



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Carrera de Biología

"Expresión de los receptores del Péptido Intestinal
Vasoactivo (VIP) en el ovario de la rata adulta cíclica"

T E S I S

Para obtener el título de:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Rocio Sarahy Ayala Martínez

Directora de tesis:

Dra. Leticia Morales Ledesma



Ciudad de México

Septiembre 13, 2017.



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

"Expresión de los receptores del Péptido Intestinal
Vasoactivo (VIP) en el ovario de la rata adulta cíclica"

T E S I S

Para obtener el título de:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Rocio Sarahy Ayala Martínez

Directora de tesis:

Dra. Leticia Morales Ledesma

Investigación realizada gracias al Programa
UNAM DGAPA-PAPIIT con clave IN217016



Ciudad de México

Septiembre 13, 2017.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

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

Comunico a usted que la alumna **AYALA MARTÍNEZ ROCIO SARAHY**, con número de cuenta **308049668**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **13 de septiembre de 2017** 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 Dra. JUANA MONROY MORENO

SUPLENTE Dra. ELIZABETH VIEYRA VALDEZ

El título de la tesis que presenta es: **Expresión y distribución de los receptores del péptido intestinal vasoactivo (VIP) en el ovario de la rata adulta cíclica.**

Opción de titulación: Tesis.

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 15 de agosto de 2017

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

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

AGRADECIMIENTOS

Al programa UNAM DGAPA-PAPIIT con clave IN217016 por haberme brindado la beca que fue de gran apoyo para concluir mis estudios de licenciatura y para el desarrollo de la tesis profesional.

A la UNAM por darme la oportunidad de ingresar desde la preparatoria, y a la FES Zaragoza por permitirme concluir mis estudios.

A la **Dra. Leticia Morales Ledesma**, por permitirme entrar a su laboratorio, por sus consejos, paciencia, conocimientos y el gran apoyo que me brindó durante la estancia en el laboratorio. Le agradezco infinitamente.

A la **Dra. Isabel Arrieta Cruz**, por haberme brindado su paciencia y sus conocimientos sobre la técnica inmunohistoquímica.

A la **Dra. María Esther Cruz Beltrán**, por permitirme usar el equipo y el microscopio de fluorescencia.

A mis sinodales:

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dra. Juana Monroy Moreno

Dra. Elizabeth Vieyra Valdez

Por dedicar tiempo en la revisión de este estudio y por sus conocimientos brindados para la mejora de la tesis.

A la **Dra Ely**, a la **Dra. Adriana** y al **Dr. Ramón** por el cuidado de los animales utilizados para este estudio.

A la **Dra. Gaby**:

Fuiste un gran apoyo en la realización de este estudio, te agradezco infinitamente por tenerme paciencia, por tratar de ser comprensiva y por todo el conocimiento que me brindaste. Todo lo que he aprendido de ti siempre lo tomaré en cuenta, porque eres una excelente asesora y amiga. Te quiero mucho.

A la **Dra. Rosa**:

Gracias por ser una parte fundamental de este trabajo. Por todos esos consejos y apoyo que me brindaste, no sólo en la parte académica sino también en la personal. Eres una excelente amiga y un gran ejemplo a seguir. Te quiero mucho.

A mis compañeros y amigos de laboratorio:

Nallely, David, Misa, Azu, Iván, Fer, Hugo, Gaby, Rosa, Ely, Dey. Les agradezco por todos esos momentos de risa y compañerismo, que hicieron que mi estancia en el laboratorio fuera más agradable. Además de la ayuda que me brindaron cuando la necesitaba, los quiero mucho.

Nalle, eres una excelente amiga. Gracias por tu apoyo, tanto en la vida académica y personal. Eres la mejor, te quiero mucho.

David, gracias por brindarme tu ayuda en las perfusiones y en todo. Eres una excelente persona y amigo. Te quiero mucho.

Amigas de la carrera:

Mayra, Elisa y Caro. Por convivir conmigo en gran parte de la carrera, por los ratos de estudio y por los momentos de alegría. Las quiero mucho, son las mejores.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

Francisco y Teresa, no tengo palabras para agradecerles todo lo que me han dado. Son las mejores personas y lo mejor de mi vida, todo lo que tengo y soy es gracias a ustedes. Los amo demasiado.

Francisco, yo se que te sientes muy orgulloso de mi, gracias por confiar en mi, por apoyarme siempre, por todo lo que me has dado y los consejos que me has brindado. Eres el mejor padre.

Teresa, eres la mejor madre del mundo. Gracias por tus consejos, tus regaños, por escucharme y tratar de apoyarme siempre, te amo demasiado.

A mis hermanos:

Especialmente a **Cristian**, por brindarme todo su apoyo, cariño y consejos. Te quiero mucho.

A **Mario, Nallely y Veronica**, por sentirse orgullosos de mi y creer que todo lo puedo lograr. Los quiero mucho hermanos.

A mis sobrinos:

Lisset, Yozune, Belen (las gemas), David, Ángel, Dani, Tsaquiel, Adán, Iker, Isaac, Icel y Jesús ustedes son el motivo de mis alegrías y mi motor, espero ser un ejemplo para todos y que puedan lograr todo lo que se propongan. Los amo.

A **Gabino**:

Eres parte fundamental de mi vida, gracias por todo el apoyo, la paciencia y el cariño que me brindas. Te agradezco por los consejos y las cosas buenas que tratas de inculcarme. Te amo mucho, precioso amor.

A mi padrino:

Ignacio, por brindarme su apoyo y estar siempre que lo necesitamos, lo quiero mucho

CONTENIDO

ABREVIATURAS	I
RESUMEN	II
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	2
Estructura del ovario.....	2
Desarrollo folicular	4
Regulación endócrina del desarrollo folicular.....	8
Ovulación.....	10
Fase lútea.....	12
Ciclo estral.....	12
Esteroidogénesis ovárica.....	14
Inervación del ovario.....	17
Asimetrías ováricas	19
Péptido Intestinal Vasoactivo	20
El Péptido Intestinal Vasoactivo y su participación en la regulación de las funciones del ovario	21
Receptores VIPérgicos	23
Vías de señalización del VIP	25
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
HIPÓTESIS	28
OBJETIVO GENERAL	28
Objetivos particulares	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Diseño experimental	29
Perfusión.....	30
Deshidratación e inclusión	31
Inmunohistoquímica.....	31
Análisis estadístico	33
RESULTADOS	34
DISCUSIÓN	46
MODELO	51
CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52
Anexo 1	65
Anexo 2	66
Anexo 3	69

ABREVIATURAS

- **3 β -HSD**: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
- **17 β -HSD**: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
- **ABC**: Complejo avidina-biotina
- **AMPc**: Monofosfato de Adenosina cíclico
- **ARNm**: Ácido ribonucleico mensajero
- **ATP**: Trifosfato de adenosin
- **CGRP**: Péptido relacionado con el gen que codifica a la calcitonina
- **DAB**: 3,3'-diaminobencidina
- **DAG**: Diacilglicerol
- **DHEA**: Dehidroepiandrosterona
- **FSH**: Hormona estimulante del folículo
- **GCMS**: Ganglio celiaco mesentérico superior
- **GDP**: Guanosin difosfato
- **GIP**: Polipéptido inhibidor de la gastrina
- **GLP**: Péptido similar al glucagón
- **GnRH**: Hormona liberadora de las gonadotropinas
- **GPCRs**: Receptores transmembranales acoplados a proteínas G
- **GRF**: Factor liberador de la hormona del crecimiento
- **GTP**: Guanosin trifosfato
- **H₂O₂**: Peróxido de hidrógeno
- **LH**: Hormona luteinizante
- **MAPK**: Proteínas cinasas activadas por mitógenos
- **NA**: Noradrenalina
- **NaBH₄**: Boro. hidruro de sodio
- **NGF**: Factor de crecimiento neural
- **NO**: Óxido nítrico
- **NOS**: Nervio ovárico superior
- **NPO**: Nervio del plexo ovárico
- **NPY**: Neuropeptido Y
- **NV**: Nervio vago
- **P450scc**: Enzima de escisión de la cadena lateral de colesterol citocromo P450
- **PACAP**: Polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria
- **PBS**: Buffer de fosfatos
- **PLC**: Fosfolipasa C
- **PLD**: Fosfolipasa D
- **PKA**: Proteína cinasa A
- **PKC**: Proteína cinasa C
- **REL**: Retículo endoplásmico liso
- **RT-PCR**: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
- **SP**: Sustancia P
- **StAR**: Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda
- **VIP**: Péptido intestinal vasoactivo

RESUMEN

El péptido intestinal vasoactivo (VIP) es un neuropéptido que ingresa al ovario por el Nervio Ovárico Superior (NOS) y el Nervio Vago (NV), además de que es sintetizado de manera local por células de la granulosa. El VIP estimula el desarrollo folicular, la ovulación y la síntesis de hormonas esteroides. Los efectos del VIP sobre sus células diana son mediados por los receptores VPAC-1 y VPAC-2, que son receptores transmembranales acoplados a proteínas G (GPCRs) que activan la vía de señalización adenilato ciclasa/monofosfato de adenosina cíclico (AMPC).

