zaragoza por su apoyo en el cuidado de las ratas utilizadas en este estudio

Al **Dr. Roberto Chávira** por su colaboración en las mediciones de las concentraciones hormonales.

## **DEDICATORIAS**

*Esta tesis la dedico a mis padres, Carmen y José, quienes me han dado amor incondicional y apoyado durante toda mi vida, tanto moral, como económicamente, gracias a ustedes he llegado hasta aquí y me he convertido en un buen ser humano, no se si bastara con un simple gracias por todo lo que han hecho por mí, pero aun así gracias, los amo.*

*A mis hermanos, Cali y Pepe con quienes he compartido todo y que sin saberlo, me han enseñado mucho. Los amo.*

*A Dulce, Pedro, Andy, Ale, Carmen, Nancy, Norma y Tere porque todos ustedes me han dado alguna lección de vida.*

*A todos mis amigos sin excluir a ninguno, pero en especial:*

*Vero y Yareli, por apoyarme y ser mis amigas desde el inicio de la carrera hasta la culminación de esta; Isa, por tantas experiencias juntas y porque a pesar de la distancia seguirás siendo mi amiga, te quiero; Aly, porque en un corto periodo te has convertido en una gran amiga; Noé, por tener tanto en común y por hacer más amenos los días; Aldo, por ser mi amigo y porque tu sarcasmo “hace un mundo mejor”; Aaron por tu cariño; Jesica y Diego por las vivencias inquebrantables que hemos vivido; Carlos porque en un cortísimo periodo te has convertido en una persona especial; Nathali y Viri por las carcajadas en este corto tiempo, las estimo y a Javier, porque lo mejor de la vida es encontrar alguien con quien reír, con quien llorar, con quien hablar, saber que alguien se preocupa por tu felicidad.*

*Gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos y porque siempre han estado conmigo.*

***La gratitud no es la única virtud, pero es la madre de todas las demás***

## ÍNDICE

	Páginas
<b>Abreviaturas</b> .....	<i>i</i>
<b>Resumen</b> .....	<i>ii</i>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Marco Teórico</b> .....	<b>3</b>
<i>Ovario</i> .....	<b>3</b>
<i>Desarrollo folicular</i> .....	<b>4</b>
<i>Regulación endocrina del desarrollo folicular</i> .....	<b>8</b>
<i>Ovulación</i> .....	<b>10</b>
<i>Cuerpo lúteo</i> .....	<b>11</b>
<i>Atresia folicular</i> .....	<b>12</b>
<i>Esteroidogénesis</i> .....	<b>13</b>
<i>Regulación endocrina del proceso de esteroidogénesis</i> .....	<b>17</b>
<i>Ciclo estral</i> .....	<b>19</b>
<i>Inervación ovárica</i> .....	<b>22</b>
<i>Evidencias de la participación de la inervación simpática en las funciones del ovario</i> ...	<b>24</b>
<i>Péptido Intestinal Vasoactivo</i> .....	<b>25</b>
<i>SOPQ en la mujer</i> .....	<b>28</b>
<i>SOPQ en la rata</i> .....	<b>32</b>
<i>Participación de la inervación en el desarrollo del SOPQ</i> .....	<b>33</b>
<b>Planteamiento del problema</b> .....	<b>34</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>35</b>
<b>Objetivo General</b> .....	<b>35</b>

## Índice

<b>Objetivos particulares</b> .....	<b>35</b>
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>36</b>
<i>Diseño experimental</i> .....	<b>36</b>
<i>Administración de solución salina y del antagonista de los receptores a VIP</i> .....	<b>38</b>
<i>Procedimiento de autopsia</i> .....	<b>38</b>
<i>Cuantificación de hormonas esteroides en suero</i> .....	<b>39</b>
<i>Cuantificación de monoaminas y sus metabolitos en ovario</i> .....	<b>39</b>
<i>Análisis estadístico</i> .....	<b>40</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>41</b>
<i>Experimento 1. Efectos de la inyección del antagonista de los receptores a VIP en la bursa del ovario de animales cíclicos</i> .....	<b>41</b>
<i>Experimento 2. Efectos de la inyección de VE en ratas de 10 días de edad, sacrificadas en la etapa adulta</i> .....	<b>44</b>
<i>Experimento 3. Efectos de la inyección unilateral del antagonista de los receptores a VIP en la bursa del Ovario de animales con SOPQ</i> .....	<b>51</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>61</b>
<b>Modelo</b> .....	<b>69</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>71</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>72</b>



## Abreviatura

<b>20<math>\alpha</math>-HSD</b>	20 $\alpha$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa
<b>5HIAA:</b>	Acido-5-hidroxiindol-3-acético
<b>5-HT:</b>	Serotonina
<b>AMPc:</b>	Adenosin 3',5' Monofosfato Cíclico
<b>DA:</b>	Dopamina
<b>DHEA:</b>	Dehidroepiandrosterona
<b>DOPAC:</b>	3-4 dihidroxifenilacético
<b>E2:</b>	Estradiol
<b>FSH:</b>	Hormona estimulante del folículo
<b>GnRH:</b>	Hormona liberadora de gonadotropinas
<b>LH:</b>	Hormona luteinizante
<b>MHPG:</b>	4-Hidroxi-3-metoxifenilglicol
<b>NA:</b>	Noradrenalina
<b>NOS:</b>	Nervio ovárico superior
<b>NPO:</b>	Nervio del plexo ovárico
<b>NPY:</b>	Neuropéptido Y
<b>NV:</b>	Nervio vago
<b>P4:</b>	Progesterona
<b>SOPQ:</b>	Síndrome del Ovario Poliquístico
<b>SP:</b>	Sustancia P
<b>T:</b>	Testosterona
<b>VE:</b>	Valerato de estradiol
<b>VIP:</b>	Péptido Intestinal Vasoactivo

## Resumen

El síndrome del ovario poliquístico (SOPQ) es una patología que se presenta en el 10 % de mujeres en edad reproductiva, siendo la primer causa de infertilidad. Se caracteriza por altas concentraciones de andrógenos, anovulación y ovarios poliquísticos. Para investigar la etiología del síndrome se han utilizado modelos en los que se induce el síndrome mediante la administración de valerato de estradiol (VE). En estudios anteriores se ha sugerido que el péptido intestinal vasoactivo (VIP), neurotransmisor que regula las funciones ováricas, podría estar participando en el desarrollo de la patología.

En el presente estudio se analizó en el animal cíclico o con SOPQ, el papel del VIP mediante el bloqueo de sus receptores en el ovario sobre la esteroidogénesis y la síntesis de monoaminas. Para ello se diseñaron dos experimentos: 1) Ratas cíclicas de la cepa CII-ZV de 60 días de edad en el día del estro inyectadas con un antagonista de los receptores a VIP (VIP híbrido) en la bursa del ovario izquierdo o derecho, a una concentración de  $10^{-6}$ M en un volumen de 20  $\mu$ l; 2) Ratas con SOPQ inducido en la etapa infantil (10 días de edad) por la administración de 5 mg de VE a los cuales se les inyectó 20 $\mu$ l del antagonista de VIP en la bursa de los ovarios (izquierdo o derecho). Los animales de los dos experimentos fueron sacrificados 30 minutos después del bloqueo de los receptores a VIP, y se determinó la concentración de hormonas esteroides en suero y monoaminas ováricas.

En los animales tratados con VE se observó adelanto en el inicio de la pubertad, bloqueo de la ovulación, incremento en la concentración de progesterona (P4) y testosterona (T) en suero así como en la concentración de noradrenalina (NA) ovárica.

En el animal cíclico, la inyección unilateral del antagonista de los receptores a VIP no modificó la concentración de P4 ni la de estradiol (E2) en suero. Cuando el VIP híbrido se inyectó en la bursa del ovario izquierdo (OI) la concentración de T en suero fue menor, contrario a lo ocurrido cuando se inyectó en la bursa del ovario derecho (OD) (OI:  $0.5 \pm 0.2$

vs.  $18.6 \pm 1.5$ ; **OD**:  $1.7 \pm 0.8$  vs.  $0.14 \pm 0.02$  pg/ml;  $p < 0.05$ ). La concentración ovárica de NA o serotonina (5-HT) no se modificó, mientras que la de dopamina (DA) disminuyó únicamente cuando se inyectó el antagonista de VIP en el ovario izquierdo ( $246.8 \pm 38.6$  vs.  $396.1 \pm 24.9$  pg/mg de ovario,  $p < 0.05$ ). Resultados que nos permiten inferir que el VIP participa de manera asimétrica en la regulación de la secreción de testosterona, resultado que podría estar dado por una diferente sensibilidad de cada ovario ante el péptido.

En el modelo del animal con SOPQ, el bloqueo unilateral de los receptores a VIP resultó en una menor concentración de P4 (**OI**:  $26.9 \pm 0.7$  vs.  $33.7 \pm 1.3$ ; **OD**:  $21.5 \pm 1.3$  vs.  $34.9 \pm 0.7$  ng/ml,  $p < 0.05$ ), y mayor de T (**OI**:  $25.9 \pm 2.6$  vs.  $0.5 \pm 0.2$ ; **OD**:  $10.9 \pm 4.6$  vs.  $1.7 \pm 0.8$  pg/ml) y de E2 en suero (**OI**:  $60.7 \pm 4.6$  vs.  $40.0 \pm 3.8$ ; **OD**:  $71.9 \pm 5.3$  vs.  $47.7 \pm 4.1$  pg/ml,  $p < 0.05$ ). La inyección del antagonista de VIP en la bursa del ovario izquierdo incrementó la concentración de ovárica de NA ( $1984.3 \pm 217.5$  vs.  $63.2 \pm 12.5$  pg/mg de ovario,  $p < 0.05$ ), mientras que la de 5-HT incrementó cuando el ovario inyectado fue el derecho ( $347.0 \pm 68.2$  vs.  $137.5 \pm 14.3$  pg/mg de ovario,  $p < 0.05$ ).

Los resultados obtenidos permiten sugerir que en la rata con SOPQ el bloqueo local de los efectos del VIP en el ovario, por la administración de un antagonista no selectivo de los receptores VIPérgicos, resultó en la inhibición de la secreción de progesterona y la estimulación de testosterona y estradiol. La respuesta fue asimétrica en la secreción de aminos, cuando la evaluación se realiza a los 30 minutos del bloqueo de los receptores a VIP.

## INTRODUCCIÓN

El ovario realiza dos funciones, la ovulación y la síntesis de hormonas esteroides. Ambas son reguladas de manera neuroendocrina por el eje-hipotálamo-hipófisis-ovario, y por la información nerviosa que recibe el ovario de tres paquetes neurales: el nervio ovárico superior (NOS), el plexo ovárico (PO) y el nervio vago (NV). (Lawrence y Burden, 1980; Domínguez y Cruz-Morales, 2011).

El NOS aporta al ovario neuropéptido Y (NPY), noradrenalina (NA), y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Dissen y Ojeda, 1999; Gartner y Hiatt, 2007; Ross y Pawlina, 2007; Domínguez y Cruz-Morales, 2011).

El VIP es un neurotransmisor constituido por 28 aminoácidos. Las fibras VIPérgicas del ovario se localizan en el tejido intersticial, en los vasos sanguíneos y alrededor de los folículos primordiales como en desarrollo (Ahmed y col., 1986; Johnson y col., 1994). En el ovario se expresan los dos tipos de receptores a VIP: el VPAC-1 y el VPAC-2. Los dos receptores se encuentran en células teco-intersticiales, mientras que en células de la granulosa únicamente se ha descrito la presencia del receptor VPAC-2 (Vaccari y col., 2006).

La alteración de alguna de las vías de regulación de las funciones del ovario puede resultar en el desarrollo de patologías como el Síndrome del Ovario Poliquístico (SOPQ). Esta patología es considerada como la principal causa de infertilidad en mujeres en edad reproductiva, la que fue descrita en el año de 1935 por Stein y Leventhal, caracterizada por amenorrea, hirsutismo, infertilidad y ovarios con numerosos quistes foliculares. De acuerdo al consenso realizado en el año de 2003 en Rotterdam, Holanda, por la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología y la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva, el SOPQ es diagnosticado al presentar hiperandrogenismo asociado por lo menos con una de las siguientes características (Merino y col., 2009; Goodarzi y col., 2011):

## ❧ *Introducción* ❧

- ❧ Presencia de ovarios poliquísticos
- ❧ Anovulación

De manera experimental, el SOPQ ha sido inducido en la rata por la inyección de valerato de estradiol (VE), un estrógeno de larga actividad que resulta en una condición de ovarios poliquísticos, anovulación e hiperandrogenismo (Brawer y col., 1986).

En la actualidad se desconoce cuál es el factor primario que provoca el desarrollo de esta patología, sin embargo, hay resultados que evidencian la participación de la inervación simpática en el desarrollo de síndrome. En el ovario de la mujer con SOPQ aumenta la densidad de las fibras adrenérgicas (Semenova, 1969; Heider y col., 2001). De manera experimental también se ha observado que en la rata con SOPQ, inducido por la administración de VE, incrementa la actividad de las fibras simpáticas del NOS. Al eliminar este paquete nervioso por la sección bilateral del NOS, se restablecen las funciones ováricas (Barria y col. 1993; Lara y col. 1993; Morales-Ledesma y col., 2010).

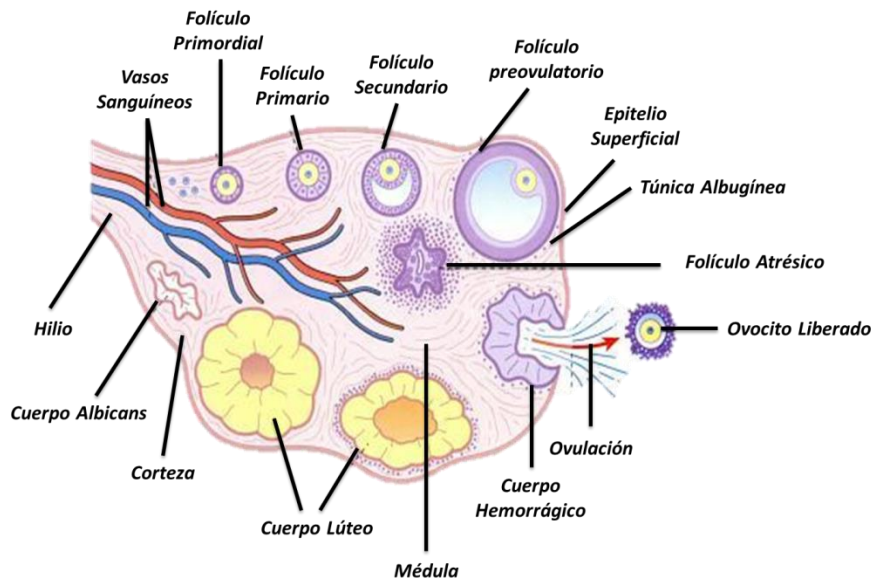
Por el NOS además de ingresar NA y NPY, también llega VIP, péptido que ha sido implicado en la etiología del síndrome. Ya que en cultivo de ovario de rata con SOPQ, el VIP incrementa la actividad esteroidogénica (Parra y col., 2007).

Con la finalidad de evaluar si el VIP participa en las alteraciones esteroidogénicas características del animal con SOPQ, en el presente estudio se evaluó la respuesta esteroidogénica aguda de cada ovario ante el bloqueo de los receptores VIPérgicos por la inyección de un antagonista de los receptores a VIP en la bursa ovárica.

## Ovario

El ovario es un órgano par de color blanco rosado con forma ovoide cuya función es la ovulación y la síntesis de hormonas esteroideas y proteicas. Cada ovario está fijado a la superficie posterior del *ligamento ancho del útero* por un pliegue peritoneal (mesovario), que mantiene suspendida a la gónada dentro de la cavidad peritoneal. El polo superior del ovario está unido a la pared de la pelvis por el *ligamento suspensorio* al cual se asocian los vasos sanguíneos y las fibras nerviosas que ingresan al ovario. El polo inferior del ovario está unido al útero por medio del ligamento ovárico (Ross y Pawlina, 2007).

La superficie del ovario está cubierta por una capa de células epiteliales cúbicas denominada epitelio superficial, por debajo del cual se encuentra una capa de tejido conjuntivo denso, la *túnica albugínea*, que los separa de la corteza subyacente (Figura 1) (Ross y Pawlina, 2007).



**Figura 1.** Estructura del ovario en la que se aprecian las diferentes etapas del desarrollo folicular seguido del proceso de ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Tomado y modificado de Welsch y Sobotta, 2008).

El ovario se encuentra rodeado por un repliegue de peritoneo denominado bursa ovárica. En roedores, la bursa ovárica juega un papel esencial en la reproducción y ovulación debido a que aumenta la probabilidad de que los ovocitos liberados ingresen al oviducto. Asimismo, el líquido de la cavidad bursal crea un microambiente adecuado para el tránsito de los ovocitos hacia el oviducto (Vanderhyden y col., 1986).

En el ovario se distinguen tres regiones (Sánchez-Criado, 1999; Ross y Pawlina, 2007):

- La región medular: se encuentra situada en el centro del ovario. Contiene tejido conjuntivo laxo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios (Figura 1).
- La región cortical: está ubicada en la periferia del ovario, rodeando a la médula. Contiene los *folículos ováricos* incluidos en un tejido conjuntivo, denominado *estroma* (Figura 1).
- El hilio: contiene células hiliares. Es la porción del ovario por donde ingresa la arteria y la vena ovárica, los vasos linfáticos y las terminales nerviosas (Figura 1). Esta región se une por el mesovario al ligamento ancho, y se acerca al extremo de las trompas de Falopio.

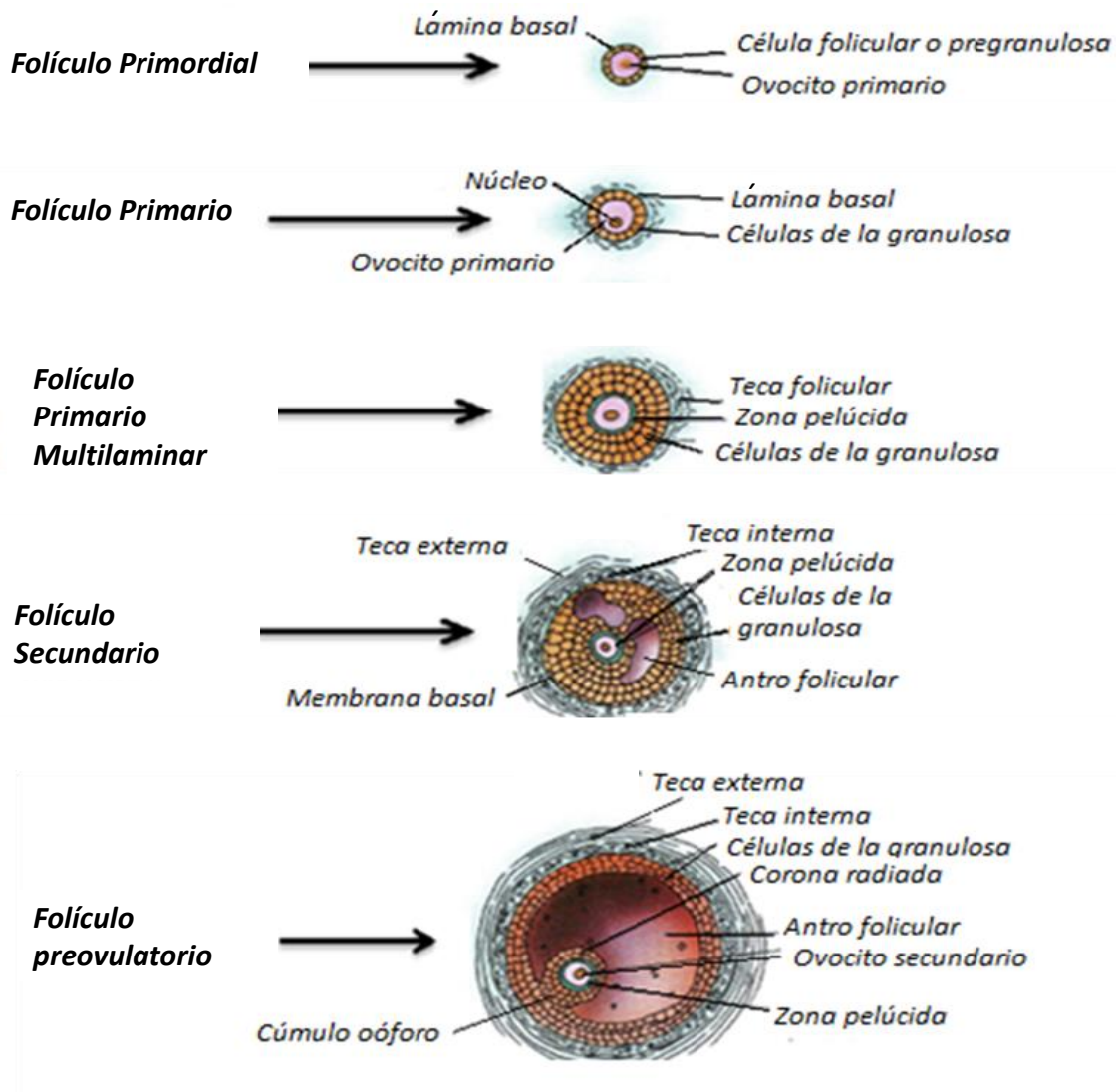
### ***Desarrollo Folicular***

La duración de la foliculogénesis varía con la especie, en la mujer culmina en el periodo fetal, mientras que en la rata ocurre en la etapa neonatal. Con base en los cambios morfo-fisiológicos que experimenta el ovocito y las células foliculares, los folículos se clasifican en (Gartner y Hiatt, 2007):

#### **❧ *Folículo primordial***

Los folículos primordiales constituyen la reserva de folículos en reposo. El crecimiento inicial de estos folículos es independiente de la estimulación gonadotrópica (Domínguez y col., 1991; Ross y Pawlina, 2007).

El folículo primordial consta de un ovocito primario detenido en la profase de la primera división meiótica (dictioteno en los roedores). El ovocito está rodeado por una capa de células planas denominadas células foliculares o pregranulosas (Figura 2), unidas entre sí mediante desmosomas. La lámina basal delimita al folículo primordial del estroma ovárico (Gartner y Hiatt, 2007; Welsch y Sobotta, 2008).



**Figura 2.** Muestra la dinámica del desarrollo folicular y las estructuras que caracterizan a cada folículo en los diferentes estadios de maduración (Tomado y modificado de Gartner y Hiatt, 2007).



### ☞ *Folículo primario*

En este folículo aumenta el diámetro del ovocito y en él se aprecia un núcleo grande denominado vesícula germinal (Gartner y Hiatt, 2007). Las células pregranulosas adquieren una forma cúbica, momento a partir del cual reciben el nombre de células de la granulosa (Figura 2). Estas células poseen varios complejos de Golgi dispersos, retículo endoplasmático liso, ribosomas libres y múltiples mitocondrias dispersas que le confieren la capacidad de secretar hormonas esteroides. Las células de la granulosa empiezan a proliferar, se estratifican y forman de una a tres capas de células alrededor del ovocito. Su proliferación es estimulada por acción de la hormona estimulante del folículo (FSH) y la activina, esta última sintetizada por el ovocito primario (Sánchez-Criado, 1999; Gartner y Hiatt, 2007).

Entre el ovocito y las células de la granulosa se forma la zona pelúcida, una sustancia amorfa compuesta de tres glucoproteínas, la ZP1, ZP2 y ZP3. La zona pelúcida es secretada por el ovocito y las células de la granulosa, y proporciona nutrientes al ovocito primario en maduración (Berne y Levy, 2006; Gartner y Hiatt, 2007).

Las células mesenquimales procedentes del estroma, emigran hacia la membrana basal del folículo primario y originan la teca. Esta migración hacia la membrana basal tiene lugar cuando el folículo ha adquirido de 2 a 3 capas de células granulosas. La membrana basal separa las células granulosas de la teca aún indiferenciada (Sánchez-Criado, 1999).

