



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

“EFECTOS DE LA SECCIÓN DEL NERVIO OVÁRICO
SUPERIOR EN RATAS ADULTAS CON SÍNDROME DE
OVARIO POLIQUÍSTICO, INDUCIDO CON VALERATO
DE ESTRADIOL EN DISTINTOS DÍAS DEL CICLO
ESTRAL, SOBRE LA RESPUESTA OVÁRICA”.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA

RICARDO TREJO SERNA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA

MÉXICO, D. F.

Noviembre, 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

“Efectos de la sección del nervio ovárico superior en ratas adultas con síndrome de ovario poliquístico, inducido con valerato de estradiol en distintos días del ciclo estral, sobre la respuesta ovárica”.

Tesis presentada por: Ricardo Trejo Serna.

Directora de Tesis: Dra. Leticia Morales Ledesma

**Realizada en el Laboratorio de Fisiología Reproductiva de la Unidad de
Investigación en Biología de la Reproducción.**

FES-ZARAGOZA, UNAM

**La realización de esta tesis contó con el apoyo financiero de
UNAM-DGAPA-PAPIIT clave IN211813**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.**

Comunico a usted que el alumno **TREJO SERNA RICARDO**, con número de cuenta **098173745**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **03 de noviembre de 2015** a las **09:00 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** Biól. CARLOS MARTÍNEZ MONTOYA
- SUPLENTE** M. en IBSH. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ

[Handwritten signatures of the jury members]

El título de la tesis que presenta es: **Efectos de la sección del nervio ovárico superior en ratas adultas con síndrome de ovario poliquístico, inducido con valerato de estradiol en distintos días del ciclo estral, sobre la respuesta ovárica.**

Opción de titulación: Tesis.

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

México, D.F., 24 de septiembre 2015

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ

DIRECTOR

ZARAGOZA

DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

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

Dedicado

A mis hijos Bere y Canek ustedes son mi orgullo más grande, mi tesoro más preciado, mi más grande proyecto y el motivo que me impulsa todos los días, los amo mis niños.

A mi hermosa Paty, caminar a tu lado ha sido la bendición más grande que he tenido, espero que sigamos caminando juntos aún después del ocaso. ¡Te amo!

A Julia Adela Serna Chávez, mi mami, por todo el apoyo que siempre me has dado, por enseñarme a hablar con la verdad en la boca y el corazón en la mano. Porque sé, que siempre puedo contar contigo. Gracias Mami.

A Ricardo Trejo Becerril, mi Pa, por el apoyo que siempre me has brindado en situaciones especiales. Tu esfuerzo me ha enseñado a ser perseverante. Gracias Pa.

A mi hermano Fabián y mi hermanita Dulce, a mi primo Mario, a Remy, a Jonás, a Jesús Candia L., a Patricia García A. y a todas las personas que de alguna manera me apoyaron durante esta etapa. Gracias Familia.

Agradecimientos

A Dios, por ponerme, no en el camino que quiero, si no en el que necesito. Gracias Señor.

A la UNAM y a la FES-Zaragoza, por el orgullo de ser azul y oro.

A los miembros del jurado:

Dra. María Esther Cruz Beltrán.

Dra. Leticia Morales Ledesma.

Biól. Carlos Martínez Montoya.

M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez.

Por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, enriqueciéndolo con su experiencia.

Muy especialmente a la Dra. Leticia Morales Ledesma mi asesora de tesis, por la oportunidad que me dio, al permitirme ser parte de su equipo de trabajo, pero principalmente por la confianza que brindó, el tiempo y su valiosa amistad. Sin duda, es un ejemplo a seguir para muchos profesionales y colegas, sé que su labor aún no termina y que le dará mucho más a la comunidad universitaria y a este país. Gracias Doctora Lety.

A la Dra. Adriana y al Dr. Román, así como a todo el personal técnico del bioterio de la FES-Zaragoza, por el cuidado de los animales utilizados para la elaboración de este trabajo.

A los doctores Roberto Chavira y Mario Cárdenas por su colaboración en las mediciones hormonales del presente trabajo.

Al D.I Ricardo Trejo Becerril, por la realización de las figuras de esta tesis.

A mis compañeros durante la licenciatura principalmente a la Bióloga Ana Margarita Pichardo Ramírez por el compañerismo, amistad y alegría que me brindó durante la carrera.

A cada uno de mis compañeros del laboratorio 7 de la UMIEZ, principalmente a Rosa, Gaby, Deyra, Eli, Denisse, Juan, Dan, Andy y Azu, por el apoyo que me brindaron durante mi estancia en el laboratorio 7.

Contenido

Abreviaturas	i
Resumen	iii
Introducción.....	1
Marco Teórico.....	3
Funciones Ováricas.....	3
Estructura ovárica.....	4
Producción de hormonas.	6
Esteroidogénesis en el ovario.	8
Desarrollo folicular.	12
Regulación del desarrollo folicular.....	15
Ovulación.	17
Cuerpo lúteo.....	18
Sistema nervioso.	19
Inervación Ovárica.	22
Ciclo estral.....	25
Síndrome del Ovario Poliquístico.	27
Participación del sistema nervioso simpático en el SOPQ.	33
Planteamiento del problema.	36
Hipótesis.....	37
Objetivos	37
Método y diseño experimental.....	38
Resultados.	42
Experimento 1. Efecto de la administración de VE en los días del diestro 1, proestro o estro, sobre la respuesta ovulatoria.	42
Experimento 2. Efecto de la sección del NOS izquierdo en ratas tratadas con VH o VE en el diestro 1, proestro o estró, sobre la respuesta ovárica.	45
Experimento 3. Efecto de la sección derecha del NOS en ratas tratadas con VE en el	

diestro 1, proestro o estro, sobre la respuesta ovárica.	54
Experimento 4. Efecto de la sección bilateral del NOS en ratas tratadas con VE en el diestro 1, proestro o estro, sobre la respuesta ovárica.	64
Discusión	74
Conclusiones	87
Referencias.	88

Abreviaturas

Δ^4 :	Vía 4-en-3-oxo
Δ^5 :	Vía 5-ene-3 β -hidroxi
17β-HSD:	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
ACh:	Acetilcolina
BE:	Benzoato de estradiol
CGRP:	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
D1:	Diestro 1
DHEA:	Dehidroepiandrostediona
DHT:	Dihidrotestosterona
E:	Estro
FSH:	Hormona estimulante del folículo
GCMS:	Ganglio mesentérico superior
GnRH:	Hormona liberadora de gonadotropinas
hCG:	Gonadotropina coriónica humana
LH:	Hormona luteinizante
LHRH:	Hormona liberadora de LH
NA:	Noradrenalina
NGF:	Factor de crecimiento neural
NOS:	Nervio ovárico superior
NPY:	Neuropéptido-Y
OSB:	Operación simulada bilateral

OSD:	Operación simulada derecha
OSI:	Operación simulada izquierda
P:	Proestro
P₄:	Progesterona
P450_{17α}:	17α-hidroxilasa/17,20 liasa
P450_{arom}:	CYP 19 P450-aromatasa
p75 NGFR:	Receptor de baja afinidad del NGF
PNO:	Plexo nervioso ovárico
PT:	Propionato de testosterona
SB:	Sección bilateral del nervio ovárico
SNA:	Sistema nervioso autónomo
SNC:	Sistema nervioso central
SNOD:	Sección del nervio ovárico derecho
SNOI:	Sección del nervio ovárico izquierdo
SNP:	Sistema nervioso periférico
SNS:	Sistema nervioso simpático
SOPQ:	Síndrome de ovario poliquístico
SP:	Sustancia P
StAR:	Proteína reguladora de la esteroideogénesis aguda
TA:	Testigo absoluto
VE:	Valerato de estradiol
VH:	Vehículo
VIP:	Péptido intestinal vasoactivo

Resumen

El síndrome del ovario poliquístico (SOPQ) es un trastorno heterogéneo, con alteraciones endocrinas y metabólicas, afecta del 4 al 10% de las mujeres en edad reproductiva en diferentes poblaciones, por lo que se considera el trastorno reproductivo más frecuente de la mujer en edad reproductiva. El SOPQ se manifiesta clínicamente por una combinación de hiperandrogenismo con anovulación crónica y una inadecuada secreción de gonadotrofinas destacando altas concentraciones de hormona luteinizante (LH) y aumento de la relación LH-hormona folículo estimulante (FSH). Tanto en la mujer como en la rata se ha sugerido que la hiperactivación de los nervios simpáticos que llegan al ovario participa en el desarrollo y mantenimiento del ovario poliquístico. En la rata se utiliza la administración del valerato de estradiol (VE) para estimular al sistema nervioso periférico que inerva al ovario e inducir el SOPQ. La sección bilateral del nervio ovárico superior (NOS), conduce a la restauración del ciclo estral y recuperación de las funciones ováricas.

En el presente estudio, la administración de VE en diferentes días del ciclo estral condujo a una disminución de la proporción de animales ovulantes (TA: 100% vs D1+VE: 72%; P+VE: 58% y E+VE: 37%, $*P<0.05$ vs TA prueba de χ^2) y ovocitos liberados (TA: 8.83 ± 0.7 vs D1+VE: 4.75 ± 1.03 y E+VE: 4.33 ± 1.76 $*P<0.05$ vs TA prueba de U de Mann-Whitney).

Las concentraciones de FSH disminuyeron en las hembras inyectadas en los días del diestro 1 o proestro (TA: 11.25 ± 0.38 ng/ml vs D+VE: 2.4 ± 0.48 ng/ml; P+VE: 6.27 ± 0.19 ng/ml $P<0.05$ prueba de ANDEVA), mientras que las concentraciones de LH solo incrementan en las hembras tratadas en el día del proestro (TA: 0.14 ± 0.012 ng/ml vs P+VE 0.21 ± 0.03 ng/ml $P<0.05$ vs TA prueba de prueba de ANDEVA).

En el grupo tratado con VE en el día del estro, la sección bilateral del NOS, incrementó la tasa ovulatoria del ovario derecho respecto a su testigo con VE. En los grupos tratados

con VE en los días del diestro 1 o estro sometidos a la sección bilateral del NOS la proporción ovulatoria fue similar a sus grupos tratados con VE sin ninguna cirugía.

En las hembras tratadas con VE y sometidas a la sección bilateral del NOS, la concentración de gonadotropinas fue similar a sus testigos sin cirugía.

Los resultados del presente estudio nos permiten sugerir que el SOPQ se desarrolla independientemente del día del ciclo estral en el que se administre el VE, en las hembras tratadas con VE en los días del proestro o estro, la falta de la información neural aportada por el ambos nervios del NOS parece no tener una influencia en los mecanismos que culminan con la ovulación. Por último, el desarrollo y mantenimiento del SOPQ no parece depender de la concentración plasmática de gonadotropinas.

Introducción

La información neural que llega al ovario, principalmente la de naturaleza catecolaminérgica y peptidérgica, participa en la modulación de la esteroidogénesis (Adashi y col., 1981; Aguado y col, 1982), el inicio del desarrollo folicular (Mayerhofer, 2003; Lara y col, 1990b; Curri y col, 1984) y la liberación de un óvulo viable (Dissen y Ojeda, 1999).

La correcta función del ovario garantiza la producción de hormonas y de gametos sanos para la reproducción (Tortora y Derrickson 2006; Yen, 2001). Estas funciones son reguladas a través del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Sánchez, 1999).

La actividad del ovario varía a lo largo del ciclo ovárico (Galas, 2012). Para que exista un ciclo normal se requieren de varios factores, entre ellos una liberación pulsátil y periódica de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) (Kably, 2006) y la liberación preovulatoria de la hormona estimulante del folículo (FSH) y de la hormona luteinizante (LH), estimulada por la caída brusca de los estrógenos (Halvorson, 2001). Por lo que el control del ciclo ovárico es en parte regulado por el propio ovario.

Existen dos tipos de ciclos ováricos en los mamíferos, el estral y el menstrual, estos comparten características pero a su vez tiene cada uno características propias (Sánchez, 1999). Alteraciones neuroendocrinas pueden ocasionar una disfunción de estos ciclos ocasionando en muchos casos patologías que pueden llevar a la anovulación y como consecuencia de ésta la infertilidad (Moran-Villota, 2006; Sánchez, 1999).

El síndrome del ovario poliquístico (SOPQ) es un desorden heterogéneo, endócrino-metabólico y ha sido reconocido como la principal causa de infertilidad afectando del 4 al 10% de las mujeres en edad reproductiva. El SOPQ se manifiesta clínicamente por una combinación de hiperandrogenismo con anovulación crónica y un aumento de la relación LH- FSH (Moran-Villota, 2006; Lara y col., 2002; Yen 2001).

La etiología del SOPQ no se conoce con certeza (Discacciati 2007; Stener-Victorin y col. 2005). Existen varias hipótesis sobre el origen del SOPQ que incluyen desbalances hormonales, cambios epigenéticos en la vida fetal, anormalidades genéticas, estilo de vida y factores ambientales (Pascuali y col., 2011).

Para el estudio de esta patología, desde la década de los 60's se han realizado varios estudios utilizando modelos animales, entre los más empleados están los roedores que ofrecen diversas ventajas como: antecedentes genéticos estables, fácil manejo y mantenimiento, ciclos reproductivos y generaciones cortas y viabilidad para manipulación genética (Walters, 2012).

Muchas de las características presentes en la mujer con SOPQ están asociadas con una sobre activación crónica del sistema nervioso simpático (SNS), lo que lleva a especular sobre su participación en la patogénesis del SOPQ (Lansdown, 2012). En la mujer con SOPQ se ha reportado que el ovario presenta una mayor densidad en el contenido de fibras catecolaminérgicas (Stener-Victorin y col., 2004) y que esta inervación simpática está acoplada a la secreción de hormonas esteroides (Lara y col., 2001).

En la rata se puede inducir el síndrome de ovario poliquístico (SOPQ) por la administración de una dosis de valerato de estradiol (VE) que resulta en la estimulación del sistema nervioso periférico que inerva al ovario (Barria y col., 1993).

Por los antecedentes antes descritos fue de interés del presente estudio analizar en la rata adulta, la participación de la inervación simpática en el desarrollo del SOPQ y si esta varía en función del día del ciclo estral.

Marco Teórico

Funciones Ováricas

Los ovarios, son glándulas pares, sus funciones son (Tortora y Derrickson 2006; Yen, 2001):

- Producción de gametos viables para la reproducción.
- Producción de hormonas esteroides y proteicas como inhibina, activina y relaxina.

En la mujer, los ovarios uno a cada lado del útero, descienden hacia el borde de la porción superior de la cavidad pelviana durante el tercer mes de desarrollo. Varios ligamentos los fijan en su posición. El ligamento ancho del útero, se une a los ovarios por un pliegue de una capa doble de peritoneo llamado mesoovario (Tortora y Derrickson, 2006; Tresguerres y Castillo, 2005). El ligamento propio del ovario fija los ovarios al útero y el ligamento suspensorio los fija a la pared pelviana (Tortora y Derrickson, 2006).

En la rata el ovario es fijado a través del ligamento suspensorio por el cual viaja el nervio ovárico superior (NOS) (Dissen y Ojeda, 1999).

El ovario presenta tres regiones distintas perfectamente estructuradas: una médula central, una corteza y el hilio interno en el punto de anclaje del ovario con el mesovario. Es en la corteza donde se van a localizar los folículos ováricos, cuya organización y componentes van a sufrir toda una serie de cambios coincidentes con el grado de diferenciación y desarrollo de los ovocitos contenidos en su interior. Estos cambios están íntimamente relacionados con la doble misión de los ovarios. Por un lado, serán los responsables de la secreción de las hormonas femeninas una vez transcurrida la pubertad y, por el otro, serán también los encargados de proporcionar los gametos femeninos, para su potencial fecundación (Tresguerres y Castillo, 2005).

Estructura ovárica

La mayoría de los vertebrados desarrollan un par de ovarios con excepción de algunas aves, reptiles y pocos mamíferos que solo tienen un ovario. Los ovarios son de los órganos más vascularizados. La arteria ovárica o arteria útero-ovárica surge de la aorta abdominal llegando al ovario por medio del mesovario. A través del hilio ingresa al ovario una rama de la arteria ovárica, nervios adrenérgicos y colinérgicos (Yao, 1999).

Aunque el tamaño de los ovarios varía, la estructura del ovario es similar entre los mamíferos (Yao, 1999).

Cada ovario puede dividirse en las siguientes partes (Tortora y Derrickson, 2006) (Fig. 1):

- El epitelio germinal, una capa de epitelio simple que cubre la superficie del ovario. La expresión epitelio germinal no es correcta debido a que éste no da origen a los óvulos; sin embargo al momento de denominarlo así, se creía que sí lo hacía.
- La túnica albugínea, una capa blanquecina de tejido conectivo denso irregular localizada inmediatamente por debajo del epitelio germinal.
- La corteza ovárica, la región al interior de la túnica albugínea. Está compuesta por folículos ováricos rodeados de tejido conectivo denso irregular con células musculares lisas dispersas.
- La médula ovárica se encuentra en el centro. El borde entre la corteza y la médula es impreciso; sin embargo, la médula se distingue por tener un tejido conectivo más laxo con vasos sanguíneos linfáticos y nervios.
- Los folículos ováricos se encuentran en la corteza y están compuestos por los ovocitos en sus distintos estadios de desarrollo, junto con las células que los rodean. Cuando las células son planas y forman una sola capa se les denomina células foliculares, durante el desarrollo cuando forman más capas se llaman

células de la granulosa.

El ovario está constituido por tres compartimentos funcionales diferentes:

- El compartimiento folicular o cortical: Donde se lleva a cabo el proceso de foliculogénesis (Sánchez, 1999).
- El compartimiento luteal: El cuerpo lúteo es una estructura glandular que ocupa el sitio del folículo roto. El cuerpo lúteo secreta grandes cantidades de progesterona (Neagle, 2006).
- El compartimiento intersticial: Se forma de las células de la teca de aquellos folículos que van a la atresia. En el estroma ovárico se encuentran cuatro clases principales de células intersticiales, que se clasifican por sus características y posición en el ovario en: primarias, tecales, secundaria e hiliares. En respuesta a la acción de la LH, la glándula intersticial secreta andrógenos, principalmente androstenediona y testosterona (Sánchez, 1999).

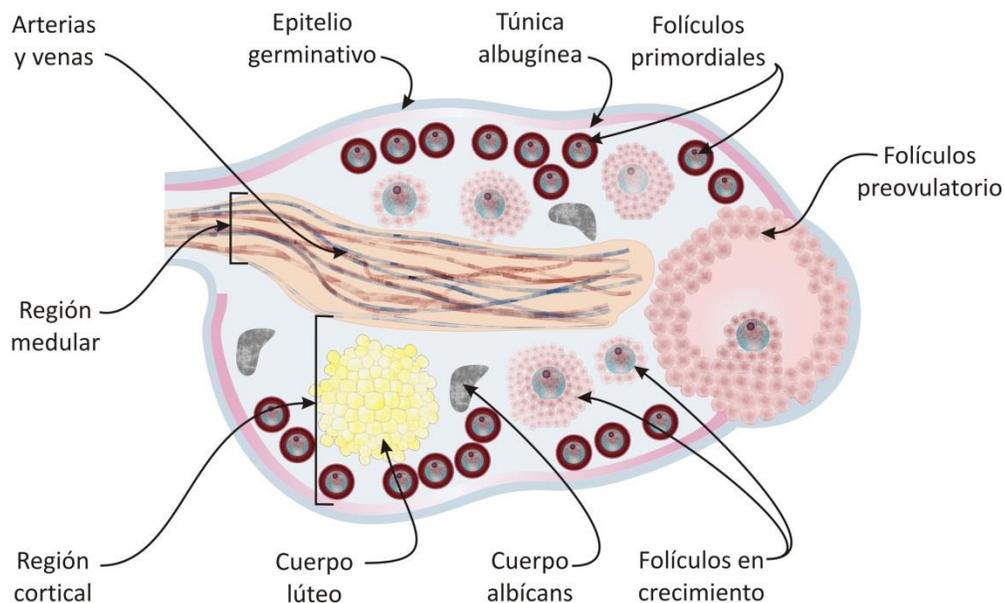


Fig. 1. Diagrama del ovario donde se muestran sus principales componentes: epitelio germinativo, túnica albugínea, región cortical y región medular. Tomado y modificado de Junqueira y Carneiro, 2005.

Producción de hormonas

Durante mucho tiempo se consideró a la hipófisis como la glándula endocrina maestra porque secreta varias hormonas que controlan otras glándulas endocrinas. Hoy sabemos que la hipófisis tiene a su vez un regulador, el hipotálamo. El hipotálamo es el sustrato anatómico a través del cual el sistema nervioso central (SNC) y sus aferencias regulan el funcionamiento de la hipófisis (Neagle, 2006; Tortora y Derrickson, 2006). El lóbulo anterior de la hipófisis o adenohipófisis secreta hormonas que regulan un amplio rango de funciones como el crecimiento o la reproducción (Tortora y Derrickson, 2006).

Las células gonadotrópicas presentes en la adenohipófisis secretan dos hormonas la FSH y la LH (Tortora y Derrickson, 2006).

La neurohormona hipotalámica que controla la producción de gonadotropinas hipofisarias fue llamada en una primera instancia hormona liberadora de LH (LHRH) y luego por su capacidad de liberar ambas gonadotropinas, fue renombrada como GnRH (Neagle, 2006; Domínguez, 1997).

La FSH estimula el crecimiento y la maduración folicular, actúa sobre las células de la granulosa para la liberación de estrógenos y genera en ella la adquisición de receptores para la LH y la capacidad de producir inhibina. La LH promueve la ovulación, en el cuerpo lúteo se encuentra la mayor concentración de receptores sobre los que actúa estimulando la producción de progesterona (Lombardi y La Spina, 2006).

El ovario produce hormonas esteroides y no esteroides. Las hormonas esteroides son solubles en grasa y generalmente derivan del colesterol, las hormonas no esteroides son solubles en agua, de naturaleza peptídica y funcionan como factores de crecimiento o son factores relacionados al crecimiento (Ying, 1999).

Las hormonas sexuales femeninas producidas en el ovario son fundamentalmente el *estradiol* y la *progesterona*, aunque también se producen pequeñas cantidades de

estrona, androstendiona, testosterona, 17 α -hidroxiprogesterona y varias hormonas no esteroideas, como la inhibina, la activina y la relaxina y algunos factores locales (Tresguerres y Castillo, 2005).

Las hormonas no esteroides son principalmente producidas en las células granulosas y las células del cuerpo lúteo (Ying, 1999). La inhibina es una sustancia peptídica heterodimérica con un peso de 32 kD constituida por dos cadenas α y β unidas por puentes disulfuro. En el ovario se produce fundamentalmente en las células de la granulosa, con lo cual los folículos más grandes producen más, pero también se sintetiza en las células luteínicas (Tresguerres y Castillo, 2005).

Los lugares principales de producción esteroidea en el ovario son fundamentalmente la granulosa, la teca y las células del cuerpo lúteo (Ying, 1999; Tresguerres y Castillo, 2005), que poseen el sistema enzimático requerido para la formación de hormonas esteroideas (Tresguerres y Castillo, 2005).

Los esteroides producidos en los testículos, en las glándulas suprarrenales o en la placenta, derivan del colesterol (Hinshelwood, 1999, Yao, 1999), que se obtiene a partir de tres fuentes principales: el colesterol que circula en la sangre en forma de lipoproteínas, el que se sintetiza *de novo* dentro del ovario a partir de acetilcoenzima A, y el que se libera de los ésteres del colesterol almacenados en las gotas lipídicas. La fuente principal de colesterol utilizado por el ovario deriva de la captación del colesterol lipoproteico, concretamente de las lipoproteínas de baja densidad o LDL (Tresguerres y Castillo, 2005).

Esteroidogénesis en el ovario

La producción de esteroides está en función del contenido de cuatro enzimas clave, que son el CYP desramificante, la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD), la 3 β -hidroxilasa y la CYP 19 P450-aromatasa (P450_{arom}). Estas enzimas catalizan la conversión de colesterol de 27 átomos de carbono a progestágenos de 21 átomos de carbono, de progestagenos a andrógenos de 19 átomos de carbono y finalmente, de andrógenos a estrógenos de 18 átomos de carbono (Brown, 1999, Van Voorhis, 1999, Tresguerres y Castillo, 2005) (Fig. 2.).

Tanto las células tecaes como las del cuerpo lúteo son capaces de sintetizar elevadas concentraciones de andrógenos, mientras que las células granulosas no son capaces de ello. El último paso para la biosíntesis de los estrógenos es la aromatización del anillo A de los andrógenos utilizando la enzima CYP 19 aromatasa, que está presente en grandes cantidades en las células granulosas (Tresguerres y Castillo, 2005).

En la mayoría de mamíferos, a excepción del cerdo y el mono Rhesus, las células de la teca carecen de la enzima aromatasa. Sin embargo, la actividad de esta enzima en las células tecaes de estas dos especies es mucho menor que en las células granulosas y no influyen significativamente en las concentraciones de estradiol (Galas, 2012).

Aun es aceptada la teoría que supone la necesidad de interacción entre las células de la teca interna y las de la granulosa para conseguir la biosíntesis de estrógenos. Las células tecaes, con suficiente vascularización y dotación de receptores para LDL, disponen de los sistemas enzimáticos capaces de transformar la pregnenolona en andrógenos en respuesta a la LH, pero no tienen las enzimas para llegar a la biosíntesis de estradiol. Por su parte las células de la granulosa en respuesta a la acción de la FSH son capaces de sintetizar elevadas cantidades de estrógenos a través de la vía P450c17, siempre y cuando los andrógenos precursores les sean suministrados por las células

tecales. De este modo la producción de hormonas esteroides depende de dos células (tecales y granulosa) y dos gonadotropinas (LH y FSH). Esta es la teoría de la dos células dos gonadotropinas (Tresguerres y Castillo, 2005; Yeh, 2001; Van Voorhis, 1999) Fig. 3.

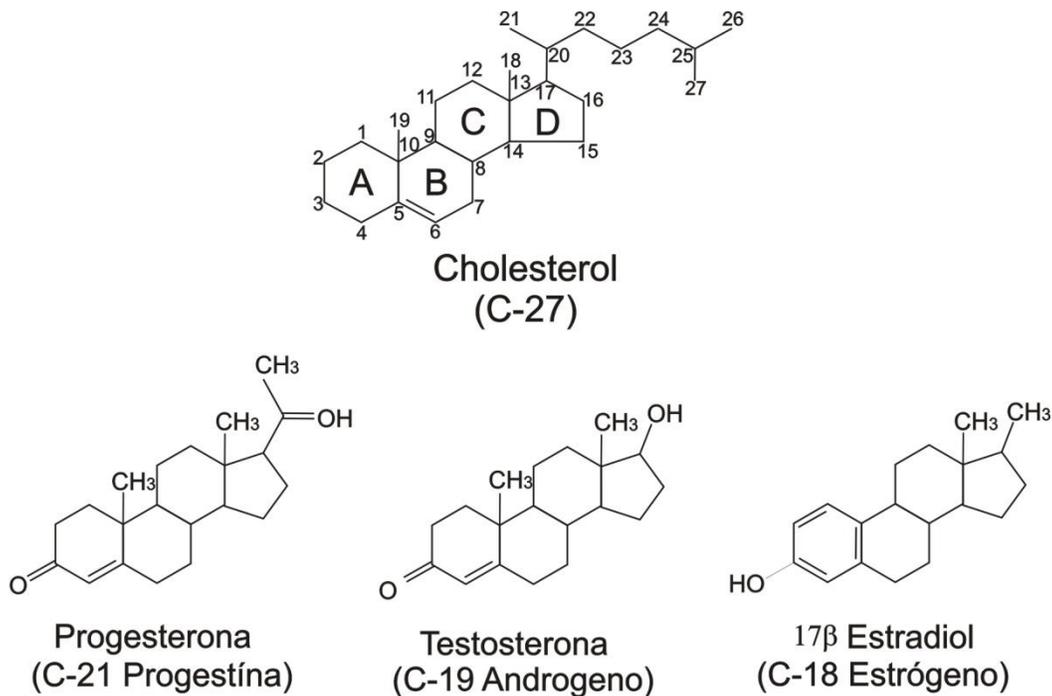


Fig. 2. Estructura química del colesterol con 27 átomos de carbono, Progesterona con 21 átomos de carbono y 17-β estradiol con 18 átomos de carbono, testosterona 19 átomos de carbono (abajo centro). Tomado y modificado de Smith, 1999.

La esteroidogénesis se lleva a cabo en la mitocondria, la transferencia mitocondrial de colesterol es llevada a cabo por la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) (O' Malley, 2001; Hinshelwood, 1999).

El primer paso para la esteroidogénesis es la conversión de colesterol a pregnenolona por la escisión del enlace del carbón 20 y 22 resultando una molécula de pregnenolona. Esta reacción ocurre en la mitocondria de las células foliculares y se cree que es el paso limitante para la esteroidogénesis. La enzima que cataliza esta reacción es la P450_{scc} (Van Voorhis, 1999; Hinshelwood, 1999; Brown, 1999).