La inyección de VIP en la bursa del ovario izquierdo o derecho, modifica la secreción de hormonas esteroides, lo que depende del ovario estimulado y del estado neuroendocrino del animal. Esta respuesta del ovario al estímulo VIPérgico puede deberse a una expresión diferencial de sus receptores en cada ovario que varía en función del día del ciclo estral. Para evaluar esta posibilidad, en el presente estudio se analizó la distribución y expresión de los receptores VPAC-1 y VPAC-2 en los ovarios de la rata adulta cíclica. Para ello, se utilizaron ratas hembras de la cepa CII-ZV de 60 días de edad, que fueron sacrificadas en los días del diestro 1, diestro 2, proestro o estro. Los ovarios fueron extraídos y procesados para evaluar la expresión de los receptores VIPérgicos a través de la técnica de inmunohistoquímica. La inmunoreactividad a VPAC-1 y a VPAC-2 se cuantificó por el porcentaje de píxeles.

Los resultados muestran que ambos receptores se expresan en los cuatro días del ciclo estral en células de la teca y de la granulosa de folículos primarios, secundarios y preovulatorios; en el estroma, en la glándula intersticial, así como en los cuerpos lúteos. La expresión del VPAC-1 fue mayor en folículos secundarios del ovario derecho de

animales sacrificados en diestro 1 y diestro 2, comparado con el ovario izquierdo (1179.1% vs. 837.8% y 1305.6 vs. 505.89%, respectivamente). El mismo caso se observó para cuerpos lúteos, en diestro 2 y diestro. En cambio, en animales sacrificados en diestro 2, el VPAC-2 se expresa más en el ovario izquierdo (2520% vs. 573.2%). En los folículos preovulatorios no se encontraron diferencias significativas entre ovarios del mismo día del ciclo. No obstante, el ovario izquierdo de animales sacrificados en el diestro 2, presenta mayor expresión del VPAC-2 en comparación con el ovario izquierdo de animales en proestro y diestro.

Los resultados del presente estudio permiten concluir que los receptores VIPérgicos presentan una distribución asimétrica que depende del día del ciclo estral, de la estructura ovárica y del ovario en estudio, lo que pudiera, al menos en parte, ser la responsable de la respuesta esteroidogénica diferencial que presentan los ovarios al estímulo VIPérgico.

INTRODUCCIÓN

El ovario realiza dos funciones, la producción de gametos y de hormonas esteroides y protéicas (Ross y Pawlina, 2015). Estas funciones son reguladas por señales hormonales provenientes del hipotálamo, la hipófisis y los ovarios, que funcionan como un eje de regulación (Levine, 2015).

Las funciones del ovario además de ser moduladas por señales neuroendocrinas e intraováricas, son reguladas por señales nerviosas de naturaleza peptídica (Hsueh y col., 1984). Las fibras VIPérgicas ingresan al ovario a través de dos paquetes nerviosos, el NOS (Dees y col., 1986) y en menor proporción por el NV (Said y Rosenberg, 1976). Las fibras VIPérgicas se encuentran en el tejido intersticial, alrededor de vasos sanguíneos y folículos primordiales, y en asociación con la teca de folículos en desarrollo (Ahmed y col., 1986; Dees y col., 1986; Schulte y col., 1992; Hulshof y col., 1994). Además, la presencia del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) del VIP en el ovario ha llevado a sugerir su síntesis local (Gozes y Tsafiriri, 1986).

Los efectos del VIP sobre sus células diana, están mediados por dos receptores acoplados a proteínas G, el VPAC-1 y el VPAC-2, que activan la vía de la adenilato ciclasa y estimulan la producción de AMPc (Harman y col., 1998; Dickson y Finlayson, 2009). Mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) y el análisis con inmunofluorescencia en el ovario, se ha descrito la presencia del VPAC-1 en la pared de los vasos sanguíneos, en el estroma, en el hilio ovárico y en células teco-intersticiales; mientras que el VPAC-2 está presente en el oviducto, las células teco-intersticiales y en células de la granulosa (Vaccari y col., 2006).

El VIP participa en la regulación de las funciones del ovario, como son: el desarrollo folicular (Mayerhofer y col., 1997; Chen y col., 2012), la ovulación (Liu y col., 1987; Schmidt y col., 1990; Apa y col., 1997) y en la modulación de la actividad de enzimas esteroideogénicas (George y Ojeda, 1987; Johnson y col., 1994; Kowalewski y col., 2010) que participan en la síntesis de hormonas esteroides (Fredericks y col., 1983; Davoren y Hsueh, 1985; Ahmed y col., 1986; Parra y col., 2007; Rosas y col., 2015).

Usando como modelo de estudio animales hemiovariectomizados, se ha observado que la capacidad de los ovarios para secretar progesterona, testosterona, y estradiol es asimétrica y varía a lo largo del ciclo estral (Cruz y col., 2006; Flores y col., 2006). Recientemente se mostró que la inyección unilateral de VIP en la bursa del ovario izquierdo o derecho, modifica la tasa de secreción de hormonas esteroides, cambios que dependen del ovario estimulado y de la etapa del ciclo estral del animal (Rosas y col., 2015). Estos resultados han llevado a sugerir que en la rata adulta cíclica, cada ovario tiene diferente respuesta al estímulo VIPérgico, dada posiblemente por la expresión diferencial de los receptores VIPérgicos en cada ovario (Rosas, 2015). Para analizar esta posibilidad, en el presente estudio se evaluó la presencia y distribución de los receptores VPAC-1 y VPAC-2 en los ovarios de la rata adulta en cada día del ciclo estral, y se analizó sí la distribución de ambos receptores es asimétrica.

MARCO TEÓRICO

ESTRUCTURA DEL OVARIO

El ovario está constituido por folículos en diferentes estadios de desarrollo que interactúan y llevan a cabo la producción de óvulos maduros (ovulación) aptos para la fecundación. Además secretan hormonas esteroides sexuales y péptidos que crean un ambiente adecuado para la fertilización y la implantación posterior del cigoto en el endometrio (Geneser, 2000; Tresguerres, 2010; Strauss y Williams, 2014).

Los ovarios son órganos pares ovoides, de color rosa grisáceo y con una superficie irregular, debido a la presencia de folículos ováricos. Cada ovario está fijado a la superficie posterior del ligamento ancho del útero mediante una estructura vascularizada corta, el mesovario, unido a los bordes del ovario (Ross y Pawlina, 2012; Brüel y col., 2015). En la parte superior, el ovario se encuentra unido a la pared de la pelvis mediante el ligamento suspensorio, que conduce los vasos y los nervios al interior de la gónada (Ross y Pawlina, 2015).

La superficie del ovario está recubierta por tejido epitelial simple cúbico, denominado **epitelio de superficie** que tiene funciones de transporte y secreción. Está formado por queratina, desmosomas, microvellosidades apicales y una membrana basal. Debido a que

esta expuesto a rupturas en los sitios de ovulación, contiene y secreta diversos agentes que regulan su crecimiento y diferenciación, entre los que se encuentran receptores para la hormonaas como la luteinizante (LH), la estimulante del folículo (FSH), estrógenos, andrógenos, progesterona y la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), así como factores de crecimiento y citocinas (Auersperg y Woo, 2004). El epitelio de superficie está separado del estroma ovárico por una capa de colágeno, la **túnica albugúnea** (Auersperg y Woo, 2004), la cual está compuesta por tejido conectivo denso que forma una cápsula muy delgada (Sepúlveda, 2014; Brüel y col., 2015).

En el ovario se distinguen tres zonas:

- **El hilio.** Es la porción del ovario mediante la cual ingresan nervios, vasos sanguíneos y linfáticos (Fig. 1). Contiene además tejido conectivo de sostén y algunas células esteroideogénicas denominadas células hiliares, que producen testosterona en respuesta a la LH (Geneser, 2000; Sepúlveda, 2014; Gartner y Hiatt, 2015).
- **La corteza.** Es la estructura externa del ovario (Fig. 1), cubierta por el epitelio celómico (Gougeon, 2004). La corteza está formada por:
 - a) El **estroma**, que contiene células fibroblásticas que expresan algunas enzimas que sintetizan andrógenos (Jabara y col., 2003).
 - b) Los **folículos** en diferentes estadios de crecimiento y maduración, lo cual depende de la edad y la etapa del ciclo reproductivo (Sepúlveda, 2014).
 - c) La **glándula intersticial**, formada por células intersticiales, que derivan de la teca interna de folículos que degeneraron por atresia y que contienen lípidos como almacenamiento para la síntesis de andrógenos, principalmente androstenediona y testosterona (Botella, 1995; Kühnel, 2005).
- **La médula.** Se encuentra por debajo de la corteza, formando el centro del ovario (Fig. 1). Está compuesta por tejido conectivo denso que rodea a los vasos sanguíneos, a las vías linfáticas y a las fibras nerviosas (Geneser, 2000; Gougeon, 2004; Hoffman y col., 2012).