### ☞ *Folículo secundario*

El folículo continúa su desarrollo y aumenta de tamaño (Figura 2). Una vez que presentan más de tres capas de células granulosas alrededor del ovocito, recibe el nombre de folículo secundario (Gartner y Hiatt, 2007). En estos folículos se forman los cuerpos de Call-Exner, espacios entre las células granulosas que contienen líquido folicular. La fusión de los cuerpos de Call-Exner da lugar a la formación de una cavidad llena de líquido, el

antro folicular. El líquido folicular contiene glucosaminoglucanos, proteoglicanos, hormonas como la progesterona, estradiol, inhibina, activina, FSH, y hormona luteinizante (LH), cuyas concentraciones varían durante el ciclo estral (Domínguez y col., 1991; Gartner y Hiatt, 2007; Ross y Pawlina, 2007).

Las células de la teca se disponen en bandas para formar, tras su diferenciación (adquisición de receptores a LH), una capa celular vascularizada denominada teca interna, y una teca externa, integrada por tejido conjuntivo fibroso, células musculares lisas y haces de fibras colágenas. Las células de la teca interna poseen receptores a LH y asumen las características ultraestructurales de las células productoras de esteroides: mitocondrias, retículo endoplasmático liso y gránulos de secreción (Sánchez-Criado, 1999; Gartner y Hiatt, 2007; Ross y Pawlina, 2007).

### ❧ *Folículo preovulatorio*

La proliferación de las células de la granulosa y la formación constante del líquido folicular dan lugar a la formación del folículo preovulatorio (Figura 2) que se encuentra preparado para la ovulación. Las células de la granulosa se reordenan de tal manera que forman un montículo que recibe el nombre de cúmulo oóforo o disco prolífero. Una capa de células granulosas, la corona radiada, permanece rodeando al ovocito primario. Las células del cúmulo oóforo y las de la corona radiada proporcionan al ovocito los nutrientes necesarios para su crecimiento (Gartner y Hiatt, 2007). A medida que el folículo se acerca a su tamaño máximo, la actividad mitótica de las células de la granulosa disminuye (Ross y Pawlina, 2007).

### *Regulación endocrina del desarrollo folicular*

La secreción de las gonadotropinas es regulada por la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH), secretada de forma intermitente (cada 90 a 120 minutos en

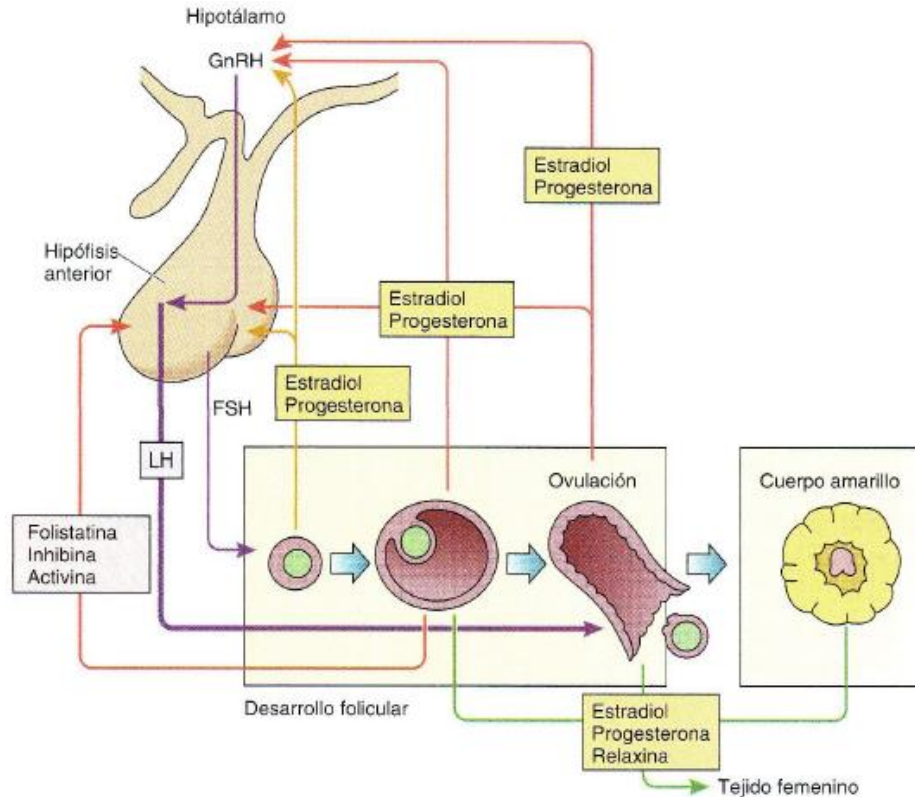
humanos), por neuronas localizadas en el núcleo arqueado y en el área preóptica del hipotálamo. La GnRH es vertida a la eminencia media, viaja por el sistema portahipotálamo-hipofisiario hasta llegar a la adenohipófisis (Figura 3), donde se une a sus receptores en las células gonadotropas y estimula la secreción de FSH y LH (Domínguez y col., 1991; Berne y Levy, 2006).

El desarrollo temprano del folículo primordial es independiente de las gonadotropinas. Es a partir del estadio primario en que el desarrollo folicular depende de la FSH (Domínguez y col., 1991; Van Voorhis, 1999). Las células de la granulosa de los folículos expresan receptores a FSH. El aumento de la concentración de FSH al comienzo de la fase folicular incrementa el número de células granulosas (actividad mitogénica) y la concentración de receptores a FSH. Esta gonadotropina induce en las células granulosas la actividad de la enzima aromatasa que estimula la transformación de andrógenos a estrógenos. Asimismo, el estradiol estimula en células de la granulosa, la formación de sus propios receptores así como los de la FSH, lo que estimula la división mitótica adicional. Además, por acción sinérgica de la FSH y el estradiol, en la granulosa de los folículos preovulatorios se estimula la formación de receptores a la LH (Sánchez-Criado, 1999). El ovocito en conjunto con las células de la granulosa sintetizan activina, hormona peptídica que estimula en los gonadotropos la secreción de FSH y en las células de la granulosa su división mitótica (Sánchez-Criado, 1999; Gartner y Hiatt, 2007; Carlson, 2009).

El aumento en la concentración de estradiol e inhibina disminuye la secreción de FSH (Figura 3), lo que impide la maduración de otros folículos, sin impedir la capacidad de respuestas del folículo dominante a la FSH (Sánchez-Criado, 1999). En la maduración folicular también participan factores locales tales como el inhibidor de la actividad de las aromatasas y el inhibidor de la maduración del ovocito (Sánchez-Criado, 1999).

Conforme aumentan las concentraciones sanguíneas de estrógenos, estos continúan estimulando la síntesis de LH por las células gonadotropas en la hipófisis, así como la disminución de la síntesis de FSH (Gartner y Hiatt, 2007).

Las células de la granulosa del folículo preovulatorio experimentan un cambio en la esteroidogénesis que provoca la biosíntesis adicional de progesterona, señal temprana de luteinización (Figura 3) (Sánchez-Criado, 1999).



**Figura 3.** Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario. La GnRH sintetizada en el hipotálamo viaja hasta la adenohipófisis donde estimula la secreción de la LH y FSH, que estimulan el desarrollo folicular, la secreción de hormonas esteroides y la ovulación (Tomado de Gartner y Hiatt 2007).

### Ovulación

En el torrente sanguíneo, el incremento de los estrógenos producidos principalmente por el folículo preovulatorio ejerce retroalimentación positiva en la adenohipófisis, lo que estimula el “pico preovulatorio” (aumento súbito) de LH y FSH, que activa los eventos que culminan con la ovulación:

- 1) El folículo preovulatorio secreta colagenasa, que digiere el colágeno del tejido conjuntivo. Los productos generados en la degradación de este colágeno producen una

reacción inflamatoria, que atrae a leucocitos que secretan prostaglandinas hacia el interior del folículo. Estas prostaglandinas causan la contracción de las células musculares de la teca externa, provocando la ruptura de la pared del folículo (Berne y Levy, 2006; Gal y Gal, 2007; Gartner y Hiatt, 2007).

2) Incrementa el flujo sanguíneo a los ovarios y los capilares dentro de la teca externa comienzan a filtrar plasma, lo que provoca edema. Asimismo se libera histamina, prostaglandinas y colagenasa en la proximidad del folículo preovulatorio. La concentración del activador del plasminógeno que cataliza la conversión del plasminógeno en plasmina aumenta en el folículo; la plasmina recién formada facilita la proteólisis de la membrana granulosa, lo que permite la ruptura del folículo (Berne y Levy, 2006; Gal y Gal. 2007; Gartner y Hiatt, 2007).

3) Con el “pico preovulatorio” de LH el ovocito primario del folículo preovulatorio reanuda la meiosis. Al completarse la primera división meiótica, se forman dos células hijas, el ovocito secundario y el primer cuerpo polar que tiene poco citoplasma y es desechado. El ovocito secundario inicia entonces la segunda meiosis hasta la metafase, donde se detiene nuevamente su maduración, que se reanudara únicamente si ocurre la fertilización del ovocito secundario. Al término de la segunda división meiótica, se forma el ovulo haploide (23 cromosomas) y un segundo cuerpo polar (Berne y Levy, 2006; Gartner y Hiatt, 2007).

Tras esta serie de eventos, el líquido antral se libera junto con el complejo cumulo ovóforo-corona radiada-ovocito. El ovocito es liberado hacia las trompas de Falopio donde será fecundado o expulsado al útero (Berne y Levy, 2006; Gal y Gal, 2007; Gartner y Hiatt, 2007).

### ***Cuerpo Lúteo***

Tras la ovulación, las células de la granulosa y de la teca interna del cuerpo hemorrágico recién formado experimentan el proceso de luteinización, durante el cual incrementa su diámetro debido al aumento de la vascularización y a la hipertrofia que experimentan,

además de que se llenan de inclusiones lipídicas. La luteinización de estas células es estimulada principalmente por la LH (Guyton y Hall, 2001).

El cuerpo lúteo que se forma presenta dos tipos celulares: 1) Las células granuloso-luteínicas que contienen todos los elementos de las células secretoras de esteroides: mitocondrias, retículo endoplasmático liso y gránulos de secreción; y 2) las células tecoluteínicas que contienen retículo endoplasmático rugoso y no presentan gránulos de secreción (Sánchez-Criado, 1999; Guyton y Hall, 2001; Berne y Levy, 2006).

El cuerpo lúteo proporciona el equilibrio necesario de hormonas esteroideas que hace óptimas las condiciones para la implantación de un óvulo fecundado y para el mantenimiento posterior del cigoto hasta que la placenta sea capaz de llevarlo a cabo. El cuerpo lúteo secreta principalmente progesterona. También produce estrógenos, prostaglandinas, relaxina y oxitocina (Sánchez-Criado, 1999; Guyton y Hall, 2001; Berne y Levy, 2006).

De no haber fecundación, el cuerpo lúteo comienza a involucionar y pierde su función secretora. Los estrógenos principalmente, y en menor grado la progesterona, secretados por el cuerpo lúteo ejercen un efecto de retroalimentación negativa sobre la adenohipófisis que mantiene baja la secreción de FSH y LH. Asimismo, las células luteínicas secretan pequeñas cantidades de inhibina, que inhibe la secreción de FSH, por lo que disminuye su concentración en sangre. La disminución de ambas gonadotropinas ocasiona que el cuerpo lúteo degenera completamente. Es entonces cuando se convierte en el llamado cuerpo blanco o cuerpo albicans (presente en las mujeres), que después es remplazado por tejido conjuntivo y reabsorbido (Guyton y Hall, 2001).

La regulación de la función del cuerpo lúteo varía según la especie, en la rata la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo es autónoma y no depende de los productos de secreción de la hipófisis, mientras que en los primates depende de la LH (Sánchez-Criado, 1999).

### ***Atresia folicular***

Es un proceso natural a través del cual degeneran los folículos en cualquiera de las etapas de desarrollo, y de aquellos que habiendo iniciado el proceso de crecimiento y diferenciación, no ovulan. Una gran cantidad de folículos experimentan la atresia durante el desarrollo fetal y puberal, y se presenta en cualquier etapa del desarrollo folicular. Este proceso es mediado por la apoptosis (o muerte celular programada) de las células de la granulosa (Domínguez y col., 1991; Ross y Pawlina, 2007).

Los cambios foliculares que se presentan durante la atresia son (Ross y Pawlina, 2007):

- Picnosis nuclear de las células de la granulosa, así como su descamación en el antro folicular.
- Invasión de la capa granulosa por neutrófilos y macrófagos.
- Hipertrofia de las células de la teca interna.
- Invasión de la cavidad del folículo por tejido conjuntivo.

El ovocito también experimenta degeneración y autólisis, pierde su capacidad para mantener el control metabólico del folículo, cuyos restos son fagocitados por macrófagos invasores, reduce su tamaño y degenera. La membrana pelúcida se pliega y colapsa mientras se desintegra en la cavidad del folículo (Domínguez y col., 1991; Sánchez-Criado, 1999; Gartner y Hiatt, 2007; Ross y Pawlina, 2007).

La mayoría de los folículos degeneran por atresia y las células tecales de los folículos atrésicos forman parte de la glándula intersticial, que secreta andrógenos. Las células de la glándula intersticial son inervadas por terminales nerviosas adrenérgicas (Domínguez y col., 1991; Sánchez-Criado, 1999; Gartner y Hiatt, 2007; Ross y Pawlina, 2007).

En los animales recién nacidos, se observa una oleada de atresia folicular, lo cual se explica por el descenso brusco de la concentración plasmática de las gonadotropinas que actúan como factores anti-atretogénicos (Domínguez y col., 1991; Ross y Pawlina, 2007).

### ***Esteroidogénesis***

El ovario sintetiza hormonas esteroides como los progestágenos (pregnenolona, 17-hidroxiprogesterona, progesterona), los andrógenos (androstenediona y testosterona) y los estrógenos (estrona y estradiol). Además sintetiza hormonas polipeptídicas como la activina, inhibina, relaxina y la folistatina (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Sánchez-Criado, 2003).

Las células que sintetizan hormonas esteroides en el ovario son las células de la teca interna, de la granulosa, del cuerpo lúteo y de la glándula intersticial (González y col., 2006).

Las hormonas esteroides derivan del colesterol que se obtiene a partir de tres fuentes principales (Sánchez-Criado, 1999):

- \* El colesterol que circula en la sangre en forma de lipoproteínas.
- \* El colesterol que se sintetiza *de novo* dentro del ovario a partir de AcetiCoA.
- \* El colesterol que se libera de los ésteres del colesterol almacenados en las gotas lipídicas.

La principal fuente del colesterol utilizado por el ovario se deriva de la captación del colesterol lipoprotéico, que proviene principalmente de las lipoproteínas de baja densidad (Sánchez-Criado, 1999). Las lipoproteínas se unen a receptores específicos de las células productoras de esteroides y son internalizadas a las células. En el interior se unen con lisosomas, cuyas proteasas y esterases desdoblan las lipoproteínas y liberan al colesterol no esterificado de la parte proteica (Lehninger y col., 1993; González y col., 2006).

El colesterol (C<sub>27</sub>) es transportado a la membrana mitocondrial interna por la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR, steroidogenic acute regulator). La teca interna expresa receptores para la LH. En las células tecales, la LH estimula la biosíntesis de andrógenos, para ello, en la mitocondria, el colesterol es transformado en pregnenolona (C<sub>21</sub>) (Figura 4) por el complejo enzimático P450<sub>scc</sub> (22-hidroxilasa; 20-hidroxilasa; 20,22-desmolasa) que pertenece al grupo oxidasa del citocromo P450 y que



utiliza NADPH y O<sub>2</sub> y que actúa como transportador electrónico en este sistema oxidasa de función mixta. Los procesos de transformación del colesterol a pregnenolona, comprenden la hidroxilación de los carbonos 20 y 22, y la ruptura de su cadena lateral (Lehninger y col., 1993; González y col., 2006).

La pregnenolona es un precursor común a todas las hormonas esteroideas del ovario (Figuras 4 y 5), a partir de la cual se sintetiza la progesterona (C<sub>21</sub>) (Figura 4) por acción de un complejo enzimático microsomal, la 3β-HSD (3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa) (González y col., 2006).

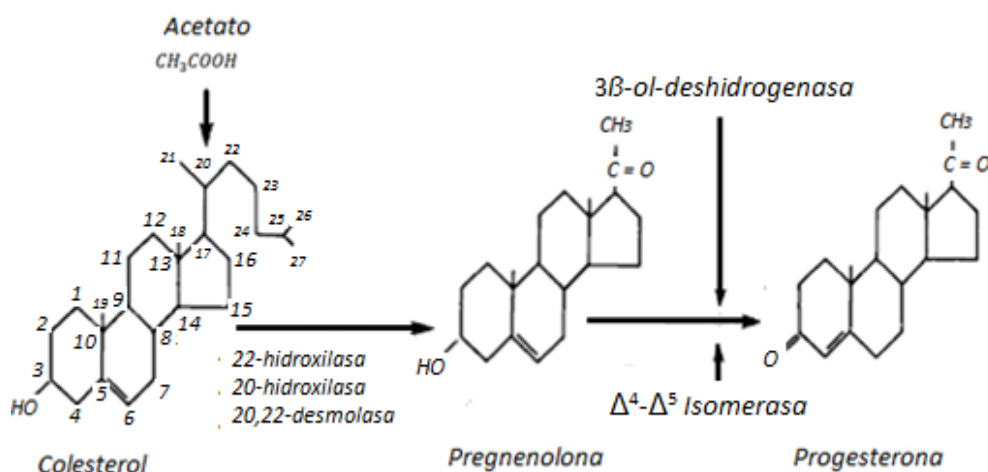


Figura 4. Biosíntesis de Progesterona (Tomado y modificado de González y col., 2006).

Una vez sintetizada la pregnenolona, sale de la mitocondria e ingresa al retículo endoplasmático liso de las células tecales, donde puede seguir dos vías alternas en la síntesis de andrógenos (Figura 5): **1) Vía Δ<sup>4</sup>**: la pregnenolona es transformada directamente en progesterona (C<sub>21</sub>) por acción de la enzima 3β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa (3β-HSD) (Figura 5). Posteriormente el complejo enzimático P450c17α (17α-hidroxilasa; c-17, 20 desmolasa) convierte la progesterona en androstenediona (C<sub>19</sub>), que es el precursor de la testosterona (C<sub>19</sub>) que se sintetiza en células de la teca (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Devlin, 2000; González y col., 2006).

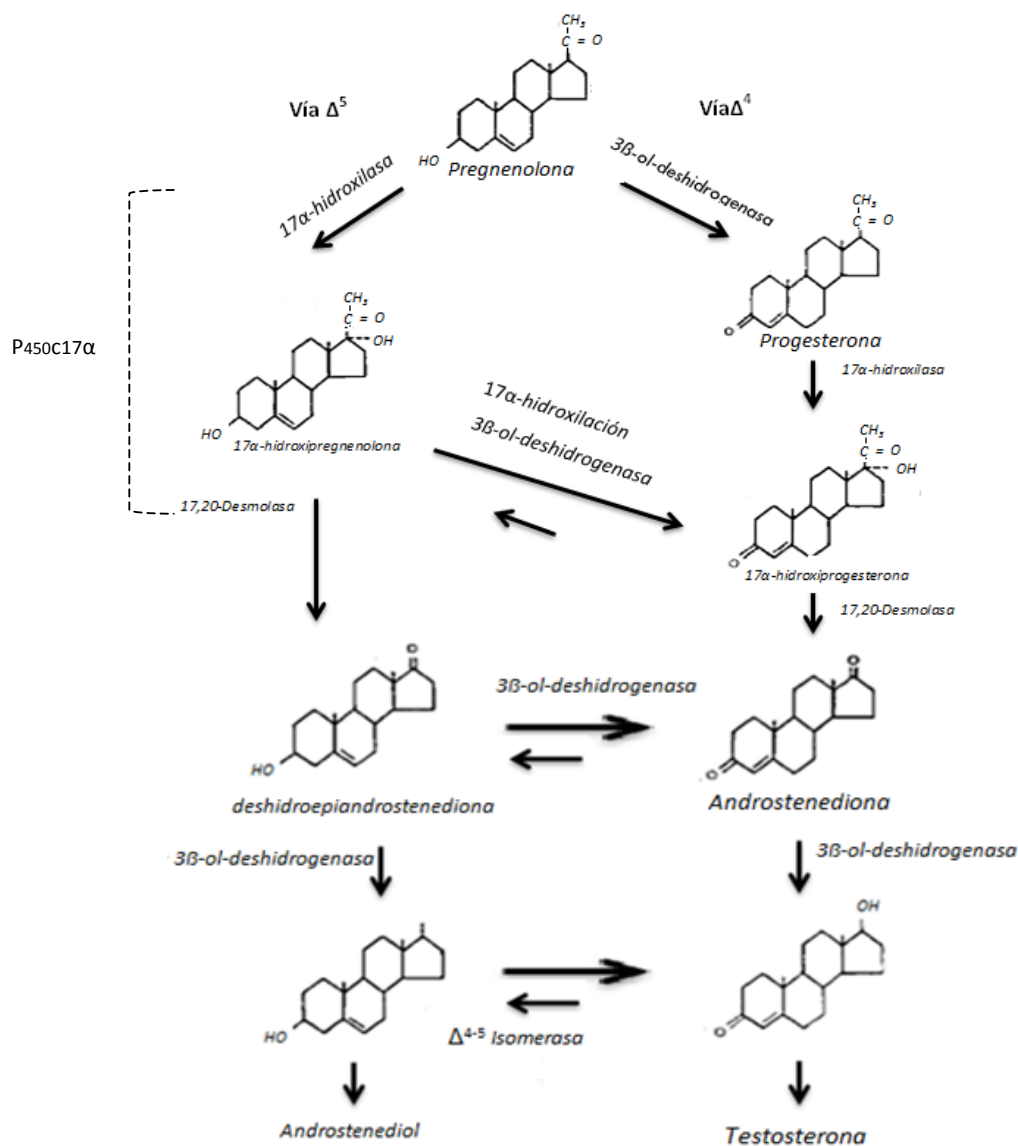


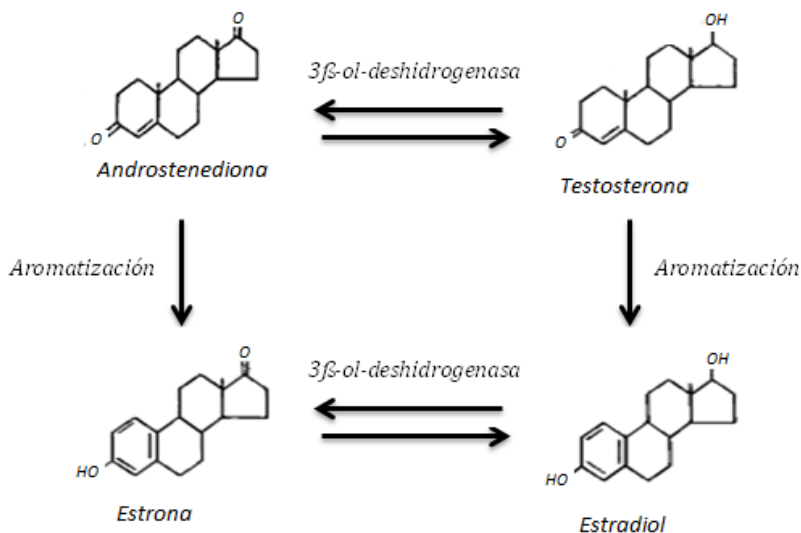
Figura 5. Biosíntesis de Andr6genos (Tomado y modificado de Gonz1lez y col., 2006).

2) Vía  $\Delta^5$ : es la principal v1a enzim1tica utilizada por las c3lulas de la teca. La pregnenolona mediante una serie de reacciones enzim1ticas es transformada en deshidroepiandrostenediona (DHEA), por acci3n de la P450c17 $\alpha$ . La DHEA producida es metabolizada a androstenediona, que es el principal andr6geno C<sub>19</sub> aromatizable producido por la teca. En las c3lulas tecales tambi3n se produce, aunque en menor cantidad, testosterona (Gore-Langton y Armstrong, 1999; Devlin, 2000; Gonz1lez y col., 2006).

La mayoría de los andrógenos sintetizados en el ovario son transformados en estrógenos en las células de la granulosa. Sin embargo, parte de ellos (androstenediona y DHEA) pasan en pequeña proporción a la circulación general y pueden ser transformados en testosterona y estrógenos, o bien, son excretados en la orina en forma de 17-cetosteroides (Gore-Langton y Armstrong, 1999; González y col., 2006).