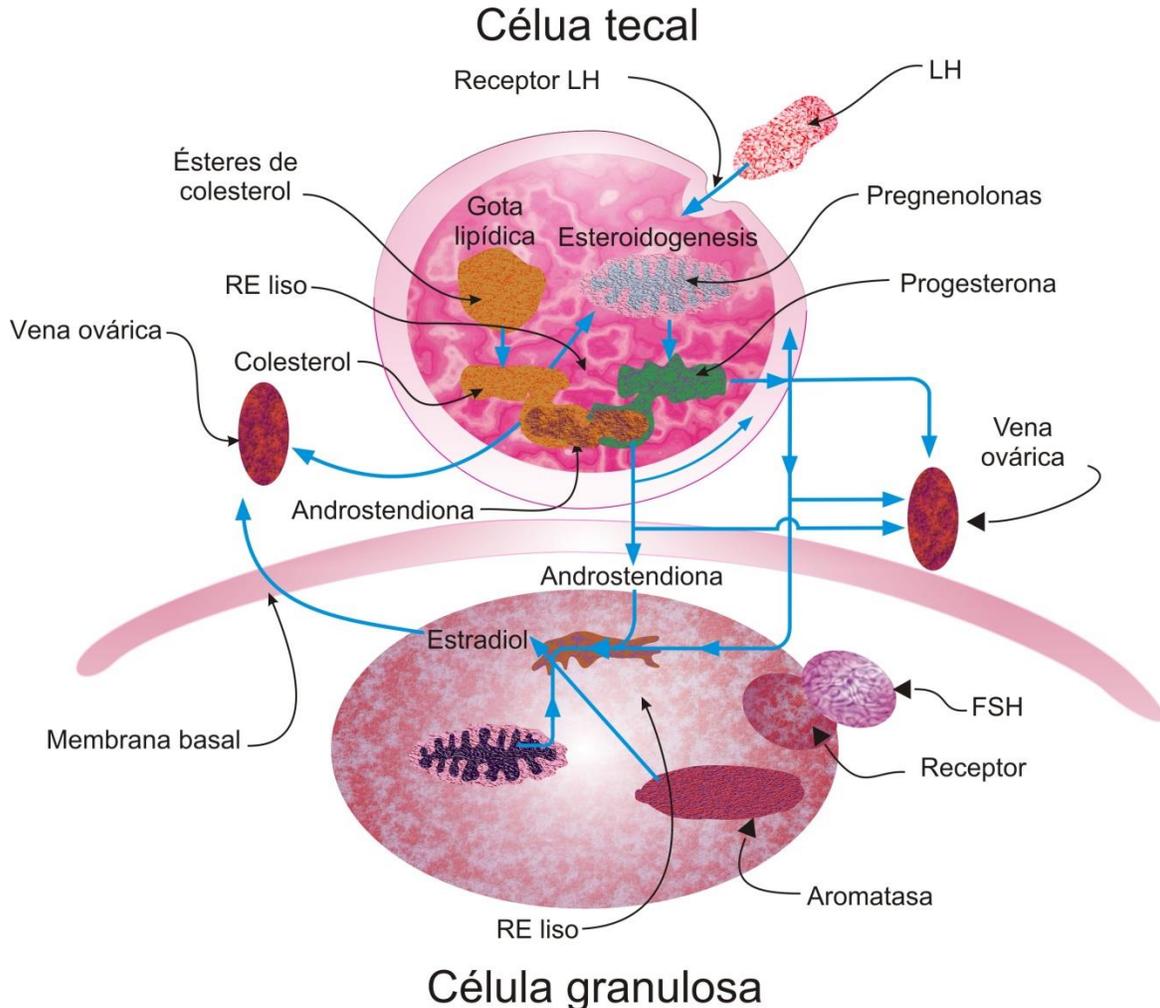


Fig. 3. Biosíntesis de hormonas esteroides en el ovario, explicado a través de la "teoría de la doble célula-doble hormona" tomado y modificado de Tresguerres y Castillo, 2005.

La hidroxilación de pregnenolona y subsecuente escisión del enlace 17 y 20 para formar dehidroepiandrostenediona (DHEA) o androstenediona (esteroides con 19 átomos de carbono) es catalizada por una sola enzima, la 17α -hidroxilasa/17,20 liasa ($P450_{17\alpha}$). Esta enzima se localiza en el retículo endoplásmico, está presente en la corteza adrenal en varias especies, excepto en la rata. También se expresa en las células de Leyding en los testículos y en las células de la teca interna en el folículo ovárico y

dependiendo de la especie en el cuerpo lúteo. La expresión de P450_{17α} es regulada en las gónadas por la LH (Hinshelwood, 1999).

La acción del complejo enzimático P450_{17α} es requerido para convertir la pregnenolona en progesterona así como en sus respectivos productos DEHA y androstenediona. Estas dos rutas alternativas son referidas como vía 5-ene-3β-hidroxi o Δ⁵ llevada a cabo en el folículo ovárico y la vía 4-en-3-oxo o Δ⁴ la cual se realiza en el cuerpo lúteo (Tesguerres y Castillo, 2005; Brown, 1999).

La 17β-HSD cataliza la interconversión de androstenediona a testosterona ambos andrógenos de 19 átomos de carbono (Brawn, 1999). La aromatización de estos andrógenos es catalizada por la enzima P450_{arom}, localizada en el retículo endoplásmico de las células granulosas en el folículo ovárico, esta acción es regulada por la FSH (Tesguerres y Castillo, 2005; Brown, 1999; Hinshelwood, 1999). La Fig. 4 muestra la síntesis de esteroides por el ovario así como las enzimas que participan en ella.

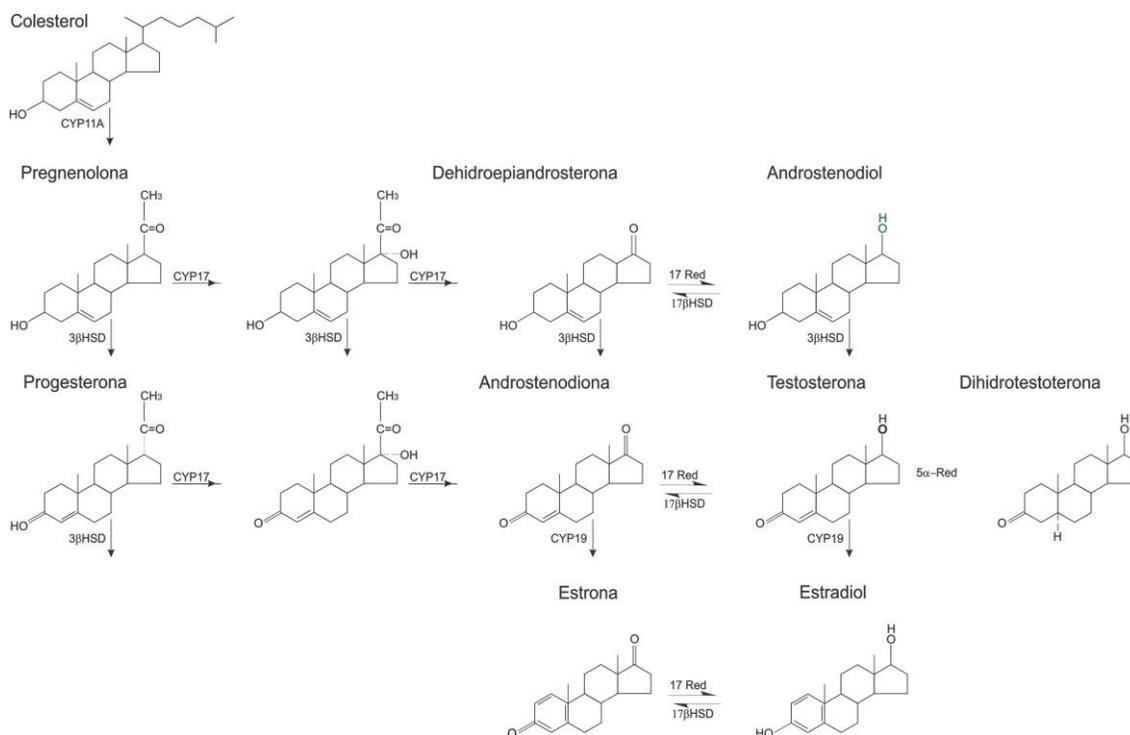


Fig. 4. Esquema general de la síntesis de estrógenos y andrógeno. Tomado y modificado de O' Malley, 2001.

Desarrollo folicular

El desarrollo folicular comienza cuando los folículos abandonan su estado de reposo y comienzan un proceso de crecimiento, división y diferenciación celular que culmina en la ovulación (Van Voorhis, 1999).

En las ratas y ratones, la histogénesis ovárica y la iniciación del crecimiento folicular son eventos que toman lugar durante la primera semana después del nacimiento. En la rata el ensamble folicular ocurre después de las 24 horas de vida postnatal, como parte de un proceso de diferenciación, que resulta en la masiva formación de folículos en un periodo menor a las 36 horas (Malamed y col., 1992). Seguido de la formación de folículos que comienzan su crecimiento, bajo otro proceso de diferenciación, donde se adquieren receptores y sensibilidad a las gonadotrofinas (Mayerhofer, 1997).

Durante el desarrollo fetal temprano, células germinativas primordiales migran desde el saco vitelino a los ovarios, donde se diferencian en ovogonios. Los ovogonios son células madre diploides ($2n$) que se reproducen por mitosis para formar millones de células germinativas, la mayor parte de estas células se degeneran por un proceso conocido como atresia. Algunas logran desarrollarse hasta formar células de mayor tamaño llamadas ovocitos primarios, que entran en la profase de la meiosis I durante el desarrollo fetal pero no completan esa fase hasta la pubertad. Durante esta etapa detenida del desarrollo, cada ovocito primario es rodeado por una capa de células foliculares, y la estructura entera es el folículo primordial (Tortora y Derrickson, 2006).

La población de folículos primordiales es progresivamente reducida durante la etapa reproductiva. El descenso de los folículos primordiales ocurre como el resultado de dos procesos, la atresia y la entrada de los folículos a la fase de crecimiento. En el humano, una gran cantidad de los folículos son reducidos por atresia al momento de nacer y siguen reduciéndose desde el nacimiento hasta la menopausia (Van Voorhis, 1999).

Al final de la pubertad y antes del comienzo de los ciclos reproductores, parte de los folículos primordiales, se han desarrollado hasta el estadio de folículo primario (60-150 μm de diámetro) (Sánchez, 1999). Estos consisten en un ovocito primario rodeado por varias capas de células cuboides que se encuentran separadas en algunos puntos por pequeñas cantidades de líquido folicular.

A medida que el folículo crece, forma una capa glucoprotéica definida, llamada zona pelúcida entre el ovocito primario y las células granulosas (Carlson, 2001; Sánchez, 1999; Tortora y Derrickson, 2006).

La membrana basal separa las células granulosas de la teca. Cuando el folículo primario se convierte en folículo secundario, la teca se diferencia en dos capas celulares: 1) la teca interna, una capa interna muy vascularizada de células secretoras cuboides y 2) la teca externa, una capa de células externas del tejido conectivo y fibras colágenas (Tortora y Derrickson, 2006). El desarrollo inicial del folículo tiene lugar sin que haya una influencia importante de las hormonas hipofisarias, pero a medida que se aproxima la pubertad, la maduración folicular continua requiere la acción de la FSH sobre las células de la granulosa, que para este momento han desarrollado receptores para FSH en sus superficies. La indicación más evidente del desarrollo ulterior de algunos de los folículos es la formación de un antro, que es una cavidad llena de líquido folicular. El líquido es secretado por las células granulosas y se acumula en el centro del folículo, al comienzo el líquido es secretado por las células foliculares y más tarde se forma principalmente como un trasudado procedente de los capilares del lado externo de la membrana granulosa (Carlson, 2001). Además, la capa más interna de las células granulosas se une firmemente a la zona pelúcida y pasa a formar la corona radiada (Tortora y Derrickson, 2006; Carlson, 2001). Con la aparición del antro, el folículo recibe el nombre de folículo secundario (Carlson, 2001).

Bajo múltiples influencias hormonales, el folículo aumenta de tamaño rápidamente y empieza a hacer relieve en la superficie del ovario. En este punto se denomina folículo terciario, maduro o de Graaf (Fig. 5.) En el interior de éste, el ovocito primario completa la meiosis I, produciendo dos células, el ovocito secundario y el primer corpúsculo polar.

Una vez que se forma el ovocito secundario, inicia la meiosis dos pero se detiene en metafase (Tortora y Derrickson, 2006; Carlson, 2001). El óvulo ahora un ovocito secundario, está localizado en un pequeño montículo de células conocido como *cummulus oophorus* (Carlson, 2001).

En los individuos monoovulantes, un solo folículo adquiere dominancia, mientras que los demás entran en proceso de atresia. En este folículo se incrementa la cantidad de líquido antral, el cúmulo ovóforo disminuye, la capa de células granulosas se estira y adelgaza y la vascularización de la teca aumenta. La membrana basal sufre un proceso proteolítico y el ovocito es liberado (Sánchez, 1999).

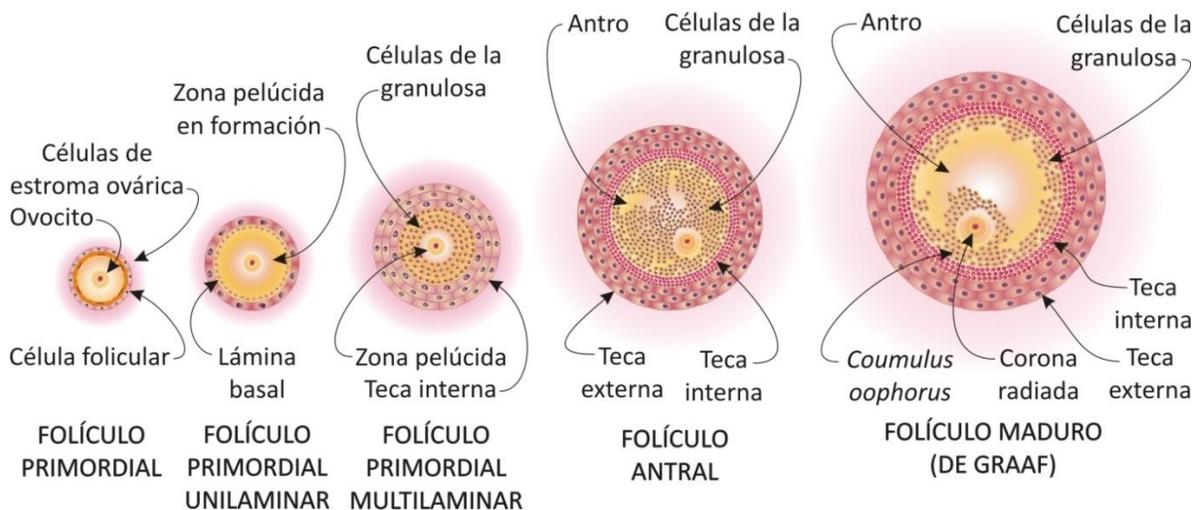


Fig.5. Folículos en diferentes etapas de desarrollo. Tomado y modificado de Junqueira y Carneiro 2005.

Regulación del desarrollo folicular

Los folículos primordiales y primarios son insensibles a las gonadotropinas y se desarrollan en función de los sistemas locales intraováricos. Al llegar la pubertad, la FSH ejerce una acción estimulante del desarrollo folicular, la FSH interviene también en el proceso de reclutamiento folicular, crecimiento folicular y desarrollo del folículo dominante. Será precisamente en el folículo dominante donde las altas concentraciones de estradiol determinen un incremento de sus receptores para la FSH. Esto posibilita que este folículo continúe desarrollándose en presencia de concentraciones cada vez más bajas de FSH, que determinan la atresia de los otros folículos (Tesguerres y Castillo, 2005; Domínguez, 1997).

Se ha considerado a la FSH como la principal hormona responsable de la maduración folicular y que a medida que avanza el ciclo y los folículos crecen se produce una disminución de sus concentraciones. Este descenso de la FSH ocurre por una retroalimentación negativa de los estrógenos producidos por las células granulosas, conjuntamente con la inhibina, sobre la FSH (Tesguerres y Castillo, 2005; Domínguez, 1997).

La importancia de las dos gonadotropinas, FSH y LH, es estimular el desarrollo folicular, bajo la influencia de la GnRH liberada por el hipotálamo de modo pulsátil. La frecuencia de los pulsos no sólo consigue incrementar o disminuir las concentraciones de ambas gonadotropinas, sino que es capaz de controlar por separado la LH y la FSH (Tesguerres y Castillo, 2005; Domínguez, 1997).

La secreción de GnRH es regulada por múltiples sistemas de señales neuroendocrinas, que estimulan o inhiben su liberación. La secreción pulsátil de GnRH conlleva a que la secreción de gonadotropinas y esteroides también sea en forma de pulsos (Tesguerres y Castillo, 2005; Domínguez, 1997).

Knobil y col. establecieron por primera vez en las monas Rhesus que el sistema neuronal de GnRH, localizado en el hipotálamo medio basal, tiene una conducta rítmica con descargas de actividad eléctrica, agudas y de corta duración, estas descargas ocurren aproximadamente con intervalos horarios y comprobaron que existe una gran sincronía entre los pulsos de GnRH en la sangre del sistema porta hipotalámico y los pulsos de LH en la sangre (Kably, 2006).

Para que exista un ciclo ovárico normal se requiere de una liberación pulsátil y periódica de GnRH, esta actividad controlada por el generador de pulsos se encuentra mediado en gran parte por neurotransmisores. En términos generales se sabe que la dopamina y noradrenalina (NA) modulan la pulsatilidad de GnRH a nivel hipotalámico (Kably, 2006).

La dopamina tiene un efecto inhibitorio sobre el generador de pulsos de GnRH y la secreción de prolactina a través de la inhibición de la adenilato ciclasa mediado por los receptores D1 y D2 en la adenohipófisis, mientras que la NA estimula la secreción de GnRH. El neuropéptido-Y (NPY) participa en la regulación de la pulsatilidad de GnRH favoreciendo su secreción, y a nivel hipofisiario incrementa la respuesta de los gonadotropos a la GnRH, sin embargo, en ausencia de estrógenos este neuropéptido tiene un efecto inhibitorio sobre la secreción de gonadotropinas (Kably, 2006).

La frecuencia de los pulsos de GnRH difiere a través del ciclo reproductivo normal. Se cree que las variaciones observadas en la pulsatilidad de la GnRH se producen a través de la modulación del patrón pulsátil “intrínseco” por la retroalimentación de los esteroides gonadales (Halvorson, 2001).

Los esteroides gonadales ejercen sus efectos tanto a nivel de hipotálamo como de hipófisis anterior. Se han encontrado receptores de estrógenos, progesterona y andrógenos en los gonadotropos, mientras que, en el hipotálamo se han encontrado estos receptores en múltiples tipos de neuronas, incluidas las que liberan dopamina y β -

endorfinas, sin embargo no se encuentran en las células GnRHérgicas, esto sugiere que los esteroides gonadales alteran la liberación de GnRH indirectamente a través de la modulación de sistemas neuronales que actúan sobre las neuronas GnRHérgicas (Halvorson, 2001).

Durante la fase folicular media, el incremento progresivo en las concentraciones sanguíneas de estradiol y también de inhibina provocan un efecto inhibitorio temporal en la síntesis y secreción de FSH, este efecto de retroalimentación negativa se revierte cuando las concentraciones de estrógenos se incrementan, tal como ocurre en la fase folicular tardía y preovulatoria del ciclo en la que el estradiol provoca una retroalimentación positiva temporal, que conlleva a la producción y liberación de ambas gonadotropinas principalmente LH. El efecto positivo de los estrógenos durante esta fase es amplificado por el aumento paralelo en las concentraciones de progesterona provenientes de las células la granulosa diferenciadas. Durante la fase lútea, el estradiol junto con la progesterona y la inhibina suprimen notablemente las concentraciones circulantes de FSH. La involución del cuerpo lúteo resulta en la reducción de esteroides sexuales e inhibina provocando el inicio del incremento en la producción y secreción de FSH y el reclutamiento de nuevos folículos (Kably y Ruíz, 2006).

Ovulación

En las últimas fases del desarrollo folicular, los estrógenos junto con las gonadotropinas coordinan la maduración del folículo, y ejercen una acción de retroalimentación positiva sobre el eje hipotálamo-hipofisiario que resulta en la liberación ovulatoria de gonadotropinas. Además, las células granulosas del folículo preovulatorio sufren un cambio en la estereidogénesis que provoca la producción adicional de progesterona (señal temprana de leuteinización). La producción por la granulosa de

estradiol y progesterona incrementan los receptores de LH en ésta y estimula la liberación ovulatoria de LH (Sánchez, 1999).

Tras la liberación ovulatoria de LH se produce un aumento de la concentración de AMP cíclico tisular, lo que induce la luteinización y activación de enzimas luteolíticas responsables de la ruptura de la pared folicular (Sánchez, 1999).

El aumento de LH y en menor medida de FSH, es el gatillo para que el folículo dominante ovule. Se ha demostrado que en los seres humanos la LH y la gonadotropina coriónica humana (hCG) estimulan la ruptura de folículos maduros. No obstante, en ratas hipofisectomizadas la FSH altamente purificada puede servir como la hormona “ovulatoria” después de que la maduración folicular haya sido estimulada con FSH y LH (Yen, 2001).

Cuerpo lúteo

El cuerpo lúteo resulta de una transformación estructural y funcional del folículo ovulatorio. El folículo, se convierte en una estructura básicamente sólida, bicelular, integrada por células granulosas y tecaes diferenciadas. Por lo tanto sus cualidades son íntegramente dependientes de la calidad y cantidad de las células foliculares que lo precedieron y de su adecuada organización (Neagle, 2006).

Las células de la granulosa murales sufren cambios morfológicos colectivamente conocidos como luteinización. Estas células junto con las células tecointersticiales circundantes y la invasión por la vasculatura se entremezclan para formar el cuerpo lúteo (Yen, 2001).

Esta glándula endocrina es la mayor fuente de hormonas esteroideas sexuales secretadas por el ovario durante la fase post-ovulatoria del ciclo (Yen, 2001).

La regresión espontánea del cuerpo lúteo o luteólisis es consecuencia de un

fenómeno neuroendocrino cíclico que posibilita el reinicio de la foliculogénesis y el desarrollo de un nuevo ciclo. La regresión del cuerpo lúteo cumple dos etapas (Neagle, 2006):

- La primera, funcional y reversible, manifestada por la pérdida de la capacidad de la síntesis de progesterona como consecuencia de una acción de bloqueo de la prostaglandina F2 α sobre el clivaje del colesterol a nivel citocromo P450_{scc} mitocondrial.
- La segunda, estructural e irreversible, en la cual se mezclan la apoptosis y proliferación celular especialmente macrofágica.

A medida que los niveles de progesterona, estrógenos e inhibina disminuyen, la liberación de GnRH, FSH y LH aumentan, el crecimiento folicular se reanuda y se inicia un nuevo ciclo (Tortora y Derrickson, 2006).

Sistema nervioso

El sistema nervioso es el responsable de la mayoría de las funciones que caracterizan a los organismos superiores. En el ser humano, es el origen de la conciencia, la sensibilidad, los movimientos voluntarios, la memoria, el aprendizaje y otras formas de conducta cognitiva. A un nivel más simple media la actividad refleja y controla las respuestas autónomas y endócrinas (Levy, 2006).

El sistema nervioso se divide, desde el punto de vista estructural, en SNC y sistema nervioso periférico (SNP). El SNC comprende el encéfalo y la médula espinal. El SNP incluye neuronas sensitivas, que conectan al SNC con los receptores sensitivos, así como neuronas motoras que conectan al SNC con los músculos y glándulas. Los elementos del SNP dedicados a la función motora se dividen a su vez en nervios somáticos y el sistema nervioso autónomo (SNA) (Purves, 2001). Las neuronas autónomas pueden dividirse a su

vez en simpáticas, parasimpáticas y entéricas. El primero surge de la región torácico-lumbar del sistema nervioso central (T1-L4) y el segundo de las regiones craneal (III, VII, IX, y X) y sacra (S2, S3 y S4). Típicamente cada órgano visceral recibe tanto fibras simpáticas como parasimpáticas; una es excitadora mientras que la otra es inhibidora (Purves y col., 2001; Roger, 1996).

El sistema nervioso entérico, si bien recibe inervación simpática y parasimpática, en cierta medida actúa de forma independiente del resto del sistema autónomo (Purves y col., 2001; Roger, 1996).

Los somas de las neuronas preganglionares parasimpáticas se encuentran en núcleos en el tronco encefálico, y en las astas laterales del segundo al cuarto segmento sacro de la médula espinal. Los axones preganglionares de ambas eferencias, craneal y sacra, llegan a ganglios terminales donde establecen sinapsis con neuronas posganglionares. La eferencia sacra parasimpática forma los nervios espláncnicos pélvicos. Estos nervios establecen sinapsis con neuronas posganglionares parasimpáticas ubicadas en ganglios terminales en las paredes de las vísceras inervadas. Desde los ganglios, los axones posganglionares parasimpáticos inervan el músculo liso, las glándulas de las paredes del colon, los uréteres, la vejiga y los órganos reproductores (Tortora y Derrickson, 2006).

Los somas de las neuronas simpáticas preganglionares son parte de las astas de todos los segmentos torácicos y de los primeros dos segmentos lumbares de la médula espinal. Los axones preganglionares emergen de la médula espinal a través de la rama anterior de un nervio espinal junto con neuronas somáticas del mismo segmento de la médula. Luego de su salida los axones simpáticos mielínicos preganglionares ingresan a una pequeña vía llamada ramo blanco antes de pasar al tronco simpático ganglionar. Sólo los nervios torácicos y primeros dos lumbares poseen ramos comunicantes blancos. Algunos axones simpáticos preganglionares pasan por el tronco simpático sin terminar en él. Más allá de la cadena simpática forman nervios conocidos como nervios espláncnicos que se

extienden y terminan en los ganglios prevertebrales periféricos. Los ganglios espláncnicos del área torácica terminan en el ganglio celiaco, donde las neuronas preganglionares hacen sinapsis con somas de neuronas posganglionares.

Los axones preganglionares que forman el nervio espláncnico lumbar provienen del primer al tercer ganglio lumbar (L1-L3), ingresan al plexo mesentérico inferior donde establecen sinapsis con neuronas posganglionares se extienden a través del plexo hipogástrico y brindan inervación a colon distal, recto, vejiga y órganos genitales (Tortora y Derrickson, 2006).

Las neuronas del SNA se clasifican según el neurotransmisor que posean o segreguen en sus botones terminales: la acetilcolina o la NA. Por lo tanto, las que liberan acetilcolina (ACh) se denominan colinérgicas y las que liberan NA adrenérgicas.

Las neuronas adrenérgicas comprenden la mayoría de las neuronas posganglionares simpáticas. La NA y a la adrenalina se unen por igual al receptor adrenérgico. Los receptores adrenérgicos son de dos tipos: los alfa (α) y los beta (β). Estos receptores a su vez se subdividen en subtipos: α_1 , α_2 , β_1 , β_2 y β_3 (Cardinali y Dvorkin, 1999).

Las células de la mayoría de los efectores tienen receptores del tipo α o β , y algunas células de efectores viscerales contienen ambos tipos (Tortora y Derrickson, 2006).

Inervación Ovárica

Los ovarios de los mamíferos son inervados por neuronas simpáticas y sensoriales que son extrínsecas a la glándula (Dissen y Ojeda, 1999). La distribución de fibras simpáticas intraováricas es similar en todas las especies, pero la densidad de la red varía considerablemente entre las especies (Lara y col., 2002).

La inervación simpática extrínseca al ovario se origina en los segmentos T-11 a L-4 y hace sinapsis con los ganglios celiaco y mesentérico. Las vías sensoriales se derivan del ganglio nodoso y del ganglio de la raíz dorsal, que se localizan entre el segmento torácico caudal (T9-T11) y el segmento lumbar craneal de la médula espinal (L2-L4) (Dissen y Ojeda, 1999; Burden, 1978).

La inervación simpática del ovario está compuesta por neuronas que contienen NA y NPY y la sensorial está compuesta por fibras que contienen sustancia P (SP) y péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). Ambos tipos de vías nerviosas contienen, además, péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Klein y Burden, 1988; Dissen y Ojeda, 1999).

Las fibras posganglionares inervan el ovario por dos vías el NOS y el plexo nervioso ovárico (PNO) (Dissen y Ojeda, 1999). Los nervios penetran al ovario por el hilio (Ayala y col., 2005). Las fibras del NOS, el cual está asociado con el ligamento suspensorio ovárico, inerva principalmente los componentes secretorios del ovario, glándulas intersticiales y folículos, las fibras viajan a través del tejido intersticial y rodean los folículos en desarrollo pero nunca penetran el cuerpo lúteo ni las células de la granulosa de los folículos (Lara y col., 2002). El PNO viaja a lo largo de la arteria ovárica y sus fibras son mayormente perivasculares (Dissen y Ojeda, 1999).

En los mamíferos la inervación simpática de los ovarios ha sido relacionada con la regulación de los procesos reproductivos (Lara y col., 2002; Burden 1978).

Las catecolaminas modulan la esteroidogénesis ovárica por la activación de

receptores β -adrenérgicos, éstos estimulan la liberación de progesterona por las células de la granulosa y del cuerpo lúteo y la liberación de testosterona por las células de la teca (Dissen y Ojeda, 1999). También facilitan la respuesta esteroideogénica de los ovarios cuando las concentraciones de gonadotropinas son bajas, esto sugiere que en circunstancias fisiológicas las fibras catecolaminérgicas amplifican los efectos de las gonadotropinas sobre la esteroideogénesis ovárica (Dissen y Ojeda, 1999).

La inervación simpática del ovario participa en la regulación del desarrollo folicular, de manera que cuando es destruida por la administración de anticuerpos al factor de crecimiento neural (NGF) o por el tratamiento con guanetidina (Lara y col. 1990b), se obtiene como resultado retraso en el desarrollo folicular, reducción en la liberación de esteroides ováricos y una marcada irregularidad en el ciclo estral (Lara y col. 1990a).

En adición a esto, en la rata adulta la sección bilateral del NOS resulta en el descenso en la concentración de estradiol y progesterona circulantes durante la fase preovulatoria. Resultados que apuntan a que la información que transporta el NOS ejerce un efecto directo sobre las células foliculares (Aguado y Ojeda 1984a).

En la rata prepúber la sección bilateral del NOS no altera la edad de apertura vaginal la primera ovulación, la concentración plasmática de prolactina, FSH o LH. Sin embargo, conduce a un marcado decremento en el contenido de NA ovárica y un incremento de receptores β -adrenérgicos (Aguado y Ojeda, 1984b). La sección del NOS se traduce en una caída drástica de la concentración de NA ovárica, hecho que confirma la idea de que esta vía neural es el mayor aporte de la amina al ovario (Aguado y Ojeda, 1984b; Lawrence y Burden 1980; Chávez y col., 1991).

En la rata juvenil la sección bilateral del NOS no modifica el número ovocitos liberados (Morales y col., 1993), mientras que la sección unilateral del NOS resulta en la disminución del número de ovocitos liberados por el ovario denervado (Morales y col., 1993). La subsecuente administración de gonadotropinas no restaura la ovulación por el

ovario denervado, sugiriendo que el NOS regula la respuesta de los compartimentos ováricos a las gonadotropinas de manera estimuladora y asimétrica (Morales y col., 1998). En la rata adulta la sección derecha o bilateral del NOS reduce la tasa de animales ovulantes. Tanto la sección bilateral como la unilateral reduce el número de ovocitos liberados por el ovario denervado; en los animales con sección unilateral, la tasa de animales ovulantes se recupera después de la administración de hCG no así los ovocitos liberados por el ovario denervado. Sugiriendo que la información que llega al ovario por el NOS modula la ovulación espontánea de manera estimuladora y lateralizada (Chávez y col., 1991).

En la rata con hemiovariectomía, la sección del NOS del ovario *in situ* no modifica el patrón de ciclicidad, sin embargo bloquea la ovulación compensadora, seis días después de la cirugía. Cuando se deja transcurrir veinte días después de la denervación no hay diferencias en la tasa de animales ovulantes ni en el número de ovocitos liberados y la hipertrofia es similar, independientemente del ovario extirpado (Chávez y Domínguez, 1994).