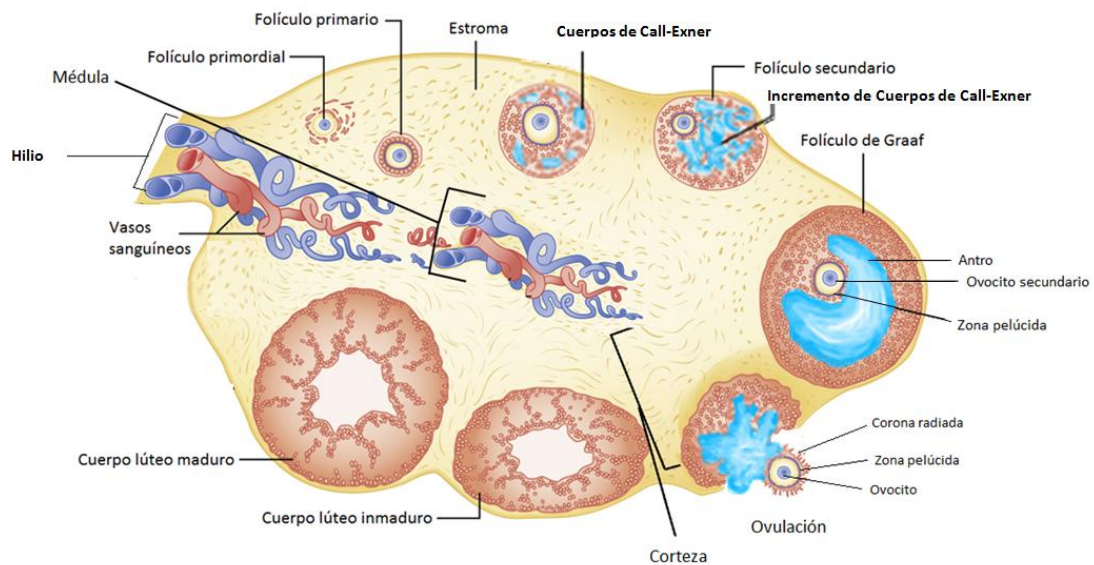


Figura 1. Composición estructural del ovario. Se muestra la secuencia de la maduración folicular, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Tomado y modificado de Strauss y Williams, 2014).

DESARROLLO FOLICULAR

Los folículos son la unidad anatómica y funcional del ovario. Su función es mantener, nutrir, madurar y liberar al ovocito en el momento en que este sea capaz de ser fecundado (Gartner y Hiatt, 2015). Según el grado de maduración, los folículos están formados por un ovocito primario o secundario, una membrana basal y una o varias capas de células de la granulosa y de la teca (Sepúlveda, 2014).

El desarrollo del folículo es complejo y consiste en la integración de múltiples señales. El inicio del desarrollo folicular es dirigido por señales intraováricas, mientras que la influencia de la LH y la FSH ocurre a partir del estadio de folículo secundario (Albertini, 2015; Pangas y Rajkovic, 2015).

Los folículos ováricos se clasifican en función de su tamaño y complejidad morfológica en:

1. Folículos primordiales

Constituyen la reserva de los folículos en reposo y se localizan en la corteza ovárica, por debajo de la túnica albugínea (Brüel y col., 2015). Las células germinales primordiales se originan fuera de las gónadas y migran a ellas durante los primeros estadios del

membrana **basal**, una barrera especializada de matriz extracelular semipermeable (Irving-Rogers y col., 2010) que permite el desarrollo de un microambiente dentro del folículo, esencial para el funcionamiento y desarrollo folicular (Christensen y col., 2015).

2. Folículos primarios

El crecimiento folicular comienza a partir de la activación de los folículos primordiales. Estos folículos aumentan de tamaño, debido principalmente al incremento de volumen del ovocito (Arteaga-Martínez y García-Peláez, 2014). En los folículos primarios las células pregranulosas se transforman en células cúbicas, momento a partir del cual se les denomina células de la granulosa (Tresguerres, 2010; Levine, 2015), que al dividirse por mitosis forman un epitelio estratificado (Fig. 3).

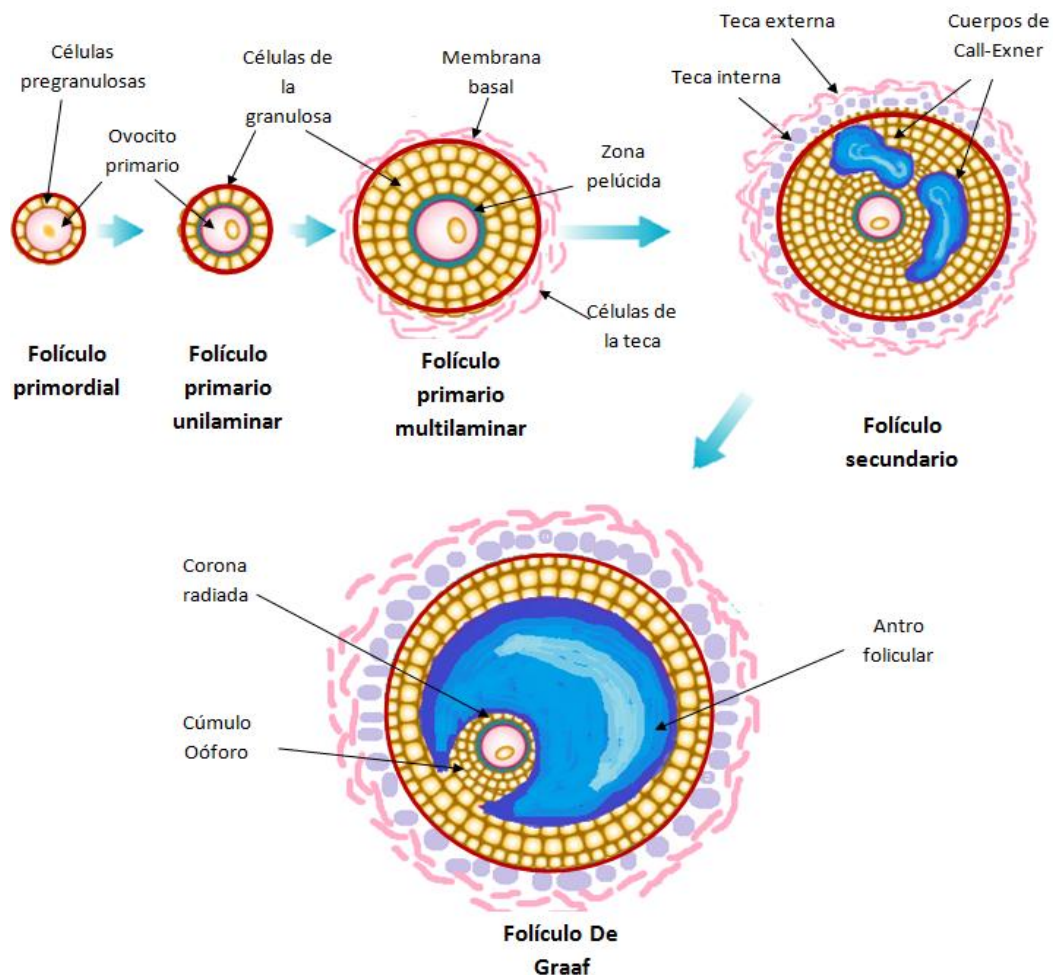


Figura 3. Estadios de maduración folicular (Tomado y modificado de Sepúlveda, 2012).

Entre el ovocito y las células de la granulosa se encuentra la zona pelúcida, una matriz extracelular que envuelve el ovocito, compuesta por glucoproteínas sintetizadas por el estrato granuloso. La zona pelúcida es invadida por microvellocidades del ovocito y filopodios de las células granulosas que entran en contacto entre sí y forman uniones de intersticio a través de las cuales se comunican durante todo el desarrollo folicular (Yeh y Adashi, 2001). La zona pelúcida juega un papel importante en la unión específica de los espermatozoides al ovocito e induce la reacción acrosómica. También protege a los ovocitos y a los embriones en crecimiento de la infección por agentes bacterianos o fúngicos antes de la implantación (Gupta, 2015).

Alrededor de la membrana basal comienzan a agruparse células del estroma cortical que dan lugar a las células de la teca (Tresguerres, 2010; Gartner y Hiatt, 2015).

3. Folículos secundarios

La capa granulosa alcanza un espesor de 6 a 12 estratos celulares, entre los cuales aparecen pequeños espacios llenos de líquido (Ross y Pawlina, 2012), conocidos como cuerpos de Call-Exner (Fig. 3), que son productos de secreción de dichas células (Yen, 2001). Este líquido producido por las células de la granulosa contiene, entre otros, progesterona, estradiol, inhibina y activina (las cuales regulan la liberación de FSH y LH), así como enzimas y proteoglicanos. La carga negativa de los proteoglicanos atrae moléculas de agua y, conforme aumenta la secreción de estos, incrementa el volumen del líquido intrafolicular (Gartner y Hiatt, 2015; Sepúlveda, 2014). La teca folicular se diferencia en:

- **Teca interna:** capa de células secretoras cúbicas, adyacente a la membrana basal. Contiene fibroblastos, haces de fibras de colágeno, fibras nerviosas y una red extensa de vasos sanguíneos, que aseguran el aporte sanguíneo necesario para el crecimiento folicular. Estas células poseen receptores a LH y son capaces de secretar hormonas esteroideas (Ross y Pawlina, 2012; Arteaga-Martínez y García-Peláez, 2014).
- **Teca externa:** rodea a la teca interna. Es una capa de células de tejido conectivo (Geneser, 2000; Sepúlveda, 2014) que contiene células musculares lisas y haces de

fibras de colágeno, por lo que se le denomina capa fibrosa (Ross y Pawlina, 2012; Albarrán y col., 2016).