Las células de la granulosa carecen de vascularización, razón por la cual utilizan como principal fuente de colesterol el que sintetizan a partir del acetato (Gore-Langton y Armstrong, 1994). Solo después de transformarse en células granuloso-luteínicas, cuando ya presentan irrigación sanguínea, pueden utilizar las lipoproteínas circulantes (González y col., 2006).

Los estrógenos (C<sub>18</sub>) son sintetizados a partir de los andrógenos. La androstenediona y la testosterona son aromatizados y dan lugar a la formación de estrona y estradiol, respectivamente (Figura 6). Para ello se lleva a cabo la hidroxilación del carbono 3, la aromatización en el anillo A y la pérdida del grupo metilo (CH<sub>3</sub>) del carbono 10. Estas transformaciones se llevan a cabo por el complejo enzimático denominado P450-aromatasa, localizado en las membranas del retículo endoplasmático liso de las células de la granulosa y del cuerpo lúteo. El estradiol se produce en el ovario en cantidades superiores a la estrona (González y col., 2006).



**Figura 6.** Síntesis de estrógenos (Tomado y modificado de González y col., 2006).

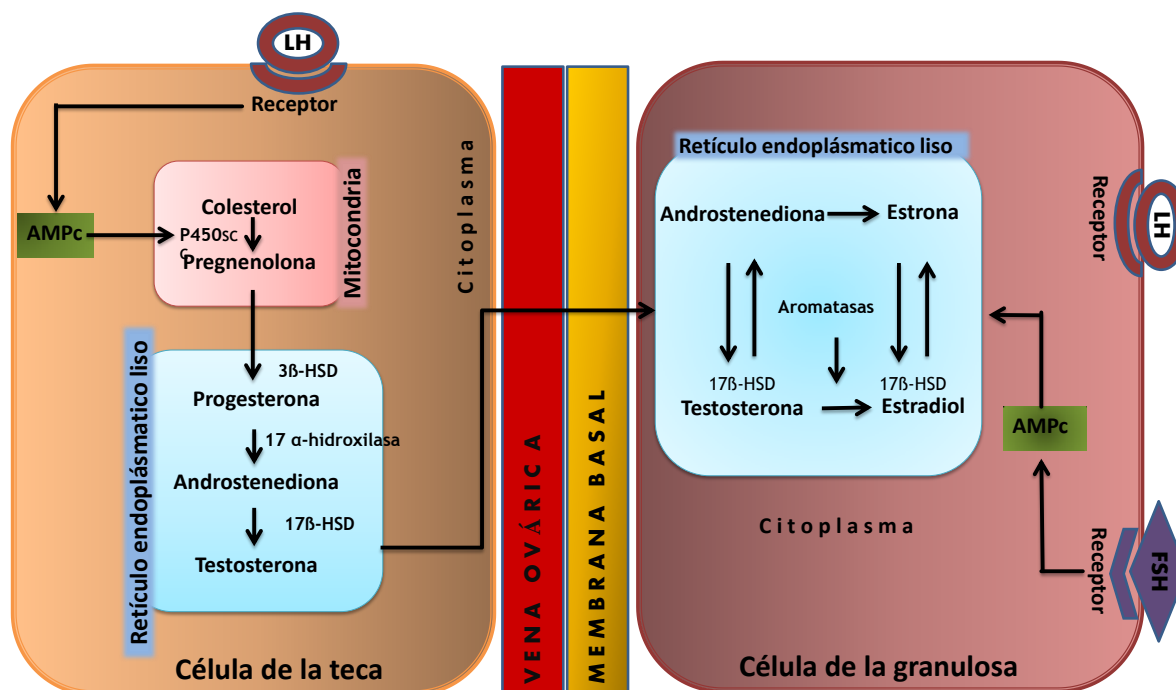
### ***Regulación Endocrina del proceso de esteroidogénesis***

Las hormonas hipofisarias, FSH y LH, estimulan la biosíntesis de las hormonas esteroideas del ovario. Dado que las células de la teca interna poseen receptores a la LH (Figura 7), la unión de esta gonadotropina a su receptor, incrementa la síntesis de 3', 5'- monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), segundo mensajero, que constituye el principal mediador intracelular de la LH, estimulando así la actividad enzimática y la consecuente biosíntesis de progesterona y andrógenos (González y col., 2006).

Aunque las células de la teca interna pueden sintetizar estrógenos a partir de los andrógenos, la actividad aromática necesaria para esta transformación es mayor en las células de la granulosa, por lo que se calcula que, en los folículos preovulatorios, el 99.9% de la actividad de las aromatasas está localizada en el estrato granuloso. Por ello, los andrógenos difunden en su mayoría a las células de la granulosa, donde son transformados en estrógenos. La LH estimula la actividad del complejo P450sc (Domínguez y col., 1991; González y col., 2006).

Las células de la granulosa poseen receptores a la FSH (Figura 7). Cuando la FSH se une a su receptor, actúa sobre el sistema de la adenilato ciclasa, que resulta en el aumento del AMPc y estimula una mayor actividad de las aromatasas, evento que se acompaña del incremento en la biosíntesis de estrógenos (Domínguez y col., 1991; González y col., 2006).

Las células de la granulosa de los folículos antrales y de los folículos preovulatorios producen progesterona, estimulados en principio, por la FSH. Posteriormente, la síntesis de progesterona aumenta cuando aparecen receptores a la LH y las células de la granulosa experimentan la transformación en células luteínicas, en donde la síntesis máxima de progesterona tiene lugar por estímulo de la LH (González y col., 2006).



**Figura 7.** Biosíntesis de las hormonas esteroideas y su regulación por las gonadotropinas. Hormona Luteinizante (LH), Hormona foliculoestimulante (FSH), monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) (Tomado y modificado de González y col., 2006).

### **Ciclo Estral de la Rata**

La reproducción en la hembra se caracteriza por la secuencia repetitiva de periodos de receptividad sexual y periodos de reposo. El ciclo estral se define como el intervalo de tiempo existente desde el comienzo de un período de celo hasta el comienzo del siguiente. Su duración es variable en cada especie. En el caso de la rata y ratón hembra tiene una duración de cuatro a cinco días. El establecimiento del ciclo estral requiere de la liberación periódica de hormonas que determinan los cambios en el aparato reproductor (Sánchez-Criado, 1999; Álvarez y col., 2009).

El ciclo estral se divide en 4 etapas:

**Estro:** Es el periodo de receptividad al macho, se caracteriza por el apareamiento, que ocurre en las primeras horas del estro. Tiene una duración aproximada de 20 horas. En la mañana se presenta la segunda elevación en la concentración de FSH. Es en este momento cuando se produce la ovulación. Una vez liberado el ovocito, el cuerpo hemorrágico comienza a estructurarse como cuerpo lúteo mientras que una nueva serie de folículos primarios comienza a desarrollarse. Tras las numerosas mitosis que experimenta la mucosa vaginal, aparecen células epiteliales escamosas y cornificadas (células sin núcleo y sin orgánulos citoplasmáticos) (Gilbert y Shyamal, 1994; Sánchez-Criado, 1999; Álvarez y col., 2009).

**Diestro 1 o Metaestro:** La hembra ya no permite la monta y la cópula. Tiene una duración aproximada de 10 h. En el ovario se forma el cuerpo lúteo, responsable de la secreción de altas concentraciones de progesterona que caracterizan esta etapa, y de la secreción de estradiol que inhibe la secreción de gonadotropinas. La mucosa vaginal es delgada. En el frotis vaginal además de observarse leucocitos, también se pueden apreciar algunas células cornificadas (Sánchez-Criado, 1999; Álvarez y col., 2009).

**Diestro 2:** Comprende un periodo de inactividad sexual. Representa generalmente la fase más larga del ciclo. Al no haber ocurrido la fecundación, durante esta fase se produce la regresión del cuerpo lúteo, por lo que disminuye la concentración de progesterona

circulante. La secreción de estradiol por los folículos en crecimiento sigue aumentando y disminuye la secreción basal de gonadotropinas que, a su vez, mantienen el crecimiento folicular. El útero se hace pequeño y poco contráctil. La mucosa vaginal es muy delgada y los leucocitos que emigran a través de ella constituyen la mayoría de las células vaginales aunque también se observan algunas células epiteliales nucleadas (Sánchez-Criado, 1999; Álvarez y col., 2009).

En caso de haberse producido la fecundación, el ciclo estral se interrumpe y la etapa del diestro continua durante el periodo de gestación, cuya duración en la rata es de aproximadamente 21 días (Sánchez-Criado, 1999; Álvarez y col., 2009).

**Proestro:** Comprende un periodo de preparación para la cópula. Su duración es de aproximadamente 16 h. Bajo el estímulo de la FSH, un conjunto de folículos ováricos (aproximadamente 12) han alcanzado el estadio de maduración, con lo que aumenta la secreción de estrógenos, que ejercen un efecto estimulante (retroalimentación positiva) sobre la secreción de gonadotropinas, ocasionando que la hipófisis secrete LH y estimule al día siguiente la ovulación. Conforme los folículos van creciendo, secretan hormonas esteroideas que van preparando al aparato reproductor para la etapa del estro (Sánchez-Criado, 1999; Álvarez y col., 2009). En las últimas horas de la tarde del proestro es cuando se presenta la elevación brusca de FSH y LH que van a facilitar la ovulación.

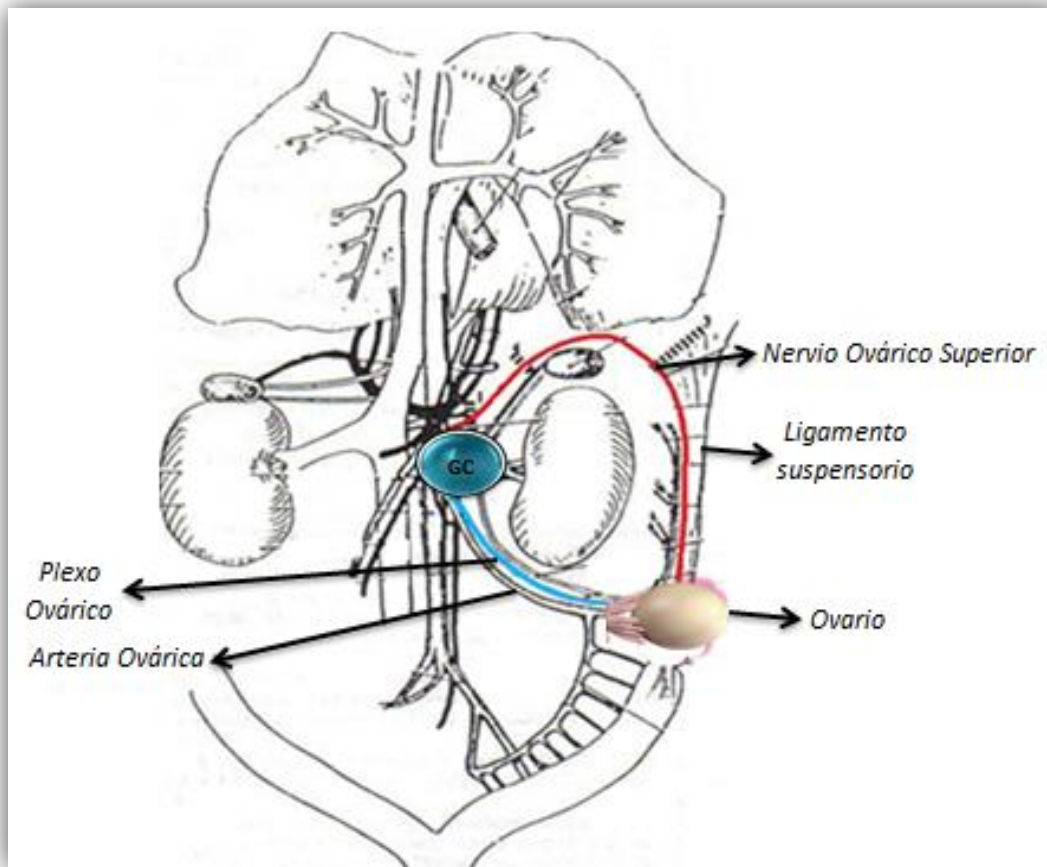
El útero por acción del estradiol, se hace contráctil y se va engrosando progresivamente. La mucosa vaginal presenta numerosas mitosis y pueden apreciarse células epiteliales nucleadas en el frotis (Sánchez-Criado, 1999; Álvarez y col., 2009).

## **Inervación ovárica**

El ovario posee inervación de origen extrínseco e intrínseco. La inervación extrínseca está constituida por fibras de naturaleza simpática, parasimpática y sensorial, que ingresan al ovario a través del hilio mediante tres paquetes nerviosos:

- ❧ **Nervio Ovárico Superior.** Constituido por fibras simpáticas que se originan en el ganglio celiaco (Figura 8) (Baljet y Drukker, 1980). Se encuentra asociado al ligamento suspensorio. Aporta a los ovarios neurotransmisores como la noradrenalina (NA), el neuropéptido Y (NPY) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP). Sus fibras inervan vasos sanguíneos, células de la glándula intersticial y células de la teca interna (Lawrence y Burden, 1980).
- ❧ **Nervio del Plexo Ovárico.** Sus fibras de tipo sensorial y simpático se originan en el ganglio celiaco y se encuentra acompañado por la arteria ovárica (Figura 8). Contiene en su mayoría fibras de tipo sensorial que liberan sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen que codifica para la síntesis de calcitonina (CGRP). Sus fibras simpáticas transportan al ovario NA y NPY. Inerva principalmente los vasos sanguíneos del ovario (Lawrence y Burden, 1980).
- ❧ **Nervio Vago.** Es un nervio mixto que contiene fibras parasimpáticas, sensoriales y motoras, que liberan al ovario acetilcolina, SP, VIP y somatostatina (Lawrence y Burden, 1980). Los somas de las neuronas que lo constituyen se localizan en cuatro núcleos del bulbo raquídeo: el núcleo del tracto solitario, el núcleo ambiguo, el núcleo dorsal del vago y el núcleo trigémino (Upledger y Vredevoogd, 2004).





**Figura 8.** Esquema que representa el origen y trayectoria del Nervio ovárico superior, del Nervio Plexo ovárico. GC, Ganglio celiaco, (Tomado y modificado de Lawrence y Burden, 1980).

En el ovario de mamíferos, como la rata, el mono y el humano se ha descrito la presencia de neuronas ováricas intrínsecas de naturaleza catecolaminérgica, en las que se ha identificado la tirosina hidroxilasa, enzima limitante de las catecolaminas (Dees y col., 1995); además de que se han descrito algunas neuronas que sintetizan NPY (D'Albora y col., 2000). En ovarios fetales de primates y de humanos también se han localizado las neuronas catecolaminérgicas, que expresan el receptor a neurotrofinas como el p75, principalmente en la médula y en menor proporción en el tejido conectivo que circunda la vasculatura ovárica (Anesetti y col., 2009).

### **Evidencias de la participación de la inervación simpática en las funciones del ovario**

La inervación ovárica se encuentra presente desde antes de iniciar la foliculogénesis, se mantiene y se desarrolla rápidamente hasta que los folículos llegan a su etapa de maduración, lo que sugiere que la inervación ejerce un efecto estimulante sobre el crecimiento folicular (Shultea y col., 1992).

En el ovario los neurotransmisores participan en la regulación de la secreción de las hormonas esteroides. La NA al unirse a sus receptores presentes en las células de la teca folicular, estimula la síntesis de progesterona y de andrógenos. El VIP en el ovario estimula la síntesis de progesterona, de andrógenos y de estradiol. Al NPY, junto con la SP y el CGRP se les ha relacionado con el control del flujo sanguíneo ovárico (Dissen y Ojeda, 1999). Cuando se produce la ruptura del folículo y se da la liberación del ovocito, la inervación continua en las células tecales que se convierten en células intersticiales secundarias a las cuales se les ha conferido la capacidad de sintetizar andrógenos (Hernandez y col., 1988).

Las herramientas utilizadas en el estudio de la participación de la inervación ovárica en la regulación de las funciones ováricas, son mediante la destrucción de las fibras simpáticas por agentes químicos o por la eliminación quirúrgicas de las fibras. En la rata adulta, la sección bilateral del NOS disminuye el número de ovocitos liberados en el ovario derecho (Chávez y col., 1991). Esta misma cirugía practicada en la rata prepúber no modifica la respuesta ovulatoria, mientras que con la sección unilateral del NOS, el ovario inervado libera menor número de ovocitos (Morales y col., 1993).

En ratas recién nacidas disminuye el número de folículos a los 20 y 90 días de edad cuando se realiza la sección unilateral o bilateral del NOS (Zhang y col., 2010), en ratas prepúberes reduce la concentración de NA en el ovario denervado (Chávez y Domínguez, 1994).

La destrucción de las fibras simpáticas por la administración de guanetidina (GTD) resulta en el retraso del inicio de la pubertad, la disminución del número de folículos preantrales

y no se modifica la síntesis de hormonas esteroides de los ovarios cultivados en condiciones basales (Lara y col., 1990).

Mediante el uso de un sistema ganglio celiaco-NOS-ovario, que simula *in vitro* las condiciones *ex vivo* de la inervación simpática el ovario, se mostró que la estimulación del ganglio por NA provoca aumento en Diestro 1 y disminución en Diestro 2 de la concentración de P4 (Sosa y col., 2000), ante la estimulación adrenérgica se observa también incremento de androstenediona y estradiol (Delgado y col., 2010). Si la estimulación se realiza con acetilcolina, la respuesta depende del día del ciclo estral (Sosa y col., 2004), cuando el sistema es ganglio celiaco-PO-ovario y la estimulación es mediante un agonista colinérgico incrementa la concentración de androstenediona (a los 30 minutos de la estimulación), mientras que disminuye la actividad de la enzima 20 $\alpha$ -HSD, aumenta la concentración de progesterona ovárica, dada por la mayor actividad enzimática de 3 $\beta$ -HSD en Diestro 1 y Diestro 2 (Vega y col., 2010). De igual manera, la estimulación del ganglio con estradiol resulta en el incremento de la concentración de P4 y androstenediona (Vega y col., 2012).

### **Péptido Intestinal Vasoactivo**

El VIP es un neurotransmisor de 28 aminoácidos, aislado por primera vez del duodeno porcino, de ahí su nombre de péptido intestinal vasoactivo (Said y Mutt, 1970). Ejerce diversos efectos biológicos como la relajación del músculo liso y la vasodilatación, y en el hipotálamo actúa como un factor de liberación de la prolactina por la adenohipófisis (Said, 1982; Abe y col., 1985).

El ovario recibe VIP por dos vías: 1) La extrínseca, donde el mayor aporte de fibras VIPérgicas lo constituyen el NOS y una menor proporción son aportadas por el nervio vago (Dees y col., 1986). Las fibras VIPérgicas inervan el compartimento intersticial, el folicular (células de la teca interna y externa) (Hulshof y col., 1994), y la vasculatura ovárica (Ahmed y col., 1986; Johnson y col., 1994); 2) La intrínseca, donde puede ser

secretado por las células de la granulosa del folículo preovulatorio, ya que se encuentra presente el ARNm que codifica para la síntesis del péptido (Hulshof y col., 1994).

Los efectos del VIP son mediados por dos tipos de receptores, el VPAC-1 y el VPAC-2, ambos acoplados a la proteína G (Lutz y col., 1993). En el folículo estos receptores se encuentran expresados en células de la teca (VPAC-1) y en células de la granulosa (VPAC-1 y VPAC-2) (Vaccari y col., 2006). *In vitro* se ha descrito que la unión del VIP a sus receptores en el ovario resulta en la activación del adenilato ciclasa y la estimulación de la síntesis del AMPc (segundo mensajero que envía la señal intracelularmente), a través de la desfosforilación del trifosfato de adenosina (ATP) (Vaccari y col., 2006).

El VIP participa en la diferenciación de los folículos primordiales. Por estudios *in vitro*, se ha mostrado que en el ovario de rata de dos días de edad, la adición de VIP al medio favorece la expresión de los receptores a FSH, lo que resulta en el crecimiento de los folículos (Mayerhofer y col., 1997).

El VIP estimula la síntesis del Kit Ligando (KL), ligando del receptor a tirosina kinasa, que actúa como factor de supervivencia, proliferación y diferenciación celular de los folículos primordiales. De manera que el cultivo de ovarios de rata de cuatro días de edad con VIP estimula la síntesis del ARNm que codifica al KL (Chen y col., 2012).

Cuando se cultivan folículos antrales de rata en presencia del péptido, aumenta la concentración de AMPc, que actúa como segundo mensajero en la síntesis de IGF (Factor de crecimiento insulínico), este factor se encuentra involucrado en la prevención del proceso apoptótico, por lo que se dice que el VIP inhibe la apoptosis, por lo que se sugiere que regula la supervivencia de los folículos (Flaws y col., 1995).

En la pared de vasos sanguíneos existen fibras VIPérgicas y receptores al péptido (Vaccari y col., 2006). La unión del VIP a su receptor, ejerce un efecto vasodilatador, con lo que disminuye la presión arterial (Said 1980; Ahmed y col., 1986).

El hecho de que se haya detectado VIP en células de la granulosa de folículos preovulatorios (Hulshof y col., 1994), ha permitido sugerir que el péptido participa en el

proceso ovulatorio. Aunado a esto se ha reportado que el VIP participa en la maduración del ovocito induciendo la meiosis (Törnell y col., 1988), e *in vitro* es capaz de inducir la ovulación (Schmidt y col., 1990), esto a través del incremento en la actividad del activador del plasminógeno, en el complejo cúmulo-ovocito y en las células de la granulosa, el cual convierte al plasminógeno en plasmina, ésta última participa en la degradación de la membrana, provocando así la ruptura del folículo para liberar al ovocito (Liu y col., 1987).

En el cultivo del ovario o de células de la granulosa en presencia de VIP incrementa la secreción de P4, T, y E2 (Davoren y Hsueh, 1985) su efecto se debe a:

- ❧ En células de la granulosa induce la expresión y actividad de la StAR, proteína que transporta el colesterol del citoplasma a la mitocondria (Kowalewski y col., 2010).
- ❧ Aumenta la actividad del citocromo P450<sub>SCC</sub>, complejo enzimático que participa en la conversión de colesterol a pregnenolona (Trzeciak y col., 1986; Johnson y col., 1994).
- ❧ Induce la actividad del complejo enzimático 3 $\beta$ -HSD y disminuye la actividad de la 20 $\alpha$ -HSD, enzimas limitantes en la síntesis de andrógenos (Davoren y Hsueh, 1985).
- ❧ Aumenta la actividad de la enzima 17 $\alpha$ -hidroxilasa que participa en la conversión de progesterona a androstenediona (Johnson y col., 1994).
- ❧ Induce la actividad de las aromatasas (George y Ojeda, 1987), enzimas que participan en la conversión de testosterona a estradiol (Ahmed y col., 1986).

El efecto de la administración de VIP en ratas cíclicas puede ser estimulante o inhibitoria en la secreción de hormonas esteroides. El VIP modula de manera asimétrica la secreción de estradiol, y depende del día del ciclo estral, mientras que la de testosterona es inhibitoria en el día del estro. Al parecer la secreción de progesterona no es modulada por la información VIPérgica. Resultados que permiten sugerir que la respuesta del ovario

ante el péptido depende de la influencia endocrina o neural que regula las funciones ováricas (Rosas, 2011).

Uno de los antagonistas a VIP es el VIP híbrido, cuya molécula es [Lis<sup>1</sup>, Pro<sup>2,5</sup>, Arg<sup>3,4</sup>, Tyr<sup>6</sup>]-VIP la cual se caracteriza por ser un híbrido del VIP y de la neurotensina, de ahí su nombre (Gozes y col., 1991). Este antagonista se une a los dos tipos de receptores a VIP e impide que el VIP pueda ejercer sus efectos a nivel celular (Gozes y col., 1989). Se ha observado que los efectos del VIP son mediados por el AMPc y el uso del VIP híbrido provoca una disminución del AMPc en cultivos gliares corticales (Gozes y col., 1991). Al administrar desde el nacimiento de manera crónica el VIP híbrido, se inhibe el desarrollo de las neuronas del área cortical, implicada en la conducta sexual (Hill y col., 1991). El uso de antagonistas de los receptores a VIP ha permitido evaluar sus efectos en diferentes líneas celulares, además incrementa el daño neuronal (Hill y col., 1994).