En la rata prepúber las señales neurales que llegan al ovario por el NOS modulan la acción de las enzimas que participan en la síntesis de progesterona, testosterona y estradiol de manera independiente. Esto sugiere que los mecanismos de síntesis de cada hormona no son regulados por las mismas señales y que los cambios en las concentraciones de hormonas esteroides no son consecuencia de la modificación en las concentraciones de gonadotropinas (Morales y col., 2012). Experimentos *in vitro* han demostrado que el número de receptores β -adrenérgicos en las células granulosas es modulado por las catecolaminas (Aguado y Ojeda, 1984b).

Ciclo estral

La ciclicidad de la función ovárica durante la vida reproductora es un hecho bien conocido. En la mayoría de las especies, con excepción de los primates, la característica más relevante de la ritmicidad es la aparición de la conducta de celo o estro, en la cual la hembra acepta la monta y la cópula (Sánchez, 1999).

La clasificación más habitual de los ciclos ováricos se basa en la característica rítmica (conductual o fisiológica) más sobresaliente. Así los ciclos se clasifican en: ciclo estral y ciclo menstrual. Con excepción de los monos del viejo mundo y la especie humana, que presentan ciclos menstruales, el resto de los mamíferos presentan ciclos estrales (Sánchez, 1999).

El ciclo estral más caracterizado es el de la rata, dura entre 4 y 5 días (Sánchez, 1999; Feder, 1981) y es influenciado por factores exteroceptivos como la luz, la temperatura y las sustancias químicas percibidas por el sentido del olfato. Se divide en cuatro fases: estro (E), diestro 1 (D1), diestro 2 (D2) y proestro (P) (Sánchez, 1999).

- Estro. Es el periodo en que la hembra presenta los patrones de conducta sexual característicos (lordosis.). El acercamiento, la monta por el macho y la cópula son permitidos. Como la ovulación ha sucedido pocas horas antes, los óvulos se encuentran en el oviducto.

El folículo posovulatorio comienza a experimentar una serie de cambios morfológicos y funcionales hasta transformarse en un cuerpo lúteo, mientras una nueva serie de folículos primarios comienza a desarrollarse. En la mucosa vaginal se encuentran numerosas mitosis que desplazan a las capas más superficiales (epitelio escamoso y cornificado) que son exfoliadas a la luz de la vagina. La presencia de estas células en el frotis vaginal es indicativa de estro y señal probable de ovulación (Sánchez, 1999).

- Metaestro o diestro 1. La monta y la cópula ya no son permitidas. La secreción de progesterona por el cuerpo lúteo y la de estradiol por los folículos inhiben la secreción de gonadotrofinas. La progesterona incrementa alrededor de 12 horas antes de la ovulación, también se ha observado un pequeño incremento de progesterona durante el primer día del diestro que probablemente indica la formación de un cuerpo lúteo funcional (Feder, 1981). La vascularización y la motilidad del útero están disminuidas. En el frotis vaginal se encuentra infiltración de leucocitos junto con algunas células cornificadas (Sánchez, 1999).
- La fase de diestro 2 dura entre 60-70 horas. Durante esta fase tiene lugar la regresión del cuerpo lúteo (luteólisis). Mientras tanto, la secreción de estradiol por parte de los folículos sigue aumentando. Al igual que en la fase de metaestro, los esteroides ováricos inhiben la secreción basal de gonadotrofinas. El útero es pequeño y no contráctil (Sánchez, 1999).
- Proestro. Los folículos han alcanzado el estadio de folículos preovulatorios y secretan grandes cantidades de estradiol. Es al principio de esta fase donde se registra la máxima concentración del esteroide y declina bruscamente antes de la ovulación (Feder, 1981). El estradiol ejerce ahora un efecto estimulante (retroalimentación positiva) sobre la secreción de gonadotrofinas. La LH produce la ovulación y la luteinización del folículo postovulatorio. El útero por acción del estradiol se hace extremadamente contráctil y en la vagina aparecen células epiteliales nucleadas. La cópula sólo es permitida en el proestro tardío. La secreción de FSH en la mañana del día de estro, que es debida a la disminución de la secreción ovárica de inhibina, estimula el crecimiento folicular (Sánchez, 1999).

Existen indicadores de cambios en la actividad ovárica que no requieren de procedimientos de análisis químico. Ejemplo de estos es que la rata hembra exhibe cambios cíclicos en la conducta sexual y en su citología vaginal, otro indicador biológico del cambio cíclico de la producción de hormonas ováricas es el peso del útero, el peso total promedio del útero va de los 242 mg al comienzo del ciclo a los 134 mg al termino del ciclo. Estos cambios cíclicos, conducta sexual, citología vaginal y peso uterino, son indicadores biológicos de fluctuaciones en la liberación de hormonas ováricas, esto es apoyado, por el hecho de que la ovariectomía resulta en el cese inmediato de las conductas cíclicas y de la citología vaginal (Feder, 1981).

Síndrome del Ovario Poliquístico

El SOPQ es un trastorno heterogéneo, con alteraciones endocrinas y metabólicas, de probable origen genético, pero influenciado por factores ambientales, como la nutrición y la actividad física (Morán-Villota 2006).

El SOPQ se manifiesta clínicamente por una combinación de hiperandrogenismo con anovulación crónica y un aumento de la relación LH-FSH. El hiperandrogenismo se traduce en hirsutismo, acné y en casos raros en una alopecia dependiente de los andrógenos (Yen, 2001). Es, sin duda, la causa más frecuente de esterilidad anovulatoria hiperandrogénica encontrándose en aproximadamente el 80% de las mujeres con hiperandrogenismo, afecta del 4 al 10% de las mujeres en edad reproductiva en diferentes poblaciones, por lo que se considera el trastorno reproductivo más frecuente de la mujer a esta edad (Morán-Villota, 2006; Yen 2001).

En 1844 Chereau describió la existencia de cambios escleroquísticos en el ovario humano, aproximadamente 90 años antes de la aparición del trabajo de Stein y Leventhal los cuales entre 1925 y 1935, fueron los primeros en reconocer una asociación entre ovarios poliquísticos y signos de amenorrea, hirsutismo y obesidad. Estos autores

describieron por primera vez la eficacia de la resección en cuña de estos ovarios lo que resultaba en la regulación del ciclo de las pacientes e incluso embarazos (Morán-Villota, 2006; Fábregues 2006; Yen 2001).

En el SOPQ la anovulación se manifiesta por ciclos menstruales irregulares, generalmente oligomenorrea o incluso amenorrea y por trastornos de la fertilidad. Actualmente se describe que el SOPQ puede cruzar también con oligoovulación, la cual consiste en la presentación de ciclos menstruales irregulares con ovulación eventual (Morán-Villota, 2006).

En el SOPQ la estimulación crónica de LH induce una hipersecreción persistente de andrógenos (Yen 2001). La secreción anormal de andrógenos parece ser el resultado de un estado hiperactivo de las células tecaes que escapan de la desregulación de la estroidogénesis sobre todo a nivel de la 17-hidroxilasa y la 17-20 liasa (Fábregues, 2006; Bernabeu y col., 2006).

La producción de andrógenos *in vitro* por las células tecaes, provenientes de ovarios de pacientes con SOPQ, es mayor que en los controles. No obstante, algunas pacientes tienen una concentración normal de andrógenos, lo que hace pensar que su sensibilidad a los andrógenos es mayor (Bernabeu y col., 2006).

El hiperandrogenismo puede manifestarse clínicamente por hirsutismo y acné, o puede presentarse por hiperandrogenemia. La hiperandrogenemia se refiere al aumento de uno o varios andrógenos circulantes, como la testosterona total o libre, androstenediona, dehidroepiandrosterona o sulfato de dehidroepiandrosterona (Morán-Villota, 2006).

En la década de los 70 Rebar describió en el SOPQ la inadecuada secreción de gonadotropinas, destacando las altas concentraciones de LH (Fábregues, 2006), mientras que la de FSH se encuentra reducida alrededor de un 30% (Yen, 2001). El aumento de la

LH favorece la producción de andrógenos por la teca del folículo (Bernabeu y col., 2006). Esta alteración parece consistir con el incremento de los pulsos de GnRH, generando una mayor liberación de la LH, pero no de la FSH (Morán-Villota, 2006; Yen, 2001). Los folículos presentes en mujeres con el SOPQ no alcanzan una maduración completa, esta falta de folículos maduros tiene como consecuencia una baja producción de estradiol. En estos folículos las células granulosas son escasas, y están virtualmente desprovistas de actividad de P450_{arom}. Sin embargo, el examen de las células de la granulosa *in vitro* revela que no son apoptóticas; que tienen concentraciones elevadas de receptores a FSH y son altamente reactivas a la FSH, en consecuencia la integridad funcional de las células granulosas se encuentra preservada. Por lo tanto, la escasa actividad aromatasa en mujeres con SOPQ implica posiblemente la existencia de una FSH con una menor actividad biológica, o de un bloqueo de sus efectos *in vivo* (Yen, 2001).

La FSH presenta diferentes formas moleculares, la presencia y concentración relativa de las isoformas de FSH dependen del ambiente endocrino (Ulloa-Aguirre y Chaptel, 1982). En ambientes endocrinos ricos en estrógenos se presentan formas alcalinas de FSH, mientras que expuestas a andrógenos las formas de FSH son más ácidas (Ulloa-Aguirre y col., 1986). Las formas ácidas presentan una mayor vida media en plasma (Blum y Gupta, 1985) y exhiben menor actividad biológica *in vitro* que las isoformas alcalinas (Ulloa-Aguirre y col., 1986).

En 1980 Burghen describió por primera vez la asociación del SOPQ con la presencia de resistencia a la insulina (Fárbegues, 2006) e hiperinsulinemia, la gravedad de ambos trastornos aumenta en presencia de obesidad (Morán-Villota, 2006; Yen, 2001). Como ya es conocido, la insulina es una hormona con un gran campo de acción (tejido adiposo, músculo, hígado, ovario, etc.). La insulina en el SOPQ contribuye al hiperandrogenismo y a la anovulación al estimular la síntesis suprarrenal de andrógenos y de modo sinérgico con la LH la producción de andrógenos ováricos, disminuyendo la secreción de la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHGB) por el hígado e incrementando

los andrógenos libres circulantes (Morán-Villota, 2006; Fárbegues, 2006).

La resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, se ha demostrado en pacientes con SOPQ tanto delgadas como obesas, teniendo una prevalencia entre un 50 y 70% (Morán-Villota, 2006; Fárbegues, 2006).

En 1981 se describió por primera vez los hallazgos ecográficos de la mujer con SOPQ, pero fue hasta 1985 cuando el diagnóstico ecográfico del ovario poliquístico llegó a ser aceptado (Fárbegues, 2006). En la mujer, la presencia de ovarios poliquísticos se determina actualmente por ultrasonido, con la presencia de 12 o más folículos menores a 10 mm y volumen ovárico mayor a 10 cm³ (Morán-Villota, 2006).

En mayo de 2003 en Rotterdam se establecen criterios de diagnósticos para el SOPQ, que actualmente son vigentes: presencia de oligo y/o anovulación, signos clínicos y/o bioquímicos de hiperandrogenismo y ovarios de apariencia ecográfica poliquística. Se acordó que en el diagnóstico del síndrome se debe tener siempre hiperandrogenismo acompañado de alguno de los otros criterios de inclusión (Fárbegues, 2006).

También se ha postulado un origen genético del SOPQ, fundamentado en una mayor incidencia de oligomenorrea y poliquistosis ovárica en familiares de primer grado de pacientes con SOPQ. En la búsqueda del origen genético del SOPQ se han evaluado múltiples genes relacionados con la producción de andrógenos, con la función de las gonadotropinas, con la acción de la insulina y la regulación de energía (Morán-Villota, 2006; Luque y Escobar, 2006).

La etiología e historia natural del SOPQ no se conocen con certeza y por lo tanto el diagnóstico y tratamiento de esta entidad es tema de controversia (Discacciati 2007; Stener-Victorin 2005). Existen varias hipótesis sobre el origen del SOPQ que incluyen desbalances hormonales, cambios epigenéticos en la vida fetal, anormalidades genéticas, estilo de vida y factores ambientales (Pascuali, 2011). Desde 1960 se han

utilizado modelos animales, incluyendo roedores y primates, en el estudio del origen de la patología (Walters y col., 2012).

La androgenización prenatal de monos Rhesus desencadena varias de las características que presenta la mujer con SOPQ, incluido el hiperandrogenismo, anovulación, ovarios poliquísticos, obesidad y resistencia a la insulina, sin embargo estos modelos son caros y el tiempo de experimentación es largo lo cual limita su práctica (Walters y col., 2012).

Los modelos en roedores son una herramienta versátil. En la rata se pueden inducir varias de las características que tipifican al SOPQ, entre ellas el hiperandrogenismo, concentraciones elevadas de LH, irregularidad en los ciclos estrales y alteraciones en la sensibilidad a la insulina (Walters y col., 2012).

Se han utilizado diversas manipulaciones para inducir experimentalmente el SOPQ, a continuación se describen algunos de ellos.

- Dorfman y col. en 2003 estudiaron el efecto del estrés por frío sobre la activación de la inervación simpática y sus efectos sobre la función ovárica. Para ello, sometieron a ratas a frío crónico intermitente por 3 ó 4 semanas, al finalizar las 4 semanas se observó incremento en la concentración de NA ovárica, que se acompañó por la presencia de folículos que presentan una capa engrosada de células tecaes, lo que caracteriza a los quistes foliculares.
- En los roedores la liberación de LH que gatilla la ovulación es regulado por los ciclos de luz-obscuridad (Weber, 1979). En la rata la exposición a luz continua, conduce a un gradual desarrollo de anovulación crónica (Lambert, 1975). Este efecto se ha atribuido al incremento en la actividad del SNS, debido a un estrés continuo provocado por la exposición a la luz constante (Singh, 1969).
- En la etapa fetal de la rata la administración de propionato de testosterona (PT),

induce anovulación en el 64% de los animales (Fels y Bosch 1971), estro persistente, ovarios poliquísticos, incrementan las concentraciones de estrógenos y andrógenos (McDonald, 1972; Arai, 1981). También se presenta resistencia a la insulina, que es una característica del SOPQ en mujeres (Beloosesky, 2004).

Cuando en la rata se inicia el tratamiento con testosterona a los días 16 o 19 días de gestación se induce cambios en las concentraciones hormonales y cambios en la morfología ovárica similares a los observados en el SOPQ (Wo, 2010).

- La Dihidrotestosterona (DHT) es un andrógeno no aromatizable, la exposición de fetos de rata a DHT en el día 16 o 19 y en ratones en los días 16 o 18, da como resultado irregularidades en el ciclo estral durante la vida adulta (Sullivan, 2004). Tanto las ratas como los ratones, mostraron incremento en la concentración sérica de LH y testosterona (Sullivan, 2004). La frecuencia de la secreción pulsátil de LH y la concentración de estradiol y progesterona (P_4) incrementaron (Wo, 2010).

El tratamiento postnatal con propionato de dihidrotestosterona dentro de los primeros cinco días de vida no tuvo efectos sobre el ciclo estral ni en la apariencia histológica de los ovarios (McDonald, 1972). Sin embargo, cuando a ratas de 21 días de edad se les administra la DHT en pellets por 90 días y son sacrificadas de 11 a 13 semanas después, se observan ciclos estrales irregulares y características ováricas similares a las del SOPQ (Manneras, 2007).

- En ratas adultas el tratamiento con benzoato de estradiol (BE) induce pérdida del ciclo estral, anovulación, atrofia ovárica y disminución en la concentración de LH, mientras que incrementa la concentración sérica de FSH y prolactina (Pinilla y col., 1993).
- En ratas cíclicas jóvenes expuestas por 8 semanas a estradiol vía implante subcutáneo de liberación continua (McCarthy y Brawer, 1990), o una sola inyección de VE (Brawer y col., 1978, Lara, 1993), inducen pérdida del ciclo estral,

anovulación y ovarios poliquísticos, los cuales presentan incremento en el número de folículos atrésicos y quistes con una delgada capa de células de la granulosa y una capa engrosada de células tecales (McCarthy y Brawer, 1990; Stener-Victorin, 2005). En los ovarios de las ratas con SOPQ, inducido con VE, se observa elevación de la concentración de NA ovárica, así como reducción de en el número de receptores β (Lara y col., 1993).

En los animales tratados con VE también se observa aumento en la presión arterial, como consecuencia del incremento de la actividad nerviosa simpática, éste evento también ocurre en las mujeres con SOPQ (Stener-Victorin, 2005).

- El letrozol es un inhibidor no esteroide de la aromatasa, el cual bloquea la transformación de andrógenos a estrógenos. En la rata induce desarrollo de quistes foliculares y características endócrinas del SOPQ como la elevación de LH y testosterona (Manneras, 2007).

Participación del sistema nervioso simpático en el SOPQ

El papel de los nervios simpáticos en la fisiología ovárica ha sido evidenciado por los estudios sobre la liberación de NA, la relación de la actividad neural y la variación de la concentración de los receptores β -adrenérgicos (β_1 y β_2) en función del estado endócrino del animal (Lara y col., 2002).

La NA actúa sobre los adrenoreceptores- β_2 presentes en las células de la teca y de la granulosa donde estimula la secreción de andrógenos y P_4 pero no de estradiol (Parra y col., 2007). El efecto estimulador de la NA sobre la secreción de esteroides por el ovario proporciona bases para sugerir un papel complementario y regulador entre las gonadotropinas y los nervios simpáticos ováricos (Lara, 2002). La estimulación de los

receptores β por la administración de un agonista noradrenérgico, el isoproterenol, incrementa la liberación de progesterona y andrógenos, además de reducir los receptores β -adrenérgicos (Barria y col., 1993).

Muchas de las características presentes en la mujer con SOPQ, incluidas la obesidad y la hiperinsulinemia están asociadas con una sobre activación crónica del sistema nervioso simpático, lo que lleva a especular sobre su participación en la patogénesis del SOPQ (Lansdown, 2012). El ovario de la mujer con SOPQ presenta una mayor densidad en el contenido de fibras catecolaminérgicas (Stener-Victorin, 2004) y ésta inervación simpática está acoplada a la secreción de hormonas esteroides (Lara y col., 2001).

En la rata también se ha sugerido que la hiperactivación de los nervios simpáticos que llegan al ovario participa en el desarrollo y mantenimiento del ovario poliquístico (Lara y col., 1993).

En la rata se utiliza la administración del VE para estimular al sistema nervioso periférico que inerva al ovario e inducir el SOPQ. Esta activación es evidenciada por un incremento en la capacidad de las terminales nerviosas ováricas para incorporar y liberar NA y una baja regulación de los β -adrenoreceptores en los ovarios (Barria y col., 1993). En este modelo experimental se desarrolla un estado anovulatorio que muestra muchas características morfológicas y endocrinas del SOPQ humano.

En los animales tratados con VE incrementa la liberación de NA después de 30 días de iniciado el tratamiento, este incremento se hace más notable después de 60 días, cuando los quistes ováricos se han desarrollado completamente (Barria y col., 1993). La sección bilateral del NOS, conduce a la restauración del ciclo estral y recuperación de las funciones ováricas (Rosa-E-Silva, 2003; Barria, 1993).

Resultados de nuestro laboratorio muestran que el VE administrado en ratas de 10 días de edad conduce a un incremento en la concentración de NA y un bloqueo de la ovulación. La sección bilateral del NOS en estos animales restaura la función ovulatoria y provoca un descenso en la concentración de NA en ambos ovarios, mientras que, con la sección unilateral (izquierda o derecha) del NOS incrementa la tasa de animales ovulantes y el número de ovocitos liberados por parte del ovario inervado, aún cuando la concentración de NA es alta. Estos resultados nos han permitido postular que el SOPQ, inducido por VE, no es el resultado exclusivo de una mayor actividad del sistema simpático del ovario (Morales y col., 2010).

En la rata infantil tratada con VE la sección izquierda o bilateral del nervio vago resulta en la recuperación de la respuesta ovulatoria en el 65% de los animales, mientras que con la sección derecha lo hace el 72%. Evidencia de que la información neural que llega por el nervio vago participa en los mecanismos que regulan el desarrollo y mantenimiento del SOPQ, y que puede existir a nivel del ganglio celiaco mesentérico superior (GCMS) comunicación entre las fibras simpáticas y parasimpáticas, donde el nervio vago actuaría como un canal de comunicación entre los ovarios (Linares y col., 2013; Navarrete, 2014).

Planteamiento del problema

El SOPQ es la principal causa de esterilidad anovulatoria en mujeres en edad reproductiva. A nivel experimental, se puede inducir la fisiopatología por la administración de una dosis de VE. Sin embargo, de los reportes que tenemos al momento, cuando se ha utilizado el modelo de la rata adulta, no se especifica el día del ciclo en el cual se realiza la administración del estrógeno.

La etiología del SOPQ no es bien conocida, algunos autores sugieren un desorden en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario y al ambiente neuroendocrino del propio ovario. A partir de la década de los 80's se postula que el SOPQ es el resultado de una hiperactividad de las fibras simpáticas que arriban al ovario por el NOS.

A la fecha sabemos que en la rata tratada con VE en la etapa infantil, la sección unilateral del NOS es capaz de restablecer la ovulación sólo por parte del ovario inervado, sin embargo, desconocemos si esta respuesta se presenta cuando la administración del fármaco se realiza en la rata adulta cíclica.

Con base en las premisas anteriores, en el presente estudio se decidió analizar en la rata adulta tratada con VE en el día del diestro, proestro o estro, la participación del NOS en el mantenimiento del SOPQ evaluado por la respuesta ovulatoria y la secreción de estradiol, FSH y LH.

Hipótesis

Si en la rata el ambiente endócrino del ovario y la información que recibe la gónada por el NOS participan en el desarrollo del SOPQ, inducido por la administración de VE, entonces, el restablecimiento de las funciones ováricas va depender del día del ciclo estral en el que se inicie el tratamiento y del nervio seccionado.

Objetivos

General:

Estudiar en la rata adulta tratada con VE en diferentes etapas del ciclo estral, la respuesta del ovario a la sección del nervio ovárico superior.

Particulares:

- Estudiar en la rata adulta, el efecto de la administración del VE en diferentes etapas del ciclo sobre la respuesta ovulatoria.
- Estudiar en la rata tratada con VE en las diferentes etapas del ciclo estral, el efecto de la sección unilateral o bilateral del NOS sobre la respuesta ovulatoria y la concentración de estradiol.
- Analizar en la rata tratada con VE en las diferentes etapas del ciclo estral, el efecto de la sección unilateral o bilateral del NOS sobre la concentración de FSH y LH

Método y diseño experimental

ANIMALES

Se utilizaron ratas hembras de la cepa CII-ZV, de 60 días de edad cíclicas, mantenidas bajo condiciones controladas de iluminación de 14 h de luz por 10 h de oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h), y temperatura de 22 ± 2 °C, con libre acceso al agua y alimento. Al presentar dos ciclos estrales consecutivos se administró VE o vehículo (VH) en el día del diestro 1, proestro o estro. Los animales fueron asignados al azar a alguno de los siguientes grupos experimentales.

Animales tratados con VE. En el día del diestro 1, proestro o estro (D1 VE, P VE y E VE); se procedió a administrar por vía intraperitoneal una dosis del fármaco, disuelto en el vehículo. Para ello se disolvieron 2 mg de VE (sigma Chemical Co., St. Louis Mo. USA) en 0.1 ml de aceite de maíz (el cual fue utilizado como vehículo). Los grupos testigo, lo conformaron animales inyectados con el vehículo en los mismos días del ciclo que en el caso del fármaco y utilizando el mismo volumen (D1-VH, P-VH y E-VH). Se contó con un grupo testigo absoluto (TA) el cual consistió en animales cíclicos sin ningún tratamiento.

Animales tratados con VE más sección del nervio ovárico superior. Transcurridos 60 días desde el tratamiento con VE las hembras fueron anestesiadas con éter y sometidas a la sección del nervio ovárico superior, ya sea izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SB). Como grupo testigo se utilizaron animales tratados con VE y sometidos a operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB).

Animales tratados con VH más sección del nervio ovárico superior. Transcurridos 60 días desde el tratamiento con VH las hembras fueron anestesiadas con éter y sometidas a la sección del nervio ovárico superior, ya sea izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SB). Como grupo testigo se utilizaran animales tratados con VH y sometidos a operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB).

Se realizó el monitoreo del ciclo estral a las hembras sometidas a cirugía, las cuales, fueron autopsiadas aproximadamente a los 130 días de edad (aproximadamente a los 10 días post-cirugía) cuando presentaron estro vaginal. Los grupos sin cirugía fueron autopsiados a los 130 días de edad, al presentar estro vaginal.

SECCIÓN UNILATERAL O BILATERAL DEL NERVI O VÁRICO SUPERIOR.

Para realizar la sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior, los animales fueron anestesiados con éter, se realizó una incisión longitudinal en la piel y el músculo sobre el costado izquierdo, derecho o en ambos, de aproximadamente 1 cm. de largo, a través de la cual se exteriorizó el ovario unido al útero. Localizado el ovario se realizó la sección del nervio ovárico (aproximadamente a un centímetro de distancia del ovario) izquierdo, derecho o de ambos nervios. Terminada la denervación se regresó el ovario unido al útero a la cavidad peritoneal y se procedió a suturar la herida.

OPERACIÓN SIMULADA.

Una vez anestesiados los animales con éter, se realizó una laparotomía, que consistió en hacer una incisión longitudinal en la piel y el músculo sobre el costado izquierdo, derecho o en ambos, de aproximadamente 1 cm. de largo, a través de la cual se exteriorizó el ovario unido al útero, se regresó a la cavidad peritoneal y se procedió a suturar la herida.

MONITOREO DEL CICLO ESTRAL

Para determinar la etapa del ciclo estral se realizaron frotis vaginales diarios, se tomó de la vagina una muestra con el asa bacteriológica, se colocó en un porta objetos, el cual fue teñido con hematoxilina-eosina, y se observó al microscopio. Después de administrar el VE o el VH, se suspende el monitoreo del ciclo, reanudándose después de la cirugía. En los animales sin cirugía el frotis vaginal se reanudó a los 120 días de edad.

AUTOPSIA

Después de 10 días transcurridos de la cirugía, o a los 130 días de edad para los animales sin cirugía, al presentar un estro vaginal, se registró el peso corporal de cada animal y se sacrificaron por decapitación entre las 9:00 y 12:00 h. Se colectó la sangre del tronco y se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido este lapso de tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 3200 r.p.m. durante 15 minutos para después separar el suero del botón celular y depositarlo en tubos eppendorf y congelarlo a -20 °C hasta el momento en que se realizó la cuantificación de 17 β -estradiol y hormonas gonadotrópicas (FSH y LH).

Se extirparon los oviductos para detectar la presencia de ovocitos, siguiendo la metodología habitual del laboratorio (Morales y col, 1998). Así mismo, se extirparon y pesaron los ovarios y útero.

CUANTIFICACIÓN DE 17 β -ESTRADIOL Y GONADOTROPINAS

La concentración de estradiol se cuantificó por radioinmunoanálisis (RIA) de fase sólida, mediante reactivos comerciales (Coat-A-Count). En tubos de polipropileno (que contienen el anticuerpo específico anti-estradiol- I^{125}), se adicionó la muestra problema (100 μ l) y 1 ml de la hormona radioactiva (I^{125}). Para facilitar la reacción, la mezcla se agitó en un vortex durante 1 minuto y se incubó durante 3 h a temperatura ambiente. Transcurrido éste tiempo, la muestra se decantó, se removió el exceso de líquido y se determinó la concentración de la hormona en la muestra problema con la ayuda de un contador de rayos gamma modelo Cobra 5005, Packard TM, en función de las cuentas por minuto y una curva de calibración.

Para la cuantificación de gonadotropinas se utilizó el RIA de doble anticuerpo. Para ello, a 100 μ l de suero problema se le añadió 100 μ l de hormona marcada con I^{125} , posteriormente se le adicionó el anticuerpo de suero de borrego para LH (rLH-RP2) o

para FSH (rFSH-RP2). Se incubaron a temperatura ambiente por 24 h. Posteriormente se agregaron 100 μ l del segundo anticuerpo (suero normal de conejo) y se incubaron durante 2 h; después los tubos se centrifugaron a 3000 r.p.m. a -4 °C por 30 minutos, el sobrenadante se decantó y se secaron las paredes de cada tubo. Finalmente, los tubos fueron colocados en un contador de centello gamma modelo Cobra 5005, Packard TM para determinar las cpm y poder calcular la concentración de la hormona.

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

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos del peso corporal, el peso relativo de los órganos (ovarios y útero) y la concentración sérica de gonadotropinas y estradiol se analizó por la prueba de Análisis de Varianza Multifactorial (ANDEVA) seguida por la prueba de Tukey. En el caso de realizar la comparación entre dos grupos se utilizó la prueba “*t*” de Student. El número de ovocitos liberados se analizó por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la prueba de Dunn. En el caso de realizar comparación entre dos grupos se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney. La tasa de animales ovulantes (número de animales ovulantes/número total de animales) se analizó por la prueba de χ^2 . Se consideraron como estadísticamente significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue menor o igual a 0.05.

Resultados

Experimento 1. Efecto de la administración de VE en los días del diestro 1, proestro o estro, sobre la respuesta ovulatoria.

Monitoreo del ciclo estral

Todos los grupos inyectados con VE perdieron el patrón del ciclo estral, independientemente del día del ciclo en el que se inyectó el fármaco.

Tasa de animales ovulantes y ovocitos liberados.

Respecto al testigo absoluto la inyección con VH en el diestro 1, proestro o estro no modificó el porcentaje de animales ovulantes ni el número de ovocitos liberados. La inyección de VE no modificó esta respuesta (Fig 6).

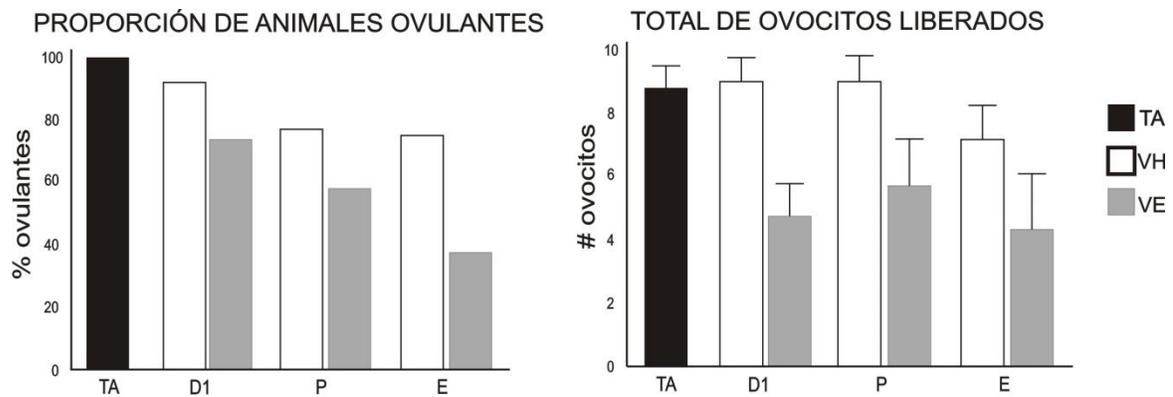


Fig. 6. Proporción de animales ovulantes y media \pm e.e.m. del número total de ovocitos liberados en hembras de 60 días de edad tratadas en el día del diestro 1 (D1), proestro (P) o estro (E) con valerato de estradiol (VE) o vehículo (VH) y hembras testigo absoluto (TA). Sacrificadas a los 130 días de edad en el día del estro

Respecto al grupo testigo, los animales inyectados con el VH en el día del proestro mostraron un menor peso corporal. En el diestro 1 la administración de VE resultó en un menor peso corporal respecto a su grupo con VH. El peso de los ovarios no se modificó por el VE respecto al grupo tratado con VH. De igual manera, el VE no modificó el peso del útero cuando se inyectó el fármaco en el día del diestro 1 o proestro, al inyectarlo en el estro se observó mayor peso del órgano (Tabla 1).