4. Folículos preovulatorios, maduros o De Graaf

En estos folículos los cuerpos de Call-Exner aumentan de tamaño, confluyen entre sí y originan una cavidad central llena de líquido, conocida como antro folicular (Fig. 3) (Yen, 2001). El ovocito adopta una posición excéntrica (Geneser, 2000). Las células de la granulosa forman un montículo, el disco prolífero o cúmulo ovoforo, que se proyecta dentro del antro. Las células del cúmulo ovoforo que rodean inmediatamente al ovocito y permanecen con él durante el proceso de ovulación forman la denominada corona radiada (Ross y Pawlina, 2012).

La longitud de la fase folicular varía entre especies. En los roedores, la fase folicular dura alrededor de 2 días y múltiples folículos se desarrollan hasta la madurez (Smith, 2009); a diferencia de la mujer donde la fase folicular del ciclo menstrual dura aproximadamente de 12-14 días y sólo un folículo normalmente alcanza la madurez (Molina, 2008).

REGULACIÓN ENDÓCRINA DEL DESARROLLO FOLICULAR

Las funciones ováricas se encuentran reguladas por los tres componentes que forman el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. En el hipotálamo las neuronas que sintetizan GnRH, se localizan en el área preóptica, en el área hipotalámica anterior y en el hipotálamo medio basal (Smith, 2009). La GnRH se transporta a lo largo de los axones de las uniones neurovasculares de la eminencia media, y es liberada de manera pulsátil en la vasculatura portal hipotálamo-hipófisis (Levine, 2015). La GnRH actúa en la adenohipófisis sobre los gonadotropos donde estimula la liberación de LH y FSH. En el ovario, las gonadotropinas estimulan el crecimiento y la maduración folicular, la ovulación y la producción de hormonas esteroides y peptídicas (Fig. 4) (Smith, 2009).

Al inicio de la fase folicular, la concentración de estradiol y progesterona es baja, lo que refleja la falta de madurez de los folículos, y el patrón de la secreción basal de LH y FSH es pulsátil. A medida que las gonadotropinas comienzan a estimular el desarrollo folicular,

la secreción de estradiol por las células de la granulosa aumenta (Smith, 2009), lo que genera altas concentraciones de LH, responsables de la ovulación (Molina, 2008).

Los esteroides ejercen efectos de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo y la adenohipófisis donde inhiben la secreción de GnRH y de gonadotropinas, respectivamente. Cuando la concentración de estradiol alcanza un valor de umbral sostenido, lo que refleja la maduración folicular, el estradiol deja de tener un efecto inhibitorio (Hoffman y col., 2012), y ejerce una retroalimentación positiva dando inicio al pico preovulatorio de LH, que estimula la ovulación (Zelevnik y Plant, 2015).

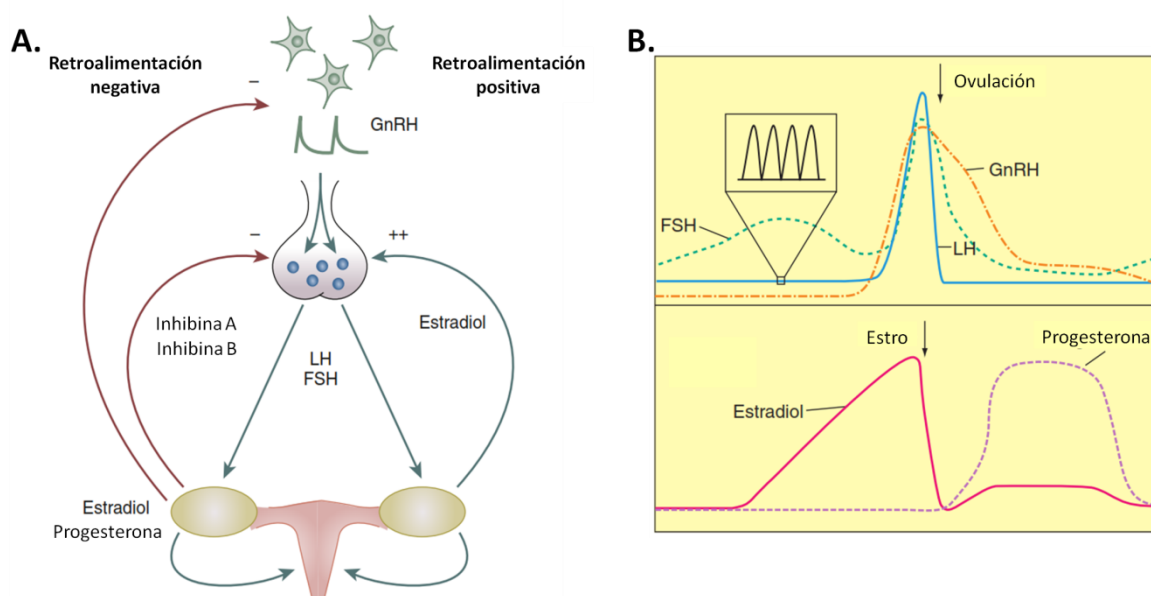


Figura 4. Regulación neuroendocrina del eje reproductivo femenino. (A) La secreción pulsátil de GnRH estimula la síntesis y liberación de LH y FSH. A su vez, estas estimulan el desarrollo folicular y la secreción de esteroides y péptidos gonadales, los cuales actúan sobre el hipotálamo y la hipófisis regulando de manera estimulante e inhibitoria la secreción de gonadotropinas. (B) El aumento y la posterior caída brusca de la concentración de estradiol es responsable de la generación del “pico” preovulatorio de gonadotropinas (Tomado y modificado de Smith, 2009; Hall, 2014).

En las células de la granulosa se sintetizan receptores para la FSH, que estimula el crecimiento y maduración de los folículos hasta el estadio preovulatorio (Fig. 2). Además, en las células de la granulosa, la FSH estimula la formación de receptores de LH, la

aromatización de andrógenos a estrógenos y la secreción de hormonas peptídicas como la inhibina, activina y folistatina, hormonas que participan en la regulación de la secreción de FSH (Tresguerres y Castillo, 2005; Gartner y Hiatt, 2015).

Las concentraciones elevadas de estradiol determinan el incremento en el número de receptores para la FSH. Esto permite que el folículo continúe desarrollándose en presencia de concentraciones de FSH cada vez menores. La disminución de la FSH ocurre por retroalimentación negativa de los estrógenos y por efecto de la inhibina (Tresguerres y Castillo, 2005).

En la adenohipófisis, la activina ejerce un efecto antagónico al de la inhibina al estimular la secreción de FSH. En las células de la granulosa, la activina estimula su proliferación, regula la expresión de los receptores de FSH, además de que modula la esteroidogénesis, tanto en células de la granulosa como en las de la teca, suprimiendo la síntesis de progesterona, andrógenos y estrógenos (Cataldo y col., 1994; Molina, 2008).

La folistatina antagoniza las acciones de la activina, actuando como una proteína de unión de alta afinidad (Nakamura y col., 1990). Inhibe la secreción de FSH, el desarrollo folicular en folículos preantrales (Guo y col., 1998) y estimula la esteroidogénesis ovárica (Findlay, 1993).

OVULACIÓN

Al proceso de liberación del ovocito secundario desde el folículo preovulatorio se le conoce como ovulación (Geneser, 2000). La reanudación de la meiosis I está dada por la receptividad sexual (Odor, 1955), las fases de luz natural y artificial (Mandl, 1963), y es controlada por el pico preovulatorio de LH. En el ciclo ovárico de la rata, el mecanismo de liberación de LH está bajo un control fotoperiódico de 24 horas, por lo que es considerado un ritmo circadiano (Levine, 2015).

Con el pico preovulatorio de la LH se reinicia la maduración del ovocito. Las primeras señales del reinicio de la meiosis I son la ruptura de la vesícula germinal, la desaparición de la membrana nuclear y la condensación de los cromosomas (Mandl, 1963). Durante la

Metafase I, los cromosomas se encuentran alineados en la placa ecuatorial. En anafase I, los cromosomas comienzan a separarse con la mitad del material cromosómico ($n=21$), perdido por la extrusión del primer cuerpo polar durante la telofase I (Odor, 1955; Ayalon y col., 1972). Se completa la primera división meiótica y se inicia la segunda hasta la metafase (Carlson, 2014). El ovocito secundario es ahora haploide, detenido en la meiosis II y su maduración meiótica sólo se completará con la fecundación (Fig. 2) (Levine, 2015).