La participación del componente endocrino en la condición de Ovario Poliquístico ha sido ampliamente estudiada (Yen, 1999), en recientes estudios y en nuestro laboratorio se ha dado énfasis al estudio del componente nervioso en esta patología.

### **SOPQ en la mujer**

El síndrome del ovario poliquístico (SOPQ) es la endocrinopatología más común de las mujeres en edad reproductiva, con una incidencia del 6 al 10% (Goodarzi y col., 2011). Las pacientes con esta patología presentan alteraciones en la esteroidogénesis ovárica y en el modelo de secreción de las gonadotropinas, esto se puede acompañar por cambios metabólicos como son el incremento en la secreción de insulina y del IGF-I (Factor de crecimiento insulínico tipo 1) (Morán, 2006). Si bien desde hace años se detectó el síndrome, hasta la fecha se desconoce cuál es el factor primario que causa la patología (Yen, 2001). Alrededor del 50% de estas pacientes son obesas. En las mujeres con SOPQ existe un mayor riesgo de desarrollar a largo plazo enfermedades como la diabetes mellitus tipo II, hipertensión y carcinoma endometrial y ovárico (Goodarzi y col., 2011). El cuadro mantiene el calificativo de síndrome porque no es posible definirlo mediante un único criterio (Arenas y col., 2009).

El SOPQ fue descrito por primera vez en 1935 por Stein y Leventhal como una condición de ovarios poliquísticos asociados con oligomenorrea, obesidad e hirsutismo (Goodarzi y col., 2011). El criterio para el diagnóstico del SOPQ se ha ido modificando con el paso del tiempo.

En el año 2003, en la ciudad de Rotterdam se estableció al hiperandrogenismo acompañado con la anovulación o los ovarios poliquísticos como los aspectos básicos para el diagnóstico del Síndrome (Morán, 2006). El **hiperandrogenismo** es la principal característica del SOPQ, cuyas manifestaciones clínicas son derivadas del exceso o la hipersensibilidad a los andrógenos. Dentro de estas manifestaciones se incluyen el hirsutismo (crecimiento de vello grueso en zonas del cuerpo donde su control depende de los andrógenos y en las que normalmente sólo se presenta en los varones), el acné y la alopecia androgénica (perdida de pelo en un patrón masculino). Bioquímicamente, el hiperandrogenismo se manifiesta por elevadas concentraciones de andrógenos en suero, particularmente de testosterona, androstenediona y dehidroepiandrosterona (Franks, 2005; Moran, 2006; Merino y col., 2009; Goodarzi y col., 2011).

La **anovulación crónica** también se presenta en mujeres con la patología; se manifiesta con ciclos menstruales irregulares como oligomenorrea (presencia de menstruaciones esporádicas) o amenorrea (ausencia de la menstruación). La falta de ovulación es una consecuencia de la secreción anormal de estrógenos. Estas alteraciones se suelen presentar desde la menarquia (Franks, 2005; Merino y col., 2009).

Los **ovarios poliquísticos** son otra característica del síndrome, la morfología de estos ovarios se caracteriza por aumento en su tamaño y por la presencia de una cápsula regular pero engrosada y desprovista de vascularización, los quistes se caracterizan por presentar pocas capas de células de la granulosa, hiperplasia de las células tecales-estromales y un área estromal extendida. Los ovarios pueden presentar más de doce quistes en la periferia de uno o de ambos ovarios (Morán, 2006). En ocasiones se produce ovulación y se puede presentar un cuerpo lúteo o un cuerpo blanco (Yen, 2001).

Las mujeres con SOPQ también pueden desarrollar alteraciones metabólicas: alrededor del 50% de las mujeres con la patología son obesas, aumenta el riesgo de cáncer de endometrio, enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus (Yen, 2001).

### ***Etiología***

En la actualidad se desconoce la etiología del SOPQ, sin embargo con el uso de modelos experimentales se han propuesto algunas hipótesis (Matalliotakis, 2006):

#### ❧ Hipótesis de LH

Algunos autores sugieren que existe una alteración en el sistema nervioso central, en donde el aumento en los pulsos de GnRH podría iniciar el trastorno; que se refleja en el aumento y amplitud de los pulsos de secreción de LH, teniendo como resultado hiperandrogenismo y anovulación (Matalliotakis y col., 2006). Cuando se presenta de manera crónica el hiperandrogenismo ovárico, se genera aromatización excesiva de los andrógenos, lo que da como resultado el incremento en los estrógenos circulantes, que a su vez actúan sobre la hipófisis mandando una señal de retroalimentación negativa lo que produce aumento en la liberación de LH, e inversamente, ocasionan la disminución en la síntesis de FSH, quizá por aumento en la concentración de inhibina ovárica, dando como resultado el incremento en la relación de LH/FSH, en una proporción mayor a dos (Yen, 2001; Franks, 2005; Matalliotakis y col., 2006; Arenas y col., 2009).



❧ Hipótesis de la insulina

El principal defecto es la acción de la insulina, que ocasiona hiperinsulinemia, el resultado es un exceso en la secreción de andrógenos y anovulación (Matalliotakis y col., 2006).

En mujeres con la patología, cuando las concentraciones de insulina en suero son altas, la testosterona circulante aumenta (Matalliotakis y col., 2006). El efecto trófico de la LH, regulador indispensable en la esteroidogénesis por las células tecaes, es incrementado por la insulina y el IGF-I (que actúa como gonadotropina) y ello induce la sobre expresión del complejo enzimático P450c17, enzima limitante en la biosíntesis de andrógenos, lo que provoca el aumento de esta hormona (Yen, 2001; Matalliotakis y col., 2006).

❧ Hipótesis del ovario

Plantea que el defecto primario es la síntesis o el metabolismo de los esteroides, que origina el exceso en la secreción ovárica de andrógenos y como resultado la anovulación.

Ante el estímulo de la LH, en las células de la teca aumenta la actividad de la enzima 17 $\alpha$ -hidroxilasa (enzima involucrada en la síntesis de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona a partir de la progesterona), de ahí que el defecto se origina en células de la teca. La alteración de esta enzima resulta en el hiperandrogenismo ovárico (Matalliotakis y col., 2006).

La secreción de estrógenos, se caracteriza por el aumento en la concentración de estrona en suero, que es mayor a la concentración que caracteriza la fase temprana del ciclo menstrual normal, y en contraste con la concentración de estradiol que es similar a la observada en la fase folicular temprana. Esto es el resultado de la aromatización periférica de androstenediona y testosterona a estrona y estradiol, respectivamente; siendo mayor la conversión a estrona al ser la androstenediona el andrógeno ovárico predominante en las mujeres con el SOPQ (Matalliotakis y col., 2006; Arenas y col., 2009).

### **Secuelas y Tratamientos**

Una de las principales secuelas del SOPQ es la anovulación, que puede llevar a la infertilidad. En la clínica, para inducir la ovulación comúnmente se utilizan agentes antiestrogénicos como el citrato de clomifeno. Cuando la paciente no responde a este tratamiento se le administra directamente FSH o bien se recurre a la resección en cuña de los ovarios a nivel del hilio (Yen, 2001; Morán, 2006).

Para tratar el hiperandrogenismo ovárico frecuentemente se utilizan los anticonceptivos orales. En las pacientes que presentan aumento en la concentración de andrógenos y disminución en la globulina transportadora de hormonas esteroides (SHBG) se puede presentar un alto índice de obesidad, lo cual conlleva a incrementar la probabilidad de desarrollar enfermedades cardiovasculares. En estas situaciones se recomienda llevar una dieta y realizar ejercicio para disminuir la masa corporal y normalizar la concentración de andrógenos (Yen, 2001).

### **SOPQ en la Rata**

Los estudios en torno al SOPQ se han basado en observaciones clínicas y experimentales. La inducción del SOPQ se ha realizado mediante el uso de diferentes fármacos (Singh, 2005), entre los cuales se encuentra el valerato de estradiol (VE), un estrógeno de larga actividad con una vida media de 15 días (Krishna, 2005). La administración de estrógenos en ratas hembras durante su vida postnatal, produce estro persistente y anovulación durante la etapa adulta. Las características que definen al SOPQ se observan a partir de los dos meses de haber realizado la administración de VE (Krishna, 2005).

Brawer y colaboradores en 1986 observaron que después de 16 a 20 días de haber administrado el VE, los animales presentan ciclos estrales caracterizados por estro persistente y anovulación, lo cual indica la ausencia del pico preovulatorio de la LH, además se presenta una progresiva disminución de folículos primarios y secundarios, y la atresia aumenta en folículos secundarios. Después de las 8 a 9 semanas de la

administración se observan los quistes ováricos, y existe disminución significativa de la LH y FSH (Brawer y col., 1986).

### **Participación de la inervación en el desarrollo del Síndrome del Ovario Poliquístico**

Las células teco-intersticiales en cultivo tiene la capacidad de secretar andrógenos en respuesta a la LH, la cual se ve amplificada por la NA (Dyer y Erickson, 1985). De igual manera, se ha mostrado que en el modelo *ex vivo*, cuando se aísla el ganglio celíaco-NOS-ovario en el primer estro, diestro o estro de la rata, la estimulación del ganglio con NA resulta en el incremento de la secreción de androstenediona por parte del ovario (Delgado y col., 2010). Este mismo efecto se observa en la rata adulta en el día del diestro 2 (Bronzi y col., 2011), evidencias que sugieren que la NA estimula la secreción de andrógenos ováricos. Cuando se pierde la homeostasis en la concentración de la NA ovárica pueden originarse patologías como el SOPQ (Lara y col., 1993).

El hiperandrogenismo que caracteriza a la hembra con SOPQ podría ser el resultado del incremento de la concentración de NA ovárica, en respuesta a la mayor actividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario (Barria y col., 1993; Lara y col., 1993).

La inyección i.m de VE induce en el ovario aumento en la síntesis del factor de crecimiento neural (NGF), y de su receptor de baja afinidad el p75. La unión del ligando a su receptor origina una cascada de señalización en ganglio celiaco, que se traduce en el aumento de la tirosina hidroxilasa (enzima limitante en la síntesis de catecolaminas), lo que favorece una mayor síntesis de NA en el ganglio, ésta es transportada por el NOS hacia el ovario (Lara y col., 2000). En la rata con SOPQ, la sobre estimulación del sistema simpático del ovario por la activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos con isoproterenol (agonista adrenérgico), incrementa la síntesis de hormonas esteroides (Barria y col., 1993).

Se acepta que el SOPQ puede originarse en respuesta al aumento en la actividad del NGF y de su receptor. En apoyo a esta idea se ha mostrado que la administración del anticuerpo a la neurotrofina (NGF-AB) resulta en el incremento del número de folículos antrales y la disminución de folículos quísticos (Lara y col., 2000), estas son evidencias que apoyan la

participación de la inervación extrínseca del ovario en el desarrollo y mantenimiento de la patología. De igual manera, en el animal con SOPQ la disminución del tono simpático del ovario por la sección bilateral del NOS, restablece las funciones ováricas (Barria y col., 1993).

Para saber si el SOPQ se debe a la hiperactividad simpática que se presenta en la patología, se realizó la sección unilateral del NOS, esperando que el ovario denervado fuese en el que se restablecieran sus funciones. Lo que se observó fue lo contrario, en el ovario inervado se restableció la ovulación mientras que el denervado mantuvo su condición quística, estos resultados sugieren que además del aumento de NA ovárica, otros neurotransmisores que llegan al ovario por el NOS podrían estar participando en el desarrollo del SOPQ (Morales-Ledesma y col., 2010).

Además del aumento ovárico de la NA asociado con el desarrollo del SOPQ, se ha reportado que el VIP podría ser un factor importante en la patología. Se ha sugerido que el VIP podría estar estimulando la actividad esteroidogénica del animal con el síndrome, ya que cuando se realiza el cultivo de ovarios, provenientes de animales tratados con VE, en presencia de VIP incrementa la secreción de andrógenos y estrógenos (Parra y col., 2007).

Por otra parte en animales con SOPQ, cuando el ovario denervado es estimulado con VIP se observa una respuesta asimétrica al estímulo, ya que la microinyección del péptido en la bursa del ovario izquierdo incrementa la concentración de testosterona, efecto que no se produce en el ovario derecho. Resultados que llevaron a sugerir que en los ovarios existe una expresión diferente de los receptores a VIP o bien, que la información neural que transcurre por el NOS izquierdo es diferente a la del derecho (Rosas, 2011).

## Planteamiento del problema

El SOPQ es la principal causa de infertilidad en la mujer. Se caracteriza por hiperandrogenismo, anovulación y presencia de quistes foliculares. En la actualidad se desconoce cuál es el factor primario que provoca el desarrollo de esta patología. La etiología del SOPQ ha sido atribuida a la hiperactividad de las fibras simpáticas que conforman el NOS.

El VIP es un neurotransmisor que ingresa al ovario por el NOS, se ha descrito que este péptido modula de manera estimulante la esteroidogénesis ovárica. El papel del VIP se ve amplificado en el animal con SOPQ, ya que sí se cultiva el ovario en presencia de VIP, la concentración de estradiol y testosterona incrementa. Si el VIP es administrado en la bursa del ovario izquierdo incrementa la concentración de testosterona, siempre y cuando el ovario se encuentre privado de la información que transcurre por el NOS. Estas evidencias permiten sugerir que el VIP puede ser otro factor involucrado en el origen del síndrome.

Dado que por el NOS llega al ovario NA y VIP, se decidió analizar el papel del péptido en la capacidad esteroidogénica y de síntesis de monoaminas en el ovario. Para ello, primeramente se analizó en la rata adulta cíclica, el efecto del bloqueo de los receptores a VIP sobre la respuesta esteroidogénica y la concentración de monoaminas ováricas. Posteriormente, se realizó la misma evaluación en el modelo del animal con SOPQ. En ambos modelos animales se administró a los 68 días de edad, en el día del estro, el bloqueador de los receptores a VIP en la bursa del ovario izquierdo o derecho y se sacrificaron a los 30 minutos.

## Hipótesis

Si el VIP estimula la actividad esteroideogénica del ovario, entonces el bloqueo de los receptores al péptido resultará en una menor secreción de hormonas esteroides ováricas. Dado que en el animal con SOPQ aumenta la concentración ovárica de VIP, que se traduce en una mayor secreción de andrógenos y estrógenos, entonces el bloqueo de los receptores VIPérgicos en el ovario del animal con síndrome, disminuirá la respuesta esteroideogénica en función del ovario en estudio.

## Objetivo General

Analizar los efectos del bloqueo agudo de los receptores VIPérgicos del ovario en el animal cíclico y en el modelo del animal con síndrome del ovario poliquístico.

## Objetivos Particulares

- ❧ Analizar en el modelo del animal con ovario poliquístico inducido por la inyección de VE, el inicio de la pubertad, el patrón del ciclo estral, la respuesta ovulatoria espontánea, la concentración de hormonas esteroides en suero y de monoaminas en ovario.
- ❧ Evaluar en ratas hembras adultas cíclicas y en ratas con SOPQ el efecto inmediato del bloqueo de los receptores VIPérgicos en la etapa del estro, sobre la concentración de progesterona, testosterona y estradiol en suero.
- ❧ Evaluar en ratas hembras adultas cíclicas y en ratas con SOPQ, el efecto agudo (30 minutos) del bloqueo de los receptores VIPérgicos en la etapa del estro, sobre la concentración de monoaminas ováricas.

## **Materiales y Métodos**

Se utilizaron ratas hembra neonatas de la cepa CII-ZV que al momento del nacimiento, considerado como día cero, fueron agrupadas en camadas de cinco hembras y un macho. Las crías se dejaron con la madre hasta el día del destete (día 24 de vida) y se mantuvieron con libre acceso al agua y al alimento hasta el momento del sacrificio.

Todos los animales fueron mantenidos a una temperatura controlada de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  con un fotoperiodo de 14 h de luz por 10 h de oscuridad (luces encendidas de 05:00 a las 19:00 h).

Durante la investigación se siguieron las normas establecidas por la Ley Mexicana de Protección Animal para el Uso de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio).

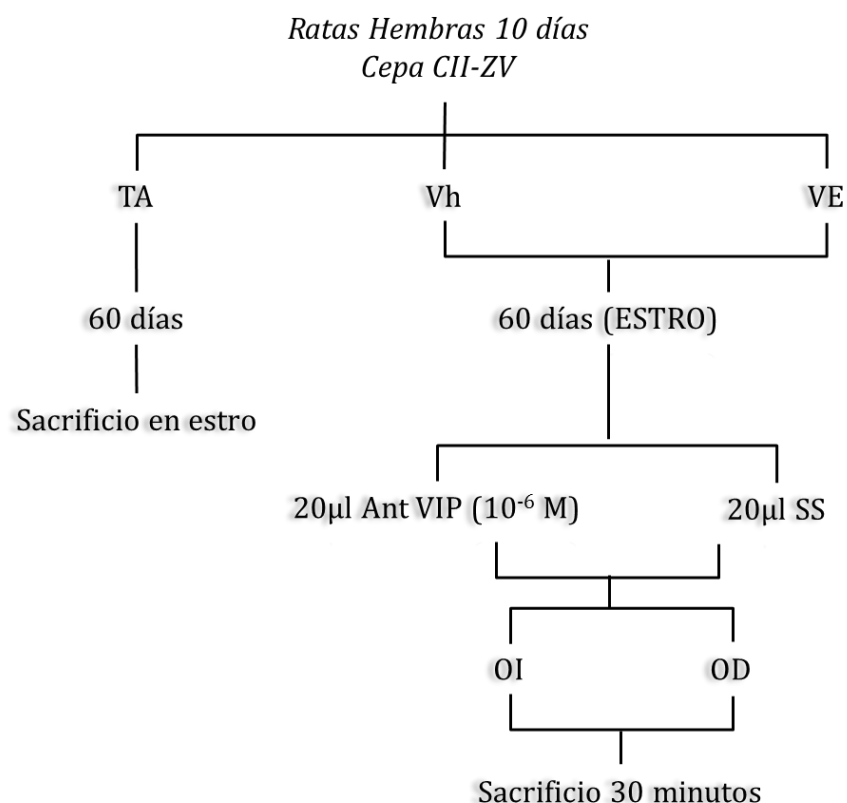
### ***Diseño Experimental***

Se utilizaron de ocho a diez animales por grupo experimental. Todos los procedimientos quirúrgicos fueron realizados bajo anestesia con éter a los 60 días de edad, en la etapa del estro, entre las 10:30 y 11:30 h. Los animales fueron sacrificados a los 30 minutos de la cirugía.

El VE (Sigma Chemical Co., St Louis Mo. USA) se disolvió en aceite de maíz. El VIP híbrido ([Lis<sup>1</sup>, Pro<sup>2,5</sup>, Arg<sup>3,4</sup>, Tyr<sup>6</sup>]-VIP; Sigma Chemical Co., St Louis Mo. USA), antagonista de los receptores de VIP, se preparó en solución salina a una concentración de  $10^{-6}$  M.

El SOPQ fue inducido por la inyección intramuscular (i.m.) de una dosis de VE (2.0 mg/0.1 ml), a los 10 días de vida del animal. Como grupos control se utilizaron animales inyectados i.m. con 0.1 ml de aceite de maíz (Vh) o animales que no tuvieron ningún tipo de tratamiento y que fueron designados como testigos absolutos (TA) (Figura 9).

En los animales tratados con VE, el monitoreo de la canalización vaginal se inició un día después de la administración del fármaco, en tanto que en el grupo TA o Vh, la apertura vaginal se verificó a partir de los 30 días de vida. Una vez que los animales canalizaron vagina, se realizó la toma de frotis vaginal diario entre las 9:00 y las 10:00 h por un periodo de ocho días, que corresponden a dos ciclos estrales. La toma de frotis se reinició por ocho días más, una vez que los animales cumplieron 60 días de edad.



**Figura 9.** Esquema que muestra los grupos experimentales utilizados para evaluar los efectos agudos del bloqueo de los receptores VIPérgicos del ovario en el animal cíclico y en el modelo del animal con síndrome del ovario poliquístico. TA, Testigo absoluto; Vh, Vehículo; VE, Valerato de estradiol; VIP Hyb, Antagonista de los receptores a VIP; SS, Solución Salina; OI, Ovario Izquierdo; OD, Ovario derecho.



❧ ***Administración del antagonista de los receptores a VIP o de la Solución Salina***

A los 60 días de edad, en la etapa del estro, las ratas tratadas con Vh o VE fueron anestesiadas con éter y sometidas a una incisión dorsolateral de piel y músculo. Uno de los ovarios (izquierdo o derecho) fue expuesto e inyectado en la bursa ovárica con 20  $\mu$ l del antagonista de VIP  $10^{-6}$ M o con solución salina (SS) [NaCl al 0.9%]. La aguja se mantuvo dentro de la bursa ovárica durante 1 minuto para asegurar que el péptido no salga del tejido ovárico. Al cabo de este tiempo, el ovario fue regresado a la cavidad abdominal y la herida se suturó (Figura 9).

❧ ***Procedimiento de Autopsia***

Todos los animales fueron pesados y sacrificados en la etapa del estro por decapitación. La sangre del tronco fue colectada en tubos de ensaye y se dejó coagular durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente fue centrifugada a 3500 rpm por un lapso de 15 min. El suero obtenido fue dividido en alícuotas con ayuda de una micropipeta y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la cuantificación de progesterona, testosterona y estradiol por radioinmunoanálisis (RIA).

El útero, los ovarios y las glándulas adrenales fueron disecados y pesados en balanza analítica. Los oviductos fueron revisados en un microscopio estereoscópico para realizar el conteo de ovocitos liberados. De cada grupo experimental, los ovarios de cinco animales fueron disecados y almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta la cuantificación de las monoaminas por la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

❧ ***Cuantificación de Hormonas Esteroides en suero***

La cuantificación de Progesterona, Testosterona y Estradiol se realizó en suero por RIA de fase sólida, con un Kit Coat-A-Count (Diagnostik Products, Los Angeles, CA, USA). En tubos de polipropileno que contienen un anticuerpo específico (anti-progesterona, anti-estradiol, anti-testosterona) se adicionaron 100 µl de muestra problema, excepto para la cuantificación de testosterona, para lo cual se adicionaron 50 µl, y 1 ml de la hormona radioactiva  $^3H$ . La mezcla se agitó en un vórtex por un minuto y se incubó durante tres horas a temperatura ambiente, después se decantó y finalmente con la ayuda de un contador de rayos gamma (modelo Cobra 5005, Packard <sup>TM</sup>) se determinó la concentración de las hormonas en función de las cuentas por minuto y de una curva de calibración. La concentración de estradiol y testosterona fue expresada en pg/ml de suero, y la de progesterona en ng/ml de suero.

La cuantificación de las Hormonas se realizó en el Laboratorio de Hormonas Esteroides del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

❧ ***Cuantificación de Monoaminas y sus Metabolitos en ovario***

En los ovarios almacenados a -70°C se realizó la cuantificación de monoaminas: Noradrenalina (NA), Dopamina (DA), serotonina (5-HT) y sus respectivos metabolitos [4-Hidroxi-3-metoxifenilglicol (MHPG), 3-4-dihidroxifenilacético (DOPAC), y el ácido 5-Hidroxiindol-3-acético (5-HIAA)]. La concentración de NA, DA, 5-HT y sus metabolitos en ovario se cuantificó por HPLC. Cada ovario fue pesado y homogeneizado con ayuda de un sonicador en un volumen de 500 µl de ácido perclórico 0.1 M. El homogenado se centrifugó a 12,000 rpm a -4°C por 30 min. El sobrenadante se filtró a través de una malla de celulosa con un poro de 0.2 µm de diámetro. En el sistema de cromatografía de líquidos se inyectaron 20 µl de la muestra problema. La validación del método se realizó utilizando concentraciones conocidas de los estándares (0.1, 0.5, 1.0 y 2.0 ng en 20 µl). La concentración de cada neurotransmisor y de su metabolito se expresó en pg/mg de tejido.

## Análisis Estadístico

El peso corporal, el peso de los órganos (ovarios, glándulas adrenales y útero), la concentración de hormonas esteroideas en suero y la de monoaminas y sus metabolitos en ovario fueron analizadas por la prueba de *Análisis de Varianza Multifactorial (ANDEVA)* seguida por la prueba de *Tukey-Kramer*.

Las diferencias entre dos grupos experimentales se analizaron con la prueba “*t*” de *Student*.