Tabla 1. Media \pm e.e.m. del peso corporal, pesos relativos (mg/100g de peso corporal) del ovario izquierdo (OI), derecho (OD), masa ovárica (MO) y útero de hembras testigo absoluto (TA), tratadas en el diestro 1 (D1), proestro (P) o estro (E) con vehículo (VH) o valerato de estradiol (VE) y sacrificadas a los 130 días de edad.

GRUPO	n	PESO	OI	OD	MO	ÚTERO
TA	6	307.0 \pm 11.67	9.4 \pm 1.24	8.9 \pm 0.47	19.3 \pm 1.81	141.2 \pm 9.09
D1-VH	13	284.6 \pm 6.1	10.6 \pm 0.54	11.1 \pm 0.52	21.1 \pm 1.01	150.2 \pm 5.78
D1-VE	12	260.9 \pm 6.78*♣	11.8 \pm 0.96	10.4 \pm 0.95	22.2 \pm 1.66	171.07 \pm 8.94
P-VH	13	269.8 \pm 6.52*	12.3 \pm 0.68	11.7 \pm 0.7	24.1 \pm 1.17	158.4 \pm 4.79
P-VE	12	267.5 \pm 5.37*	11.3 \pm 1	10.0 \pm 1.2	21.8 \pm 1.92	162.0 \pm 5.93
E-VH	8	285.0 \pm 5.65	10.2 \pm 0.59	10.4 \pm 0.99	20.6 \pm 1.28	154.4 \pm 6.6
E-VE	8	265.9 \pm 8.37*	9.8 \pm 0.74	7.9 \pm 0.68	16.7 \pm 1.21	166.9 \pm 7.2♣

* $P < 0.05$ vs TA prueba de ANDEVA seguida de Tukey. ♣ $P < 0.05$ vs su grupo con VH prueba de t de Student.

Hormonas gonadotróficas y estradiol.

Con respecto al testigo absoluto, la inyección de VH en los días de diestro 1 o proestro no modificó la concentración de estradiol, mientras que en el día del estro fue mayor. El tratamiento con VE en los diferentes días del ciclo no modificó la concentración de la hormona, respecto al grupo con VH (Fig. 7). En el diestro 1 la inyección del VH disminuyó de manera significativa la concentración de FSH en suero, respecto al grupo testigo absoluto. Respecto al grupo con VH, la administración del VE no modificó la concentración de FSH, independientemente del día del ciclo (Fig. 7).

Respecto al testigo absoluto, la inyección con el VH en el día del diestro 1 resultó en una concentración mayor de LH. La administración de VE en el día del diestro disminuyó la concentración sérica de LH al compararla con el VH, mientras que en el día del proestro se registró una concentración mayor (Fig. 7).

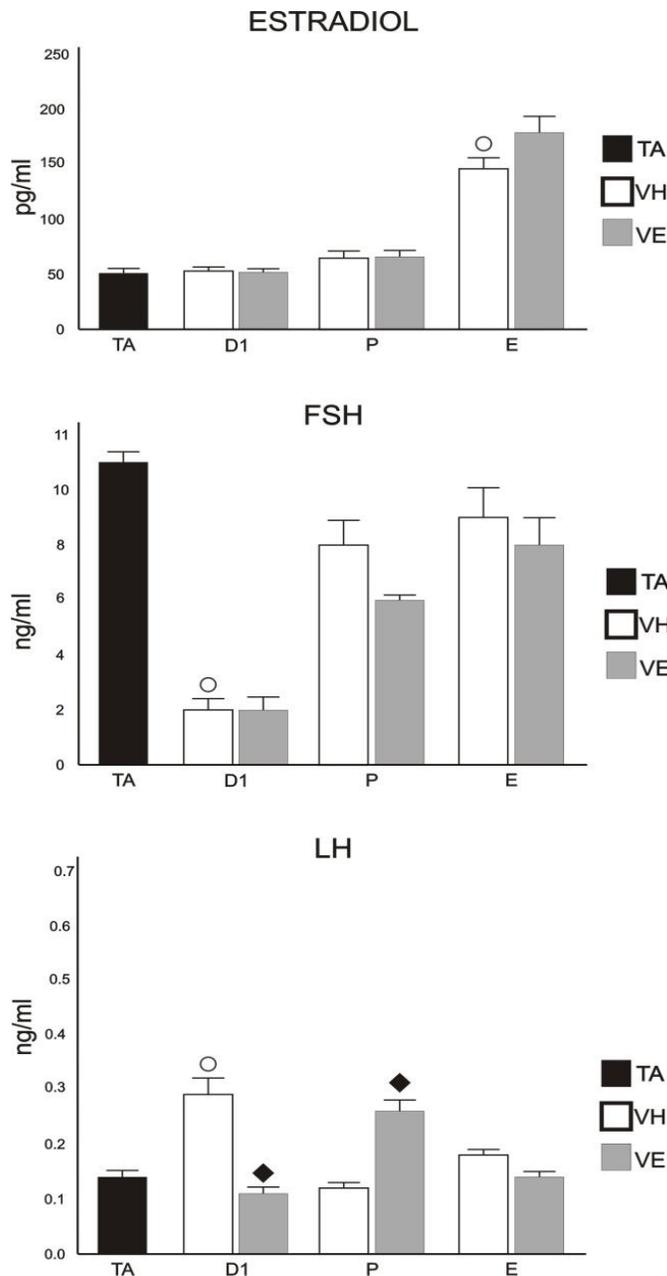


Fig. 7. Media \pm e.e.m. de la concentración de estradiol, hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) de hembras testigo absoluto (TA), tratadas en el diestro 1 (D1), proestro (P) o estro (E) con vehículo (VH) o valerato de estradiol (VE) y sacrificadas a 130 días de edad.

○ $P < 0.05$ vs TA prueba de ANDEVA seguida de Tukey. ♦ $P < 0.05$ vs su grupo con VH prueba de "t" de Student.

Experimento 2. Efecto de la sección del NOS izquierdo en ratas tratadas con VH o VE en el diestro 1, proestro o estro, sobre la respuesta ovárica.***Número de animales ovulantes y ovocitos liberados.***

En los grupos inyectados con VH en el día del diestro 1 o proestro la operación simulada no modificó la proporción de animales ovulantes respecto al grupo sin cirugía, sin embargo, en el día del proestro incrementó la cuota ovulatoria por el ovario izquierdo. En los tratados con el VH en el día del estro incrementó la tasa ovulatoria por el ovario derecho, acompañado por una disminución en el número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo (Fig. 8).

La sección del NOS izquierdo en los animales inyectados con el VH en el día del proestro o estro disminuyó el porcentaje de animales ovulantes por ambos ovarios, cuando el VH se inyectó en el día del diestro 1 la disminución sólo se observó por el ovario derecho, respecto a sus grupos con operación simulada (Fig. 8.).

En comparación con el grupo tratado con VE, en los animales tratados con VE en el día del diestro y sometidos a la operación simulada izquierda, se registró un bloqueo total en la respuesta ovulatoria, en las hembras con sección del NOS izquierdo la proporción de animales ovulantes fue del 80%, con una cuota ovulatoria superior al grupo sin cirugía (Fig. 9).

En las hembras inyectadas con VE en el día del proestro y sometidas a la operación simulada, sólo ovuló un animal por el ovario derecho con 5 ovocitos, en tanto que con la sección del NOS izquierdo ovularon alrededor del 66% de los animales con una cuota ovulatoria semejante al de su grupo con VE sin ninguna cirugía (Fig. 9).

En el grupo inyectado con VE en el día del estro y sometido a la operación simulada, ovuló el 80% de los animales (Fig. 9) Con la sección del NOS izquierdo sólo ovularon alrededor del 30% de los animales, sin cambios en la cuota ovulatoria respecto a su grupo con operación simulada (Fig. 9).

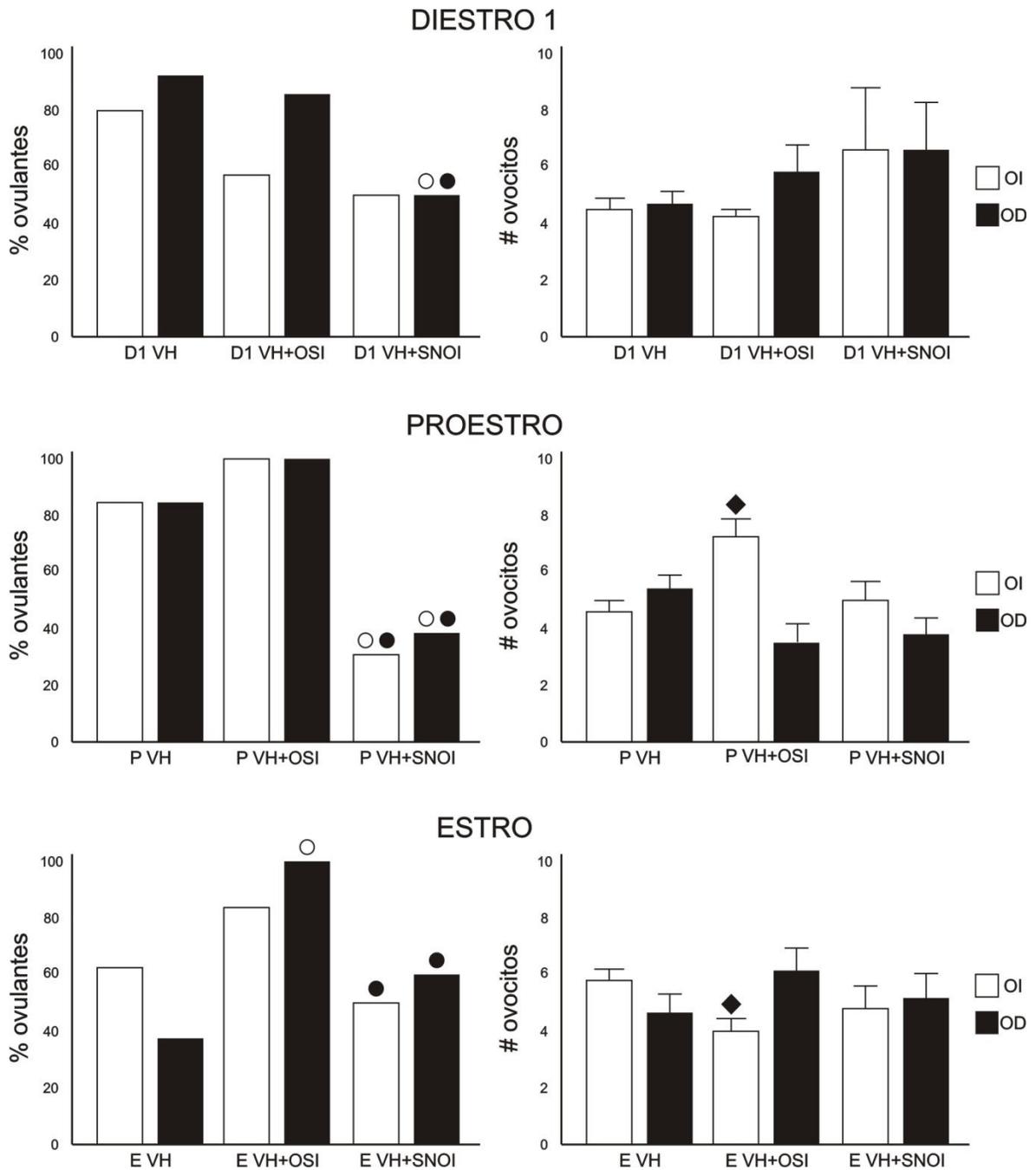


Fig. 8. Proporción de animales ovulantes y media \pm eem del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) en hembras tratadas a los 60 días de edad en el diestro 1, proestro o estro con vehículo (VH), 60 días después se realizó la sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) u operación simulada izquierda (OSI). Sacrificadas a los 10 días post-cirugía en el día del estro. $\circ P < 0.05$ vs su grupo sin cirugía prueba de χ^2 , $\bullet P < 0.05$ operación simulada prueba de χ^2 , $\blacklozenge P < 0.05$ vs su grupo tratado sin cirugía prueba de U de Mann-Whitney.

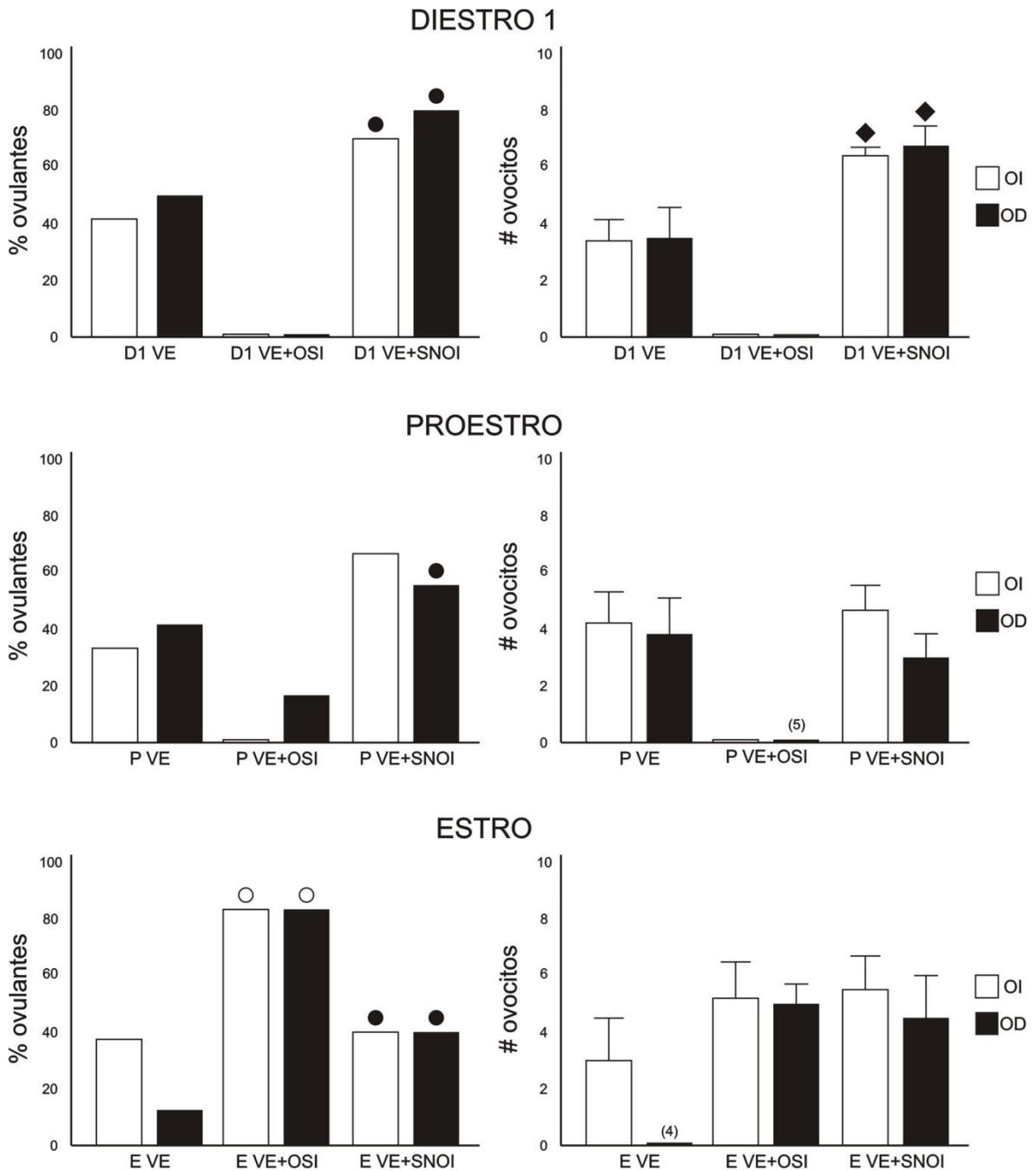


Fig. 9. Proporción de animales ovulantes y media \pm eem del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) en hembras tratadas a los 60 días de edad en el diestro 1, proestro o estro con valerato de estradiol (VE), 60 días después se realizó la sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) u operación simulada izquierda (OSI). Sacrificadas a los 10 días post-cirugía en el día del estro. ● $P < 0.05$ operación simulada prueba de χ^2 , ○ $P < 0.05$ vs su grupo sin cirugía prueba de χ^2 , ◆ $P < 0.05$ vs su grupo tratado sin cirugía prueba de U de Mann-Whitney.

En las hembras tratadas con VH en el día del diestro 1 la sección izquierda del NOS incrementó el peso de la masa ovárica, respecto al grupo con operación simulada (Tabla 2). En las hembras inyectadas con VE en el diestro 1 la operación simulada o sección del NOS izquierdo, el peso corporal fue menor al compararse con su respectivo grupo con VH. En las hembras inyectadas con VE, la operación simulada incrementó el peso de la masa ovárica respecto a su grupo tratado con VH. Respecto a su grupo tratado con VH, en los animales tratados con VE en el día del estro la laparotomía izquierda incrementó el peso del ovario izquierdo, incrementando así el peso de la masa ovárica. Respecto a su grupo con operación simulada, en las hembras con sección del NOS izquierdo el peso del ovario derecho fue menor sin modificar el peso de la masa ovárica (Tabla 2).

Tabla 2. Media \pm e.e.m. del peso corporal, pesos relativos (mg/100g de peso corporal) del ovario izquierdo (OI), derecho (OD) y masa ovárica (MO) de hembras tratadas a los 60 días de edad en el diestro 1 (D1), proestro (P) o estro (E) con vehículo (VH) o valerato de estradiol (VE), 60 días después se realizó la operación simulada izquierda (OSI) o la sección del NOS izquierdo (SNOI). Sacrificadas a los 10 días post-cirugía en el día del estro.

GRUPO	n	PESO	OI	OD	MO	ÚTERO
D1-VH OSI	7	280.4 \pm 7.92	12.9 \pm 0.48	9.6 \pm 0.37	18.3 \pm 1.58	159.7 \pm 6.51
D1-VH SNOI	10	305.9 \pm 8.36	9.6 \pm 0.32♣	11.8 \pm 0.37♣	21.8 \pm 0.59♣	144.3 \pm 7.32
D1-VE OSI	5	245.2 \pm 0.71*	11.4 \pm 0.7	11.8 \pm 0.46 *	23.5 \pm 0.42*	171.2 \pm 6.23
D1-VE SNOI	10	275.6 \pm 6.57*♣	10.2 \pm 0.5	10.9 \pm 0.69	23.3 \pm 0.66	166.8 \pm 7.07

P-VH OSI	4	259.1 \pm 11.67	11.7 \pm 0.4	11.2 \pm 0.93	24.5 \pm 1.35	153.6 \pm 6.79
P-VH SNOI	13	281.0 \pm 7.21	10.6 \pm 0.75	11.2 \pm 0.5	21.5 \pm 1.26	148.2 \pm 7.06
P-VE OSI	6	259.7 \pm 7.71	10.9 \pm 1.27	10.0 \pm 0.94	21.0 \pm 2.04	164.7 \pm 15.57
P-VE SNOI	9	257.8 \pm 8.84	10.2 \pm 0.63	10.6 \pm 0.65	20.9 \pm 1.03	162.5 \pm 7.29

E-VH OSI	7	276 \pm 11.55	9.81 \pm 0.7	10.11 \pm 0.58	19.92 \pm 0.91	163.9 \pm 11.32
E-VH SNOI	10	268.9 \pm 9	10.03 \pm 1.08	11.03 \pm 0.71	22.89 \pm 1.48	172.68 \pm 7.28
E-VE OSI	6	254.7 \pm 5.64	12 \pm 0.35*	12.57 \pm 0.81	24.57 \pm 1.04 *	170.32 \pm 9.71
E-VE SNOI	10	253.7 \pm 3.55	10.47 \pm 0.74	8.47 \pm 0.69*	19.74 \pm 1.65	181.34 \pm 7.02

* $P < 0.05$ vs su grupo tratado con VH, ♣ $P < 0.05$ vs su grupo con operación simulada prueba de "t" de Student.

Efecto de la sección del NOS izquierdo sobre la concentración de hormonas gonadotrópicas y estradiol en hembras inyectadas con VH o VE en el diestro, proestro o estro.

Hembras inyectadas en diestro

En las hembras inyectadas con VH, la operación simulada incrementó la concentración de estradiol y de FSH, respecto al grupo con VH. La sección del NOS izquierdo incrementó la concentración de FSH respecto a el grupo sin cirugía o contra el grupo con operación simulada (Fig. 10).

La operación simulada izquierda o la sección del NOS izquierdo en los animales tratados con VE también incrementaron la concentración de FSH y LH, respecto al grupo sin cirugía (Fig. 10).

Hembras inyectadas en proestro

En las hembras inyectadas con VH, la sección del NOS izquierdo incrementó la concentración de estradiol con respecto al grupo sin cirugía. En las hembras inyectadas con VH y sometidas a la sección del NOS izquierdo se observó una concentración de FSH menor respecto a su grupo con operación simulada o al grupo sin cirugía (Fig. 11).

En el grupo inyectado con VE en el día del proestro, la concentración de estradiol fue mayor después de la sección del NOS izquierdo respecto a su grupo con VE o con operación simulada. En el grupo tratado con VE la laparotomía izquierda disminuyó la concentración de FSH respecto al grupo sin cirugía, mientras que en las hembras con sección del NOS izquierdo fue mayor la concentración de la hormona al compararla contra su grupo con operación simulada (Fig. 11).

En hembras tratadas con VH en el día del proestro, la sección del NOS izquierdo incrementó la concentración de la LH respecto a su grupo sin cirugía (Fig. 11).

Hembras inyectadas en estro

En las hembras inyectadas con VH, la operación simulada incrementó la concentración de estradiol respecto al grupo sin cirugía, mientras que la sección del NOS izquierdo produjo un descenso en la concentración de la hormona respecto a su grupo con laparotomía o al grupo sin cirugía. En el grupo tratado con VH en el día del estro y sección del NOS izquierdo incrementó la concentración sérica de LH en comparación de los grupos con operación simulada o sin cirugía (Fig. 12).

En el grupo inyectado con VE y sección del NOS izquierdo la concentración de estradiol disminuyó respecto al grupo sin cirugía (Fig. 12).

Las hembras tratadas con VE en el día del estro sometidas a la sección del NOS izquierdo mostraron una menor concentración sérica de FSH respecto a su grupo con operación simulada o sin cirugía (Fig. 12).

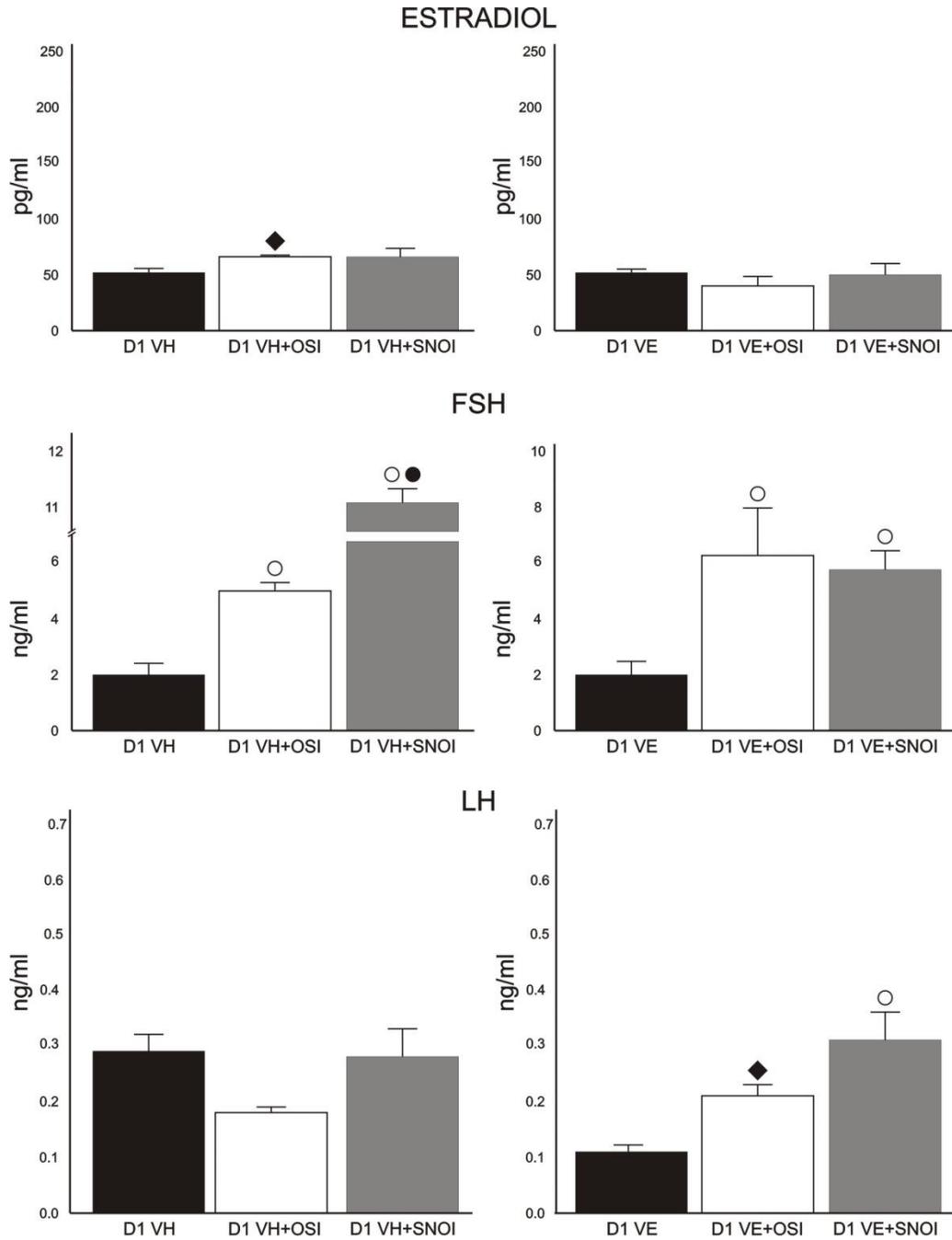


Fig. 10. Media \pm e.e.m. de la concentración de estradiol, hormona luteinizante (LH) u hormona fólculo estimulante (FSH) de hembras tratadas a los 60 días de edad en el diestro 1 (D1), con vehículo (VH) o valerato de estradiol (VE), 60 días después se realizó la sección del NOS izquierdo (SNOI) u operación simulada izquierda (OSI). Sacrificadas a los 10 días post-cirugía en el día del estro. ◆ $P < 0.05$ vs su grupo sin cirugía prueba de *t* de Student, ○ $P < 0.05$ vs su grupo sin cirugía prueba de ANDEVA seguida de Tukey, ● $P < 0.05$ vs su grupo con operación simulada prueba de ANDEVA seguida de Tukey,

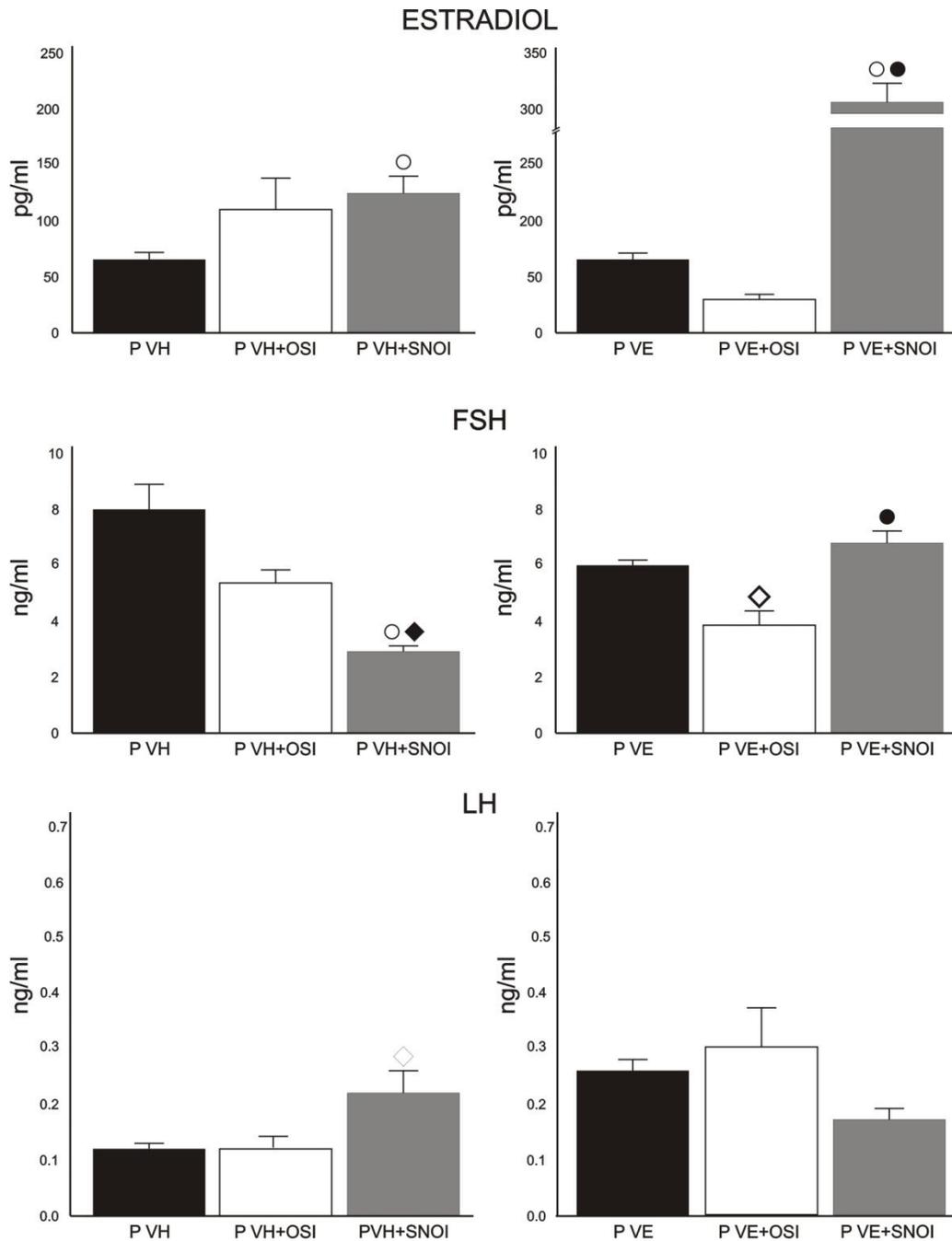


Fig. 11. Media \pm e.e.m. de la concentración de estradiol, hormona luteinizante (LH) u hormona folículo estimulante (FSH) de hembras tratadas a los 60 días de edad en el proestro (P), con vehículo (VH) o valerato de estradiol (VE), 60 días después se realizó la sección del NOS izquierdo (SNOI) u operación simulada izquierda (OSI). Sacrificadas a los 10 días post-cirugía en el día del estro. $\circ P < 0.05$ vs su grupo sin cirugía prueba de ANDEVA seguida de Tukey, $\bullet P < 0.05$ vs su grupo con operación simulada prueba de ANDEVA seguida de Tukey $\diamond P < 0.05$ vs su grupo sin cirugía prueba de t, $\blacklozenge P < 0.05$ vs su grupo con operación simulada.