Los eventos previos que culminan con la ovulación son:

- El líquido antral incrementa su presión osmótica debido a los proteoglucanos derivados de las células de la granulosa, lo que provoca el incremento del tamaño folicular (Yen, 2001), protruyendo a la pared del ovario y produciendo en ésta una zona de isquemia conocida como estigma (Arteaga-Martínez y García-Peláez, 2014).
- Las células de la teca comienzan a secretar colagenasa, prostaglandinas y activador del plasminógeno (Arteaga-Martínez y García-Peláez, 2014). La colagenasa es una enzima que degrada el colágeno del tejido conectivo que mantiene unidas las células foliculares, así como a la membrana basal (Yen, 2001). La ruptura del colágeno genera una reacción anti-inflamatoria y atrae leucocitos que secretan prostaglandinas dentro del folículo (Levine, 2015).
- Las prostaglandinas son esenciales para la expansión del complejo cúmulo-ovocito (formado por el cúmulo ovoforo, el ovocito secundario, y las células de la corona radiada). Esta expansión, también conocida como mucificación, provoca que el complejo cúmulo-ovocito se desprenda de la pared del folículo, quedando suspendido en el líquido folicular (Arteaga-Martínez y García-Peláez, 2014).
- El activador del plasminógeno, una proteasa sérica, estimula la conversión de plasminógeno en una enzima proteolítica activa, la plasmina, que contribuye a la digestión proteolítica de la pared folicular (Yen, 2001).
- La colagenasa en conjunto con la plasmina, provocan la ruptura del estigma. Posteriormente, las células del músculo liso de la teca externa se contraen por la acción de las prostaglandinas, expulsando al complejo cúmulo-ovocito (Silverthorn, 2013; Arteaga-Martínez y García-Peláez, 2014).

FASE LÚTEA

La formación del cuerpo lúteo ocurre como resultado del proceso de ovulación (Zelevnik y Plant, 2015). El pico preovulatorio de LH estimula la luteinización de las células de la granulosa y la teca, que reciben entonces el nombre de granuloso-luteínicas y tecoluteínicas (Smith, 2009; Zelevnik y Plant, 2015). Además, el cuerpo lúteo posee fibroblastos, células endoteliales e inmunitarias (Smith, 2009). Durante el proceso de luteinización, la membrana basal que rodea a la granulosa del folículo preovulatorio se degrada y permite el crecimiento de vasos sanguíneos dentro de la capa de células de la granulosa. Mediante la proliferación y la hipertrofia, estas células experimentan cambios estructurales y bioquímicos, y generan ahora progesterona como principal producto de secreción (Carlson, 2014). Además de la progesterona, el cuerpo lúteo secreta estrógenos en menor cantidad (Molina, 2008; Tresguerres, 2010).

Una vez ocurrida la ovulación, conforme se desarrolla el cuerpo lúteo, la frecuencia pulsátil de la LH disminuye debido a las concentraciones elevadas de progesterona, y probablemente de estradiol, que ejercen un efecto de retroalimentación negativa en el hipotálamo, lo que resulta en la disminución de los pulsos de GnRH (Molina, 2008; Smith, 2009). La progesterona además de suprimir la liberación de LH, aumenta el espesor del endometrio uterino; mientras que los estrógenos inhiben la secreción de FSH (Gartner y Hiatt, 2015).

En caso de no ocurrir la fertilización, el cuerpo lúteo se atrofia, proceso conocido como luteólisis. En primates superiores la consecuente disminución de la concentración de progesterona y estradiol conduce a la menstruación y causa además incremento de la concentración de gonadotropinas, con lo que se da inicio al crecimiento de nuevos folículos (Gartner y Hiatt, 2015). En la rata, la función lútea tiene una duración de 2-3 días (Smith, 2009), mientras que en la mujer dura de 12-14 días (Gartner y Hiatt, 2015).

CICLO ESTRAL

El ciclo estral se define como el tiempo que transcurre entre un período de celo y el comienzo del siguiente. Su duración varía dependiendo de la especie, siendo en las hembras de rata y ratón de 4-5 días (Mendiola y col., 1993). La progresión del ciclo estral

involucra la recurrencia de tipos celulares distintos, correlacionados con el estado de la mucosa vaginal, el útero y los ovarios; asociándose también con variaciones en las concentraciones séricas de los esteroides sexuales y de las gonadotropinas (Goldman y col., 2007). En el ciclo estral se presentan cuatro etapas (Fig. 5):

1. **Metaestro o diestro 1**, con una duración de 6 a 8 horas (Freeman, 2006). Durante esta etapa la FSH comienza a estimular el desarrollo folicular temprano (Mendiola y col., 1993; Smith, 2009) y el incremento en la secreción de estradiol (Levine, 2015). El cuerpo lúteo en el ovario se encarga de la secreción de elevadas concentraciones de progesterona (Mendiola y col., 1993). Este incremento de la progesterona es responsable del efecto de retroalimentación negativo que ejerce sobre las gonadotropinas (Smith, 2009). La mucosa vaginal entra en regresión, presenta algunas células epiteliales escamosas y es invadida por leucocitos (Fig. 5A) (Mendiola y col., 1993).

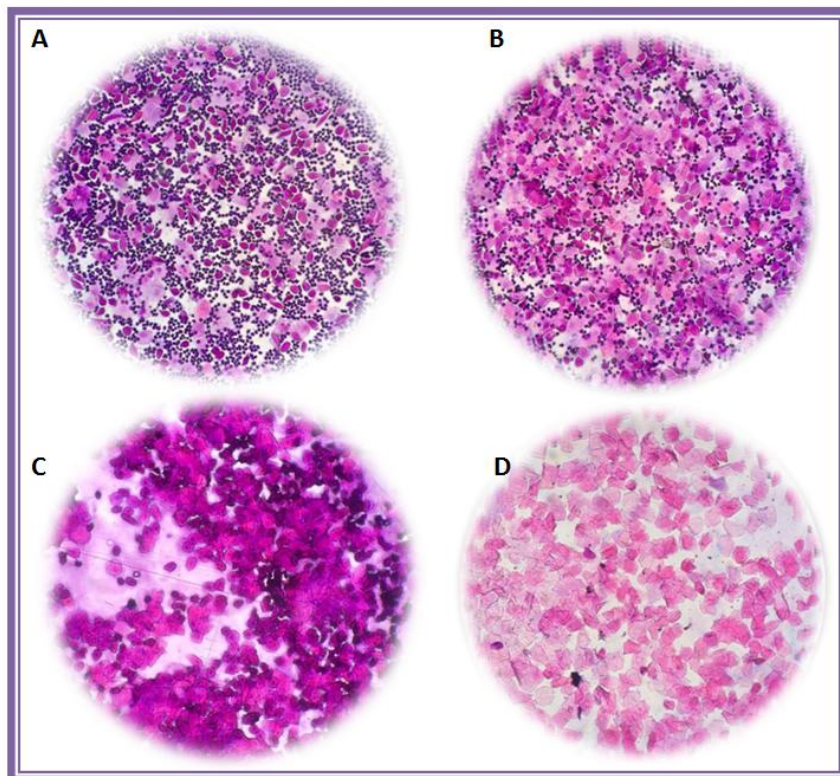


Figura 5. Citología de la mucosa vaginal de la rata durante el ciclo estral. (A) Diestro 1, (B) Diestro 2, (C) Proestro y (D) Estro.

2. **Diestro 2**, con una duración de 55 a 57 horas (Freeman, 2006). En caso de no haber ocurrido fecundación, durante esta etapa se produce la regresión del cuerpo lúteo y disminuyen las concentraciones de progesterona. Sin embargo, las concentraciones de estradiol siguen aumentando paulatinamente (Mendiola y col., 1993; Freeman, 2006). La mucosa vaginal es más delgada y los leucocitos que emigran a través de ella constituyen la mayoría de células del frotis vaginal; también se encuentran algunas células epiteliales nucleadas (Fig. 5B) (Mendiola y col., 1993).
3. **Proestro**, con una duración de 12 a 14 horas (Freeman, 2006). En esta etapa la secreción de estrógenos alcanza un valor de umbral sostenido a las 12:00 hrs (Mendiola y col., 1993), provocando un efecto de retroalimentación positiva sobre las gonadotropinas (Smith, 2009). Alrededor de las 13:00 hrs, el estradiol disminuye bruscamente, lo que para las 17:00 hrs del proestro resulta en el pico preovulatorio de LH y FSH (Freeman, 2006). La mucosa vaginal experimenta numerosas mitosis, apareciendo un gran número de células epiteliales nucleares y redondas. Ocasionalmente, pueden observarse también algunas células epiteliales escamosas queratinizadas (Fig. 5C) (Mendiola y col., 1993; Levine, 2015).
4. **Estro**, con una duración de 25 a 27 horas (Freeman, 2006). El pico preovulatorio de gonadotropinas que se produce en el día del proestro estimula una serie de eventos que culminan con la ovulación. Además, en la madrugada del estro se produce un segundo pico de FSH que estimula el reclutamiento de los folículos que ovularán para el siguiente ciclo (Freeman, 2006). Tras las numerosas mitosis que experimenta la mucosa vaginal, aparecen células epiteliales escamoso-queratinizadas, que se caracterizan por su forma irregular y ausencia de núcleo (Fig. 5D) (Mendiola y col., 1993; Levine, 2015).