El número de ovocitos liberados, la edad de apertura vaginal y del primer estro se analizó por la prueba de *Kruskal-Wallis*, seguida por la prueba de *Dunn*.

Las diferencias entre dos grupos experimentales se analizaron con la prueba de U de mann-Whitney

La tasa de animales ovulantes fue analizada por la prueba de Fisher o de  $\chi^2$ .

Las diferencias cuya probabilidad fue menor o igual a 0.05 se consideraron como estadísticamente significativas.

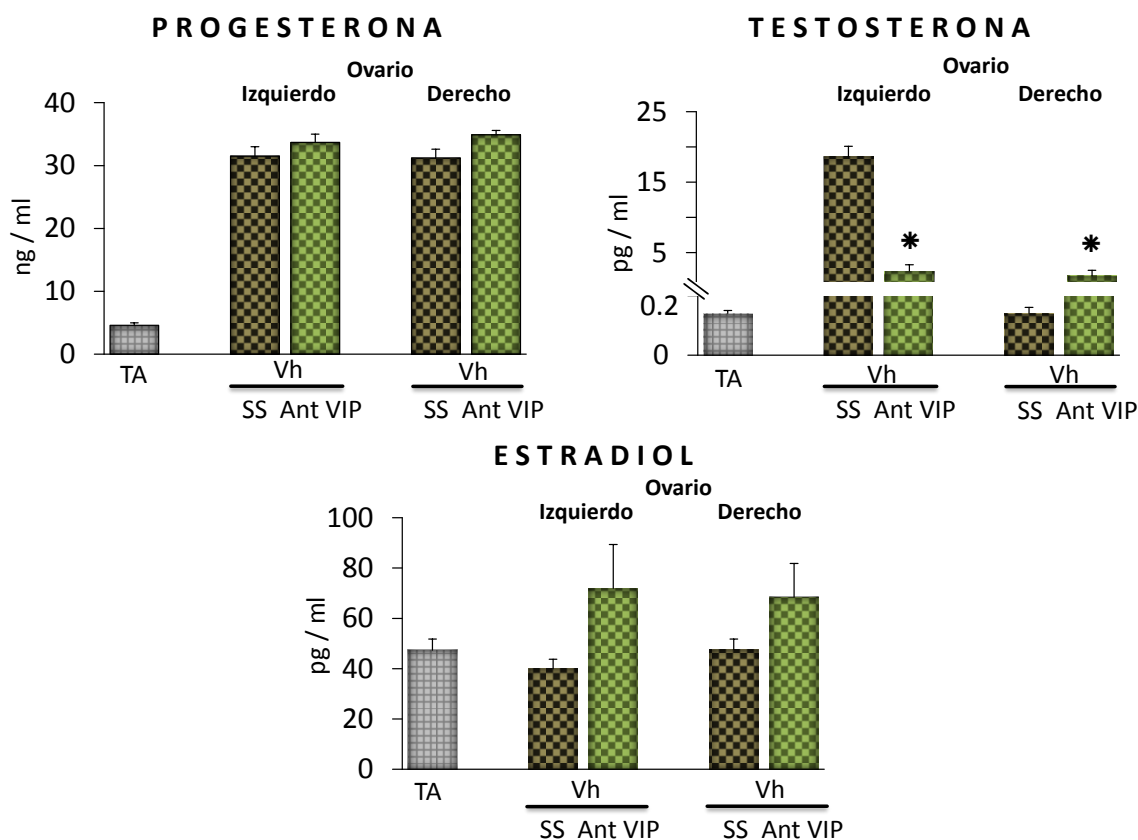
## RESULTADOS

### EXPERIMENTO 1

#### Efectos de la inyección del antagonista de los receptores a VIP en la bursa del ovario de animales cíclicos

##### Concentración de Hormonas Esteroides

Con respecto al grupo con SS, la inyección del antagonista de VIP en la bursa del ovario izquierdo resultó en menor concentración de testosterona en suero, contrario a lo ocurrido en el ovario derecho. Sin cambios en la concentración de progesterona y estradiol respecto a su grupo de comparación (Figura 10).



\*p < 0.05 vs. Vh SS (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey).

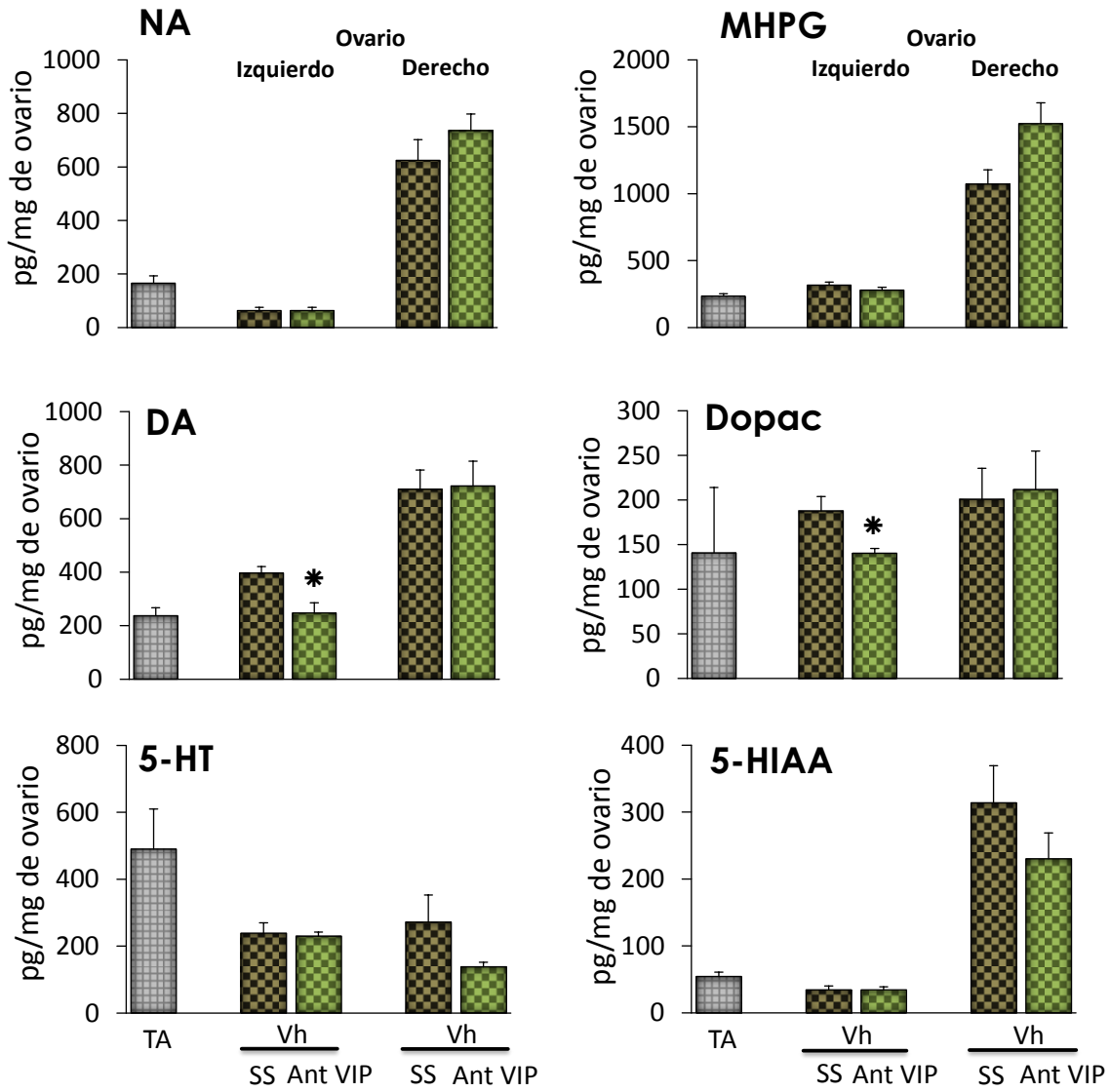
**Figura 10.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de progesterona, testosterona y estradiol en suero de animales testigo absoluto (TA) o de animales inyectados con vehículo (Vh) y a los 68 días de edad en la etapa del estro, fueron inyectados con solución salina (SS) o el antagonista de VIP (Ant VIP) en la bursa del ovario **izquierdo** o **derecho** y sacrificados a los 30 minutos de la cirugía.

### Concentración de Monoaminas ováricas

En comparación a su grupo control, la concentración de NA o de MHPG en el ovario de animales tratados con Vh no se modificó por efectos de la inyección de SS o del antagonista de VIP en la bursa del ovario **izquierdo** o **derecho** (Figura 11).

La inyección del antagonista de VIP en la bursa del ovario **izquierdo** resultó en una menor concentración de DA y DOPAC en el ovario, mientras que en el ovario **derecho** no se modificó (Figura 11).

La concentración ovárica de 5HT y de su metabolito no se modificó por acción del antagonista a VIP (Figura 11).



\*p < 0.05 vs. Vh SS (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey).

**Figura 11.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de catecolaminas en el ovario de animales testigo absoluto (TA) o de animales inyectados con vehículo (Vh) y a los 68 días de edad en la etapa del estro, fueron inyectados con solución salina (SS) o el antagonista de VIP (Ant VIP) en la bursa del ovario izquierdo o derecho y sacrificados a los 30 minutos de la cirugía.

EXPERIMENTO 2

*Efectos de la inyección de Valerato de Estradiol en ratas de 10 días de edad, sacrificadas en la etapa adulta*

**Peso corporal y pesos relativos de Ovarios, Útero y Adrenales**

En comparación con el grupo TA, la administración de Vh resultó en menor masa ovárica.

En comparación al grupo inyectado con el Vh, el tratamiento con VE resultó en un menor peso del útero (cuadro 1).

**Cuadro 1.** Media  $\pm$  e.e.m. del **peso corporal** y del **peso relativo (mg/100g)** de la masa ovárica, del útero y la masa adrenal de animales testigo absoluto (TA) o de animales inyectados i.m. con el vehículo (Vh) o el valerato de estradiol (VE) a los 10 días de edad y sacrificados en la etapa adulta, en el día del estro.

<i>Grupos</i>	<i>Peso Corporal</i>	<i>Masa Ovárica</i>	<i>Útero</i>	<i>Masa adrenal</i>
<b>TA</b>	222.8 $\pm$ 4.6	25.8 $\pm$ 0.9	121.2 $\pm$ 3.9	20.5 $\pm$ 0.8
<b>Vh</b>	219.8 $\pm$ 10.8	22.7 $\pm$ 0.4 $\blacklozenge$	129.4 $\pm$ 2.5	18.7 $\pm$ 1.1
<b>VE</b>	192.0 $\pm$ 11.9	24.1 $\pm$ 1.4	95.0 $\pm$ 9.1*	22.2 $\pm$ 1.7

$\blacklozenge$  p < 0.05 vs. TA; \*p < 0.05 vs. Vh (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer).

### Inicio de la Pubertad

La inyección del Vh no modificó la edad de apertura vaginal ni del primer estro en comparación con el TA. La administración de VE resultó en un adelanto en la edad de apertura vaginal y del primer estro vaginal con respecto al grupo Vh (cuadro 2).

**Cuadro 2.** Media  $\pm$  e.e.m. de la **edad de apertura vaginal (EAV)** y **primer estro vaginal (PEV)** de animales testigo absoluto (TA) o inyectados i.m. con el vehículo (Vh) o el valerato de estradiol (VE) a los 10 días de edad.

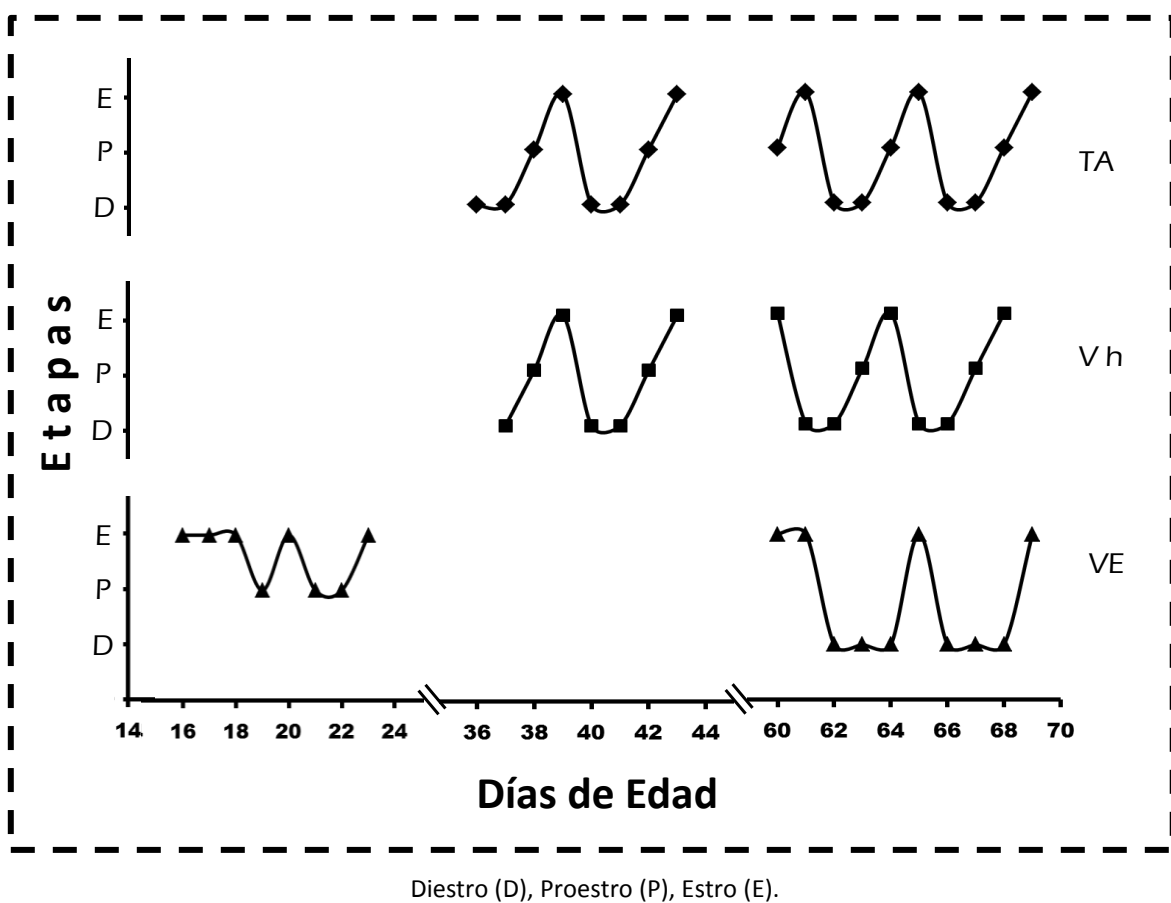
Grupo	EAV	PEV
	Días	
TA	36.2 $\pm$ 0.5	38.5 $\pm$ 0.6
Vh	39.2 $\pm$ 0.9	42.5 $\pm$ 1.1
VE	17 $\pm$ 0.2*	17.3 $\pm$ 0.3*

\* p < 0.05 vs. Vh (prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de Dunn).



Ciclo Estral

En relación al grupo TA, la inyección del Vh no modificó el patrón del ciclo estral. Las hembras inyectadas con VE presentaron alteración de su ciclo, caracterizado por la presencia de diestros, precedido de estro y ausencia de proestro (Figura 10).



**Figura 12.** Patrón representativo del ciclo estral de animales testigo absoluto (TA) o inyectados i.m. con el vehículo (Vh) o el valerato de estradiol (VE) a los 10 días de edad y sacrificados a los 68 días, en la etapa del estro.

**Respuesta Ovulatoria**

La inyección del Vh no modificó la tasa de animales ovulantes, ni el número de ovocitos liberados, en relación al grupo TA. Cuando los animales fueron inyectados con el VE sólo un animal ovuló y liberó nueve ovocitos en total (cuadro 3).

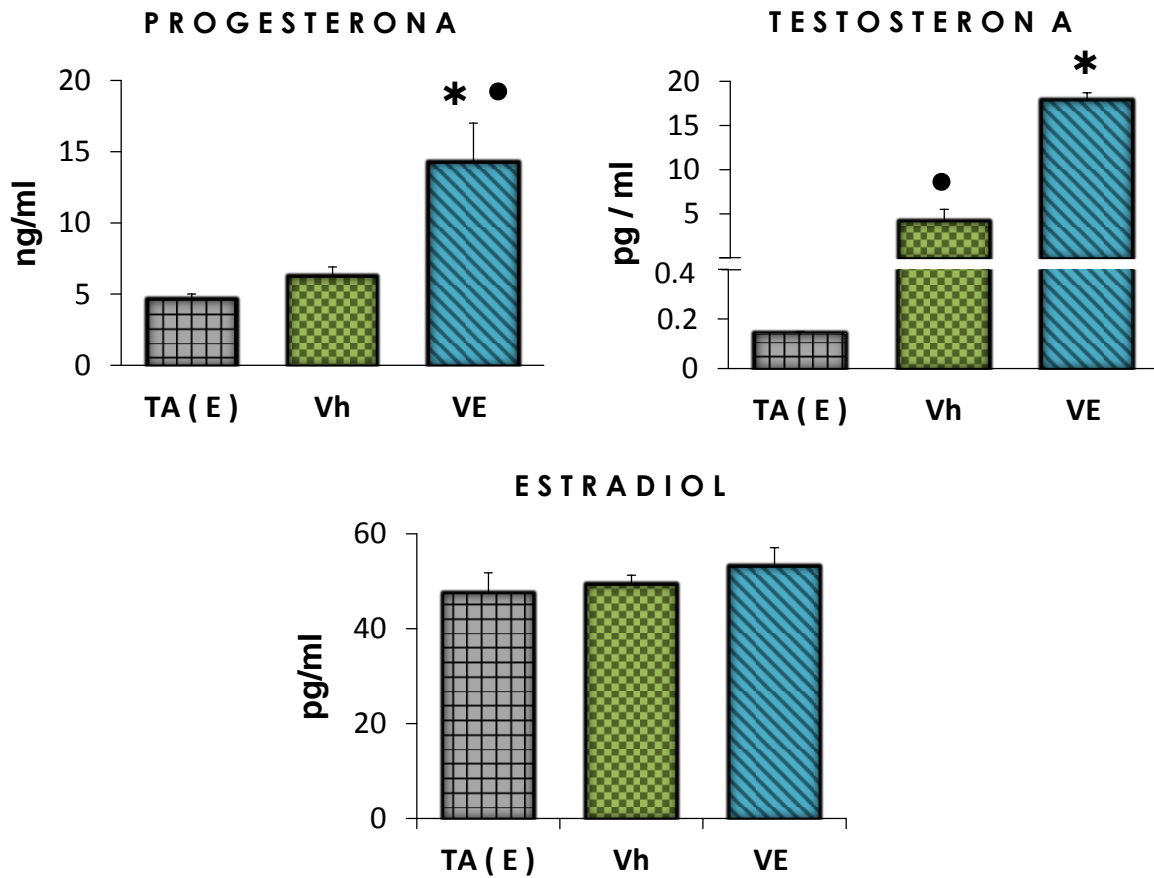
**Cuadro 3.** Porcentaje de **animales ovulantes** y media  $\pm$  e.e.m. del **número de ovocitos liberados** de animales testigo absoluto (TA) o de animales inyectados i.m. con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) a los 10 días de edad y sacrificados a los 68 días de edad, en la etapa del estro.

Grupos	Tasa de animales ovulantes por ovario (%)			Número de ovocitos liberados por ovario		
	Izquierdo	Derecho	Total	Izquierdo	Derecho	Total
TA	88.2	94.1	100	5.7 $\pm$ 0.6	5.2 $\pm$ 0.3	10.0 $\pm$ 0.8
Vh	90.9	81.8	100	5.4 $\pm$ 0.5	4.9 $\pm$ 0.7	8.9 $\pm$ 1.2
VE	20•	20•	20•	(4)	(5)	(9)

- $p < 0.05$  vs. Vh (prueba de  $\chi^2$ ). El valor entre paréntesis representa el número de ovocitos liberados por animal ovulante.

### Concentración de Hormonas Esteroides

La inyección i.m. del VE resultó en una mayor concentración de progesterona y testosterona en suero, sin cambios en la concentración de estradiol respecto a su grupo Vh (Figura 13).



● p < 0.05 vs. TA; \*p < 0.05 vs. Vh (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer).

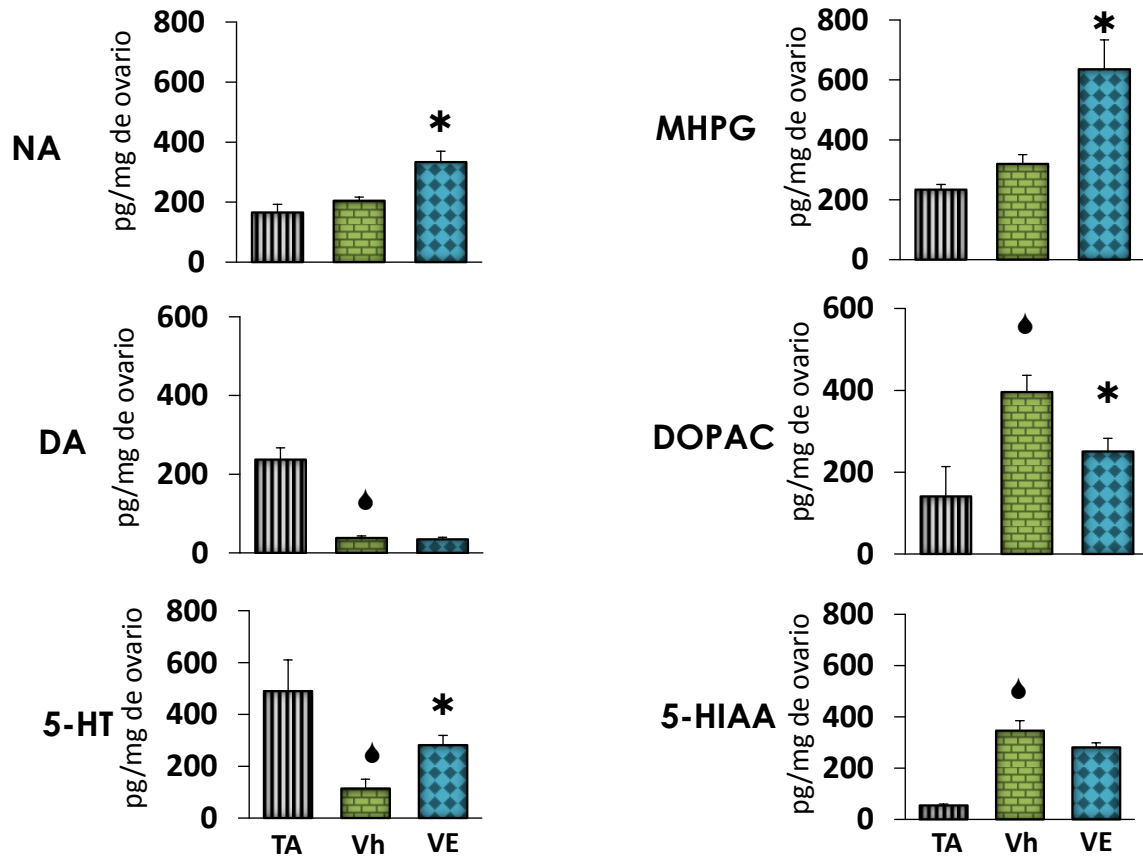
**Figura 13.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de **progesterona, testosterona y estradiol** en suero de animales testigo absoluto (TA), inyectados i.m. con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) a los 10 días de edad y sacrificados a los 68 días de edad, en la etapa del estro.

### Concentración de Monoaminas Ováricas

En comparación con el TA, la inyección i.m. del Vh no modificó la concentración de NA ni de MHPG en el ovario. En animales tratados con VE la concentración ovárica de NA y MHPG fue mayor con respecto al grupo Vh (Figura 14).

Cuando se compara con el grupo TA, la inyección del Vh disminuyó la concentración de DA e incrementó la de su metabolito. El tratamiento con VE resultó no modificó la concentración de DA y disminuyó la concentración ovárica del metabolito en relación al grupo Vh (Figura 14).

Respecto al grupo TA, la inyección del Vh disminuyó la concentración de 5-HT e incrementó la de su metabolito. El tratamiento con VE resultó incrementó la concentración de 5-HT y no modificó la concentración ovárica del metabolito en relación al grupo Vh (Figura 14).