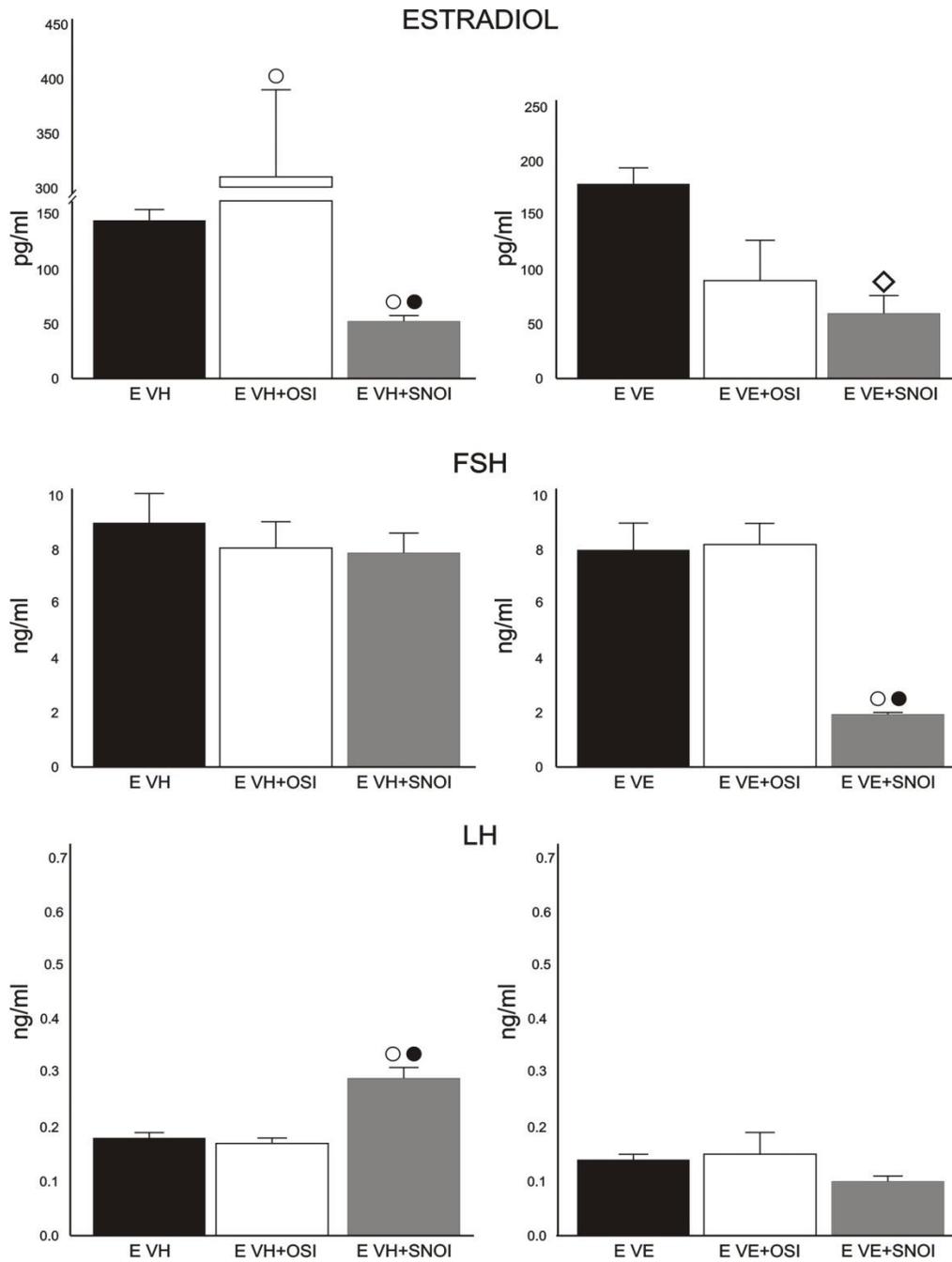


Fig. 12. Media \pm e.e.m. de la concentración de estradiol, hormona luteinizante (LH) u hormona fólculo estimulante (FSH) de hembras tratadas a los 60 días de edad en el estro (E), con vehículo (VH) o valerato de estradiol (VE), 60 días después se realizó la sección del NOS izquierdo (SNOI) u operación simulada izquierda (OSI). Sacrificadas a los 10 días post-cirugía en el día del estro. $\circ P < 0.05$ vs su grupo sin cirugía prueba de ANDEVA seguida de Tukey, $\bullet P < 0.05$ vs su grupo con operación simulada prueba de ANDEVA seguida de Tukey $\diamond P < 0.05$ vs su grupo sin cirugía prueba de t.

Experimento 3. Efecto de la sección derecha del NOS en ratas tratadas con VE en el diestro 1, proestro o estro, sobre la respuesta ovárica.

Número de animales ovulantes y ovocitos liberados.

La sección del NOS derecho en los animales inyectados con VH en el día del diestro, reduce el porcentaje de animales ovulantes del ovario izquierdo, respecto a su operación simulada. En las hembras sometidas a la operación simulada derecha, el número de ovocitos liberados por el ovario derecho incrementó respecto a su grupo sin cirugía (Fig. 13).

En las hembras inyectadas en el día del proestro con VH la sección del NOS derecho disminuyó la proporción de animales ovulantes y el número de ovocitos (Fig. 13).

Las hembras inyectadas con VH en el día del estro la laparotomía derecha incrementó la proporción de animales ovulantes respecto al grupo sin cirugía (Fig. 13).

En las hembras inyectadas con VE en el día del diestro 1, la sección del NOS derecho reduce la proporción de animales ovulantes y de ovocitos liberados, ovulando un solo animal por el ovario izquierdo y dos por el derecho (Fig. 14).

En las hembras inyectadas en el día del proestro con VE y sometidas a la operación simulada derecha incrementó la proporción de animales ovulantes por el ovario derecho. En las hembras inyectadas en el día del proestro con VE la sección del NOS derecho disminuyó la proporción de animales ovulantes y ovocitos liberados (Fig. 14).

En las hembras tratadas con VE en el día del estro la sección del NOS derecho incrementó la proporción de animales ovulantes y la cantidad de ovocitos liberados respecto a su grupo con operación simulada (Fig. 14).

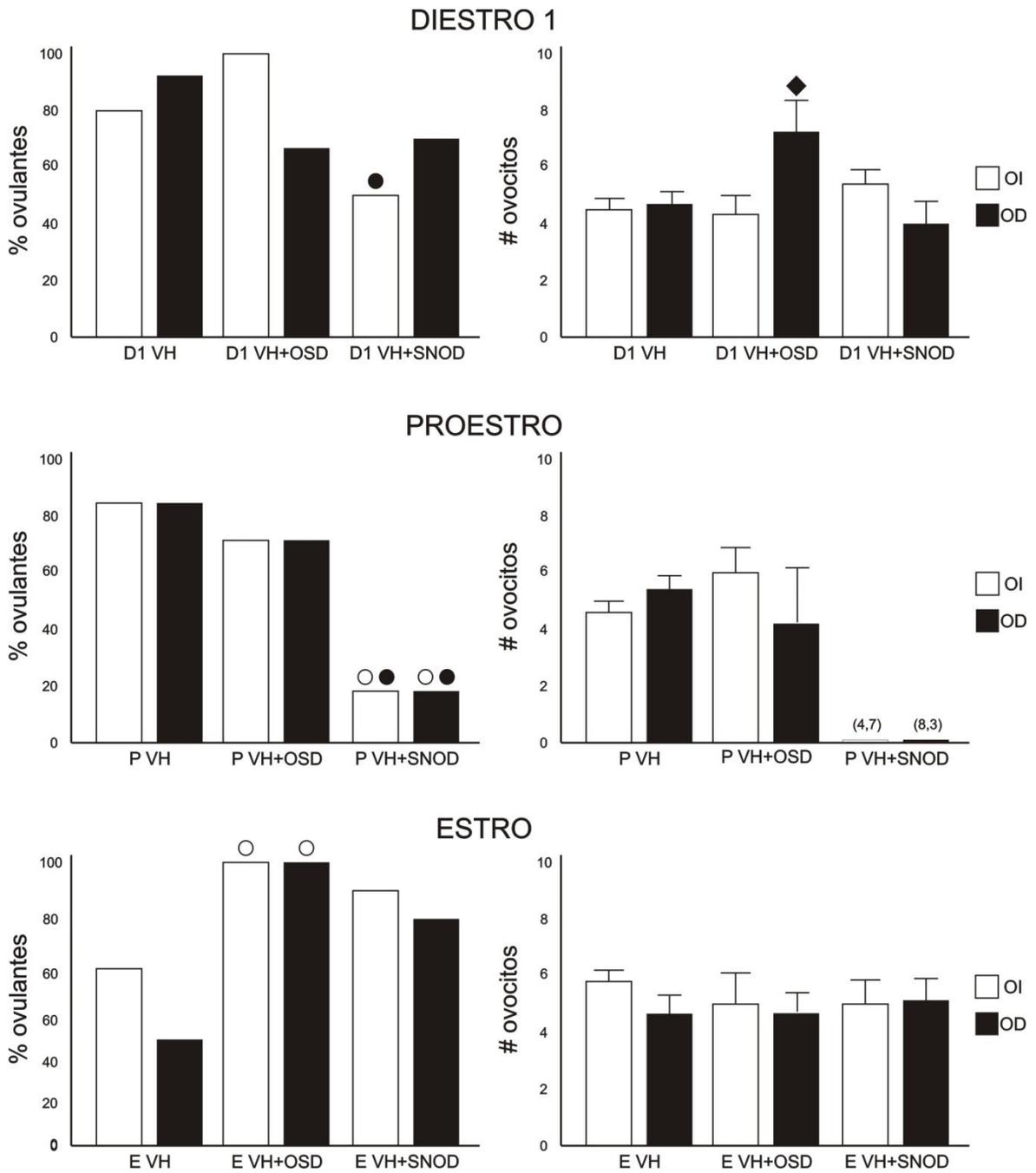


Fig. 13. Proporción de animales ovulantes y media \pm eem del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) en hembras tratadas a los 60 días de edad en el diestro 1, proestro o estro con vehículo (VH), 60 días después se realizó la sección del nervio ovárico superior derecho (SNOD) u operación simulada derecha (OSD). Sacrificadas a los 10 días post-cirugía en el día del estro. $\circ P < 0.05$ vs su grupo sin cirugía prueba de χ^2 , $\bullet P < 0.05$ operación simulada prueba de χ^2 , $\blacklozenge P < 0.05$ vs su grupo tratado sin cirugía prueba de U de Mann-Whitney.

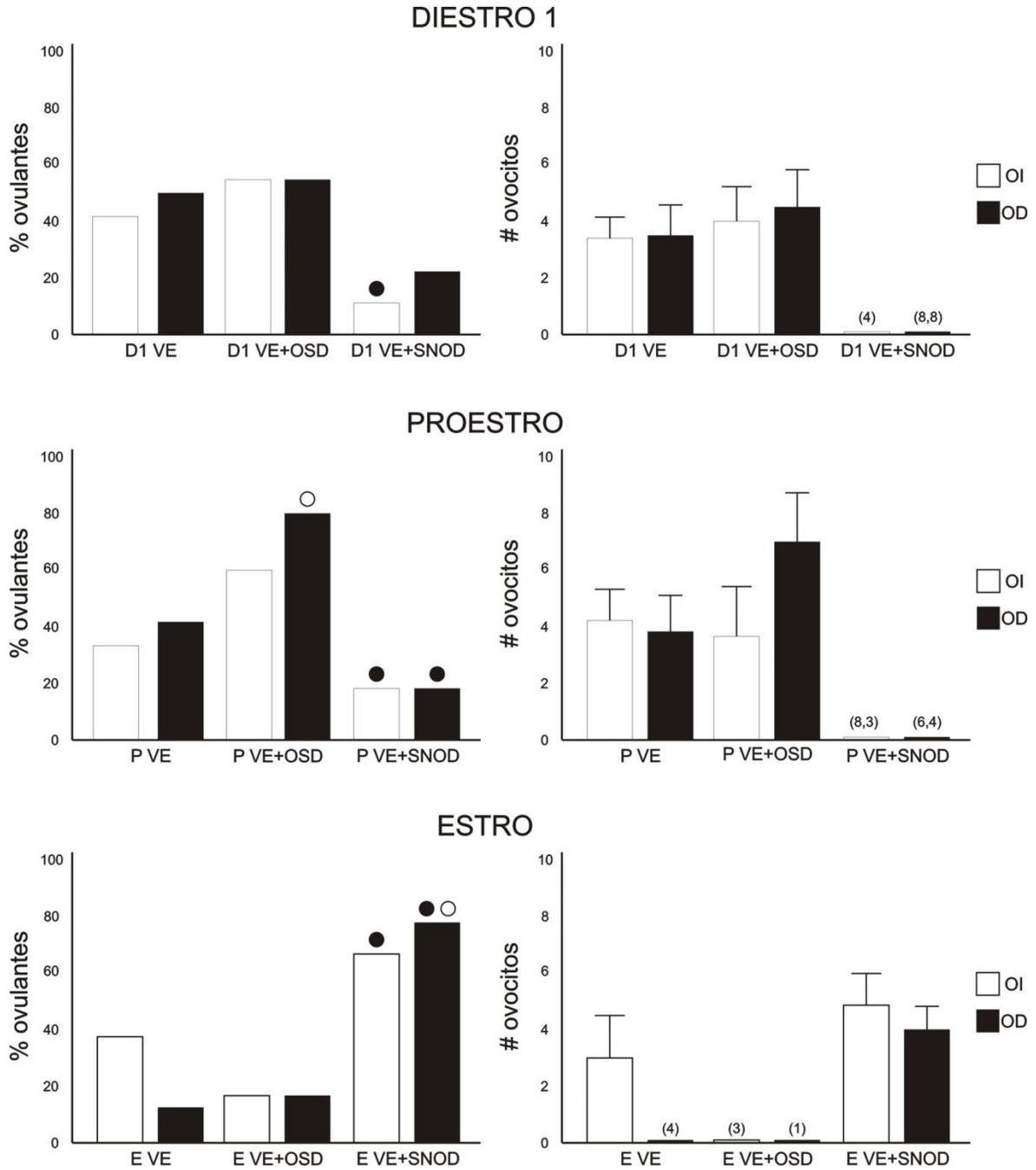


Fig. 14. Proporción de animales ovulantes y media \pm eem del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) en hembras tratadas a los 60 días de edad en el diestro 1, proestro o estro con valerato de estradiol (VE), 60 días después se realizó la sección del nervio ovárico superior derecho (SNOD) u operación simulada derecha (OSD). Sacrificadas a los 10 días post-cirugía en el día del estro. $OP < 0.05$ vs su grupo sin cirugía prueba de χ^2 , $\bullet P < 0.05$ operación simulada prueba de χ^2 .

La sección del NOS derecho en los animales tratados con VH en el día del diestro 1 provocó una disminución del peso relativo del ovario izquierdo y de la masa ovárica al compararla contra su grupo con operación simulada (Tabla 3). Con respecto a su grupo con operación simulada, en las hembras con sección del NOS derecho tratadas con VE en el día del diestro se observó un incremento en el peso corporal, disminución en el peso del ovario inervado y del peso del útero (Tabla 3).

En las ratas tratadas con VE en el día del proestro la sección del NOS derecho provocó un incremento en el peso del ovario derecho, de la masa ovárica y del útero cuando se comparó contra su grupo con operación simulada. Al comparar ambos grupos tratados con VE contra sus grupos tratados con VH se observó un decremento del peso corporal y no se observan cambios en el peso de los órganos, excepto en el ovario derecho del grupo tratado con VE y sometido a la sección del NOS derecho, el cual incrementa su peso al compararlo contra su grupo tratado con VH (Tabla 3).

En ambos grupos tratados con VE en el día del estro el peso del útero se incrementó respecto a los grupos tratados con VH. En el grupo con sección del NOS derecho tratado con VH también se observó un incremento del peso del útero con respecto a su grupo con operación simulada (Tabla 3).

Tabla 3. Media \pm e.e.m. del peso corporal, pesos relativos (mg/100g de peso corporal) del ovario izquierdo (OI), derecho (OD) y masa ovárica (MO) de hembras tratadas a los 60 días de edad en el diestro 1 (D1), proestro o estro con vehículo (VH) o valerato de estradiol (VE), 60 días después se realiza sección derecha del NOS (SNOD) u operación simulada derecha (OSD). Sacrificadas a los 10 días post-cirugía en el día del estro.

GRUPO	n	PESO	OI	OD	MO	ÚTERO
D1-VH OSD	6	260.6 \pm 11.55	13.6 \pm 0.67	12.6 \pm 0.78	27.0 \pm 1.09	160.5 \pm 8.84
D1-VH SNOD	10	280.5 \pm 7.38	11.0 \pm 0.63*	12.3 \pm 1.13	21.5 \pm 1.49*	142.7 \pm 5.1
D1-VE OSD	8	248.2 \pm 6.16	14.4 \pm 1.08	12.3 \pm 1.23	21.9 \pm 1.48	178.8 \pm 9.74
D1-VE SNOD	9	288.9 \pm 6.67*	10.7 \pm 0.75*	11.0 \pm 1.01	21.8 \pm 1.66	140.3 \pm 12.22*

P-VH OSD	7	260.4 \pm 9.21	11.7 \pm 0.85	11.2 \pm 0.9	23.4 \pm 0.55	150.7 \pm 6.11
P-VH SNOD	11	291.3 \pm 8.51	11.1 \pm 0.49	10.5 \pm 1.24	23.8 \pm 0.66	159.4 \pm 12.8
P-VE OSD	5	239.1 \pm 0.71♣	12.4 \pm 1.37	8.8 \pm 0.565	21.2 \pm 1.54	177.4 \pm 14.20
P-VE SNOD	11	251.4 \pm 9♣	12.4 \pm 1.11	13.7 \pm 0.67♣*	26.2 \pm 1.11*	219.7 \pm 9.64*

E-VH OSD	6	288.7 \pm 9.06	11.1 \pm 0.99	9.7 \pm 0.76	20.9 \pm 1.4	134.3 \pm 10.2
E-VH SNOD	10	273.4 \pm 5.88	9.7 \pm 0.52	10.9 \pm 5.88	20.7 \pm 0.62	159.6 \pm 0.62*
E-VE OSD	6	266.2 \pm 15.51	11.2 \pm 1.01	10.4 \pm 1.42	19.0 \pm 1.81	178.1 \pm 15.1♣
E-VE SNOD	9	269.6 \pm 4.28	10.7 \pm 0.65	10.7 \pm 4.28	21.5 \pm 0.92	179.7 \pm 0.92♣

* $P < 0.05$ vs su grupo tratado con operación simulada prueba de t de Student, ♣ $P < 0.05$ vs su grupo tratado con. VH prueba de ANDEVA seguida de Tukey

Efecto de la sección del NOS derecho sobre la concentración de hormonas gonadotrópicas y estradiol en hembras inyectadas con VH o VE en el diestro, proestro o estro.

Hembras inyectadas en diestro

En las hembras inyectadas con VH, la operación simulada derecha disminuyó la concentración de estradiol, respecto al grupo sin cirugía, este efecto no se observa en las hembras sometidas a la sección del NOS derecho. La laparotomía derecha o la sección del NOS derecho incrementó la concentración sérica de FSH al compararlo con el grupo control (Fig. 15).

En las hembras inyectadas con VH, la laparotomía derecha o la sección del NOS derecho condujeron a una disminución de la concentración de la LH respecto al grupo sin cirugía, en las hembras inyectadas con VE en el día del diestro solo la laparotomía derecha redujo la concentración de la hormona respecto al grupo sin cirugía, la sección derecha mostró cantidades superiores de LH respecto a su grupo con laparotomía (Fig. 15).

Hembras inyectadas en proestro

En las hembras inyectadas con VE, la laparotomía derecha disminuyó la concentración de estradiol respecto al grupo sin cirugía (Fig. 16).

En las hembras inyectadas con VH sometidas a la sección del NOS derecho o a la laparotomía mostraron una concentración de FSH menor respecto al grupo sin cirugía. Este efecto en el grupo tratado con VE, solo se observó en los animales con sección del NOS derecho (Fig. 16). En hembras tratadas con VH o VE en el día del proestro, la sección del NOS derecho incrementó la concentración de la LH respecto a su grupo sin cirugía o al grupo con operación simulada (Fig. 16).

Hembras inyectadas en estro

Las hembras inyectadas con VH o VE, la concentración de estradiol disminuyó al realizar la operación simulada derecha o la sección del NOS derecho (Fig. 17).

En las hembras inyectadas con VH sometidas a la sección del NOS derecho disminuyó la concentración de FSH respecto a su grupo con operación simulada así como contra el grupo sin cirugía (Fig. 17). En el grupo con VE en las hembras sometidas a la laparotomía derecha disminuyó la concentración de la gonadotropina, mientras que en las hembras sometidas a la sección del NOS derecho aumentó (Fig. 17).

La operación simulada derecha en las hembras inyectadas con VE incrementó la concentración de LH, respecto al grupo sin cirugía (Fig. 17).

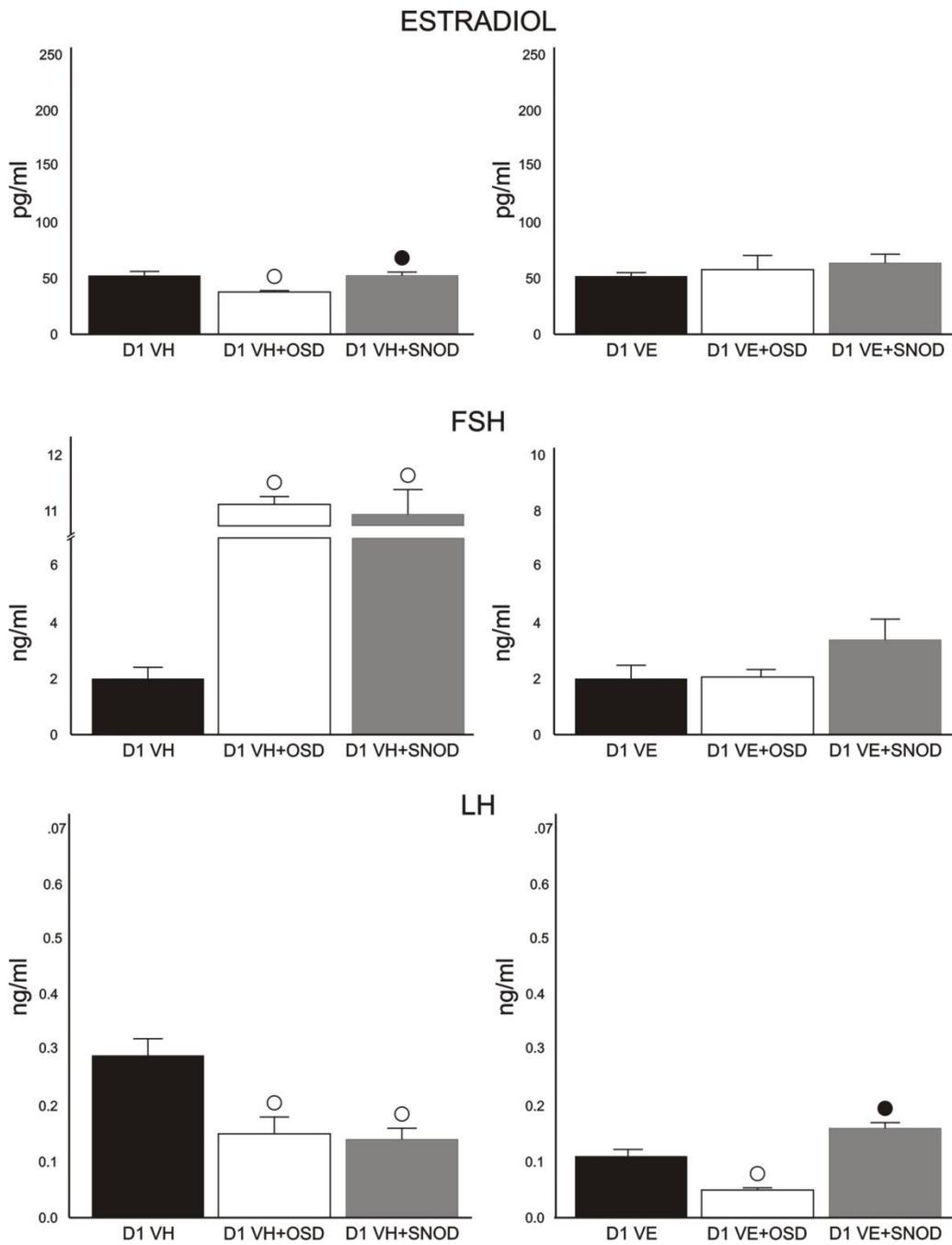


Fig. 15. Media \pm e.e.m. de la concentración de estradiol, hormona luteinizante (LH) u hormona fólculo estimulante (FSH) de hembras tratadas a los 60 días de edad en el diestro 1 (D1), con vehículo (VH) o valerato de estradiol (VE), 60 días después se realizó la sección del NOS derecho (SNOD) u operación simulada derecha (OSD). Sacrificadas a los 10 días post-cirugía en el día del estro. ○ P <0.05 vs su grupo sin cirugía prueba de ANDEVA seguida de Tukey, ● P <0.05 vs su grupo con operación simulada prueba de ANDEVA seguida de Tukey.

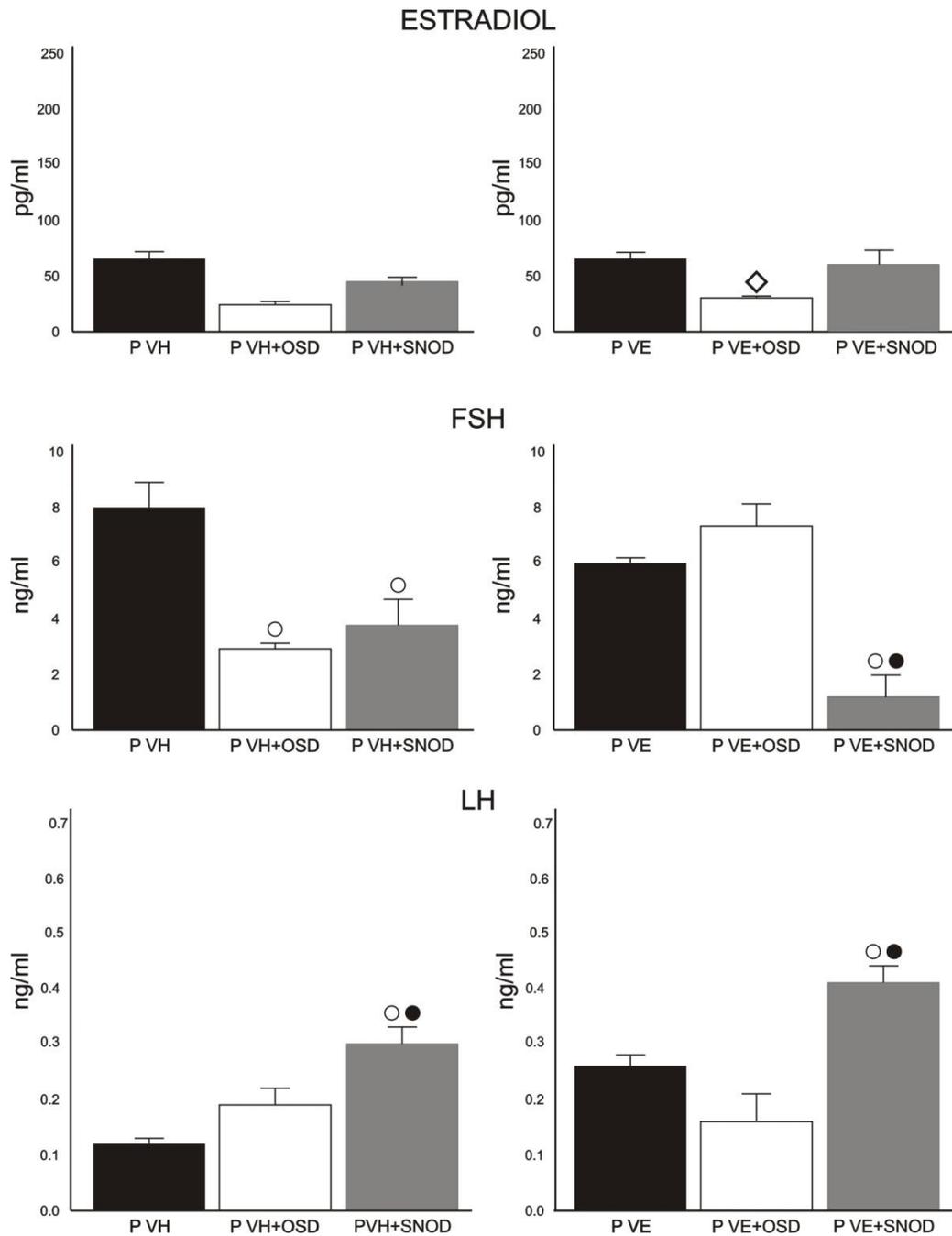


Fig. 16. Media \pm e.e.m. de la concentración de estradiol, hormona luteinizante (LH) u hormona folículo estimulante (FSH) de hembras tratadas a los 60 días de edad en el proestro (P), con vehículo (VH) o valerato de estradiol (VE), 60 días después se realizó la sección del NOS derecho (SNOD) u operación simulada derecha (OSD). Sacrificadas a los 10 días post-cirugía en el día del estro. $\circ P < 0.05$ vs su grupo sin cirugía prueba de ANDEVA seguida de Tukey, $\bullet P < 0.05$ vs su grupo con operación simulada prueba de ANDEVA seguida de Tukey $\diamond P < 0.05$ vs su grupo sin cirugía prueba de t.