ESTEROIDOGÉNESIS OVÁRICA

Las principales hormonas sexuales femeninas producidas por el ovario son el estradiol y la progesterona, aunque también se producen pequeñas cantidades de estrona, androstendiona, testosterona y 17- α -hidroxiprogesterona (Fig. 6) (Tresguerres, 2010).

La síntesis de esteroides implica una serie de modificaciones secuenciales en la molécula del colesterol (Strauss y Williams, 2014). El colesterol se obtiene de tres fuentes

principales: el que se sintetiza dentro de las células de la granulosa a partir del acetato, el que se libera de los ésteres del colesterol almacenados en las gotas lipídicas y el que es incorporado desde las lipoproteínas de alta o baja densidad (Tresguerres, 1999; Miller, 2008).

La biosíntesis de esteroides se produce con la participación conjunta de dos tipos celulares. En los folículos ováricos las células de la granulosa expresan receptores de FSH, en tanto que las células de la teca interna poseen receptores de LH (Carlson, 2014). Los receptores a ambas gonadotropinas son transmembranales acoplados a proteínas G. La unión de la hormona a su receptor activa a la enzima adenilato ciclasa que permite la conversión de trifosfato de adenosina (ATP) intracelular a AMPc. Este segundo mensajero activa la proteína cinasa A (PKA) e incrementa la actividad de enzimas esteroidogénicas en las células de la granulosa y la teca (Yen, 2001).

En las células de la teca, la LH estimula la producción de progesterona y andrógenos (Carlson, 2014). Esto se lleva a cabo gracias a la activación de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR), la cual regula la internalización de colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la interna, paso limitante en la síntesis de hormonas esteroides. La enzima de escisión de la cadena lateral de colesterol el citocromo P450 (P450_{scc}), estimula la conversión de colesterol a pregnenolona en las mitocondrias (Fig. 6) (Miller y Styne, 2001).

La pregnenolona puede seguir dos vías, la Δ -4, donde la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD) estimula la conversión de pregnenolona en progesterona; o bien, la Δ -5, en donde el citocromo P450_{c17} (17α -hidroxilasa y $17,20$ -liasa) cataliza la conversión de pregnenolona a 17α -hidroxipregnenolona. En el cuerpo lúteo ocurre preferentemente la ruta Δ -4, en tanto que la Δ -5 se lleva a cabo principalmente en las células tecales (Miller y Styne, 2001; Tresguerres y Castillo, 2005).

Los esteroides 17α -hidroxilados pueden ser convertidos en dehidroepiandrosterona (DHEA), y en androstenediona, por acción de la enzima $17,20$ -liasa. Como último paso, dentro de la célula de la teca, la enzima 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD) estimula la conversión de androstenediona a testosterona (Miller y Styne, 2001).

Estos andrógenos atraviesan la lámina basal e ingresan a las células de la granulosa donde la FSH, al unirse a su receptor, estimula la actividad de las aromatasas que catalizan la conversión de androstenediona a estrona y de testosterona a estradiol (Fig. 6)(Miller y Styne, 2001; Carlson, 2014; Strauss y Williams, 2014).

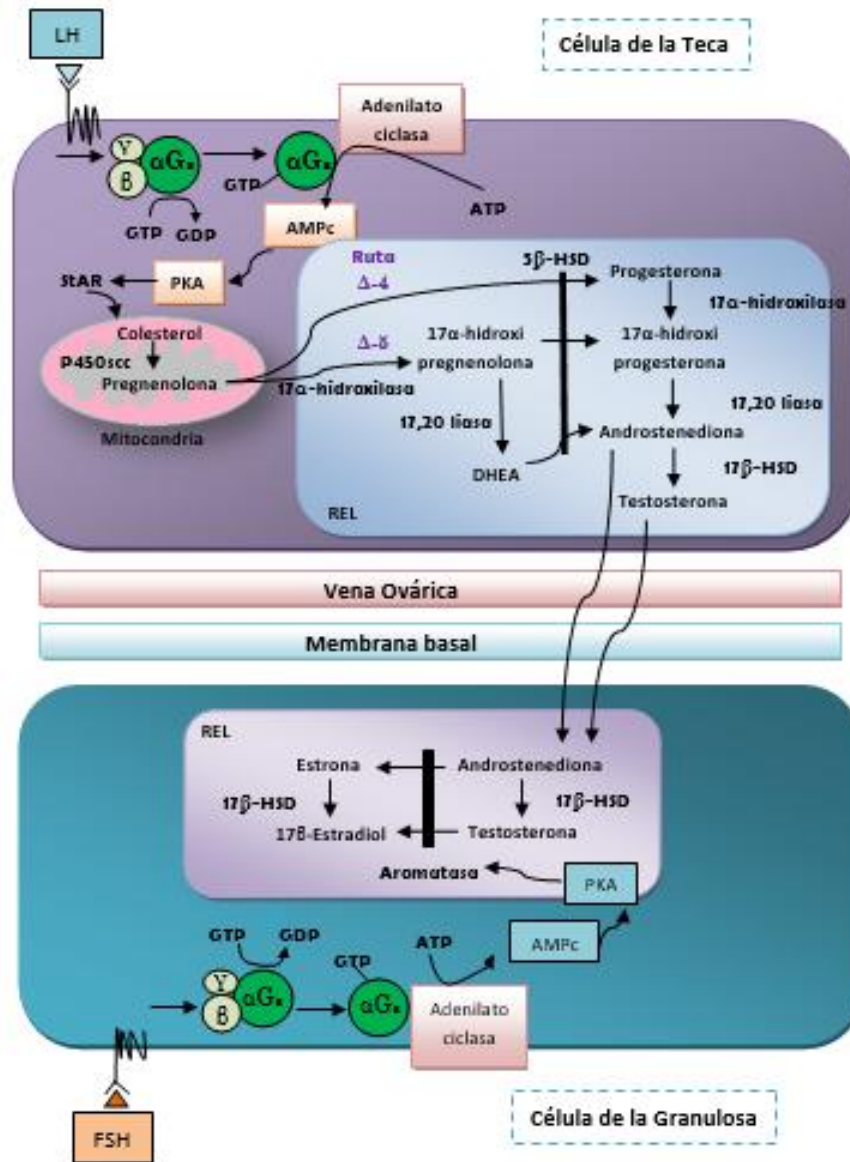


Figura 6. Biosíntesis y regulación de las hormonas esteroides ováricas. LH, hormona luteinizante; FSH, hormona estimulante del folículo; GTP, trifosfato de guanosina; GDP, difosfato de guanosina; ATP, trifosfato de adenosina; AMPc, monofosfato de adenosina cíclico; PKA, proteína cinasa A; REL, retículo endoplásmico liso; StAR; proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda; 3 β -HSD, 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; DHEA, dehidroepiandrosterona; 17 β -HSD, 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; P450_{scc}, citocromo P450 de escisión de la cadena lateral de colesterol (Tomado y modificado de Gore-Langton y Armstrong, 1994; Strauss y Williams, 2014).

INERVACIÓN DEL OVARIO

El ovario posee inervación extrínseca e intrínseca que participa en la regulación de sus funciones. La inervación extrínseca ingresa al ovario a través del hilio, y está constituida por fibras de naturaleza simpática, parasimpática y sensorial (Fig. 7) (Burden, 1978; Dissen y Ojeda, 1999). Estas fibras ingresan al ovario por tres paquetes nerviosos:

1. El Nervio Ovárico Superior (NOS) aporta al ovario fibras de naturaleza simpática, que se originan en los segmentos torácicos (T11) a los lumbares (L4) de la médula espinal, y hacen sinapsis en el ganglio celiaco-mesentérico superior (GCMS) (Dissen y Ojeda, 1999). Las fibras del NOS corren a lo largo del ligamento suspensorio (Fig. 7) (Burden, 1978; Hsueh y col., 1984; Ojeda y Lara, 1989) e inerva al ovario, al oviducto y al útero (Dissen y Ojeda, 1999). En el ovario, sus fibras se encuentran asociadas a los vasos sanguíneos, células de la glándula intersticial y de la teca interna. El NOS libera a los ovarios neurotransmisores como la noradrenalina (NA), el neuropéptido Y (NPY) y el VIP (Lawrence y Burden, 1980; Dissen y Ojeda, 1999).

2. El Nervio del Plexo Ovárico (NPO) es un nervio mixto que contiene fibras simpáticas y sensoriales que viajan a lo largo de la arteria ovárica (Fig. 7), e inervan principalmente la vasculatura ovárica. Las fibras sensoriales contienen sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen que codifica a la calcitonina (CGRP) (Dees y col., 1995; Klein y Burden, 1988), en tanto que las fibras simpáticas transportan NA y NPY (Lawrence y Burden, 1980; McDonald y col., 1987). La inervación sensorial del ovario deriva del ganglio nodoso y del ganglio dorsal, que se localizan en el segmento torácico caudal (T9-T11) y el segmento lumbar craneal (L2-L4) de la médula espinal (Burden, 1978).