♦p < 0.05 vs. TA; \*p < 0.05 vs. Vh (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer).

**Figura 14.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de **Noradrenalina (NA)**, **Dopamina (DA)** y **Serotonina (5-HT)**, y sus respectivos metabolitos **MHPG**, **DOPAC** y **5-HIAA** en el ovario de animales testigo absoluto (TA) o de animales inyectados i.m. con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) a los 10 días de edad y sacrificados a los 68 días de edad, en la etapa del estro.

EXPERIMENTO 3

*Efectos de la inyección unilateral del antagonista de los receptores a VIP en la bursa del ovario de animales con SOPQ*

**Peso corporal y pesos relativos de Ovarios, Útero y Adrenales**

En el animal con VE, la inyección de SS en el ovario izquierdo no modificó el peso del útero, masa adrenal y ovárica, cuando la SS se inyectó en el ovario derecho sólo disminuyó la masa ovárica (Cuadro 4).

En animal tratado con VE la administración del antagonista de VIP en la bursa del ovario izquierdo disminuyó el peso de la masa ovárica, del útero y adrenal. La administración del antagonista en el ovario derecho disminuyó el peso del útero y la masa adrenal.

**Cuadro 4.** Media  $\pm$  e.e.m. del **peso corporal** y del **peso relativo (mg/100g)** de la masa ovárica, del útero y la masa adrenal de animales testigo absoluto (TA) o de animales inyectados i.m. a los 10 días de edad con el vehículo (Vh) o el valerato de estradiol (VE). A los 68 días de edad, en la etapa del estro, fueron inyectados con la solución salina (SS) o el antagonista de VIP (Ant VIP) en la bursa del ovario **izquierdo** (OI) o **derecho** (OD) y sacrificados a los 30 minutos de la cirugía.

	Masa Ovárica	Útero	Masa Adrenal
Vh SSOI	26.5 $\pm$ 1.2	130.5 $\pm$ 6.9	21.1 $\pm$ 0.7
VE SSOI	23.8 $\pm$ 1.3	113.8 $\pm$ 6.6	20.3 $\pm$ 0.9
Vh AntVIP OI	27.7 $\pm$ 1.3	131.6 $\pm$ 5.7	22.8 $\pm$ 1.1
VE AntVIP OI	13.2 $\pm$ 1.1*	87.7 $\pm$ 8.2*	10.0 $\pm$ 1.6*

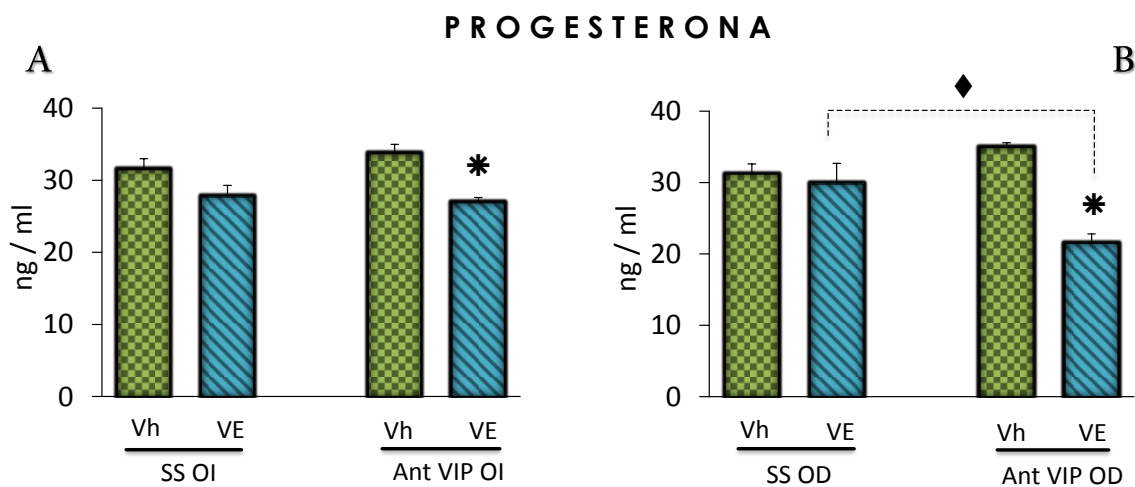
	Masa Ovárica	Útero	Masa Adrenal
Vh SSOD	27.3 $\pm$ 0.9	133.8 $\pm$ 7.5	20.2 $\pm$ 1.1
VE SSOD	22.7 $\pm$ 2.3*	108.9 $\pm$ 7.5	24.1 $\pm$ 0.7
Vh AntVIP OD	25.9 $\pm$ 0.9	134.1 $\pm$ 5.9	24.2 $\pm$ 1.9
VE AntVIP OD	25.4 $\pm$ 1.9	106.8 $\pm$ 6.1*	14.3 $\pm$ 1.1*

\*p < 0.05 vs. Su Vh (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer).

### Concentración de Hormonas Esteroides

En los animales tratados con VE, la inyección de SS en la bursa del **ovario izquierdo** no modificó la concentración de progesterona en suero con respecto a su grupo de comparación (Figura 15A). La inyección del antagonista de VIP en el ovario izquierdo de animales tratado con VE resultó en una menor concentración de la hormona respecto a su grupo Vh (Figura 15A).

La concentración de progesterona en los animales tratados con VE no se modificó por efecto de la inyección de SS en la bursa del **ovario derecho** (Figura 15B), contrario a lo observado ante la administración del antagonista de VIP que resultó en la disminución de la concentración de la hormona en comparación a su grupo control y al grupo tratado con VE e inyectado con SS (Figura 15B).

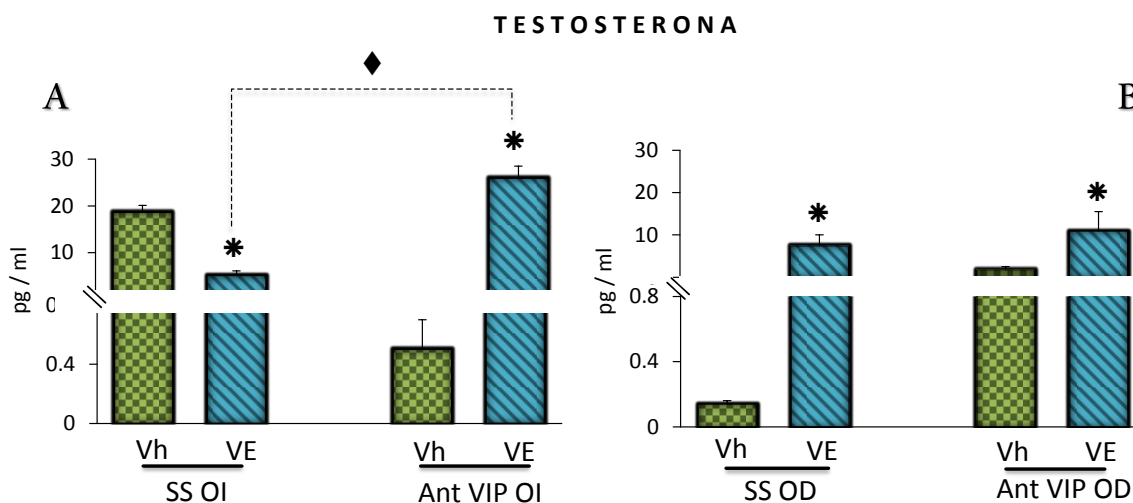


\*p < 0.05 vs. Vh; ♦ p < 0.05 vs. VE SSOD (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer).

**Figura 15.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de progesterona en suero de animales que a los 10 días de edad fueron inyectados i.m. con el vehículo (Vh) o el valerato de estradiol (VE) y a los 68 días de edad, en la etapa del estro, fueron inyectados con la solución salina (SS) o el antagonista de VIP (Ant VIP) en la bursa del ovario **izquierdo** (OI) (A) o **derecho** (OD) (B) y sacrificados a los 30 minutos de la cirugía.

En animales tratados con VE, la inyección de SS en la bursa del **ovario izquierdo** resultó en una menor concentración de testosterona en suero con respecto a su grupo control, mientras que la inyección del antagonista de VIP la incrementó (Figura 16A). Al comparar los grupos inyectados con VE se observó que la inyección del antagonista de VIP resultó en una mayor concentración de testosterona en suero (Figura 16A).

Los animales tratados con VE e inyectados con SS o el antagonista de VIP en la bursa del **ovario derecho** presentaron aumento en la concentración de testosterona en suero respecto a su grupo control (Figura 16B).



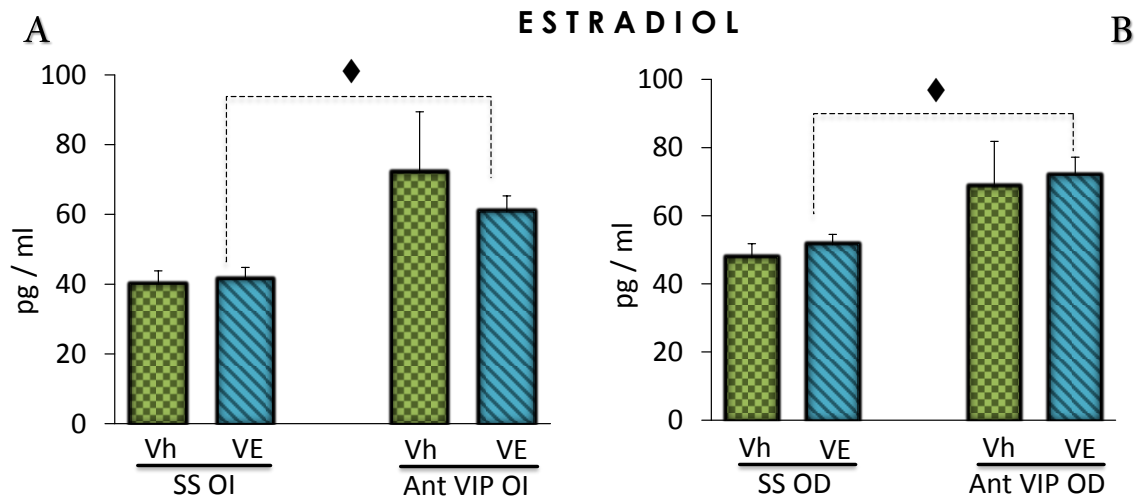
\*p < 0.05 vs. Vh; ♦ p < 0.05 vs. VE SSOI (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer).

**Figura 16.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de testosterona en suero de animales que a los 10 días de edad fueron inyectados i.m. con el vehículo (Vh) o el valerato de estradiol (VE) y a los 68 días de edad, en la etapa del estro, fueron inyectados con la solución salina (SS) o el antagonista de VIP (Ant VIP) en la bursa del **ovario izquierdo** (OI) (A) o **derecho** (OD) (B) y sacrificados a los 30 minutos de la cirugía.



## Resultados

En comparación con el grupo Vh, en los animales tratados con VE e inyectados con SS o el antagonista de VIP en la bursa del **ovario izquierdo** o **derecho** no se modificó la concentración de estradiol en suero (Figura 17A y B). Al comparar los grupos tratados con VE, se observó una mayor concentración del estrógeno ante la inyección del antagonista de VIP en la bursa del ovario **izquierdo** o **derecho** (Figura 17A y B).



◆  $p < 0.05$  vs. VE SS (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer).

**Figura 17.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de estradiol en suero de animales que a los 10 días de edad fueron inyectados i.m. con el vehículo (Vh) o el valerato de estradiol (VE) y a los 68 días de edad, en la etapa del estro, fueron inyectados con la solución salina (SS) o el antagonista de VIP (Ant VIP) en la bursa del **ovario izquierdo** (OI) (A) o **derecho** (OD) (B) y sacrificados a los 30 minutos de la cirugía.

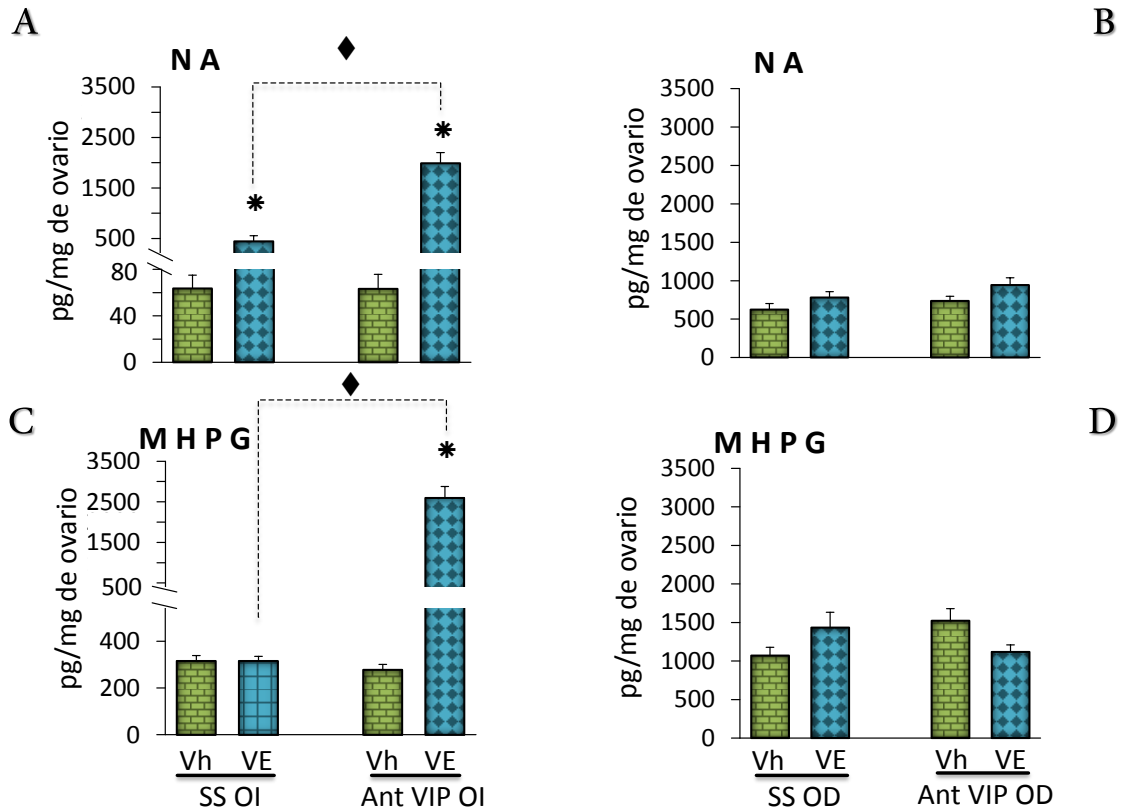
## Concentración de monoaminas ováricas

### NA y MHPG

En los animales tratados con VE, la inyección de SS en la bursa del **ovario izquierdo** resultó en una mayor concentración de NA (Figura 18A), efecto que se amplifica ante la inyección del antagonista de VIP, respecto a su grupo control y al grupo tratado con VE e inyectado con SS (Figura 18A).

La inyección de SS en la bursa **ovárica izquierda** de animales tratados con VE no modificó la concentración de MHPG, mientras que la inyección del antagonista de VIP resultó en una mayor concentración ovárica de MHPG en comparación a su grupo control y al grupo tratado con VE e inyectado con SS (Figura 18C).

En comparación a su grupo control, la concentración de NA o de MHPG en el ovario de animales tratados con VE no se modificó por efectos de la inyección de SS o del antagonista de VIP en la bursa del **ovario derecho** (Figura 18B y D).



\* $p < 0.05$  vs. su grupo con Vh; ♦  $p < 0.05$  vs. VE SS (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer).

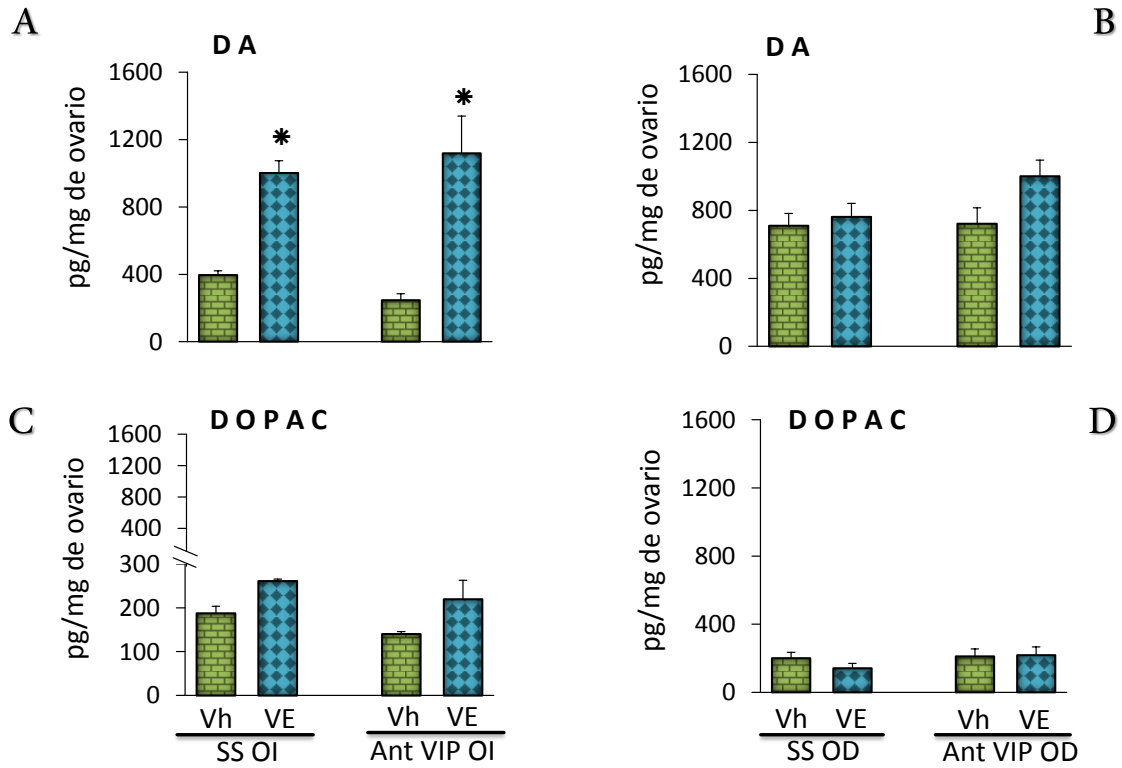
**Figura 18.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de Noradrenalina (NA) y su metabolito (MHPG) en ovario de animales que a los 10 días de edad fueron inyectados i.m. con el vehículo (Vh) o el valerato de estradiol (VE) y a los 68 días de edad, en la etapa del estro, fueron inyectados con la solución salina (SS) o el antagonista de VIP (Ant VIP) en la bursa del **ovario izquierdo** (OI) o **derecho** (OD) y sacrificados a los 30 minutos de la cirugía.

## Dopamina y DOPAC

En animales tratados con VE la inyección de SS o del antagonista de VIP en el **ovario izquierdo** incrementó la concentración de dopamina respecto a su grupo de comparación (Figura 19A).

En comparación a su grupo control, la inyección de SS en la bursa del **ovario izquierdo** en animales tratados con VE resultó en una mayor concentración de DOPAC en el ovario, semejante a lo observado por la inyección del Antagonista de VIP, aunque no fue estadísticamente significativo (Figura 19C).

La inyección de SS o del antagonista de VIP en la bursa del **ovario derecho** de animales tratados con el VE no modificó la concentración ovárica de dopamina (Figura 19B) ni de DOPAC en comparación a su grupo control (Figura 19D).



\* $p < 0.05$  vs. su grupo con Vh (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer).

**Figura 19.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de Dopamina (DA) y su metabolito (DOPAC) en ovario de animales que a los 10 días de edad fueron inyectados i.m. con el vehículo (Vh) o el valerato de estradiol (VE) y a los 68 días de edad, en la etapa del estro, fueron inyectados con la solución salina (SS) o el antagonista de VIP (Ant VIP) en la bursa del **ovario izquierdo** (OI) o **derecho** (OD) y sacrificados a los 30 minutos de la cirugía.

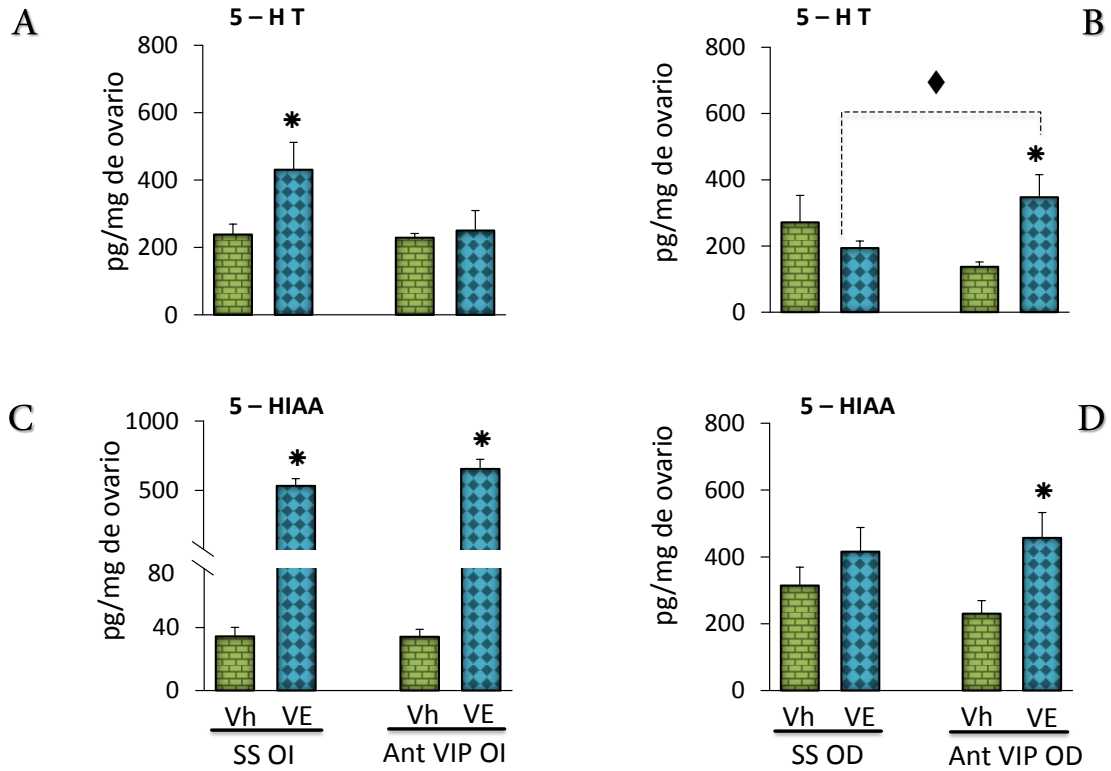
## Serotonina y 5-HIAA

En animales tratados con VE, la inyección de SS en la bursa del **ovario izquierdo** resultó en una mayor concentración de serotonina en el ovario, efecto que no se observó cuando se administró el antagonista de VIP, con respecto a su grupo de comparación (Figura 20A).

La concentración de 5-HIAA en el ovario de animales tratados con VE e inyectados en la bursa del **ovario izquierdo** con SS o el antagonista de VIP fue mayor en comparación a su grupo control (Figura 20C).

La concentración ovárica de serotonina en animales tratados con VE e inyectados con SS en la bursa del **ovario derecho** no se modificó respecto a su grupo de comparación (Figura B). Cuando se inyectó el antagonista de VIP en la bursa del ovario derecho de animales tratados con VE se observó aumento de la concentración de serotonina ovárica en comparación a su grupo control y al grupo tratado con VE e inyectado con SS (Figura 20B).

La concentración ovárica de 5-HIAA no se modificó al inyectar SS en la bursa del ovario derecho de animales tratados con VE en comparación a su grupo control. Cuando los animales tratados con VE fueron inyectados con el antagonista de VIP en la bursa del **ovario derecho** se observó aumento en la concentración de 5-HIAA con respecto a su grupo de comparación (Figura 20D).



\*p < 0.05 vs. Vh; ◆ p < 0.05 vs. VE SS Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer).

**Figura 20.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de Serotonina (5-HT) y su metabolito (5-HIAA) en ovario de animales que a los 10 días de edad fueron inyectados i.m. con el vehículo (Vh) o el valerato de estradiol (VE) y a los 68 días de edad, en la etapa del estro, fueron inyectados con la solución salina (SS) o el antagonista de VIP (Ant VIP) en la bursa del **ovario izquierdo** (OI) o **derecho** (OD) y sacrificados a los 30 minutos de la cirugía.