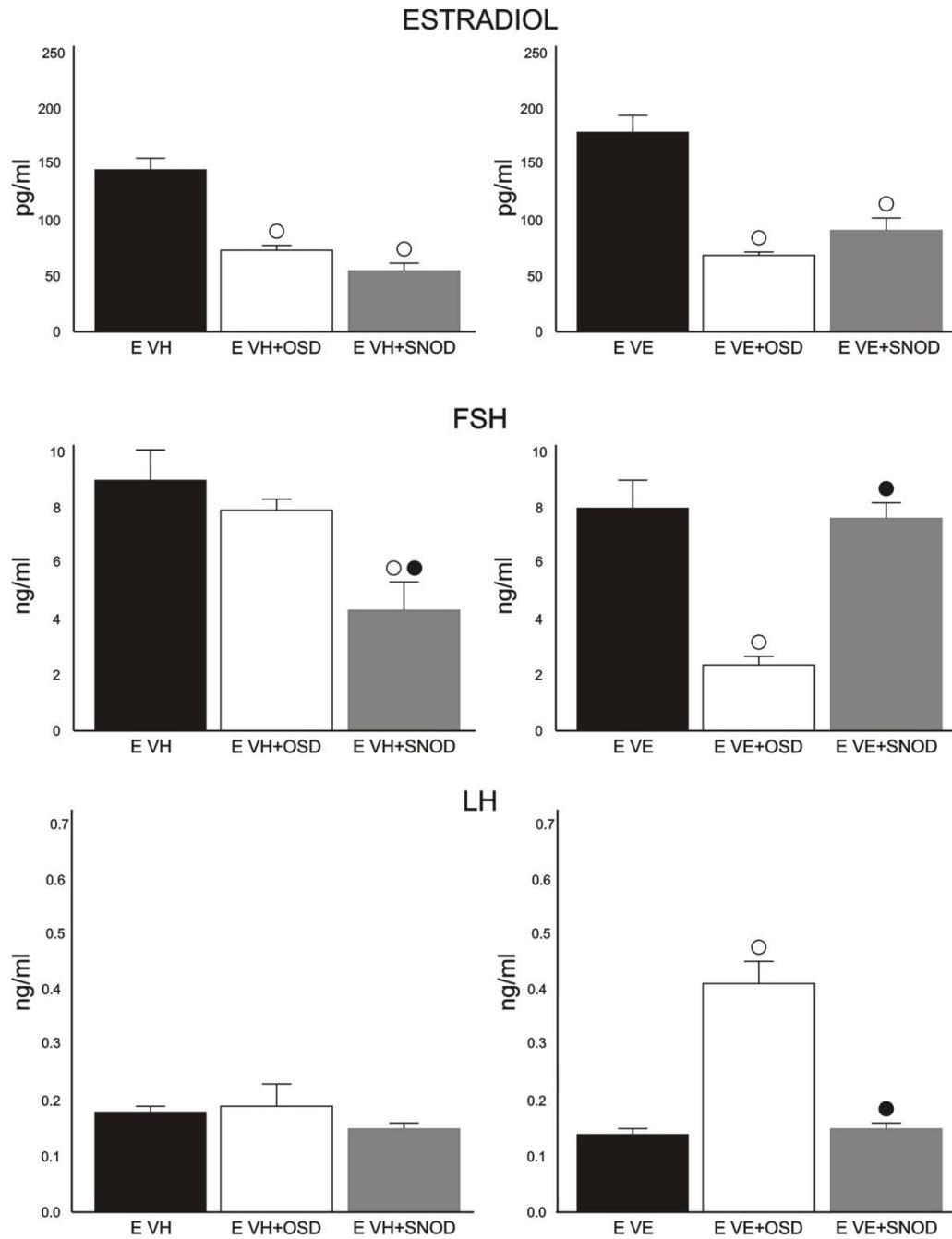


Fig. 17. Media \pm e.e.m. de la concentración de estradiol, hormona luteinizante (LH) u hormona folículo estimulante (FSH) de hembras tratadas a los 60 días de edad en el estro (E), con vehículo (VH) o valerato de estradiol (VE), 60 días después se realizó la sección del NOS derecho (SNOD) u operación simulada derecha (OSD). Sacrificadas a los 10 días post-cirugía en el día del estro. $\circ P < 0.05$ vs su grupo sin cirugía prueba de ANDEVA seguida de Tukey, $\bullet P < 0.05$ vs su grupo con operación simulada prueba de ANDEVA seguida de Tukey.

Experimento 4. Efecto de la sección bilateral del NOS en ratas tratadas con VE en el diestro 1, proestro o estro, sobre la respuesta ovárica.

Número de animales ovulantes y ovocitos liberados.

En las hembras inyectadas con VH en el día del diestro 1 la laparotomía bilateral, así como la sección bilateral del NOS, disminuyeron la proporción de animales ovulantes en ambos ovarios, con una cuota ovulatoria menor en el ovario izquierdo respecto al grupo sin cirugía (Fig. 18).

En los animales tratados con VH en el día del proestro, los animales con sección bilateral del NOS redujeron su tasa ovulatoria con respecto a su grupo con operación simulada, así como contra el grupo sin cirugía. La sección bilateral del NOS en los animales tratados con VH en el proestro reduce considerablemente la cantidad de ovocitos liberados por ambos ovarios (Fig. 18).

Las hembras tratadas con VH en el día del estro sometidas a la laparotomía bilateral, ovularon en un 100% por el ovario derecho y en un 80% por el izquierdo. La sección bilateral del NOS disminuyó la proporción de animales ovulantes en ambos ovarios con respecto a su grupo con operación simulada (Fig. 18).

En las hembras inyectadas en el día del diestro con VE la sección bilateral del NOS disminuyó la tasa ovulatoria del ovario izquierdo respecto a su grupo con operación simulada, sin modificar la cantidad de ovocitos (Fig. 19).

En el grupo tratado en el día del proestro con VE y sometido a la operación simulada bilateral se observó una disminución de la cuota ovulatoria respecto al grupo tratado con VE sin ninguna cirugía (Fig. 19). En el grupo inyectado con VE en el día del estro la laparotomía y la sección bilateral del NOS aumentaron la tasa ovulatoria del ovario derecho respecto a su testigo con VE.

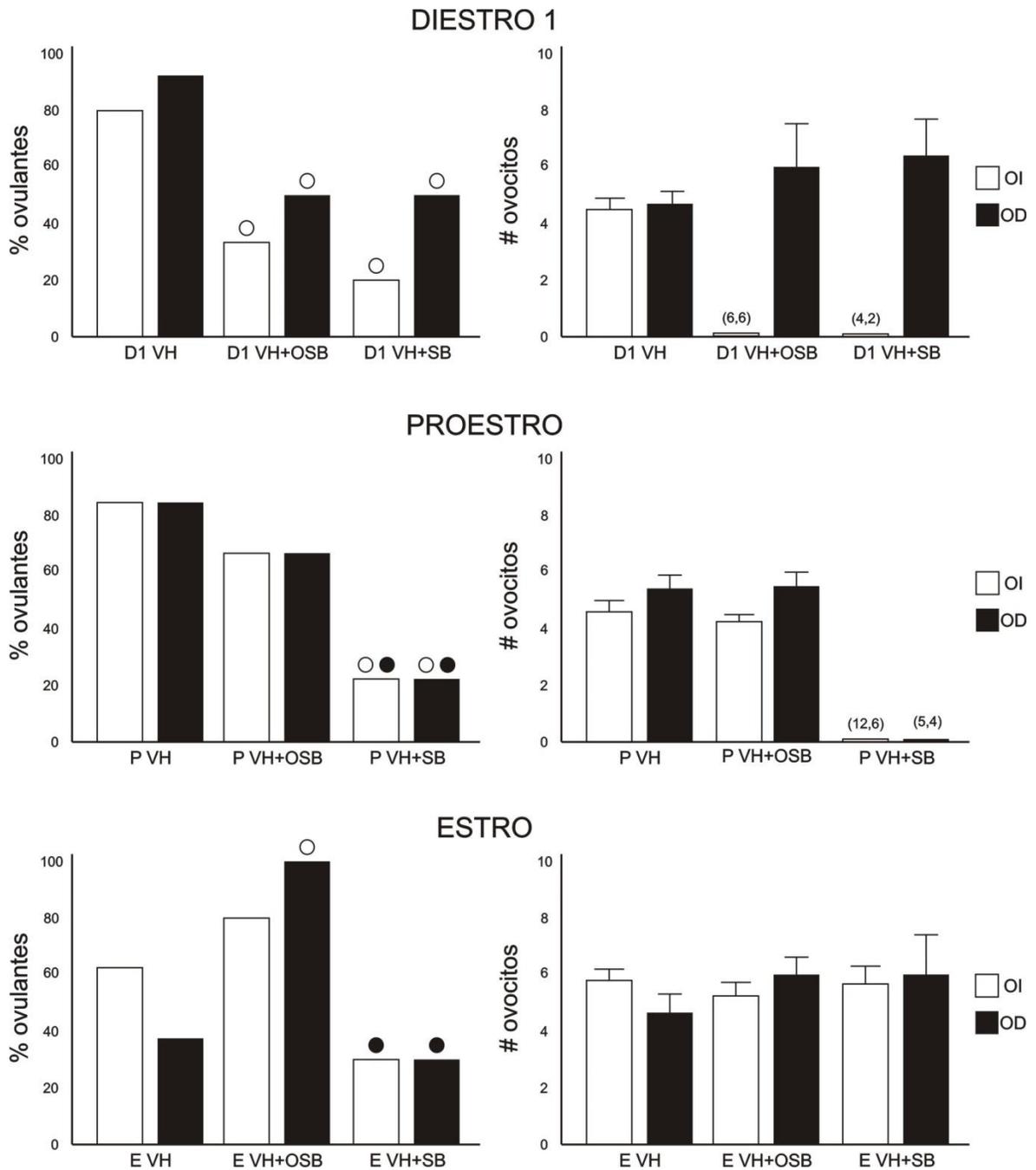


Fig. 18. Proporción de animales ovulantes y media \pm eem del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) en hembras tratadas a los 60 días de edad en el diestro 1, proestro o estro con vehículo (VH), 60 días después se realizó la sección bilateral del nervio ovárico superior (SB) u operación simulada bilateral (OSB). Sacrificadas a los 10 días post-cirugía en el día del estro. $OP < 0.05$ vs su grupo sin cirugía prueba de χ^2 , $\bullet P < 0.05$ operación simulada prueba de χ^2 .

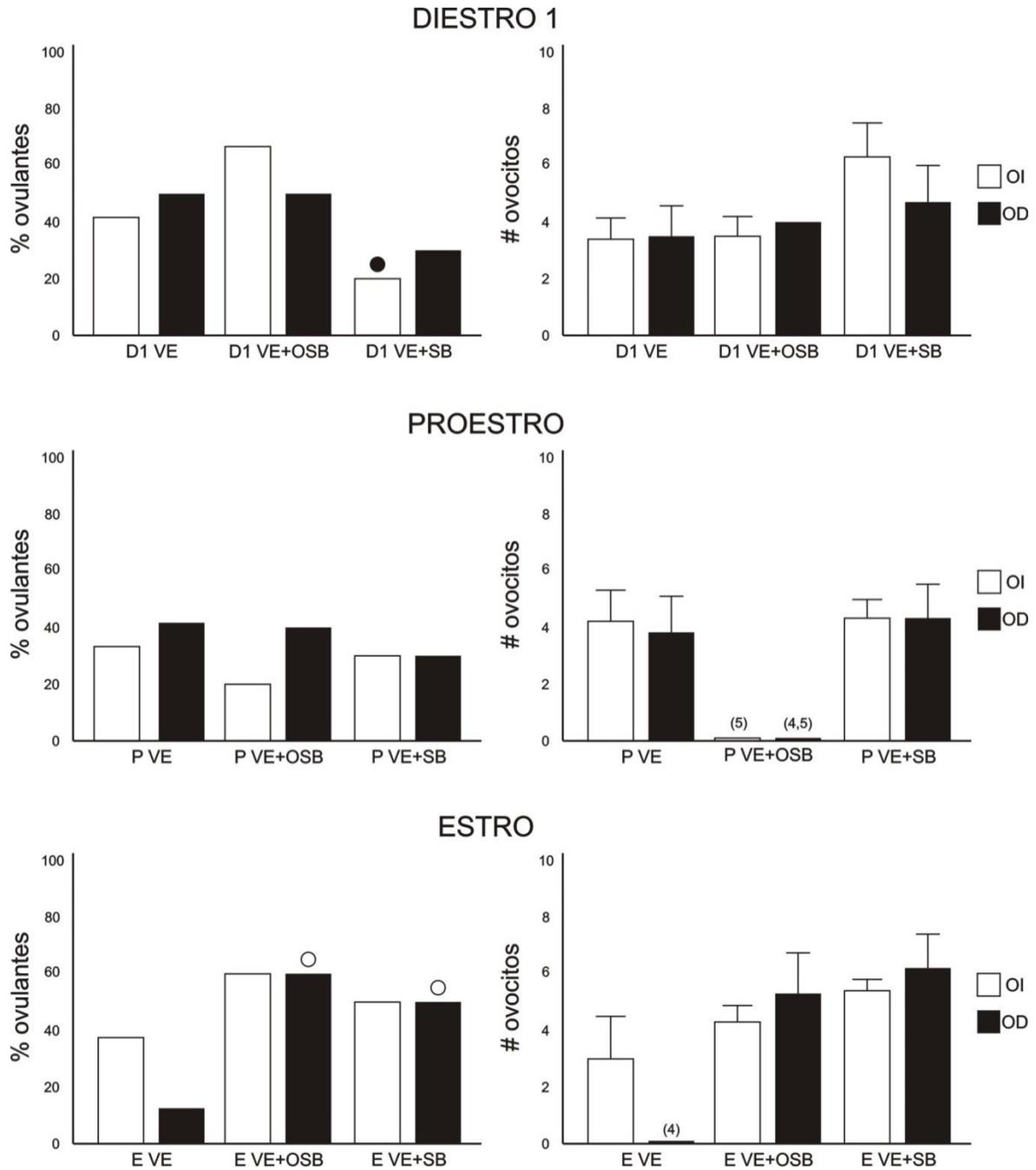


Fig. 19. Proporción de animales ovulantes y media \pm eem del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) en hembras tratadas a los 60 días de edad en el diestro 1, proestro o estro con valerato de estradiol (VE), 60 días después se realizó la sección bilateral del nervio ovárico superior (SB) u operación simulada bilateral (OSB). Sacrificadas a los 10 días post-cirugía en el día del estro. $OP < 0.05$ vs su grupo sin cirugía prueba de χ^2 , $\bullet P < 0.05$ operación simulada prueba de χ^2 .

El peso corporal y la masa ovárica de los animales tratados en el día del diestro 1 con VH y sección bilateral del NOS incrementaron con respecto a su grupo con operación simulada. En el grupo con VE disminuyó el peso corporal y la masa ovárica con respecto a su grupo tratado con VH, mientras que si se compara respecto a su grupo con operación simulada incrementó el peso del ovario derecho y del útero (Tabla 4).

En los animales tratados en el día del proestro con VH y sección bilateral del NOS incrementó el peso corporal con respecto a su grupo con operación simulada. En el grupo con VE y sección bilateral del NOS disminuyó el peso corporal y la masa ovárica con respecto a su grupo con VH, mientras que al compararse respecto a su grupo con operación simulada disminuyó el peso del útero (Tabla 4). En las hembras inyectadas con VE y operación simulada bilateral incrementó el peso del útero, respecto al grupo inyectado con VH (Tabla 4).

En los animales tratados con VE en el día del estro y sección bilateral del NOS disminuyó la masa ovárica con respecto a su grupo con operación simulada así como contra el grupo tratado con VH (Tabla 4).

Tabla 4. Media \pm e.e.m. del peso corporal, pesos relativos (mg/100g de peso corporal) del ovario izquierdo (OI), derecho (OD) y masa ovárica (MO) de hembras tratadas en el diestro 1 (D1), proestro y estro con vehículo (VH) o valerato de estradiol (VE), y sometidas a la sección bilateral del nervio ovárico superior (SB) u operación simulada bilateral (OSB). Sacrificadas a los 70 días postratamiento.

GRUPO	n	PESO	OI	OD	MO	ÚTERO
D1-VH OSB	6	266.3 \pm 3.11	11.1 \pm 0.82	9.4 \pm 0.63	20.6 \pm 0.83	159.4 \pm 11.1
D1-VH SB	10	292.6 \pm 0.96♣	13.8 \pm 1.08	15.3 \pm 1.7♣	29.2 \pm 1.98♣	187.2 \pm 12.21
D1-VE OSB	6	254.4 \pm 7.59	10.3 \pm 0.96	9.4 \pm 0.49	19.1 \pm 1.97	162.2 \pm 9.73
D1-VE SB	10	254.0 \pm 6.94 *	10.2 \pm 0.88 *	11.8 \pm 0.55♣	21.3 \pm 1.92 *	195.0 \pm 8.44♣

P-VH OSB	6	270.1 \pm 4.77	11.7 \pm 0.77	11.2 \pm 0.7	23.0 \pm 1.06	155.0 \pm 9.31
P-VH SB	9	291.6 \pm 3.28♣	13.1 \pm 1	13.0 \pm 0.92	26.1 \pm 1.67	170.4 \pm 5.17
P-VE OSB	5	266.1 \pm 7.61	12.1 \pm 1.1	12.0 \pm 1.34	25.3 \pm 1.98	218.9 \pm 14.97*
P-VE SB	10	270.4 \pm 4.08*	10.5 \pm 0.58 *	10.1 \pm 0.87 *	20.6 \pm 1.18*	161.4 \pm 5.75♣

E-VH OSB	5	276.3 \pm 7.03	11.6 \pm 1.013	11.2 \pm 1.04	22.8 \pm 1.567	150.2 \pm 6.071
E-VH SB	10	265.3 \pm 8.2	13.2 \pm 1.12	11.4 \pm 0.72	25.0 \pm 1.73	167.3 \pm 6.69
E-VE OSB	5	261.3 \pm 4.39	12.4 \pm 0.97	11.8 \pm 0.62	24.3 \pm 1.33	183.3 \pm 14.93
E-VE SB	10	259.9 \pm 8.3	8.9 \pm 0.63*♣	7.9 \pm 0.67*♣	16.9 \pm 1.07*♣	181.1 \pm 10.05

*P<0.05 vs su grupo tratado con VH, ♣ P<0.05 vs su grupo con operación simulada prueba de t de Student.

Efecto de la sección del NOS izquierdo sobre la concentración de hormonas gonadotrópicas y estradiol en hembras inyectadas con VH o VE en el diestro 1, proestro o estro.

Hembras inyectadas en diestro

En las hembras tratadas con VH, la operación simulada bilateral disminuyó la concentración de estradiol, mientras que la sección bilateral del NOS incrementó la concentración de la hormona respecto a su testigo con VH (Fig. 20). En los grupos tratados en el día del estro con VE la sección del nervio ovárico superior incrementó la concentración de estradiol respecto a su grupo con operación simulada así como contra su grupo tratado con VE (Fig. 20).

En las hembras tratadas con VH la sección bilateral incrementó la concentración de la FSH con respecto a su grupo con operación simulada y al grupo con VH. En el grupo tratado con VE la concentración de la gonadotropina se incrementó en el grupo con la laparotomía bilateral, la concentración de FSH disminuyó en el grupo con sección bilateral del NOS al compararlo contra el grupo con operación simulada (Fig. 20).

Hembras inyectadas en proestro

En las hembras inyectadas con VE y operación simulada bilateral la concentración de estradiol se incrementó con respecto al grupo tratado con VE. La sección bilateral en el grupo tratado con VE provocó una disminución en la concentración de la hormona con respecto a su grupo con operación simulada (Fig. 21).

En las hembras inyectadas con VH tanto la operación simulada como la sección bilateral del NOS disminuyeron la concentración de FSH. Esta disminución también se presentó en las hembras tratadas con VE y operación simulada bilateral. La sección bilateral del NOS en las hembras tratadas con VE incrementó la concentración de LH respecto a su grupo sin cirugía (Fig. 21).

Hembras inyectadas en estro.

En las hembras inyectadas con VH la sección bilateral del NOS disminuyó la concentración de estradiol al compararlo contra su grupo con operación simulada o contra el grupo sin cirugía, resultados similares se observan en el grupo con VE sometido a la sección bilateral del NOS, la operación simulada bilateral en las hembras tratadas con VE incrementó la concentración de estradiol respecto a su grupo sin cirugía (Fig.22).

En los animales inyectados con VH la sección bilateral del NOS incrementó la concentración de FSH con respecto a su grupo con operación simulada, en el grupo con operación simulada bilateral disminuyó la concentración de la gonadotropina (Fig.22).

En los animales inyectados con VH y sección bilateral del NOS, la concentración de LH incrementó respecto a sus grupos testigo (operación simulada bilateral y su grupo con VH) (Fig.22). En las hembras tratadas en el día del estro con VE y operación simulada incrementó la concentración de LH respecto a su grupo sin cirugía. Mientras que en el grupo con sección bilateral del NOS disminuyó respecto a su grupo con operación simulada (Fig. 22).

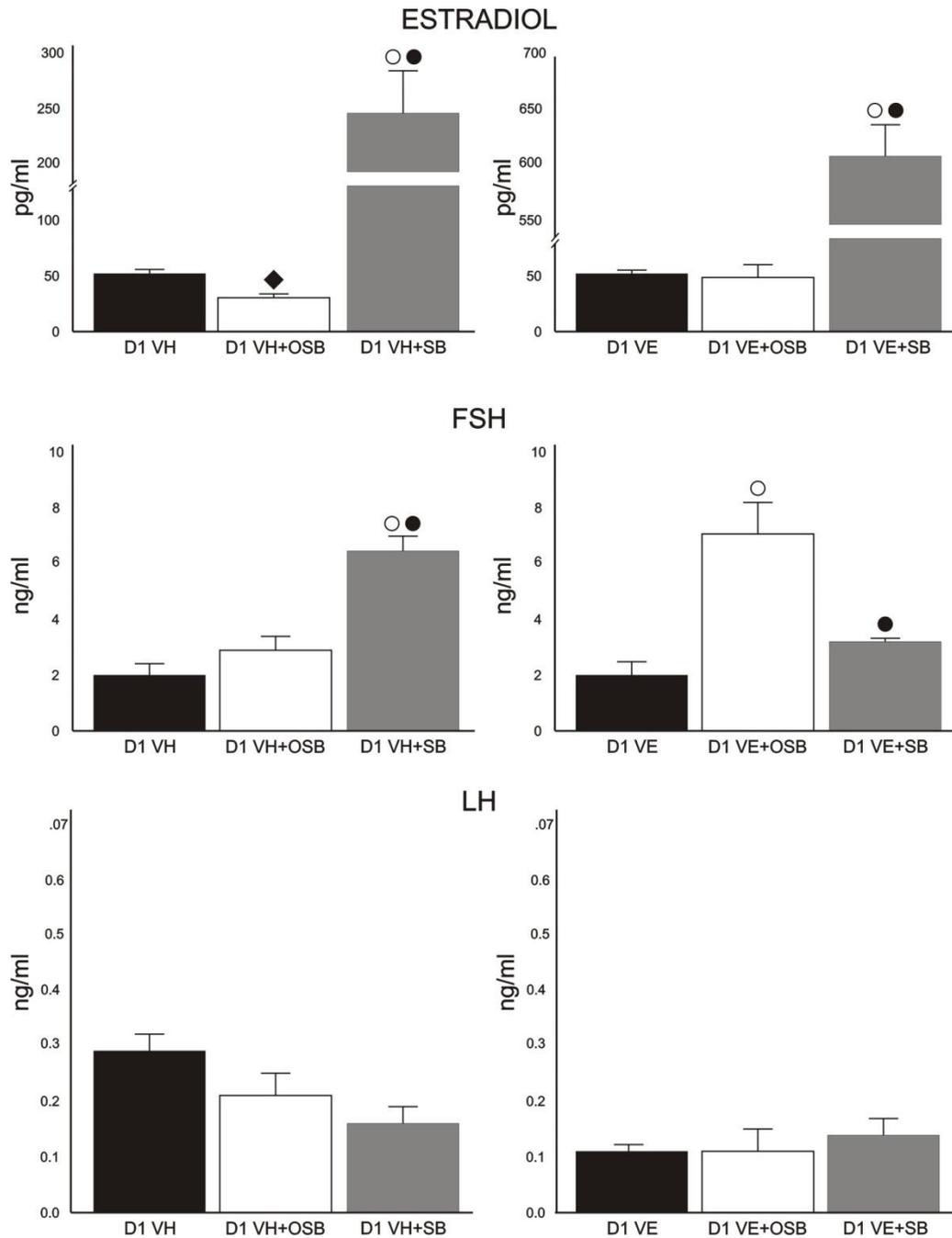


Fig. 20. Media \pm e.e.m. de la concentración de estradiol, hormona luteinizante (LH) u hormona fólculo estimulante (FSH) de hembras tratadas a los 60 días de edad en el diestro 1 (D1), con vehículo (VH) o valerato de estradiol (VE), 60 días después se realizó la sección bilateral del NOS (SB) u operación simulada bilateral (OSB). Sacrificadas a los 10 días post-cirugía en el día del estro. $\circ P < 0.05$ vs su grupo sin cirugía prueba de ANDEVA seguida de Tukey, $\bullet P < 0.05$ vs su grupo con operación simulada prueba de ANDEVA seguida de Tukey, $\blacklozenge P < 0.05$ vs su grupo sin cirugía prueba de t.

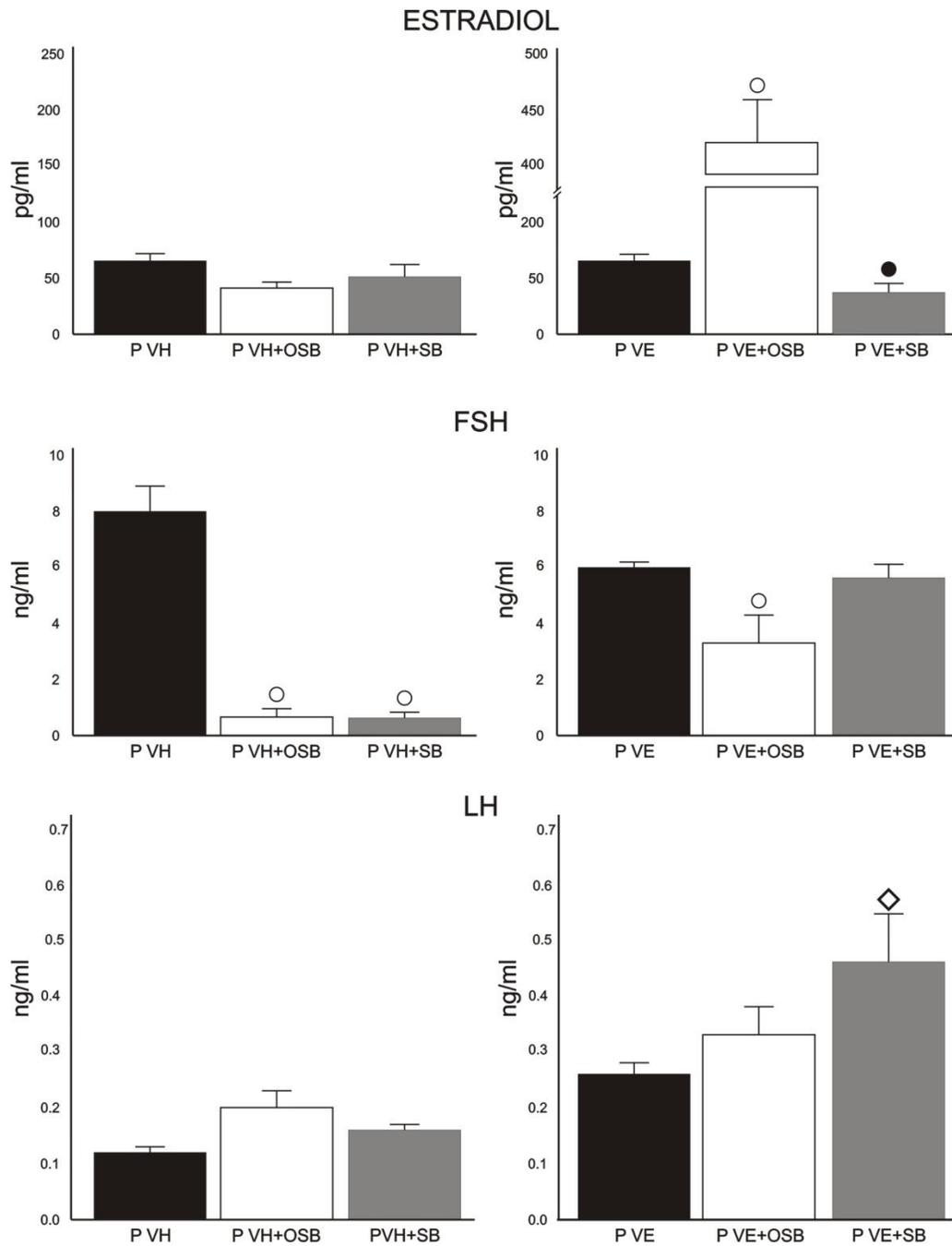


Fig. 21. Media \pm e.e.m. de la concentración de estradiol, hormona luteinizante (LH) u hormona foliculo estimulante (FSH) de hembras tratadas a los 60 días de edad en el proestro (P), con vehiculo (VH) o valerato de estradiol (VE), 60 días después se realizó la sección bilateral del NOS (SB) u operación simulada bilateral (OSB). Sacrificadas a los 10 días post-cirugía en el día del estro. $\circ P < 0.05$ vs su grupo sin cirugía prueba de ANDEVA seguida de Tukey, $\bullet P < 0.05$ vs su grupo con operación simulada prueba de ANDEVA seguida de Tukey.