3. El Nervio Vago (NV), contiene en su mayoría fibras de naturaleza parasimpática, además de fibras sensoriales y motoras (Fig. 7). Este paquete neural libera al ovario acetilcolina, SP, y en menor cantidad VIP y somatostatina (Ojeda y col., 1983; Dees y col. 1986; Klein y Burden, 1988). Los somas de las neuronas del NV se localizan en cuatro núcleos del bulbo raquídeo: el núcleo dorsal motor del vago, el núcleo del tracto solitario, el núcleo ambiguo y el núcleo espinal del nervio trigémino (Netter, 2005). Los somas de las neuronas que inervan al ovario vía el NV, se localizan en el ganglio nodoso y en las

células ganglionares de la raíz dorsal de los segmentos T10 a L2 de la médula espinal (Burden y col., 1983).

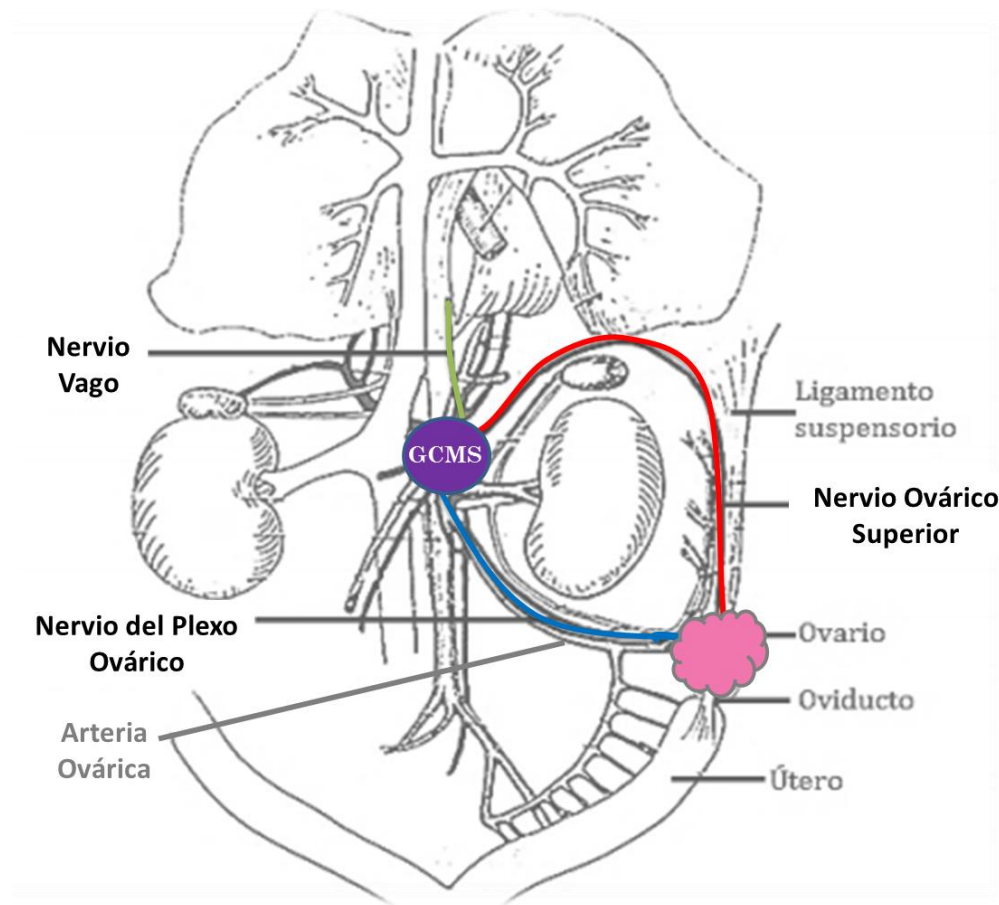


Figura 7. Inervación extrínseca del ovario, donde se observa la trayectoria que sigue el Nervio Ovárico Superior y el Nervio del Plexo Ovárico desde su origen en el ganglio celiaco mesentérico superior (GCMS) (Tomado de Lawrence y Burden, 1980).

En ovarios de diferentes especies de mamíferos también se ha mostrado la presencia de neuronas intrínsecas (D'Albora y col., 2000). La mayoría de estas neuronas son de naturaleza catecolaminérgica y expresan el receptor de baja afinidad p75^{NTR} para el factor de crecimiento neural (NGF) (Strauss y Williams, 2014).

En la rata, la presencia de neuronas intrínsecas depende de la cepa. En las ratas Wistar, a diferencia de la Sprague-Dawley, se han observado neuronas intrínsecas que son de naturaleza catecolaminérgica, distribuidas en el hilio, la médula y la corteza, las cuales

pueden estar modulando la esteroidogénesis ovárica, ya que la NA es un potente estimulador de la secreción de andrógenos y progesterona. También se han encontrado algunas neuronas inmunoreactivas a NPY, las cuales se encuentran distribuidas principalmente en la médula ovárica (D'Albora y col., 2002).

ASIMETRÍAS OVÁRICAS

Es comúnmente aceptado que los ovarios son órganos fisiológicamente similares. Sin embargo, se ha mostrado que los órganos endócrinos pareados no son idénticos en su función y control, es decir, son asimétricos (Domínguez y Cruz-Morales, 2011). Hay evidencias de asimetrías morfológicas, bioquímicas, fisiológicas y patológicas a diferentes niveles del sistema neuroendócrino (a nivel límbico, hipotalámico, glándulas endócrinas, periféricas y su inervación). Las asimetrías varían entre especies, sexo y edad del individuo (Gerendai y Halász, 1997).

El tracto reproductor de las aves se caracteriza por un desarrollo asimétrico donde sólo el ovario izquierdo se desarrolla y es funcional, la gonada derecha se reduce a una capa de tejido localizada por debajo de la vena cava inferior (Gerendai y Halász, 1997; Domínguez y col., 2003). En mamíferos poli-ovulantes se han observado diferencias en la capacidad ovulatoria por parte del ovario izquierdo y del derecho. En la rata cíclica, se ha observado que el ovario izquierdo libera 6 ovocitos, en tanto que el derecho libera 8 (Domínguez y col., 2003). Las gónadas de murciélagos presentan asimetrías funcionales y anatómicas, que son mucho más frecuentes y marcadas que las que se observan en cualquier otro mamífero, por ejemplo, la ovulación ocurre predominantemente en el ovario derecho (Jaroli y Lall, 1987).

La extirpación de un ovario (hemiovariectomía) es frecuentemente usada para analizar la existencia de asimetrías funcionales entre los ovarios. Este procedimiento realizado en ratas de 20 días de edad, resulta en un porcentaje más alto de ovulación cuando el ovario izquierdo permanece *in situ*. En ratas adultas, es el ovario derecho *in situ*, el que presenta mayor capacidad ovulatoria. Estos resultados sugieren que los ovarios desarrollan una ovulación compensadora en función del ovario *in situ* y que varía con la edad del animal (Chávez y col., 1987; Apolonio y col., 2000).

En la rata adulta en el día del estro, la hemiovarectomía izquierda (ovario derecho *in situ*), no modifica la concentración de progesterona pero incrementa la de testosterona y disminuye la de estradiol. Mientras que la hemiovarectomía derecha (ovario izquierdo *in situ*) no modifica la concentración de las hormonas esteroides (Barco y col., 2003), contrario a lo que sucede en los días del diestro 1 y proestro, donde la concentración de estradiol incrementó. Estos resultados muestran que la capacidad de secreción de los ovarios varía en función a la etapa del ciclo estral y del ovario (Cruz y col., 2006; Flores y col., 2006).

Las asimetrías en las funciones del ovario se han explicado por diferencias en la innervación ovárica (Domínguez y col., 1988). Se ha descrito la existencia de asimetrías en el número de fibras que se proyectan desde el ganglio celiaco-mesentérico superior hacia el ovario a través del NOS y el NPO, con un mayor número de fibras que ingresan al ovario derecho que al izquierdo (Klein y Burden, 1988). Por otro lado, se mostró que la innervación supra-espinal de los ovarios y de las adrenales tiene predominio del lado izquierdo (Tóth y col., 2007; Gerendai y col., 2009).

PÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO

El VIP es un neuropéptido de 28 aminoácidos. Fue aislado y purificado del duodeno porcino y recibe este nombre por sus efectos vasodilatadores (Said y Mutt, 1972). El VIP está presente en las neuronas del cerebro, específicamente en la corteza cerebral, en el hipocampo, núcleo amigdalóideo, y en cantidades menores en el hipotálamo (Giachetti y col., 1977).