## Discusión

El bloqueo de los receptores a VIP puede indicar de manera indirecta la modulación que ejerce el péptido en la esteroidogénesis ovárica. Así, en el animal cíclico regula de manera asimétrica la síntesis de testosterona y no parece regular la de progesterona y estradiol. En el animal con SOPQ el bloqueo de los receptores a VIP en el ovario izquierdo o derecho estimula la secreción de testosterona y estradiol e inhibe la de progesterona.

Como ha sido reportado en la literatura, en el presente estudio se observó que el tratamiento con una dosis de VE en la etapa infantil induce el SOPQ caracterizado por adelanto en el inicio de la pubertad (Rosa E-Silva y col., 2003), bloqueo de la ovulación (Brawer y col 1986; Azziz y col., 2006), aumento en la concentración de testosterona en suero (Rosa E-Silva y col., 2003; Morales-Ledesma y col., 2010) y de NA en el ovario (Barria y col., 1993).

Sotomayor-Zárate y colaboradores (2008) observaron que el tratamiento con VE en la etapa neonatal aumenta el peso del útero. Lo que fue asociado por una mayor incidencia de úteros balonados, y explicado con el hecho de que los animales no presentaron un estro vaginal típico. En el presente estudio se observó disminución en el peso del útero, lo que podría ser explicado por el aumento en la concentración de testosterona observada en nuestros animales tratados con VE. En apoyo a esta idea, se ha reportado que la inducción del SOPQ por la administración de letrozol (un inhibidor de las aromatasas) incrementa testosterona y disminuye el peso del útero (Maliqueo y col., 2012).

En estudios anteriores se ha mostrado que en la rata los andrógenos aromatizables contribuyen al proceso de canalización de la vagina y con ello el inicio de la pubertad. La testosterona puede actuar directamente sobre el epitelio vaginal acelerando la apertura vaginal, acción que no requiere del incremento en la concentración de estradiol en suero (Mathews y col., 1987). En el presente estudio se observó que en los animales con SOPQ se presenta un adelanto en el inicio de la pubertad, tal y como otros autores lo han



reportado (Rosa E-Silva y col., 2003; Cruz y col., 2012). Sugerimos que las altas concentraciones que observamos de testosterona pudieran ser las responsables del adelanto en el inicio de la pubertad.

En el presente estudio se observó que en los animales con SOPQ se bloqueó la ovulación cuando las ratas alcanzaron la etapa adulta. Este resultado ha sido explicado por algunos autores como respuesta a la disminución en la concentración de gonadotropinas (Brawer y col 1986), sin embargo, nuestro grupo de trabajo mostró que no existen cambios en la concentración de FSH y LH en animales con SOPQ, lo que sugiere que las gonadotropinas no juegan un papel causal en la condición del síndrome (Morales y col., 2010). Es posible que en la rata con SOPQ, el bloqueo de la ovulación se deba a una alteración en las vías simpáticas que llegan al ovario. Esta idea se ve apoyada por el hecho de que al disminuir el tono simpático por la sección bilateral del NOS se restablece la respuesta ovulatoria (Rosa-E-Silva y col., 2003), sin cambios en la concentración plasmática de las gonadotropinas (Morales y col., 2010).

En nuestra cepa de animales observamos que la administración de VE en hembras infantiles resultó en la alteración del patrón del ciclo estral, caracterizado por la presencia de varios diestros. Esto podría ser atribuido al incremento en la concentración de testosterona. El grupo de Manneras (2007) mostró que en la rata infantil al mantener altas las concentraciones de testosterona, mediante el implante de un pellet con letrozol, resulta en la presencia de diestros continuos.

En la rata con SOPQ se incrementa la concentración de NA ovárica (Lara y col., 2000). Este mismo efecto fue observado en el presente estudio, donde además se incrementó la concentración de MHPG, el metabolito de la NA. El aumento en la concentración ovárica de NA podría explicarse por el incremento en la actividad de la tirosina hidroxilasa en el ganglio celiaco (Lara y col., 2000), que es una enzima limitante en la síntesis de catecolaminas (Fuentes y col., 1998). El hecho de que haya incrementado el metabolito nos indica que en el ovario se acelera la degradación de la NA.

Garraza y colaboradores (2004) mostraron que en un sistema *ex vivo* del GC-NOS-ovario, proveniente de animales en diestro 2, la estimulación del GC con NA incrementa la secreción de progesterona por el ovario. En estudios *in vitro* se ha observado que el VIP estimula la secreción de progesterona, debido al efecto estimulante de la actividad de la enzima 3 $\beta$ -HSD, que interviene en el paso de pregnenolona a progesterona (Davoren y Hsueh, 1985). Cuando la estimulación con VIP se realiza *in vivo*, en el día del estro, no se modifica la concentración de la hormona 24 horas después de la estimulación (Rosas, 2011), lo cual fue atribuido a que en esta etapa del ciclo el principal aporte de progesterona es de origen adrenal (Barco y col., 2003; Flores y col., 2008). Esto explicaría porque en nuestros animales cíclicos en estro, 30 minutos después de haber inyectado en la bursa ovárica el antagonista de los receptores a VIP, la concentración de progesterona en suero no se modifica.

En el modelo del animal con SOPQ aumenta la actividad de las fibras simpáticas del NOS lo que trae aparejado el incremento de la concentración de NA (Lara y col., 1993) y de VIP en el ovario (Parra y col., 2007). El grupo de Rosa-E-Silva (2003) mostró que en la rata con SOPQ incrementa la actividad de la 3 $\beta$ -HSD en la pared folicular. Algunos grupos de investigadores (Ferron y col., 1985; Nowak y Kuba; 2002) han descrito que el VIP y la NA actúan de manera sinérgica en la producción de AMPc. Este mecanismo se presenta también en el ovario, donde el papel estimulante del VIP en la secreción de progesterona es amplificado por la NA ovárica (Garraza y col., 2004). Aún cuando no descartamos que las altas concentraciones de progesterona observadas en el animal tratado con VE se deban a la acción conjunta de la NA y el VIP sobre la actividad de la 3 $\beta$ -HSD, sugerimos que el incremento en la progestina está dado principalmente por la acción del VIP. Esto se apoya en el hecho de que en nuestros animales con SOPQ, el bloqueo de los receptores a VIP por la inyección de un antagonista en la bursa del ovario resultó en una menor concentración de la hormona.

La administración de VIP en la bursa ovárica de ratas en proestro no modifica la concentración de NA a los 60 minutos de la estimulación (comunicación directa Rosas,

2014). En el presente estudio observamos que en el día del estro vaginal, el bloqueo de los receptores a VIP no modificó la concentración de NA en el ovario, independientemente del ovario en estudio, y sólo se observó que el ovario derecho tiene mayor capacidad para degradar la amina. Estas evidencias nos permiten sugerir que en el animal cíclico el VIP no participa en la regulación de la secreción de NA ovárica.

En el presente estudio mostramos de manera indirecta, que en la rata con SOPQ la respuesta de cada ovario al VIP es diferente, esto en función de que el bloqueo de los receptores a VIP resultó en una mayor concentración de NA ovárica sólo cuando el antagonista se inyecta en la bursa del ovario izquierdo. Estos resultados apoyan la idea de que existe relación funcional entre el VIP y la NA, tal y como se ha señalado en el núcleo supraquiasmático, donde las fibras VIPérgicas establecen contacto con células neuroendócrinas positivas a la tirosina hidroxilasa (Mahoney y col., 2007).

La adición de VIP al cultivo de ovario incrementa la actividad de la enzima  $17\alpha$ -hidroxilasa (Johnson y col., 1994) y la concentración de testosterona en el medio (Ahmed y col., 1986; Parra y col., 2007). Al parecer el efecto del VIP en la secreción de testosterona depende del estado endócrino del animal, esto se apoya en el hecho de que en el día del estro la administración de VIP en la bursa del ovario provoca disminución en la concentración de la hormona a las 24 horas del estímulo, donde además el ovario izquierdo presenta mayor sensibilidad al VIP (Rosas, 2011). En el presente estudio se observó que en los animales cíclicos existe una respuesta asimétrica de los ovarios en la secreción de testosterona, ya que el bloqueo de los receptores a VIP en el ovario izquierdo resultó en la disminución de la concentración de la hormona, mientras que si se administra en el ovario derecho la respuesta es inversa. Mediante evidencias experimentales se ha demostrado que los órganos endocrinos pares son asimétricos en cuanto a función y control (Flores y col., 2005, 2006; Morales y col., 2011, 2012). La respuesta asimétrica de los ovarios ante una manipulación se ha relacionado con la innervación que recibe cada gónada (Morales y col., 1998, Tóth y col., 2007; 2008).

En la rata cíclica el bloqueo de los receptores a VIP en cualquiera de los ovarios ocasiona que el ovario no responda al VIP proveniente del NOS. En células de ovario de gallina, la adición de VIP estimula la expresión del ARNm que codifica para la 17 $\alpha$ -hidroxilasa, encargada de convertir la progesterona a androstenediona (Johnson y col., 1994). En el presente estudio, al bloquear los efectos del VIP por el antagonista estaríamos modificando la actividad de la enzima y como consecuencia la síntesis de andrógenos. La respuesta asimétrica del ovario en la secreción de testosterona por efecto del bloqueo de los receptores VIPérgicos podría ser el resultado de una diferencia en la sensibilidad de cada ovario al péptido (ver modelo 1), tal y como ha sido previamente sugerido (Rosas, 2011).

Se ha propuesto que en la mujer con SOPQ, el hiperandrogenismo se produce por la alteración en la frecuencia de los pulsos de liberación de la GnRH y el aumento en la secreción de LH (Franks, 2005; Morán, 2006; Merino y col., 2009; Goodarzi y col., 2011). En nuestra cepa de animales se presentó el hiperandrogenismo en respuesta a la administración del VE, tal y como ya ha sido reportado (Brawer y col., 1978; Morales y col., 2010), sin embargo, por estudios previos descartamos que sea el resultado de la alteración en la concentración de LH (Morales y col., 2010). Proponemos que se debe a una mayor actividad enzimática que facilita el paso de progesterona a testosterona.

Parra y col., (2007) mostraron por estudios *in vitro* que la adición del VIP a ovarios provenientes de animales con SOPQ incrementa la concentración de andrógenos en el medio de cultivo, evidencia que llevó a los autores a sugerir que el péptido modula de manera estimulante la secreción de andrógenos, y que puede estar participando en el desarrollo de la patología. Los resultados del presente estudio muestran en el animal tratado con VE el bloqueo de los receptores a VIP, por la administración del antagonista en la bursa ovárica, resulta en el incremento de la concentración de testosterona. Resultados que nos permiten sugerir que el VIP modula de manera inhibitoria la secreción de testosterona. La discrepancia con lo reportado, se puede atribuir al hecho de que ellos tienen al ovario en condiciones *in vitro*, privados del aporte neural. A este respecto,

nuestro grupo de trabajo mostró que en la rata con SOPQ la administración de VIP en la bursa del ovario izquierdo no modifica la concentración del andrógeno, contrario a lo que ocurre cuando previo al estímulo VIPérgico se realiza la sección del NOS (que lleva NA y VIP), donde incrementa la concentración del esteroide en suero (Rosas, 2011), resultados que nos permiten sugerir que la NA se encuentra implicada en la secreción de la hormona, donde el VIP podría estar modulando la acción de la NA.

En el cultivo de células de la granulosa o de ovarios completos de rata, el VIP incrementa la secreción de estradiol (Davoren y Huseh, 1985; Ahmed y col., 1986; Parra y col., 2007). Cuando se analiza el papel *in vivo* del VIP en el animal cíclico en diestro 2, se observa que la administración del péptido en la bursa del ovario derecho resulta en la disminución de estradiol a las 24 horas después de la estimulación, efecto opuesto al que se produce cuando el ovario tratado es el izquierdo. Cuando el VIP se inyectó en la bursa de animales en estro la secreción de estradiol no se modificó. Evidencias que permitieron sugerir que la participación del VIP en la regulación de la secreción de estradiol es asimétrica y que depende de la etapa del ciclo estral estudiada (Rosas 2011). En el presente estudio se observó que en el día del estro vaginal el bloqueo unilateral los receptores a VIP, no modificó la concentración de estradiol en suero 30 min después del bloqueo. Tomando en conjunto las evidencias, sugerimos que el efecto estimulante o inhibitorio sobre la secreción de estradiol depende de la etapa del ciclo estral y no tanto del período transcurrido entre la administración del antagonista a VIP.

En cultivo, el ovario de animales con SOPQ libera mayores concentraciones de estradiol al medio que los ovarios de animales cíclicos (Barria y col., 1993). Este aumento también se observa en el suero de animales con SOPQ y sacrificados a los 80 días de edad (Morales y col., 2010). En el presente estudio no observamos el incremento en estradiol, lo que atribuimos a que nuestros animales fueron sacrificados a los 60 días de edad, 20 días antes de lo que se ha reportado.

Cuando se cultivan los ovarios de animales con SOPQ en presencia de VIP se observa incremento en la secreción de estradiol (Parra y col., 2007). En el presente estudio se

observó que en el animal que presenta la patología, el bloqueo de los receptores a VIP en la bursa del ovario izquierdo o derecho resultó en el aumento de la concentración de estradiol en suero. Estos resultados nos llevan a plantear que el VIP modula de manera inhibitoria la síntesis de estradiol y que su participación en la regulación de la secreción del estrógeno es mediada por las señales nerviosas que ingresan al ovario a través del NOS. Esta idea se apoya en el hecho de que ante la sección del NOS izquierdo o derecho, el VIP no modifica la secreción de estradiol (Rosas, 2011).

Los resultados del presente estudio nos permiten concluir que en el modelo de la rata con SOPQ el bloqueo de los receptores a VIP mediante la inyección del VIP híbrido en la bursa del ovario, produce un efecto inhibitorio en la secreción de progesterona y estimula la concentración de testosterona y estradiol. Resultados que nos permiten sugerir que el VIP está modulando de manera estimulante la actividad de  $3\beta$ -HSD y de manera inhibitoria la actividad enzimática de  $17\beta$ -HSD y de las aromatasas (modelo 2).

En el hipotálamo las neuronas dopaminérgicas expresan receptores a VIP del tipo VPAC2, de manera que el péptido puede regular directamente la actividad de las neuronas dopaminérgicas (Gerhold y col., 2001). Este efecto del VIP es modulado por los estrógenos y la progesterona (Gerhold y col., 2001). Nuestros resultados muestran que en el ovario del animal cíclico, el VIP modula de manera estimulante la secreción de DA, ya que la inyección del antagonista de los receptores a VIP en la bursa del ovario izquierdo resulta en la disminución de la concentración de DA y de su metabolito.

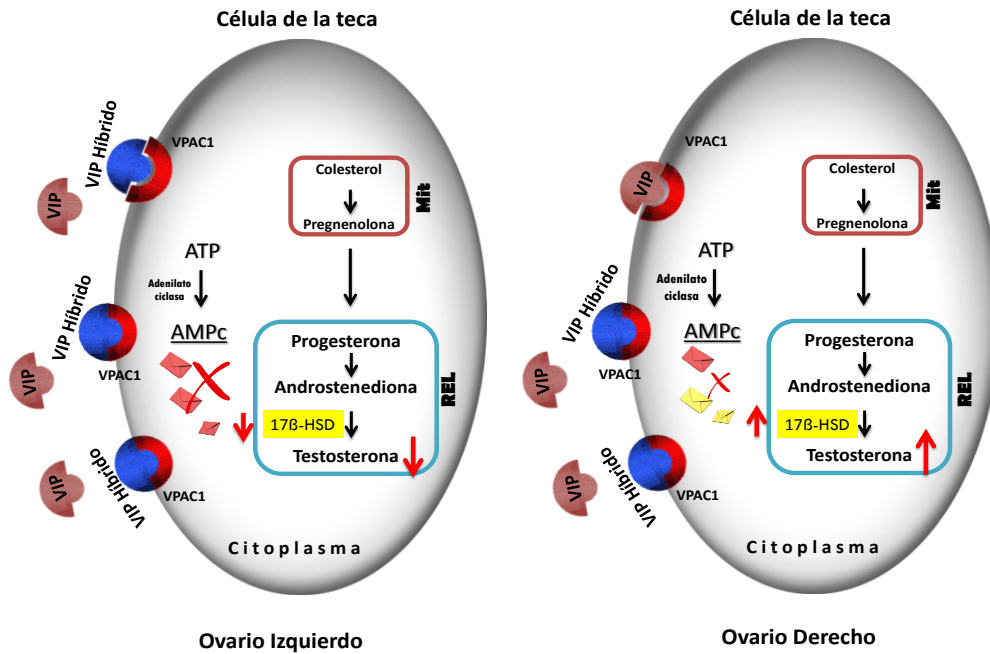
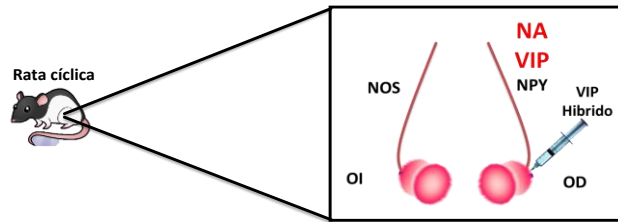
En el animal tratado con VE no se modificó la concentración ovárica de DA, tal y como lo hemos reportado previamente (Navarrete, 2014). No descartamos que el VE haya ejercido un efecto a nivel central. El grupo de Sotomayor-Zárate (2011) reportó que la administración neonatal de VE, antes de la diferenciación hipotalámica, induce un cambio permanente en la densidad y en la actividad de las neuronas serotoninérgicas y dopaminérgicas del núcleo arqueado y del hipotálamo ventromedial (Sotomayor-Zárate y col., 2011).

En mujeres con estimulación ovárica con gonadotropinas, la concentración de 5-HT en el fluido folicular no depende del estado de maduración del ovocito, pero existe una correlación negativa entre el contenido de 5-HT y LH en el fluido folicular. Resultados que llevaron a los autores a sugerir que la 5-HT puede modular de manera negativa la acción de la LH en la maduración final del ovocito (Bódís y col., 1993). Dado que en nuestros animales tratados con VE aumentó la concentración de 5-HT ovárica, sugerimos que esta amina podría estar modulando de manera negativa la respuesta del folículo a la LH, por lo que los animales no ovulan, tal y como ha sido sugerido (Clausell y Soliman, 1978).

Al momento no contamos con información bibliográfica que refiera relación entre el SOPQ y la concentración de 5-HT en el ovario. Sin embargo, el presente estudio muestra que incrementa la concentración de la indolamina cuando en el ovario derecho se inyecta un antagonista de los receptores a VIP. Resultados que nos llevan a sugerir que el VIP regula de manera inhibitoria la secreción de serotonina ovárica. Posiblemente este papel sea en función de la cantidad de fibras que recibe cada ovario, o bien, a que el número de receptores o su afinidad sea diferente, lo que explicaría el por qué se presenta sólo en el ovario derecho.

Tomados en conjunto, los resultados del presente estudio muestran que en la rata con SOPQ el bloqueo local de los efectos del VIP en el ovario, por la administración de un antagonista no selectivo de los receptores VIPérgicos, resultó en la inhibición de la secreción de progesterona y la estimulación de testosterona y estradiol. La respuesta fue asimétrica en la secreción de aminas, cuando la evaluación se realiza a los 30 minutos del bloqueo de los receptores a VIP.

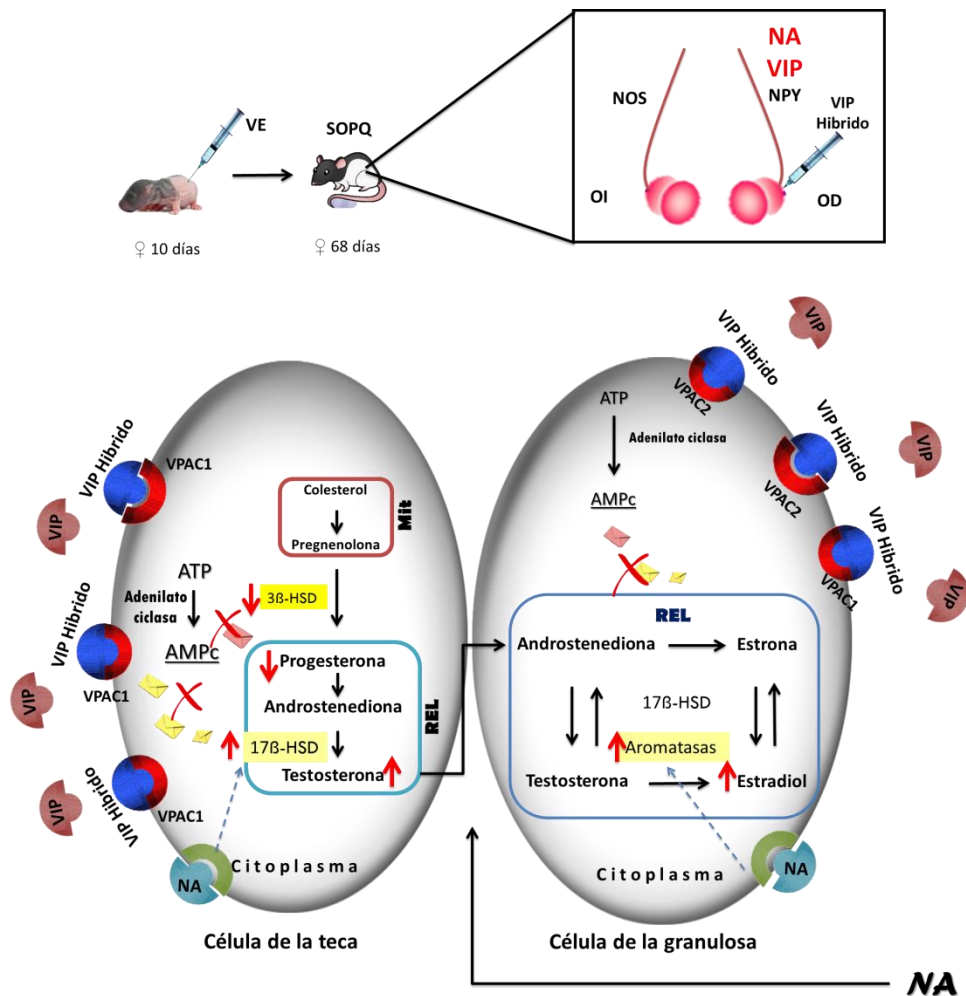
Rata cíclica



**Modelo 1.** Efectos del bloqueo de los receptores VIPérgicos mediante la inyección del VIP híbrido en la bursa del ovario de la rata cíclica, sobre la síntesis de hormonas esteroides a los 30 minutos del bloqueo. Receptor a VIP tipo 1, VPAC1; receptor a VIP tipo 2, VPAC 2; 3β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa, 3β-HSD; 17β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa, 17β-HSD; Noradrenalina, NA; péptido intestinal vasoactivo, VIP; neuropéptido Y, NPY; adenosin trifosfato, ATP; adenosin monofosfato cíclico, AMPc; mitocondria, Mit; retículo endoplasmático liso, REL. Cuando se administra en la bursa del ovario izquierdo el VIP híbrido, antagonista no selectivo de los receptores a VIP, el VIP no puede pegarse a su receptor lo que ocasiona una menor respuesta celular en cuanto a la síntesis del AMPc, y como consecuencia disminuye la actividad de la 17β-HSD, lo que resulta en la disminución de la concentración de testosterona. Cuando el VIP híbrido se administra en el ovario derecho se produce incremento de la testosterona, posiblemente porque éste ovario es menos sensible al efecto del VIP híbrido, o bien el número de receptores a VIP es mayor y no todos los receptores a VIP logran ser bloqueados.