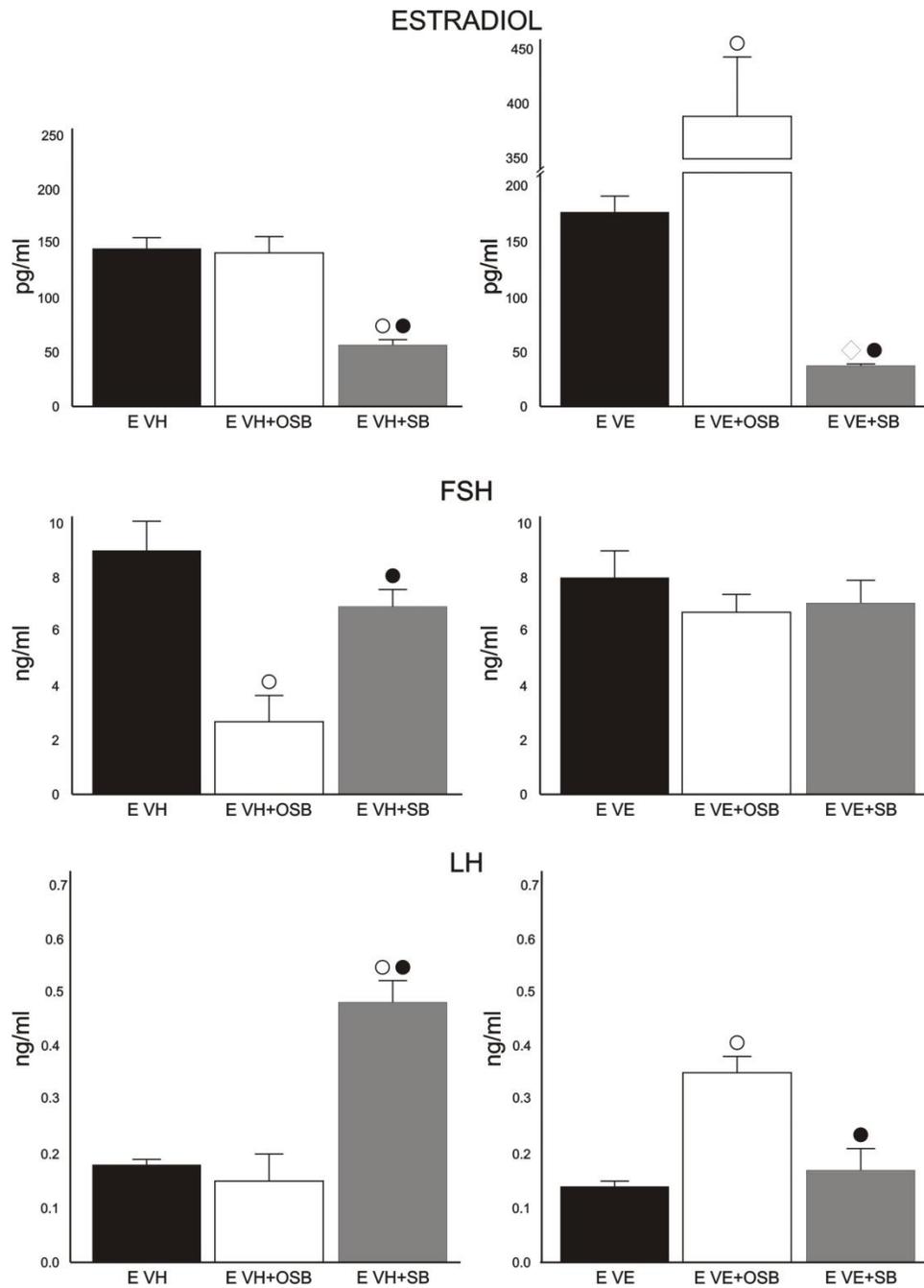


Fig. 22. Media \pm e.e.m. de la concentración de estradiol, hormona luteinizante (LH) u hormona foliculo estimulante (FSH) de hembras tratadas a los 60 días de edad en el estro (E), con vehiculo (VH) o valerato de estradiol (VE), 60 días después se realizó la sección bilateral del NOS (SB) u operación simulada bilateral (OSB). Sacrificadas a los 10 días post-cirugía en el día del estro. $\circ P < 0.05$ vs su grupo sin cirugía prueba de ANDEVA seguida de Tukey, $\bullet P < 0.05$ vs su grupo con operación simulada prueba de ANDEVA seguida de Tukey $\diamond P < 0.05$ vs su grupo sin cirugía prueba de t.

Discusión

La disminución en la respuesta ovulatoria en los animales tratados con VE está en función del día del ciclo estral en el que se inyecte el estrógeno. En este modelo animal la información neural que transcurre por el NOS modula de manera asimétrica la ovulación, lo que depende del nervio seccionado y del día del ciclo en el que se inyecte el fármaco.

Animales adultos inyectados con VE

Se ha reportado que la inervación simpática participa en la regulación de las funciones ováricas (Lara y col., 2002; Burden 1978). En la rata la administración de VE es acompañada por una hiperactivación de la inervación simpática (Stener-Victorin, 2005; Lara y col., 1993). En la rata adulta tratada con VE se incrementa en el GCMS la actividad de la tirosina hidroxilasa y la concentración de NA ovárica a los 30 días después del tratamiento y el incremento es aún mayor a los 60 días (Lara y col., 1993). Estos cambios en la actividad de la inervación simpática pueden explicar las alteraciones en las funciones ováricas. Se ha reportado que previo a la formación de los quistes es mayor la síntesis intraovárica del factor de crecimiento neural (NGF) y su receptor de baja afinidad (p75 NGFR). El bloqueo selectivo del NGF y de la síntesis de p75 NGFR en ratas tratadas con VE restaura las funciones ováricas (Dissen y col., 2000). La sobre activación de las neuronas simpáticas que llegan al ovario contribuyen al mantenimiento del estado anovulatorio en las ratas tratadas con VE (Barria, 1993).

En el presente estudio la administración de VE en los diferentes días del ciclo estral resulta en un menor peso corporal, como ya se había reportado anteriormente (Stener-Victorin y col., 2005). Dado que la inyección con VE incrementa la concentración de NA ovárica (Stener-Victorin, 2005, 2004; Rosa-E-Silva y col., 2003; Barria, 1993; Lara, 1993), es posible que el menor peso corporal se deba a que las catecolaminas estimulan la

lipólisis, tal y como ha sido señalado (Tavernier y col., 2005; Langing y col., 1995).

En la rata adulta (Shirwalkar y col., 2007; Schulster y col., 1984; Hemmings, 1983) o prepúber (Carriere, 1988; Rosa-E-Silva; 2003) la administración de VE resulta en la pérdida del ciclo estral en donde se puede observar la presencia de un estro vaginal por varios días continuos. En el presente estudio, la administración de VE resultó en la pérdida del ciclo estral, independientemente del día del ciclo en el que se inyectó el fármaco.

En animales prepúberes tratados con VE los patrones de ciclicidad cambian dependiendo de la edad en la que se administró el fármaco, en animales tratados en los días 1, 7 ó 14 se muestra ausencia de ciclos estrales, mientras que en hembras tratadas a los 21 ó 30 días de edad también se observa una disrupción en el patrón de los ciclos, sin embargo, entre el 40 y 80 % de los animales recuperan el ciclo a partir de los 80 y 100 días de edad (Cruz y col., 2012). Estas evidencias nos llevan a sugerir que las alteraciones en el patrón del ciclo estral está en función de la madurez del eje hipotálamo-hipófisis-ovario y del ambiente neuro-endocrino de las hembras.

La administración de VE en la rata prepúber resulta en anovulación y ovarios con morfología típica del SOPQ que persiste en la vida adulta (Rosa-E-Silva y col., 2003), esta morfología también se presenta cuando se administra el VE en la rata adulta (Stener-Victorin y col., 2005; Lara y col., 1993), además de acompañarse por una pérdida en el peso ovárico (Lara y col., 1993). En el presente estudio la administración del VE en el día del diestro 1, proestro o estro no resultó en una disminución significativa del porcentaje de animales ovulantes respecto al VH, sin embargo, es en los animales inyectados en el día del estro cuando menor número de animales ovula, con una cuota ovulatoria muy por debajo de la que presentan los animales sin la patología. La respuesta ovulatoria no se acompañó por cambios en el peso de las gónadas. Esto debido a que no se presentó la condición anovulatoria (Fig. 23).

La falla ovulatoria en la mujer se explica por diversas teorías, una de ellas es la inadecuada secreción de gonadotropinas caracterizada por el incremento de LH (Fábregues, 2006; Bernabeu y col., 2006; Morán-Villota, 2006; Yen, 2001; Yen y col., 1970), como respuesta al incremento en la frecuencia de los pulsos de GnRH (Matalliotakis, 2006).

En los modelos animales del SOPQ inducido con VE algunos autores han explicado la falla ovulatoria como resultado del efecto del fármaco sobre el hipotálamo, lo que resulta en una modificación en el patrón de secreción de la GnRH (Carriere, 1991; Simard y col., 1987), otros plantean que el efecto podría estar dado en la propia hipófisis y así resultar en una menor secreción de la LH (Hemmings y col., 1983). Es posible que la alteración en la respuesta ovulatoria no se explique exclusivamente por cambios en la concentración de LH, ya que se ha reportado que en la rata tratada con VE disminuye la concentración de LH (Shirwalkar y col., 2007; Rosa-E-Silva y col., 2003), y posteriormente se incrementa transitoriamente sin normalizarse (Schulster y col., 1984) o no se modifica (Linares, 2013; Cruz y col., 2012).

Los resultados del presente estudio apoyan la idea de que la falla ovulatoria no es el resultado de la alteración en la secreción de las gonadotropinas, esto a partir del hecho de que en los animales tratados en el estro, no hubo cambios en la concentración de gonadotropinas, mientras que en las ratas tratadas con VE en el día del diestro 1, la concentración de LH disminuyó y fue mayor en las tratadas en el proestro. En estos animales no se correlacionó la concentración de LH con la cuota ovulatoria. Estos resultados nos permiten sugerir que la acción del VE sobre la liberación de gonadotropinas está en función del ambiente neuroendocrino en el que se administre (Fig. 23).

En la rata prepúber inyectada con VE las concentraciones de estradiol en suero varían en función de la edad en que se administre y del tiempo que transcurre desde el

tratamiento hasta la autopsia (Cruz y col., 2012). En la rata adulta la respuesta a la administración de VE es controversial, hay quienes dicen que no cambia la concentración de estradiol (Stener-Victorin y col., 2005), y otros señalan que incrementa (Forneris y col., 2008; Barria y col., 1993). En estos estudios, a pesar de haber o no cambios en la concentración de estradiol, se mantienen las características del SOPQ. En el presente estudio se observó que la inyección del VE en el día del diestro 1, proestro o estro no modificó la concentración de estradiol 60 días después de su administración. Estos resultados nos podrían indicar que la capacidad del folículo ovárico para secretar estradiol no se vio modificada. Resulta importante resaltar que independientemente de las concentraciones de estradiol, los animales con VE no son capaces de ovular de manera normal.

La concentración de estradiol se incrementó de manera gradual en las hembras tratadas VE, en función del día en el que se inyectó, de manera semejante a lo que ocurre con los animales inyectados con el VH. Esto podría indicar que la actividad de los nervios simpáticos es regulada por el medio hormonal que prevalece al momento de la inyección. Al respecto, el grupo de Barria (1993) mostró que en los animales con SOPQ inducido con VE, la estimulación β -adrenérgica resulta en un incremento en la producción de progesterona y andrógenos pero no de estradiol, sin embargo en este estudio no se indica en que día del ciclo se inyectó el estrógeno. Por otra parte, se ha documentado que la inervación que llega al ovario por el NOS facilita la secreción de esteroides ováricos (Aguado y Ojeda 1984a, Morales-Ledesma 2012), y que la actividad de los nervios simpáticos varía a lo largo del ciclo estral, como ha sido demostrado por experimentos *in vivo* (Wolf y col., 1986) e *in vitro* (Ferruz y col., 1991).

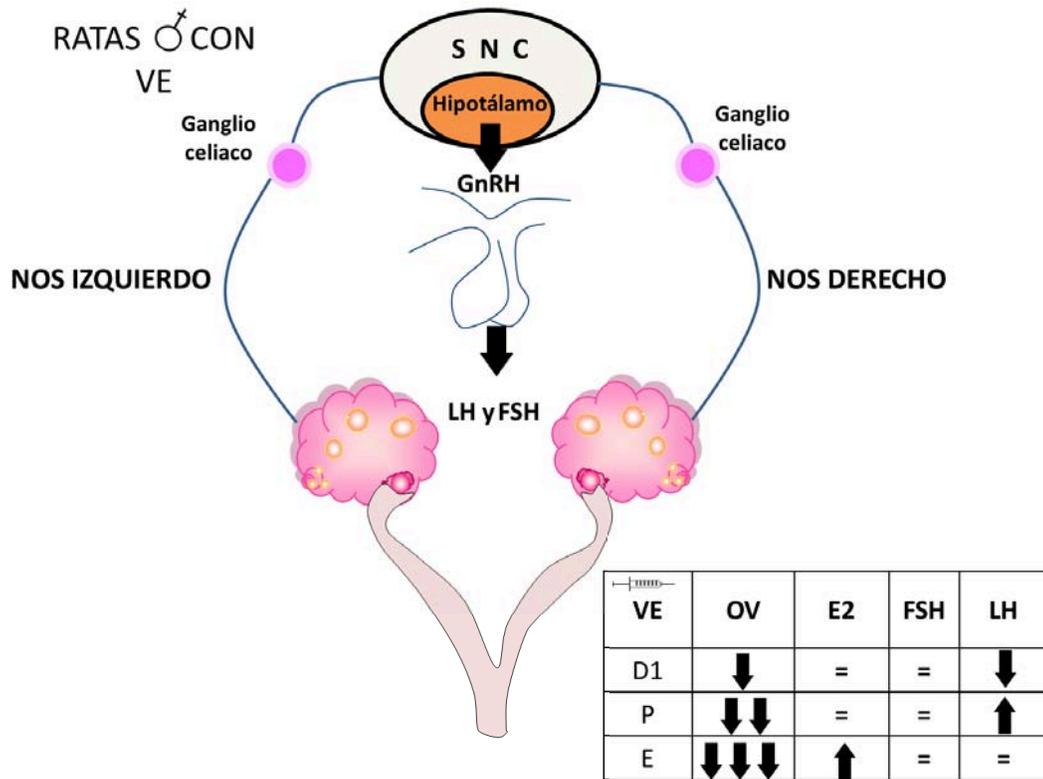


Fig. 23. Modelo de los efectos del valerato de estradiol (VE) en ratas hembras inyectadas en los días del diestro 1 (D1), proestro (P) o estro (E).

Efectos de la sección unilateral o bilateral del NOS en animales sin o con SOPQ.

Laparotomía.

Chávez y colaboradores (1991) mostraron que en la rata adulta cíclica la laparotomía no modifica la ovulación, resultados semejantes a lo reportado por Flores y col., (1990), quienes sugieren que la respuesta ovulatoria se puede producir aún con concentraciones de LH inferiores a las que presenta un animal intacto. En el presente estudio se realizó la laparotomía unilateral o bilateral en el día del estro, en animales que fueron inyectados en cada uno de los días del ciclo estral con el VH 60 días antes. Los resultados muestran que los efectos de realizar una laparotomía dependen de si se realiza unilateral o bilateral, y esta respuesta depende del día del ciclo estral en el que se inyectó el VH.

En trabajos previos de nuestra Unidad de Investigación se ha planteado que al momento de realizar una laparotomía se puede alterar alguna vía neural que inerva el peritoneo, y que pudiera estar implicada en la regulación de las funciones ováricas (Barco y col., 2003). Al momento no contamos con una explicación a nuestros resultados, ya que resulta difícil pensar que la inyección del VH modificó la ovulación, cuando la respuesta fue evaluada más de 60 días después.

En el presente estudio se evaluaron los efectos de la administración del VE en cada día del ciclo estral aunado a los efectos de la laparotomía practicada en el día del estro. Los resultados muestran que la respuesta al VE depende del ambiente endócrino del animal y del tipo de laparotomía que se practica, es decir unilateral o bilateral, tal y como ya ha sido reportado que ocurre en la rata sin ninguna patología (Flores y col., 2006).

Reportes previos muestran que en hembras de diez días de edad tratadas con VE y sometidas 14 días después a la laparotomía unilateral o bilateral, la ovulación en la etapa adulta es semejante a la de un animal sin laparotomía. (Morales-Ledesma y col., 2010). Sin embargo, en el presente estudio se observó que en las hembras tratadas con VE en el día del estro y sometidas a la laparotomía izquierda ovulan alrededor del 80% de los animales, con una cuota ovulatoria total semejante a la de un animal sin el SOPQ, esta respuesta fue semejante cuando la laparotomía se practica de manera bilateral.

Sección bilateral.

El efecto de eliminar el aporte simpático del ovario por la sección del NOS sobre la respuesta ovulatoria depende de la edad de las hembras, en la rata prepúber la sección bilateral del NOS no modifica la respuesta ovulatoria espontánea (Aguado y Ojeda, 1984b; Morales y col., 1993) o inducida (Selstam y col. 1985). Respuesta que no se observa cuando los animales son denervados en la etapa adulta; en la rata cíclica la sección bilateral del NOS reduce la tasa ovulatoria del ovario derecho, así como el

número de ovocitos liberados por animal ovulante (Chávez y col., 1991). En otro estudio se ha sugerido que la sección bilateral del NOS disminuye la capacidad ovulatoria a partir de los resultados obtenidos con hembras denervadas y colocadas con machos fértiles, donde los fetos se distribuyen en un solo cuerno uterino (Erskine y Weaver, 1988). En esta tesis, los animales inyectados con VH en cada día del ciclo estral, y sometidos a la sección bilateral del NOS ovularon de manera espontánea entre del 20% y el 50% de ellos. Estos resultados nos permiten sugerir que la inervación que llega al ovario por el NOS participa de manera estimuladora en los mecanismos que culminan con la ovulación.

La exposición al VE resulta en cambios en las funciones ováricas, estos efectos son probablemente mediados por una activación de la inervación simpática ovárica dependiente de las neurotrofinas (Sotomayor-Zárate, 2008). En los animales tratados con VE la sección bilateral del NOS (Rosa-E-Silva y col., 2003; Lara y col., 1993; Barria y col., 1993) o el tratamiento por electro acupuntura (Stener-Victorin y col., 2000) restauran la ovulación, evidenciado por la presencia de cuerpos lúteos. Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que en el 55% de los animales se restablece la respuesta ovulatoria por la sección bilateral del NOS (Morales-Ledesma y col., 2010). En el presente estudio el VE se administró en los diferentes días del ciclo estral y la denervación se practicó en el día del estro, 60 días posteriores a la inyección del VE. El 50% de las hembras inyectadas en el día del estro y sometidas a la sección bilateral del NOS ovuló, mientras que en las inyectadas en diestro o proestro la proporción de animales ovulantes es semejante a la del grupo inyectado con el VE (Fig. 24).

En el animal adulto, sin el SOPQ, la sección bilateral del NOS en el día del estro no modifica las concentraciones de estradiol (Aguado y Ojeda; 1984a); mientras que esta misma cirugía en la rata adulta tratada con VE, la concentración de estradiol disminuye (Barria y col., 1993). Los resultados del presente estudio apuntan a que los efectos de la inyección del VE dependen del día del ciclo en el que se administre. Así, en los

inyectados en el día del diestro la información que llega por el NOS modula de manera inhibitoria la secreción de estradiol, mientras que en los inyectados en el día del estro, la modulación es de tipo estimulatoria (Fig. 24). Todas estas evidencias nos permiten sugerir que la modulación que ejerce el NOS en la esteroidogénesis ovárica va estar en función del ambiente endócrino del animal. No podemos descartar que al quitar los dos nervios ováricos exista otra vía neural que se active y de como resultado que la concentración de estradiol sea similar a la de un animal con el SOPQ pero con su inervación intacta. En apoyo a esta idea, se sabe que la inervación sensorial que recibe el ovario modula la secreción de estradiol en función del día del ciclo estral (Trujillo y col., 2014).

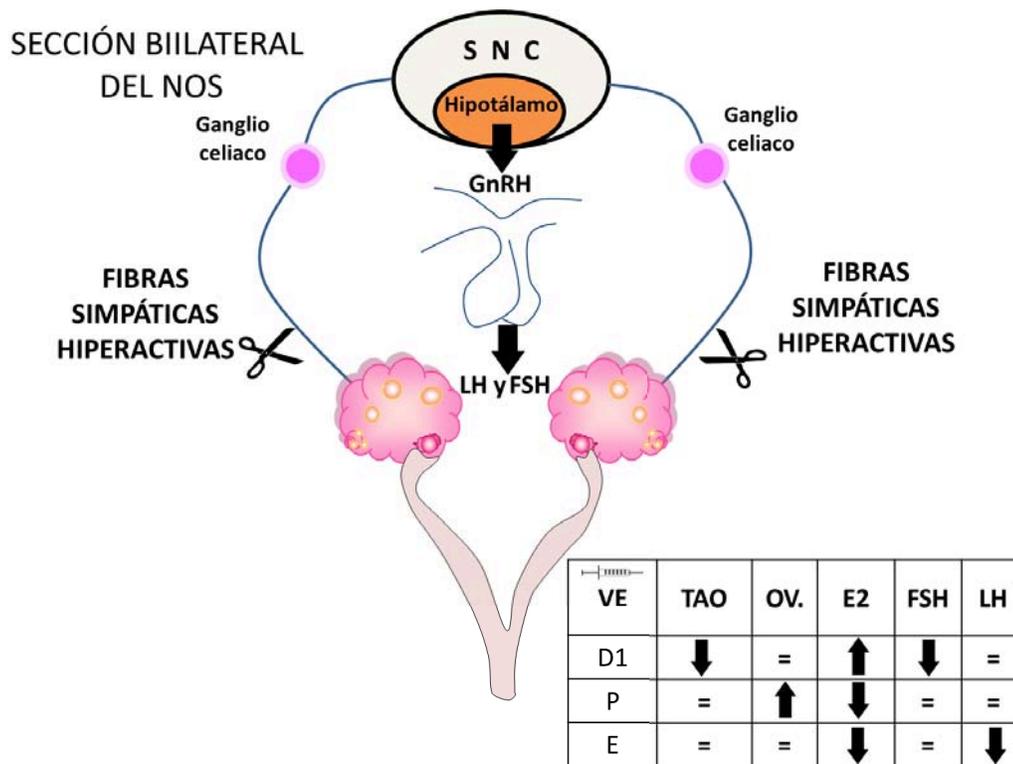


Fig. 24. Modelo de los efectos de la sección bilateral del nervio ovárico superior (NOS) en ratas tratadas con valerato de estradiol (VE) en el diestro 1 (D1), proestro (P) o estro (E).

Existe controversia sobre el patrón de secreción de las gonadotropinas que prevalece en la mujer y en la rata con SOPQ (Shirwalkar, 2007; Schulster y col., 1984; Linares, 2013; Cruz y col., 2012). Rosa-E-Silva y col. (2003) reporta que en la rata prepúber, tratada con VE, disminuye la concentración de gonadotropinas, pero si a estos animales se les practica la sección bilateral del NOS incrementa la concentración de LH pero no la de FSH. En el presente estudio, no observamos cambios en la concentración de gonadotropinas en los animales que fueron inyectados con VE en diferentes etapas del ciclo estral y sometidos a la sección bilateral del NOS. Estos resultados reafirman la idea de que el mantenimiento del SOPQ es independiente de gonadotropinas (Barria y col., 1993), además de existir otras vías de regulación en el SOPQ (Morales-Ledesma y col., 2010).

Sección unilateral.

La sección unilateral del NOS en la rata prepúber (Morales y col., 1993) o adulta (Chávez y col., 1991) resulta en disminución de la respuesta ovulatoria por parte del ovario denervado; la ovulación en las hembras con sección unilateral del NOS no se restablece por la administración de gonadotropinas (Morales y col., 1998), lo que indica que, en estado fisiológico, el NOS modula de manera estimulante la ovulación y regula la respuesta del folículo a las gonadotropinas. En la rata infantil tratada con VH, la sección unilateral del NOS en la etapa juvenil conduce a una disminución en la proporción de animales ovulantes por el ovario denervado y aumento en el número de ovocitos liberados por la gónada inervada (Morales-Ledesma y col., 2010). En el presente estudio, la sección izquierda o derecha del NOS conducen a resultados diferentes dependiendo del día del ciclo en el que se inyectó el VH. El NOS izquierdo modula de manera estimuladora la ovulación, independientemente del día del ciclo en el que se administró el VH, mientras que este efecto se observa por el NOS derecho sólo en el día del estro.

En estudios previos se ha reportado que en la rata tratada con VH durante la etapa infantil, la sección unilateral del NOS no modifica la concentración de gonadotropinas cuando el animal alcanza la etapa adulta (Morales-Ledesma y col., 2010); en la rata prepúber sin ninguna patología, la sección derecha del NOS reduce la concentración de FSH y la concentración de LH desciende independientemente si la sección del NOS es izquierda o derecha (Morales-Ledesma y col., 2012). En el presente estudio en la rata tratada con VH en el día del proestro o estro, el NOS derecho moduló de manera estimuladora la secreción de FSH, mientras que en el día del diestro lo hace de manera inhibitoria. La secreción de LH es regulada de manera inhibitoria en las hembras inyectadas en el día del proestro y estimuladora en el día del diestro.

A partir de los efectos agudos de la sección del NOS en la rata adulta cíclica, se ha sugerido que la información que recibe el ovario por el NOS no participa en la regulación de la secreción de estradiol (Flores y col., 2011). En hembras tratadas con VH durante la etapa infantil, la sección derecha del NOS disminuyó la concentración de estradiol, cuando los animales llegaron a la etapa adulta, mientras que la sección izquierda no la modificó (Morales-Ledesma y col., 2010). Esta modulación que ejerce el NOS en la secreción de estradiol es diferente en la rata sacrificada en la etapa peripuberal, donde el NOS izquierdo la modula de manera estimulante y el NOS derecho de forma inhibitoria, ésta es una respuesta aguda ante la denervación (Morales-Ledesma y col., 2012). En el presente estudio, en las hembras inyectadas con VH en el día del estro la información neural aportada por el NOS modula de manera estimulante la secreción de estradiol, mientras que en el día del diestro 1 la respuesta es asimétrica.

Existe evidencia de que la manipulación mecánica de la cavidad abdominal modifica la secreción de hormonas ováricas (Barco y col., 2003; Flores y col., 2006). Es posible que estos cambios estén asociados con la actividad de las neuronas adrenérgicas que arriban al ovario, la cual varía en función del día del ciclo estral (Ferruz y col., 1991). Los resultados del presente estudio apoyan la idea de la existencia de otras vías nerviosas

que participan en la regulación de las funciones ováricas. Se ha reportado que después de la inyección de la peroxidasa de rábano (un marcador de vías en el sistema nervioso central) dentro de la cavidad peritoneal, se marcan neuronas que están presentes en el núcleo motor dorsal del nervio vago, en los ganglios nodoso, espinal y celiaco, así como los cuernos laterales y ventrales del cordón espinal de la mitad torácica a los segmentos lumbares (Wan-Hua, 1980). Por otra parte, incrementa la actividad del NOS como reflejo de la estimulación de la inervación somato-sensorial, conduciendo a un descenso en el ritmo de secreción de estradiol por el ovario, esta respuesta es mediada por estructuras supra espinales (Uchida y col., 2012). Estos resultados nos permiten sugerir que la participación del NOS sobre las funciones ováricas puede ser modulada por la información que reciba por otras vías nerviosas y que está sujeta a los cambios hormonales cíclicos.

En animales tratados con VE en la etapa infantil, la sección unilateral del NOS realizada a los 24 días de vida, restablece el patrón del ciclo estral y restaura la ovulación por la gónada inervada en la vida adulta (Díaz, 2013; Morales-Ledesma y col., 2010). En el presente estudio en las ratas con SOPQ, inducido con VE en el día del diestro o proestro, el NOS izquierdo modula de manera inhibitoria la respuesta ovulatoria, mientras que la respuesta se invierte en el día del estro. La regulación que ejerce el NOS derecho sobre la ovulación es diferente, ya que cuando se inyecta el VE en el día del diestro o proestro la modula de manera estimulante y en el día del estro es inhibitoria (Fig. 25).

En la rata infantil tratada con VE la sección unilateral del NOS no modifica la concentración de gonadotropinas (Morales-Ledesma y col., 2010). Se ha propuesto que las gonadotropinas no tienen una implicación directa en el desarrollo del SOPQ (Morales-Ledesma y col. 2010; Shirwalkar, 2007; Rosa-E-Silva y col., 2003; Schulster y col., 1984; Linares, 2013; Cruz y col., 2012). En el presente estudio en las hembras inyectadas con VE, la sección unilateral del NOS conduce a variaciones en la

concentración de gonadotropinas que están en función del día en que se inyectó el VE y del nervio seccionado. La poca homogeneidad en la concentración de las gonadotropinas mostradas en el presente estudio, apoyan la idea de que las gonadotropinas no tienen un papel sustancial en el desarrollo y mantenimiento de la condición del SOPQ.

Morales-Ledesma y col. 2010 reporta que en la rata con SOPQ la sección unilateral del NOS conduce a bajas concentraciones de estradiol, sugiriendo que la información neural que aporta el NOS, tiene un papel estimulador en la regulación de la secreción de la hormona. Sin embargo, los resultados del presente estudio nos dicen que en la rata adulta el efecto del VE depende del día del ciclo en el que se inyecte, ya que si se realiza en el día del proestro, el NOS izquierdo modula de manera inhibitoria la secreción de estradiol (Fig. 25).

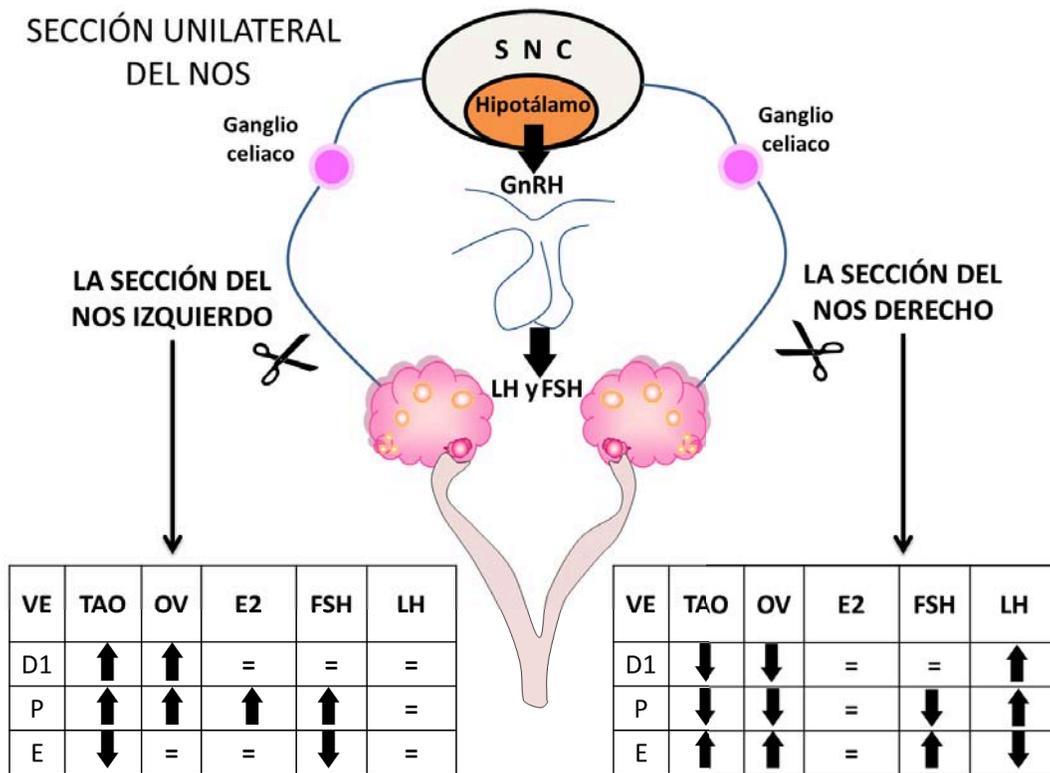


Fig. 25. Modelo de los efectos de la sección unilateral (izquierda o derecha) del nervio ovárico superior (NOS) en ratas inyectadas con valerato de estradiol (VE) en el diestro 1 (D1), proestro (P), o estro (E).

En el presente estudio, la restauración de la ovulación o su bloqueo en los animales tratados con VE y sección unilateral del NOS, no puede explicarse únicamente por los cambios en la concentración de gonadotropinas o estradiol. El retiro unilateral del estímulo nervioso puede estimular o inhibir la ovulación dependiendo del día del ciclo en el que se administre el VE. Estos resultados nos permiten sugerir que el SOPQ puede ser el resultado de la mayor actividad que se registra por la inervación simpática proveniente del NOS, pero también puede existir una regulación por parte del plexo nervioso ovárico y del nervio vago (Burden, 1978).

Se ha reportado previamente que en la rata neonata, infantil o adulta la administración de VE incrementa la concentración de NA en el ovario (Sotomayor-Zarate y col., 2008; Rosa-E-Silva, 2003; Lara y col., 1993) y conduce a una condición anovulatoria que se revierte con la sección bilateral del NOS, además de reducir la concentración de NA. Dado que en la rata con SOPQ la sección unilateral del NOS es capaz de disminuir la concentración de NA en el ovario denervado pero no se restablece su capacidad ovulatoria (Morales-Ledesma y col., 2010). Estos resultados y los del presente estudio sugieren que la información que llega por el NOS, no solo participa en el desarrollo del SOPQ, también en su mantenimiento; sin embargo no son las únicas vías nerviosas que regulan al SOPQ.

Conclusiones

- La inyección de VE disminuye la respuesta ovulatoria, independientemente del día del ciclo en el que se inyecte.
- La información neural que llega al ovario por el NOS modula de manera diferente los mecanismos que culminan en la ovulación, en función del día del ciclo estral.
- En las hembras tratadas con VE en los días del diestro 1 o proestro, el NOS izquierdo modula de manera inhibitoria la ovulación. Mientras que en las hembras tratadas en el proestro el NOS regula de manera estimuladora la ovulación.
- En las hembras tratadas con VE en los días del diestro 1 o proestro, el NOS derecho modula de manera estimuladora la ovulación. En las hembras tratadas en el estro la regulación del NOS sobre la respuesta ovulatoria fue de tipo inhibitoria.
- En las hembras tratadas con VE en los días del proestro o estro, la sección bilateral del NOS parece no tener una influencia en los mecanismos que culminan con la ovulación.
- En la rata con SOPQ, inducido en el día del proestro, el NOS izquierdo modula de manera inhibitoria la secreción de estradiol, mientras que en el día del estro lo hace de manera estimulante.
- En la rata con SOPQ, inducido en el día del estro, el NOS izquierdo modula de manera estimuladora la secreción de FSH, esta misma modulación la ejerce el NOS derecho en el día del proestro.
- En la rata con SOPQ, inducido en el día del proestro, el NOS derecho modula de manera inhibitoria la secreción de LH.
- Los efectos de la sección bilateral no es la sumatoria de las secciones unilaterales.

Referencias

- Adashi EY, Rock JA, Guzick D. (1981) Fertility Following Bilateral Ovarian Wedge Resection: A Critical Analysis of 90 Consecutive Cases of the Polycystic Ovary Syndrome. *Fertil Steril* **36**: 320.
- Aguado LI, Petrovic SL, Ojeda SR. (1982) Ovarian β -Adrenergic Receptors during the Onset of Puberty: Characterization, Distribution and Coupling to Steroidogenic Responses. *Endocrinology* **110**: 1124-1132.
- Aguado LI., Ojeda SR. (1984a) Ovarian adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion. *Endocrinology* **114 (5)**: 1944-1946.
- Aguado LI., Ojeda SR. (1984b) Prepuberal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. Role of nodrenergic innervation. *Endocrinology* **114 (5)**: 1845-1853.
- Arai Y., Yamanouchi K., Mizukami S., Yanai R., Shibata K., Nagasawa H. (1981) Induction of anovulatory sterility by neonatal treatment with 5 beta-dihydrotestosterone in female rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* **96**: 439-443.
- Ayala R., Foyo E., Alvarado I., García J., (2005) Denervación y poliquistosis ováricas, *Ginecología y Obstetricia de México* **73**: 90-98.
- Barco A., Flores A., Chavira R., Matsumura PD., Domínguez R., Cruz ME. (2003) Asymmetric effects of acute hemiovariectomy on steroid hormonal 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 β -adrenergic Stimulation is Enhanced in Polycystic Ovary Syndrome: Role of Sympathetic Innervation. *Endocrinology* **133**: 2696-2703.
- Becu-Villalobos D., Lacau-Mengido M. (1990) Control Hormonal del Desarrollo Puberal en la Rata Hembra. *Acta Physiology Pharmacology. Latinoamerican* **40**: 1-17.

- Beloosesky R., Gold R., Almog B., Sasson R., Dantes A., Land-Bracha A., Hirsh L., Itskovitz-Eldor J., Lessing J.B., Homburg R., Amsterdam A. (2004). Induction of polycystic ovary by testosterone in immature female rats: modulation of apoptosis and attenuation of glucose/insulin ratio. *Int J Mol Med* **14**: 207–215.
- Bernabeu R., Galindo A., Llácer J. (2006) Fisiopatología. En: M. A. Checa Vizcaíno, J. J. Espinós Gómez, R. Matorras Weining (Eds). Síndrome del Ovario Poliquístico, *Ed. Medica Panamericana Madrid España Capítulo 3 Pp. 43-58*.
- Brawer J.R., 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., Martin 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* **103**: 501–512
- Brown TR. (1999) Steroid hormones, Overview. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) Encyclopedia of Reproduction. *Academic Press. San Diego Vol. 4. pp. 634-643*.
- Burden H.W. (1978) Ovarian innervation. En: The vertebrate ovary: comparative biology and evolution. Jones RE (Ed.). *Plenum Press pp. 615-638*.
- Cardinali, Dvorkin. (1999) Sistema nervioso autónomo. En: Tresguerres JA. Ed. “Fisiología Humana”. 2da. Edición. Ed. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid. *pp. 142-154*.
- Carlson B. (2001) Embriología humana y biología del desarrollo, *Har Court, España pp. 9-12*.
- Carriere P., Brawer J., Farookhi R. (1988) Pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor content in rats with polycystic ovaries. *Biology of Reproduction* **38**: 562-567.

- Carriere PD, Brawer JR, Farookhi R. (1991) Alterations in Gonadotropin-Releasing Hormone-Dependent Gonadotropin Secretion in Rats with Polycystic Ovaries ***Biology of Reproduction* 45: 685-690.**
- 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.**
- Chávez R., Carrizosa L., Domínguez R. (1991) "Effects of Superior Ovarian Nerve Section on Spontaneous and Induced Ovulation in Adult Rat". ***Medical Science Research* 19: 41-42.**
- Cruz G., Barra R., Gonzalez D., Sotomayor-Zarate R., Lara H.E. (2012) Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats ***Fertility and Sterility* 98 (5).**
- Curry TE., Lawrence IE., Burden HW. (1984) Effect of ovarian sympathectomy on follicular development during compensatory ovarian hypertrophy in the guinea-pig. ***Journal of reproduction and fertility* 71: 39-44.**
- Davies MJ, Norman RJ. (2002) Programming and reproductive functioning. ***Trends Endocrinol Metab* 13: 386–92.**
- Discacciati V. (2007) Actualización: Síndrome de Ovario Poliquístico, Evidencia, Actualización en la práctica Ambulatoria. ***Buenos Aires, Argentina* 10 (6): 178-180.**
- Dissen A., Ojeda R. (1999) Ovarian Innervation. En: Knobil E, Nelly J (Eds.) *Encyclopedia of the Reproduction*. ***Academic Press. USA* 3: 583-589.**
- Dissen GA., Lara HE., Leyton V., Paredes A., Hill DF., Costa ME., Martinez-Serrano A. Ojeda SR. (2000) Intraovarian Excess of Nerve Growth Factor Increases Androgen Secretion and Disrupts Estrous Cyclicity in the Rat ***Endocrinology* 141: 1073-1082.**
- Domínguez R. (1997) Endocrinología de las gónadas. XL Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. ***Sociedad de Ciencias Fisiológicas, AC. Morelia, Michoacán.***

- Domínguez R., Cruz ME., Morán C. (1998), "Differential effects of ovarian local anaesthesia during pro-oestrus on ovulation by the right or left ovary in normal and hemi-ovariectomized adult rats" ***Journal of reproduction and fertility* 113: 185-190.**
- Dorfman M., Arancibia S., Fiedler JL., Lara HE. (2003) Chronic Intermittent Cold Stress Activates Ovarian Sympathetic Nerves and Modifies Ovarian Follicular Development in the Rat. ***Biology of Reproduction* 68: 2038–2043**
- Dorner G. (1980) Sexual Differentiation of the Brain. ***Vitamins and hormones* 38: 325-334.**
- Erskine MS., Weaver ChE. (1988) "The Role of Ovarian Sympathetic Innervation in the Control of Estrous Responsiveness in the Rat" ***Hormones and behavior* 22 (1)-11**
- Fábregues F. (2006) Epidemiología y conceptos generales. En: M. A. Checa Vizcaíno, J. J. Espinós Gómez, R. Matorras Weining (Eds). Síndrome del Ovario Poliquístico, ***Ed. Medica Panamericana Madrid España Capítulo 1 pp. 13-24.***
- Familiari G., Toscano V., Motta PM. (1985) Morphological studies of polycystic mouse ovaries induced by dehydroepiandrosterone. ***Cell Tissue Res* 240: 519–528.**
- Feder H. (1981) Estrous Cyclicity in Mammals En: Adler N.T. Neuroendocrinology of Reproduction. Physiology and Behavior. Editorial Plenum Press. ***New York pp. 279-293***
- Fels E., Bosch L.R.. (1971) Effect of prenatal administration of testosterone on ovarian function in rats. ***Am J Obstet Gyneco* 111: 964–969.**
- Ferruz J., Barria A., Galleguillos X. y Lara HE. (1991) "Release of Norepinephrine from the Rat Ovary: Local Modulation by Gonadotropins" ***Biology of Reproduction* 45: 592-597.**
- Flores A., Ayala M.E., Domínguez R. (1990) Does noradrenergic peripheral innervation have a different role in the regulation ovulation in the prepubertal and the adult rat? ***Medical Science Research* 18: 817-818.**

-
- Flores A., Rodríguez JO., Palafox MT., Meléndez G., Barco AI., Chavira R, Cruz ME. y 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*, 4: 11**
 - Flores A., Velasco J, Gallegos AI., Mendoza FD., Everardo PM., Cruz ME. y Domínguez R. (2011) Acute effects of unilateral sectioning the superior ovarian nerve of rats with unilateral ovariectomy on ovarian hormones (progesterone, testosterone and estradiol) levels vary during the estrous cycle ***Reproductive Biology and Endocrinology* 9: 34**
 - Forneris M., Rosales E., Ciuffo G. y Oliveros L. (2008) Testosterone Environment of Splenocytes Modifies the Steroidogenesis of Polycystic Ovary in Rats ***Horm Metab Res* 40: 239 – 244**
 - Galas J.F. (2012) Primary Culture of Ovarian Cells for research on cell interactions in the Hormonal Control of Steroidogenesis. En: Ragai R. and Robin D. Hughes (Eds), ***Human Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology Vol. 806***.
 - Halvorson (2001). Hormonas gonadotróficas, biosíntesis, secreción, receptores y acción. En: Yen S, Jaffe R. (Eds.) *Endocrinología de la reproducción: Fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. 4ª edición. **Ed: Médica Panamericana. Argentina Capítulo 3. Pp. 86-117.**
 - Hemmings R., Farookhi R., Brawer J.R. (1983) Pituitary and Ovarian responses to Luteinizing Hormone Releasing Hormone in the Rat with Polycystic Ovaries. ***Biology of Reproduction* 29: 239-248.**
 - Henmi H., Endo T., Nagasawa K., Hayashi T., Chida M., Akutagawa N., Iwasaki M., Kitajima Y., Kiya T., Nishikawa A., Manase K., Kudo R. (2001) Lysyl oxidase and MMP-2 expression in dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovary in rats. ***Biol Reprod* 64: 157–162.**

-
- Herrera H., Vergara M., Rosado-García A., Rosales A.M., (2005) “Diferenciación sexual en el sistema nervioso central” *Vet. Mex.* **36: 339-360**
 - Hinshelwood MM. (1999) Steroidogenesis, Overview. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) Encyclopedia of Reproduction. *Academic Press. San Diego Vol. 4. pp. 644-653.*
 - Huffman L., Hendricks SE. (1981). Prenatally injected testosterone propionate and sexual behavior of female rats. *Physiol Behav* **26: 773–778.**
 - Kably AA., Ruiz A. (2006). “Comportamiento neuroendocrino, foliculogénesis y ovulación”. En: Delgado & Fernández (Eds.) SOPQ en Ginecología y Reproducción Humana. *Ed. Colegio Mexicano de Especialistas en Ginecología y Obstetricia A.C. México. Capítulo 30. pp. 261-272.*
 - Klein CM., Burden HW. (1988) Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neuroscience Letters* **85: 217-222.**
 - Lambert HH. (1975) Continuous red light induces persistent estrus without retinal degeneration in the albino rat. *Endocrinology* **97: 208–210.**
 - Langin D., Tavernier G. y Lafontan M. (1995) “Regulation of beta 3-adrenoceptor expression in white fat cells” *Fundam Clin Pharmacol*, **9(2): 97-106**
 - Lansdown A., Aled DR. (2012) The sympathetic nervous system in polycystic ovary syndrome: a novel therapeutic target? *Clinical Endocrinology* **77, 791-801.**
 - 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. *The Endocrine Society* **141: 1059-1072.**
 - Lara HE., Dorfman M., Venegas M., Luza SM., Luna SL., Mayerhofer A., Guimaraes MA., Rosa E Silva AA., y Ramirez VD. (2002) Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: Studies on norepinephrine release. *Microsc Res Tech* **59: 495-502.**

- Lara HE., Ferruz JL., Luza S., Bustamante DA., Borges Y., Ojeda S.R. (1993) Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. ***Endocrinology* 133: 2690–2695.**
- Lara HE., Porcile A., Espinoza J., Romero C., Luza SM., Fuhrer J., Miranda C., Luis R. (2001) Release of Norepinephrine from Human Ovary. ***Endocrine* 15(2): 187–192.**
- Lara, HE., McDonald, JK., Ahmed, CE., Ojeda, SR. (1990b) Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. ***Endocrinology* 127: 2199-2209**
- Lara, HE., McDonald, JK., Ojeda, SR. (1990a) The gene encoding nerve growth factor is expressed in the immature rat ovary: Effect of denervation and hormonal treatment ***Endocrinology* 126:357-363.**
- Lawrence IE., Burden HW. (1980). The origin of the Extrinsic Adrenergic innervation to the rat ovary. ***The Anatomical Record* 196: 51-59.**
- Lee MT., Anderson E., Lee GY. (1991) Changes in ovarian morphology and serum hormones in the rat after treatment with dehydroepiandrosterone. ***Anat Rec* 231: 185–192.**
- Levy MN., Koeppen BM., Stanton BA., (2006) Berne y Levy Fisiología 4ta Ed. ***Elseviere, Barcelona España pp. 817.***
- Linares R. (2006) Participación del nervio ovárico superior en el desarrollo del síndrome del ovario poliquístico. La rata como modelo de estudio. ***Tesis de Licenciatura. UNAM. FES Zaragoza.***
- Linares R., Hernández D., Morán C., Chavira R., Cárdenas M., Domínguez R., Morales L. (2013) Unilateral or bilateral vagotomy induces ovulation in both ovaries of rats with polycystic ovarian syndrome. ***Reproductive Biology and Endocrinology* 11:68**
- Lombardi E., La Spina A., (2006) Interacciones en la fisiología endocrina del ciclo Ovárico En: Diagnóstico y terapeuta en endocrinología, ginecológica y reproducción. ***Ediciones Journal Argentina pp. 49-54.***

-
- Luque M., Escobar HF. (2006) Aspectos genéticos. En: MA. Checa Vizcaíno, JJ Espinós Gómez, R, Matorras Weining (Eds). Síndrome del Ovario Poliquístico, **Ed. Medica Panamericana Madrid España Capítulo 2 pp. 25-42.**
 - Malamed S., Gibney JA., Ojeda SR (1992) Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat. **Cell. Tissue. Res. 270: 87-93.**
 - Manneras L., Cajander S., Holmang A., Seleskovic Z., Lystig T., Lonn M., Stener-Victorin EA. (2007). New rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. **Endocrinology 148: 3781–3791.**
 - Matalliotakis I., Kourtis A., Koukoura O., y Panidis D. (2006) Polycystic ovary syndrome: etiology and pathogenesis **Arch Gynecol Obstet 274: 187–197**
 - Mayerhofer A., Dimitrijevic N., Kunz L. (2003) The expression and biological role of the non-neuronal cholinergic system in the ovary. **Life Sciences 72: 2039–2045.**
 - 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.**
 - McCarthy GF., Brawer JR. (1990) Induction of Stein-Leventhal-like polycystic ovaries (PCO) in the rat: a new model for cystic ovarian disease. **Anat Rec 228: 137–144.**
 - McDonald P.G., Doughty C. (1972). Comparison of the effect of neonatal administration of testosterone and dihydrotestosterone in the female rat. **J Reprod Fertil 30: 55–62.**
 - Mira R.A. (2005) Síndrome de ovario Poliquístico – teorías de su fisiopatología, Bioquímica y Fisiopatología Clínica, **Asociación Bioquímica Argentina, Buenos Aires 69 (2): 12-33.**
 - Morales L., Chávez R., Ayala ME, Domínguez R. (1998) Effects of Unilateral or Bilateral Superior Ovarian Nerve Section in Prepubertal Rats on the Ovulatory Response to Gonadotrophin Administration. **Journal of Endocrinology 158: 213-219.**

- Morales L., Domínguez R., Chávez R. (1993) Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve. ***Medical Science Research 21: 15-17.***
- Morales L., 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.***
- Morales L., Vieyra E., Ramírez DA., Trujillo A., Chavira R., Cárdenas M. Domínguez R. (2012). Effects on steroid hormones secretion resulting from the acute stimulation of sectioning the superior ovarian nerve to pre-pubertal rats. ***Reproductive Biology and Endocrinology 10: 88***
- Morán C., Morales L., Quiroz U., Domínguez R. (2000) Effects of Unilateral o Bilateral Superior Ovarian Nerve Section in Infantile Rats on Follicular Growth. ***Journal of endocrinology 166: 205–211.***
- Morán C., Zarate F., Morán JL., Handal A., Domínguez R. (2009) Lateralization of the connections of the ovary to the celiac ganglia in juvenile rats. ***Reproductive Biology and Endocrinology 7: 50.***
- Morán-Villota C. (2006). Síndrome de Ovario Poliquistico. En: Delgado & Fernández (Eds.) SOPQ en Ginecología y Reproducción Humana. ***Ed. Colegio Mexicano de Especialistas en Ginecología y Obstetricia A.C. México. Capítulo 35. pp. 313-318.***
- Navarrete M.I. (2014) Modificación de las funciones ováricas en el animal con síndrome de ovario poliquistico, inducido por la administración de valerato de estradiol o la exposición a estrés por frio. ***Tesis de Licenciatura. UNAM. FES Zaragoza.***
- Neagle, A.C. (2006) Fisiología del eje hipotálamo-hipofisio-gonadal y del cuerpo lúteo, en: Diagnóstico y terapeuta en endocrinología, ginecológica y reproducción. ***Ediciones Journal Argentina pp. 26-48.***

- O'Malley (2001). Hormonas esteroides: metabolismo y mecanismos de acción. En: Yen S, Jaffe R. (Eds.) Endocrinología de la reproducción: Fisiología, fisiopatología y manejo clínico. 4ª edición. **Ed: Médica Panamericana. Argentina. Capítulo 4. Pp. 118-143.**
- Ojeda SR., Andrews WW., Advis JP., Smith-White S. (1980) Recent Advances in the Endocrinology of Puberty. **Endocrine Rev 1: 228-257.**
- Parra C., Fieldler J., Luna S. (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. **Society for Reproduction and Fertility 133, 147-154.**
- Pascuali R., Stener-Victorin E., Yildiz BO., Duleba AJ., Hoeger K., Mason H., Homburg R., Hickey T., Franks S., Tapanainen J., Balen A., Abbott DH., Diamanti-Kandarakis E., Legro RS. (2011). Forum: research in polycystic ovary syndrome today and tomorrow. **Clinical Endocrinology 74: 424-433.**
- Pinilla L., Trimino E., Garnelo P., Bellido C., Aguilar R., Gaytan F., Aguilar E. (1993) Changes in pituitary secretion during the early postnatal period and anovulatory syndrome induced by neonatal oestrogen or androgen in rats. **J Reprod Fertil 97:13-20.**
- Purves D., Augustine GJ., Fitzpatrick D., Katz., LC., Lamanta AS., McNamara JO. (2001), Invitación a la neurociencia 1ra Edición. **Ed: Médica Panamericana S.A. Buenos Aires Argentina pp. 611.**
- Ramos JA. (2013) Posible comunicación interovárica, vía el plexo ovárico, en la persistencia del síndrome del ovario poliquístico. La rata como modelo de estudio. **Tesis de Licenciatura. UNAM. FES Zaragoza.**
- Roger C. (1996). Anatomía Humana Funcional. 2a reimpression. **Ed: Limusa D.F. México pp. 875.**

-
- 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 G. (2006) Efecto de la inducción del síndrome del ovario poliquístico en la rata infantil, sobre la dinámica del crecimiento folicular y la secreción de hormonas esteroides. ***Tesis de Licenciatura. UNAM. FES Zaragoza.***
 - Sánchez Criado JE. (1999) Fisiología del Ovario. En: Tresguerres JA. Ed. Fisiología Humana. 2da. Edición. ***Ed. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid. Pp. 1020-1032.***
 - Schulster A., Farookhi R. y Brawer JR. (1984) Polycystic Ovarian Condition in Estradiol Valerate-Treated Rats: Spontaneous Changes in Characteristic Endocrine Features ***Biology of Reproduction* 31: 587-593.**
 - Selstam G., Norjavaara E., Tegenfelt T., Lundeberg S., Sandstrom Ch. y Sven-Ake P. (1985) Partial denervation of the ovaries by transection of the suspensory ligament does not inhibit ovulation in rats treated with pregnant mare serum gonadotrophin. ***Anatomical Record* 213: 392–395.**
 - Shirwalkar H., Modi D., Maitra A. (2007). Exposure of adult rats to estradiol valerate induces ovarian cyst with early senescence of follicles. ***Molecular and Cellular Endocrinology* 272: 22-37.**
 - Simard M., Brawer JR., y Farookhi R. (1987) An Intractable, Ovary-Independent Impairment in Hypothalamo-Pituitary Function in the Estradiol-Valerate-Induced Polycystic Ovarian Condition in the Rat ***Biology Of Reproduction* 36: 1229-1237**
 - Singh KB. (1969). Induction of polycystic ovarian disease in rats by continuous light. I. The reproductive cycle, organ weights, and histology of the ovaries. ***Am J Obstet Gynecol* 103:1078-1083.**
 - Smith CL. (1999) Estrogens, Overview. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) Encyclopedia of Reproduction. ***Academic Press. San Diego Vol. 2. pp. 119-126.***

- Sotomayor-Zárate R., Dorfman M., Paredes A., y 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**
- Stener-Victorin E., Fujisawa S., Kurosawa M. (2006) Ovarian blood flow responses to electroacupuncture stimulation depend on estrous cycle and on site and frequency of stimulation in anesthetized rats ***Journal Appl. Physiology* 101: 84-91.**
- Stener-Victorin E., Kobayashi R., Watanabe O., Lundeberg T., Kurosawa M. (2004) Effect of electro-acupuncture stimulation of different frequencies and intensities on ovarian blood flow in anaesthetized rats with steroid-induced polycystic ovaries ***Reproductive Biology and Endocrinology* 2: 16.**
- Stener-Victorin E., Ploj K., Larsson BM., Holmäng A. (2005) Rats with Steroid-Induced Polycystic Ovaries develop Hypertension and Increased Sympathetic Nervous System Activity. ***Reproductive Biology and Endocrinology*. 3: 44.**
- Stener-Victorin E., Lundeberg T., Waldenström U., Manni L., Aloe L., Gunnarsson S, Janson PO. (2000) Effects of electro-acupuncture on nerve growth factor and ovarian morphology in rats with experimentally induced polycystic ovaries. ***Biology of Reproduction* 63(5): 1497-503**
- Sullivan SD., Moenter SM. (2004). Prenatal androgens alter GABAergic drive to gonadotropin-releasing hormone neurons: implications for a common fertility disorder. ***Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7129-7134.**
- Takeo Y. (1984) Influence of continuous illumination on estrous cycle of rats: time course of changes in levels of gonadotropins and ovarian steroids until occurrence of persistent estrus. ***Neuroendocrinology* 39: 97-104. 85.**
- Tavernier G., Jimenez M., Giacobino JP., Hulo N., Lafontan M., Muzzin P., Langin D. (2005) Norepinephrine induces lipolysis in beta1/beta2/beta3-adrenoceptor knockout mice ***Mol Pharmacol* 68(3): 793-9**

- Tortora GJ. y Derrickson B., (2006) Principios de anatomía y fisiología humana, 11. Ed. 4a reimpresión **Ed. Médica Panamericana S.A. D.F. México pp. 1154.**
- Tresguerres JAF. y Castillo C. (2005) Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico. En: Fisiología humana 3a Edición **Ed. Mcgraw-Hill Interamericana de España, S.A.U. México Pp. 1007-1023**
- Trujillo A., Morales L. y Domínguez R. (2014) The effects of sensorial denervation on the ovarian function, by the local administration of capsaicin, depend on the day of the oestrous cycle when the treatment was performed **Endocrine 48: 321-328**
- Tyndall V., Broyde M., Sharpe R., Welsh M., Drake AJ., McNeilly AS. (2012) Effect of androgen treatment during fetal and/or neonatal life on ovarian function in prepubertal and adult rats. **Reproduction 143: 21-33.**
- Uchida S., Kagitani F. y Hotta H. (2012) Reflex modulation of ovarian estradiol secretion by noxious mechanical stimulation of a hindpaw in anesthetized rats **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical 171: 14-20**
- Ulloa-Aguirre A. y Chaptel S.C. (1982) Multiple species of follicle stimulating hormone exist within the anterior pituitary gland of male golden hamsters. **J Endocrinol 95: 257-66.**
- Ulloa-Aguirre A., Mejia J., Domínguez R., Guevara-Aguirre J., Díaz-Sánchez V. y Larrea F. (1986) Microheterogeneity of anterior pituitary FSH in the male rat: isoelectric focusing pattern throughout sexual maturation. **J Endocrinol 110: 539-49**
- Van Voorhis BJ. (1999) Follicular Steroidogenesis. En Knobil E, Neill J. D. (Eds.) Encyclopedia of Reproduction. Vol 2. **Ed. Academic Press. USA. Pp. 389-395.**
- Van Voorhis BJ. (1999a) Follicular Development. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) Encyclopedia of Reproduction. **Ed. Academic Press. San Diego. Vol. 2. pp. 376-389.**
- Walters KA., Charles MA., Handelsman DJ. (2012) Rodent Models for Human Polycystic Ovary Syndrome. **Biology of Reproduction 86(5): 149, 1-12.**

- Wan-Hua AY. (1980) Uptake sites of horseradish peroxidase after injection into peritoneal structures: defining some pitfalls *Journal of Neuroscience Methods*, **2: 123-133**
- Ward RC., Costoff A., Mahesh VB. (1978) The induction of polycystic ovaries in mature cycling rats by the administration of dehydroepiandrosterone (DHA). *Biol Reprod* **18: 614-623**.
- Weber AL., Adler NT. (1979) Delay of constant light-induced persistent vaginal estrus by 24-hour time cues in rats. *Science* **204: 323-325**.
- Wittwer F., Moreira M., Klein R., Böhmwald H., (1994), Efectos de la administración de la adrenalina en las concentraciones sanguíneas y urinarias de minerales de ovejas *Vet. Mex.* **26 3: 209-213**
- Wolf R., Meier-Fleitmann A., Duker EM., Wuttke W. (1986) Intraovarian Secretion of Catecholamines, Oxytocin, Beta-Endorphin, and Gamma-Amino-Butyric-Acid in Freely Moving Rats: Development of a Push-Pull Tubing Method *Biology Of Reproduction* **35: 599-607**.
- Wu XY., Li ZL., Wu CY., Liu YM., Lin H., Wang SH., Xiao WF. (2010) Endocrine traits of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female Sprague-Dawley rats. *Endocrinology Journals* **57: 201-209**.
- Yao HHC, Bahr JM. (1999) Ovary, Overview. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) Encyclopedia of Reproduction. *Ed. Academic Press. San Diego. Vol. 3. pp. 590 - 597*.
- Yeh J., Adashi Y. (2001). El ciclo ovárico. En: Yen S, Jaffe R. (Eds.) Endocrinología de la reproducción: Fisiología, fisiopatología y manejo clínico. 4ª edición. *Ed: Médica Panamericana. Argentina. Capítulo 6. pp 164-193*.
- Yen SSC. (2001) Síndrome del ovario poliquístico: Anovulación crónica Hiperandrogénica. En: Yen S S C, Jaffe R B, Barbieri R L, editores. Endocrinología de la reproducción fisiología, fisiopatología y manejo clínico. 4ta. Edición. *Ed. Médica panamericana. pp. 465-510*.

- Yen SSC., Vela P. y Rankin J. (1970) Inappropriate secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol*; **30**: **435-442**.
- Ying SY. y Zhang Z. (1999) Ovarian Hormones, Overview. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) Encyclopedia of Reproduction. *Academic Press. San Diego Vol. 3. pp. 578- 582*.