Animal con SOPQ



**Modelo 2.** Efectos del bloqueo de los receptores VIPérgicos mediante la inyección del VIP híbrido en la bursa del ovario de la rata con SOPQ, sobre la síntesis de hormonas esteroides a los 30 minutos del bloqueo. Receptor a VIP tipo 1, VPAC1; receptor a VIP tipo 2, VPAC 2; 3β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa, 3β-HSD; 17β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa, 17β-HSD; Noradrenalina, NA; péptido intestinal vasoactivo, VIP; neuropéptido Y, NPY; adenosin trifosfato, ATP; adenosin monofosfato cíclico, AMPc; mitocondria, Mit; retículo endoplasmático liso, REL. El bloqueo de los receptores a VIP, por la administración del VIP híbrido, disminuye la producción del AMPc y como resultado disminuye la actividad de la 3β-HSD, lo que se traduce en la disminución en la concentración de progesterona. En el animal con SOPQ el aumento de testosterona y estradiol se explica por el incremento en la concentración de NA ovárica, donde el VIP podría estar modulando la acción de la NA.

## Conclusiones

El bloqueo de los receptores a VIP nos permiten inferir que el péptido:

- ❧ En el animal cíclico modula de manera asimétrica la secreción de testosterona, efecto dado por la diferente sensibilidad de cada ovario al péptido.
- ❧ El VIP modula de manera estimulante la secreción de DA ovárica.
- ❧ En el modelo del animal con SOPQ, el VIP modula de manera estimulante la secreción de progesterona.
- ❧ En el modelo de la rata con SOPQ, la secreción de testosterona y estradiol es regulada de manera inhibitoria por el VIP, efecto que es modulado por la NA.
- ❧ En el modelo del animal con SOPQ, el VIP modula de manera asimétrica la secreción de serotonina y noradrenalina ovárica.

## Referencias Bibliográficas

- ❧ Abe H, Engler D, Molitch ME, Bollinger-Gruber J, Reichlin S. (1985) "Vasoactive intestinal peptide is a physiologic mediator of prolactin release in the rat". *Endocrinology* 116:1383.
- ❧ Ahmed CE, Dees WL, Ojeda SR. (1986) "The Inmature Rat Ovary is Innervated by Vasoactive Intestinal (VIP)-Containing Fibers and Responds to VIP with Steroid Secretion". *Endocrinology*. 118: 1682 – 1689.
- ❧ Alvarez DA, Pérez EH, Martín HT, Quincosa TJ, Sanchez PA. (2009) "Fisiología animal aplicada". Ed Universidad Atioquia. Colombia. Pp. 104 – 107.
- ❧ Anesetti G, Lombide P, Chávez-Genaro R. (2009) "Prepubertal estrogen exposure modifies neurotrophin receptor expression in celiac neurons and alters ovarian innervation". *Automic Neuroscience: Basic and Clinical*. 145: 35 – 43.
- ❧ Arenas B, Lailla V, Xercavins M. (2009) "Fundamentos de Ginecología". Ed. Médica Panamericana, España. pp 71 – 80.
- ❧ Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar M, Futterweit W, Janssen E, Legro R, Norman J, Taylor A, Witchel F. (2006) "POSITION STATEMENT: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an androgen excess society guideline". *Clin. Endocrinol. Metab.* 91:4237 – 4246.
- ❧ Baljet B, Drukker J. (1980) "The extrinsic innervation of the pelvic organs in the female rat". *Acta Anat.* 107: 241 – 267.
- ❧ Barco AI, Flores A, Chavira R, Damián-Matsumara P, Domínguez R, Cruz ME. (2003) "Asymmetric effects of acute hemiovariectomy on steroid hormone secretion by the in situ ovary". *Endocrine*. 21(3): 209 – 215.
- ❧ Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE. (1993) "Ovarian steroidal response to gonadotropins and  $\beta$ -adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation". *Endocrinology*. 133: 2696 -2703.

## Referencias Bibliográficas

- ☞ Berne RM, Levy MN. (2006) "Fisiología". 4ª edición. Ed. Elsevier-Science, Madrid, España. Cap. 51.
- ☞ Bódis J, Hortmann G, Türok A, Bugnar Z, Tinneberg HR, Cledon P, Hunf V. (1993) "Relationship between the monoamine and gonadotropin content in follicular fluid of preovulatory graafian follicles after superovulation treatment". *Experimental and Clinical Endocrinology*. 101: 178 – 182.
- ☞ Brawer JR, Munoz M, Farookhi R. (1986) "Development of the Polycystic Ovarian, Condition (PCO) in the Estradiol Valerate- Treated Rat". *Biology of Reproduction*. 35: 647-655.
- ☞ Brawer JR, Naftolin F, Martín J, Sonnenschein C. (1978) "Effects of a single injection of estradiol valerate on the hypothalamic arcuate nucleus and on reproductive function in the female rat". *Endocrinology*. 107: 274 – 279.
- ☞ Bronzi D, Vega A, Delgado SM, Casais M, Rastrilla AM, Sosa ZY. (2011) "Modulation of the noradrenergic activity index by neural stimulus and its participation in ovarian androstenedione release during the luteal phase". *Fertility and Sterility*. 95: 1211 – 1216.
- ☞ Carlson BM. (2009) "Embriología humana y biología del desarrollo". 4ª edición, Editorial Elsevier, Ámsterdam. Cap 1, 16. Pp. 416 – 428.
- ☞ Chávez R, Carrizosa L, Domínguez R. (1991) "Effects of superior ovarian nerve section on spontaneous and induced ovulation in adult rats". *Med. Sci Res*. 19: 41 – 42.
- ☞ Chávez R, Domínguez R. (1994) "Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of compensatory ovarian hypertrophy: the effects of its section performed on each day of the oestrous cycle". *Journal of Endocrinology*. 140: 197 – 201.
- ☞ Chen N, Li Y, Wang W, Ma Y, Yang D, Zhang Q. (2013) "Vasoactive intestinal peptide can promote the development of neonatal rat primordial follicles during in vitro culture". *Biology of reproduction. China*. 88(1): 1-8.

## Referencias Bibliográficas

- ☞ Clausell DE, y Soliman KF. (1978) "Ovarian serotonin content in relation to ovulation". *Experientia*. 34: 410 – 411.
- ☞ Cruz G, Barra R, González D, Sotomayor-Zárate R, Lara HE. (2012) "Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats". *Fertility and Sterility* 98: 1283 – 1290.
- ☞ D'Albora H, Lombide P, Ojeda SR. (2000) "Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study". *Cell Tissue Res*. 300: 47 – 56.
- ☞ Davoren JB, Hsueh AJW. (1985) "Vasoactive Intestinal Peptide: a novel stimulator of Steroidogenesis by Cultured Rat Granulosa Cells". *Biology of Reproduction*. 33: 37 – 52.
- ☞ Dees WL, Ahmed CE, Ojeda SR. (1986) "Substance P and vasoactive intestinal peptide-containing fibers reach the ovary by independent routes". *Endocrinology*. 119: 638 – 641.
- ☞ Dees WL, Hiney JK, Schulte TD, Mayerhofer A, Danilchik M, Dissen GA, Ojeda SR. (1995) The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factors receptors. *Endocrinology*. 136:5760-5768.
- ☞ Delgado SM, Escudero CG, Casais M, Gordillo M, Anzulovich AC, Sosa Z y Rastrilla AM. (2010) "Ovary physiology in the first oestral cycle: influence of noradrenergic and cholinergic neural stimuli from coeliac ganglion". *Steroids*. 75:685 – 694.
- ☞ Devlin M. (2000) "Bioquímica libro de texto con aplicaciones clínicas". 3ª Edición. Ed. Reverté. España. pp. 960 - 985.
- ☞ Dissen G, Ojeda SR. (1999) "Ovarian Innervation". *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press. USA. 3:583 – 589.
- ☞ Domínguez R, Chávez R, Cruz ME. (1991) "La regulación del crecimiento y del desarrollo de folículo ovárico". En: *Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción*. Miguel Ángel Porrúa. México. pp. 161-192.
- ☞ Domínguez R, Cruz-Morales SE. (2011) "The ovarian innervation participates in the regulation of ovarian functions". *Endocrinology Metabolic Syndrome*. S4:001.

## Referencias Bibliográficas

- ☞ Dyer C, Erickson G. (1985) "Norepinephrine amplifies human chorionic gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by ovarian theca-interstitial cells". *Endocrinology*. 116: 1645 – 1652.
- ☞ Ferron A, Siggins R, Bloom F. (1985) "Vasoactive intestinal polypeptide acts synergistically with norepinephrine to depress spontaneous discharge rate in cerebral cortical neurons". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82: 8810-8812.
- ☞ Flaws JA, Desanti A, Tilly KI, Javid RO, Kugu K, Johnson AL, Hirshfield AN, Tilly JL- (1995) "Vasoactive intestinal peptide-mediated suppression of apoptosis in the ovary: potential mechanisms of action and evidence of a conserved antiatretogenic role through evolution". *Endocrinology*. 136: 4351 – 4359.
- ☞ Flores A, Meléndez G, Palafox MT, Rodríguez JO, Barco AL, Chavira R, Domínguez R, Cruz ME. (2005) "The participation of the cholinergic system in regulating progesterone secretion through the ovarian-adrenal crosstalk varies along the estrous cycle". *Endocrine*. 28: 145 – 151.
- ☞ Flores A, Rodríguez JO, Palafox MT, Meléndez G, Barco AL, Chavira R, Cruz ME, Domínguez R. (2006) "The acute asymmetric effects of hemiovariectomy on testosterone secretion vary along the estrous cycle. The participation of the cholinergic system". *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1: 4 – 11.
- ☞ Flores A, Gallegos AL, Velasco J, Mendoza FD, Montiel C, Everardo PM, Cruz ME, Domínguez R, (2008) "The Acute Effects of Bilateral Ovariectomy or Adrenalectomy on Progesterone, Testosterone and Estradiol serum levels depend on the surgical approach and the day of the estrous cycle when they are performed". *Reproductive Biology and Endocrinology*. 6:48.
- ☞ Franks, S. (1995) "Polycystic ovary syndrome". *Rev. Med*. Número 333. Pp. 853-8561.
- ☞ Fuentes XA, Castiñeiras ML, Queraltó JM. (1998) "Bioquímica clínica y patología molecular vol II". 2da Ed. Reverté. Barcelona. 717-718.
- ☞ Gal B, Gal I. (2007) "Bases de la Fisiología". 2ª Edición. Ed. Tébar. Madrid, España.

## Referencias Bibliográficas

- Garraza MH, Aguado LI, De Bortoli MA. (2004) "In vitro effect of neuropeptides on ovary or celiac ganglion affects the release of progesterone from ovaries in the rat". *Med Sci Monit.* 10(12): 440 – 446.
- Gartner P, Hiatt I. (2007) "Texto Atlas de Histología". 3ª Edición, Ed. McGraw-Hill Interamericana, México.
- George FW, Ojeda SR. (1987) "Vasoactive intestinal peptide enhances aromatase activity in the neonatal rat ovary before development of primary follicles or responsiveness to follicle-stimulating hormone". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 5803 – 5807.
- Gerhold M, Horvath L, Freeman E. (2001) "Vasoactive intestinal peptide fibers innervate neuroendocrine dopaminergic neurons" Elsevier Science, USA. 919:48-56.
- Gilbert S, y Shyamal KR. (1994) "Follicular development and its control". En Knobil E, y Neil JD. (1994) *The Physiology of reproduction.* . 2ª. Edición. Raven Press. New York. Cap 12. Pp 629 – 702.
- González J, Lailla V, González F, González B. (2006) "Obstetricia". Ed. Masson. Barcelona España. pp 40 - 48.
- Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, Azziz R. (2011) "Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis". *Nat. Rev. Endocrinology.* 7: 219 – 231.
- Gore-Langton RE, Armstrong DT. (1994) "Follicular steroidogenesis and its control". En: Knobil E, Neill JD. (Eds) *The Physiology of Reproduction.* 2a Edition. Editorial Raven Press. New York. Vol. 2 Cap. 11. Pp. 571-611.
- Gozes I, Mccune Sk, Jacobson L, Warren D, Moody TW, Fridkin M, Brenneman DE. (1991) "An antagonist to vasoactive intestinal peptide affects cellular functions in the central nervous system". *The Journal of Pharmacology.* 257: 959-96.
- Gozes I, Meltzer E, Rubinrout S, Brenneman DE, Fridkin M. (1989) "Vasoactive intestinal peptide potentiates sexual behavior: inhibition by novel antagonist". *Endocrinology.* 125(6):2945-9.

## Referencias Bibliográficas

- ☞ Guyton AC, Hall JE. (2001) “Fisiología femenina antes de la gestación y hormonas femeninas” En: *Tratado de Fisiología Medica*. 10ª. Edición. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. México. Cap. 81. Pp 1117-1133.
- ☞ Heider U, Pedal I, Spanel-Borowski k. (2001) “Increase in nerve fibers and loss of mast cells in polycystic and postmenopausal ovaries”. *Reproductive Endocrinology*. 75: 1141-1147.
- ☞ Hernandez ER, Jiménez JL, Payne DW, Adashi EY. (1988) “Adrenergic regulation of ovarian androgen biosynthesis is mediated via  $\beta$ 2-adrenergic theca-interstitial cell recognition sites”. *Endocrinology*. 122:1592 – 1602.
- ☞ Hill MJ, Gozes I, Hill J, Fridkin M, Brenneman DE. (1991) “Vasoactive intestinal peptide antagonist retards the development of neonatal behaviors in the rat”. *Peptides*. 12: 187 – 192.
- ☞ Hill MJ, Mervis RF, Politi J, McCune SK, Gozes I, Fridkin M, Brenneman DE. (1994) “Blockade of VIP during Neonatal Development Induces Neuronal Damage and Increases VIP and VIP Receptors in Brain”. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 739:211-25.
- ☞ Hulshof SCJ, Dijkstra G, Vand Der Beek EM, Bevers MM, Figueiredo JR, Beckers JF, Van Den Hurk R. (1994) “Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal peptide and neuropeptide Y in the bovine ovary”. *Biology of Reproduction*. 50: 553 – 560.
- ☞ Johnson AL, Li Z, Jean A, Gibney A, Malamed S. (1994) “Vasoactive Intestinal peptide-induced expression of cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage 17 $\alpha$ -Hydroxylase enzyme activity in hen granulosa cells”. *Biology of reproduction USA* 51, 327 – 333.
- ☞ Kowalewski MP, Dyson MT, Boos A, Stocco MD. (2010) “Vasoactive intestinal peptide (VIP) - mediated expression and function of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in granulosa cells”. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 320: 93-103.



## Referencias Bibliográficas

- ☞ Krishna B. (2005) "Persistent estrus rat models of polycystic ovary disease: an update". *Fertility and Sterility*. 84:1228-1234.
- ☞ Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, Ojeda SR. (2000) "An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat". *Endocrinology*. 141: 1059 – 1072.
- ☞ Lara HE, Ferruz J, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR. (1993) "Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome". *Endocrinology*. 133: 2690 – 2695.
- ☞ Lara HE, McDonald JK, Ojeda SR. (1990) "Involvement of nerve growth factor in female sexual development". *Endocrinology*. 126: 364 – 375.
- ☞ Lawrence Jr. IE, Burden HW. (1980) "The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary". *The Anatomical Record*. 196: 51 – 59.
- ☞ Lehninger A, Cox M, Nelson L. (1993) "Principios de bioquímica". 2ª Edición, Ed. Omega. Barcelona, España. pp 817 - 837.
- ☞ Liu Y, Kasson BG, Dahl KD, Hsueh AJW. (1987) "Vasoactive intestinal peptide stimulates plasminogen activator activity by cultured rat granulosa cells and cumulus-oocyte complexes". *Peptides*. 8: 29 – 33.
- ☞ Lutz EM, Sheward WJ, West KM, Morrow JA, Fink G & Harmar AJ. (1993) "The VIP2 receptor: molecular characterization of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide". *FEBS Letters*. 334 3–8.
- ☞ Mahoney M, Ramanathan C, Smale L. (2007) "Tyrosine hydroxylase positive neurons and their contacts with vasoactive intestinal polypeptide-containing fibers in the hypothalamus of the diurnal murid rodent, *Arvicanthis niloticus*" *Journal of Chemical Neuroanatomy, USA*. 33: 131-139.
- ☞ Maliqueo M, Sun M, Johansson J, Benrick A, Labrie F, Svensson H, Lön M, Duleba AJ, Stener-Victorin E. (2012) "Continuous administration of a P450 aromatase inhibitor induces polycystic ovary syndrome with a metabolic and endocrine phenotype in female rats at adult age". *Endocrinology* 154: 434 – 445.

## Referencias Bibliográficas

- ☞ Manneras L, Cajander S, Holmang A, Seleskovic Z, Lysting T, Lonn M, Stener-Victorin E. (2007) "A new rat exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome". *Endocrinology*. 148 (8): 3781 – 3791.
- ☞ Matalliotakis I, Kourtis A, Koukoura O, Panidis D. (2006) "Polycystic ovary syndrome: etiology and pathogenesis". *Rev. Arch gynecol obstet*. 274: 187-197.
- ☞ Mathews D, Andrews WW, Parker R, Ojeda SR. (1987) "A role for aromatizable androgens in female rat puberty". *Biology of reproduction*. 36: 836 – 843.
- ☞ Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR. (1997) "A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary" *Endocrinology*. 138: 3320 – 3329.
- ☞ Merino P, Schulln-Zeuthen C, Codner E. (2009) "Diagnostico del síndrome de ovario poliquístico: nuevos fenotipos, nuevas incognitas". *RevMed Chile*. 137: 1071 – 1080.
- ☞ Morales L, Chávez R, Ayala ME, Domínguez R. (1998) "Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in prepubertal rats on the ovulatory response to gonadotropin administration". *J Endocrinology* 158: 213-219.
- ☞ Morales-Ledesma L, Linares R, Rosas G, Morán C, Chavira R, Cárdenas M, Domínguez R. (2010) "Unilateral sectioning of the superior ovarian nerve of rats with polycystic ovarian syndrome restores ovulation in the innervated ovary". *Reproductive Biology and Endocrinology*. 8:99.
- ☞ Morán, VC. (2006) "Síndrome de ovario poliquístico. *Rev. Ginecología y reproducción humana*. En: especialistas en ginecología y obstetricia". México. Artículo 35. Pág. 313-318.
- ☞ Navarrete MI. (2014) "Modificación de las funciones ováricas en el animal con síndrome del ovario poliquístico, inducido por la administración de valerato de estradiol o la exposición a estrés por frio" Tesis de Licenciatura. UNAM. FES Zaragoza.

## Referencias Bibliográficas

- Nowak Z, Katarzyna K. (2002) "Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide-stimulated cyclic AMP synthesis in rat cerebral cortical slices". *Journal of Molecular Neuroscience, Polonia.* 18:47-52.
- Parra C, Fiedler JL, Luna SL, Greiner M, Padmanabhan V, Lara HE. (2007) "Participation of vasoactive intestinal polypeptide in ovarian steroids production during the rat estrous cycle and in the development of estradiol valerate-induced polycystic ovary". *Reproduction.* 133: 147-154.
- Rosa-E-Silva A, Guimaraes MA, Padmanabhan V, Lara HE. (2003) "Prepubertal administration of valerate disrupts cyclicity and leads to cystic ovarian morphology during adult life in the rat: role of sympathetic innervation". *Endocrinology.* 144: 4289 – 4297.
- Rosas GG. (2011) "Participación del Péptido Intestinal Vasoactivo en la Regulación de la Ovulación y la Secreción Hormonal. La Rata con Síndrome del Ovario Poliquístico como Modelo de Estudio" Tesis de Maestría. UNAM. FES Zaragoza.
- Ross HM, Pawlina W. (2007) "Histología texto y atlas color con biología celular y molecular", 5ª Edición, Ed. Medica Panamericana, México D.F., pp 830 – 846.
- Said SI, (1980) "VIP: isolation, distribution, biological actions, structure-function relationships and possible functions". In: *Gastrointestinal Hormones* (GBJ Glass, ed.). Raven Press, New York, pp 245 – 273.
- Said SI, (1982) "Vasoactive peptides in the lung, with special reference to vasoactive intestinal peptide". *Exp Lung Res.* 3(3-4):343-8.
- Said SI, Mutt V. (1970) "Polypeptide with broad biological activity: isolation from small Intestine". *Science.* 169: 1217 – 1218.
- Sánchez Criado JE. (1999) "Fisiología del ovario". En: Tresguerres JA. *Fisiología Humana.* 2ª. Edición. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid, España. Cap 75. Pp. 1036-1048.
- Schmidt G, Jörgensen J, Kannisto P, Liedberg F, Ottesen B, Owman Ch. (1990) "Vasoactive intestinal polypeptide in the PMSG-primed immature rat ovary and its

- effects on ovulation in the isolated rat ovary perfused in vitro". *J. Reprod. Fert.* 90: 465 – 472.
- ❧ Semenova II. (1969) "Adrenergic innervation of the ovaries in the presence of the Stein-Leventhal syndrome". *Vestnik Akademi Meditsinskikh Nauk SSSR.* 24: 83 – 88.
- ❧ Shultea TD, Dess WL, Ojeda SR. (1992) "Postnatal development of sympathetic and sensory innervation of the rhesus monkey ovary". *Biol. Reprod.* 47: 760 – 767.
- ❧ Singh KB. (2005) "Persistent estrus rat models of polycystic ovary disease an update". *Fertility and Sterility.* 84: 1228 -1234.
- ❧ Sosa Z, Delgado M, Casais M, Aguado L, Rastrilla AM. (2004) "Release of ovarian progesterone during the rat oestrous cycle by ganglionic cholinergic influence. The role of norepinephrine". *Journal of steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 91: 179 – 184.
- ❧ Sosa ZY, Casais M, Rastrilla AM, Aguado L. (2000) "Adrenergic influences on coeliac ganglion affect the release of progesterone from cycling ovaries characterization of an in vitro system". *Journal of Endocrinology.* 166: 307 – 318.
- ❧ Sotomayor-Zárate R, Dorfman M, Paredes A, Lara HE. (2008) "Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat". *Biology of reproduction.* 78: 673 – 680.
- ❧ Törnell J, Carlsson B, Hillensjö T. (1988) "Vasoactive intestinal peptide stimulates oocyte maturation, steroidogenesis, and cyclic adenosine 3',5' – monophosphate production in isolated preovulatory rat follicles" *Biology of Reproduction.* 39(2): 213 – 20.
- ❧ Trzeciak WH, Ahmed CE, Simpson ER, Ojeda SR. (1986) "Vasoactive intestinal peptide induces the synthesis of the cholesterol side-chain cleavage enzyme complex in cultured rat ovarian granulosa cells". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 7490 – 7494.
- ❧ Upledger JE, Vredevoogd JD. (2004) "Terapia craneosacra I". Ed. Paidotribo. Barcelona. 130 – 132.

## Referencias Bibliográficas

- ☞ Vaccari S, Barberi M, Teti A, Stefanini M, Canipari R. (2006) "Characterization and expression of different pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide receptors in rat ovarian follicles". *Journal of Endocrinology*. 191: 287 – 299.
- ☞ Van Voorhis BJ. (1999) "Follicular Development". En: Knobil E, Neill JD. (Eds) *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press. San Diego. Vol. 2. Pp. 389-395.
- ☞ Vanderhyden BC, Rouleau A, Armstrong DT. (1986) "Effect of removal of the Ovarian Bursa of the Rat on Infundibular Retrieval and subsequent Development of Ovulated Oocytes". *J Reprod Fertil*. 77: 393 – 399.
- ☞ Vega A, Daneri C, Anesetti G, Cabrera R, Sosa Z, Rastrilla AM. (2012) "Involvement of the oestrogenic receptors in superior mesenteric ganglion on the ovarian steroidogenesis in rat". *Reproduction*. 143: 183- 193.
- ☞ Vega A, Sosa Z, Delgado S, Casais M, Rastrilla AM. (2010) "Involvement of ganglionic cholinergic receptors on the steroidogenesis in the luteal phase in rat" *Journal of steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 120: 45 – 52.
- ☞ Welsch U., Sobotta J., (2008), "Histología", Ed. Medica Panamericana, Madrid España, pp. 501 - 511.
- ☞ Yen SSC. (2001) "Síndrome del Ovario Poliquístico: Anovulación Crónica Hiperandrogénica". En: Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RL. (Eds.) *Endocrinología de la Reproducción*. 4ª edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. Cap. 17. Pp. 465-510.
- ☞ Zhan X, Zhang L, Huo S, Wang J, Sheng Cui S. (2010). "Neonatal superior ovarian nerve transection inhibits follicle development by enhancing follicular atresia and suppressing granulosa cell proliferation in rats". *Reproduction, Fertility and Development*. 22: 1148–1158.