El VIP está involucrado en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, tales como los ritmos circadianos, secreciones exocrinas, metabolismo, liberación de hormonas, relajación muscular, inmunomodulación, supresión de la inflamación, desordenes psiquiátricos, proliferación celular en cáncer, entre otros (Piper y col., 1970; Said, 1986; Couvineau y Laburthe, 2011). Algunos de estos efectos se han descrito en el tracto digestivo, sistema cardiovascular, vías respiratorias, sistema reproductor, glándulas endocrinas, sistema inmunológico y el cerebro (Said, 1986).

El VIP pertenece a la familia de los péptidos de la secretina (Fig. 8), que incluye al polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP), la secretina, el factor liberador de la hormona del crecimiento (GRF), helodermina, glucagón, polipéptido inhibidor de la gastrina (GIP) y el péptido similar al glucagón 1 y 2 (GLP-1 y GLP-2) (Couvineau y Laburthe, 2012). Estos péptidos comparten algunas propiedades comunes: son péptidos de 27 a 44 residuos de aminoácidos, que son sintetizados y liberados por células endocrinas, neuronas o células inmunes. Contienen una estructura en espiral N-terminal con una estructura N-Cap (tapa), y largas estructuras α -helicoidales en la región C-terminal (Neumann y col., 2008).

Péptidos	Secuencia de aminoácidos	Longitud del péptido
VIP	HSDAVEFDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-----	28
PACAP27	HSDGIEFDYSRYRKQMAVKKYLAAVL-----	27
PACAP38	HSDGIEFDYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKKNK-----	38
Helodermin	HSDAIEFEEYSKLLAKLALQKYLASILGSRTSPPP-----	35
PHM	HADGVEFSDFSKLLGQLSARKYLESIM-----	27
Secretin	HSDGTEFSELSRLREGARLQRLLOGLV-----	27
GRF	YADAEFNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRRQGESNQERGARARL	44
Glucagon	HSQGTEFSDYSKYLDSTRRAQDFVQWLMNT-----	29
GLP-1	HAEGTEFSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-----	30
GLP-2	HADGSEFSDENMTILDNLAAARDFINWLIQTKITD-----	33
GIP	YAEGTEFSDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGGKNDWKHNITQ--	42

Figura 8. Comparación de la secuencia aminoacídica de los péptidos de la familia de la secretina. La secuencia idéntica es sombreada en negro y las homologías en gris (Tomado de Couvineau y Laburthe, 2012).

EL PÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO Y SU PARTICIPACIÓN EN LA REGULACIÓN DE LAS FUNCIONES DEL OVARIO

Las gonadotropinas son las principales hormonas reguladoras de las funciones ováricas. Además de estas hormonas se ha mostrado el papel modulador que ejercen varios factores esteroideos y no esteroideos, incluyendo neuropéptidos, tales como el VIP (Hsueh y col., 1984).

Las fibras VIPérgicas ingresan al ovario a través de dos paquetes nerviosos, el NOS (Dees y col., 1986) y en menor proporción a través del NV (Said y Rosenberg, 1976). En el ovario la presencia del ARNm que codifica para la síntesis de VIP ha llevado a sugerir su

síntesis local (Gozes y Tsafiriri, 1986), posiblemente por las células de la granulosa del folículo preovulatorio (Hulshof y col., 1994).

En diferentes especies de mamíferos se ha descrito que las fibras VIPérgicas del ovario se encuentran en el tejido intersticial, alrededor de vasos sanguíneos y folículos primordiales, y en asociación con la teca de folículos en desarrollo (Ahmed y col., 1986; Dees y col., 1986; Schulte y col., 1992; Hulshof y col., 1994).

El VIP tiene un efecto directo sobre el desarrollo folicular, dado que contribuye a la supervivencia folicular, al inhibir el proceso de apoptosis de las células de la granulosa y la atresia folicular (Flaws y col., 1995). Estimula la formación de receptores a FSH en ovarios de ratas de 2 días de edad (Mayerhofer y col., 1997), e induce el inicio del crecimiento folicular (Chen y col., 2012).

El VIP estimula algunos eventos previos que culminan con la ovulación como: la maduración meiótica del ovocito (Törnell y col., 1988; Apa y col., 1997), la actividad del activador del plasminógeno tisular en células de la granulosa y del complejo cúmulo-ovocito (Liu y col., 1987) y la liberación del ovocito (Schmidt y col., 1990).

El proceso de esteroidogénesis es regulado por el VIP. En la coneja, la infusión intravenosa del péptido incrementa la secreción de progesterona (Fredericks y col., 1983). En cultivo de ovarios completos o de células de la granulosa de rata, el VIP incrementa las concentraciones de progesterona, andrógenos y estradiol (Davoren y Hsueh, 1985; Ahmed y col., 1986; Parra y col., 2007). En cultivo de células tecales de folículos de gallina, el VIP estimula la secreción de andrógenos (Tilly y Johnson, 1989).

Estudios en condiciones *in vitro* han mostrado que el VIP en células de la granulosa modula la expresión génica y la actividad de ciertas enzimas esteroidogénicas:

- Incrementa el ARNm, la proteína y la actividad de la StAR. Estos efectos del VIP son mediados por la PKA y la proteína cinasa C (PKC) (Kowalewski y col., 2010).
- Aumenta la actividad del complejo enzimático P450_{scc} (Trzeciak y col., 1986).
- Incrementa la actividad de la enzima 3β-HSD (Davoren y Hsueh, 1985; Kowalewski y col., 2010). Además, disminuye la actividad de la 20α-

hidroxiesteroide deshidrogenasa (20α -HSD), enzima que reduce los compuestos de $21C$ a sus correspondientes derivados 20 -hidroxi, por lo que transforma la progesterona en 20α -hidroxiprogesterona (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Greenwald y Roy, 1994). Ambos eventos en conjunto conllevan a una mayor producción de progesterona (Davoren y Hsueh, 1985).

- Aumenta el ARNm que codifica para la 17α -hidroxilasa (Johnson y col., 1994).
- Estimula la actividad de las aromatasas (George y Ojeda, 1987).

La progesterona, testosterona y estradiol son considerados como índice de la actividad de las enzimas clave que participan en la síntesis de estas hormonas. La inyección unilateral de VIP en la bursa del ovario izquierdo o derecho, modifica la secreción de hormonas esteroides, y estos cambios dependen del ambiente neuroendócrino del animal y del ovario en estudio. Lo que sugiere que en la rata adulta cíclica cada ovario tiene diferente sensibilidad al estímulo VIPérgico. Por lo que los autores plantean que la respuesta diferencial de los ovarios al VIP puede estar dada por la modulación que ejercen las señales nerviosas provenientes del NOS, y posiblemente también por una diferencia en la expresión de los receptores VIPérgicos (Rosas, 2015; Rosas y col., 2015).

RECEPTORES VIPÉRGICOS

Los mecanismos intracelulares que median las acciones de VIP implican diferentes vías de transducción activadas por sus dos receptores, el VPAC-1 y el VPAC-2 (Dickson y Finlayson, 2009). Ambos receptores pertenecen a la familia de clase II o clase B de GPCRs (Laburthe y Couvineau, 2002; Laburthe y col., 2007).

En la Fig. 9 se muestra la estructura conformacional de este tipo de receptores que se caracteriza por presentar (Laburthe y Couvineau, 2002; Laburthe y col., 2007; Couvineau y Laburthe, 2012):

- 1) Siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G heterodiméricas constituidas por las subunidades α , β y γ .
- 2) Tres bucles intracelulares, un dominio C-terminal intracelular, tres bucles extracelulares y un dominio N-terminal extracelular grande (120-160 residuos), siendo

este último el que garantiza la especificidad de los receptores de clase II ya que disminuye su homología estructural respecto al resto de los GPCRs.

3) Seis residuos de cisteína conservados estrictamente en el dominio N-terminal, esenciales para la unión del VIP; así como sitios de N-glicosilación en este dominio.

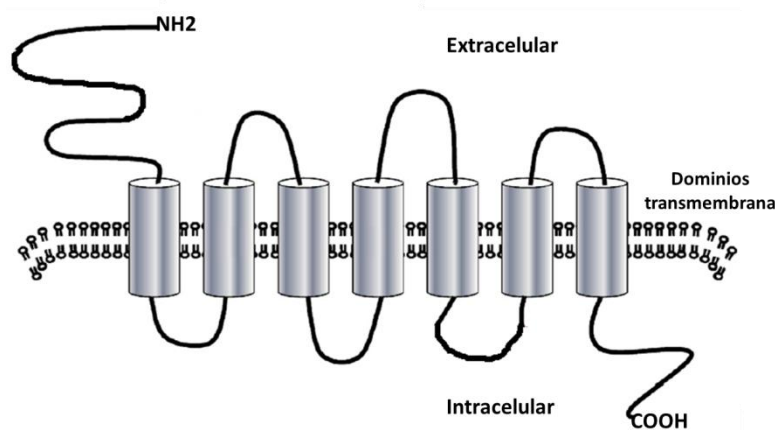


Figura 9. Estructura conformacional de los GPCRs de clase II (Tomado y modificado de Dickson y Finlayson, 2009).

Existe una amplia distribución de los receptores VIPérgicos en una variedad de tejidos y tipos celulares. En el cerebro de la rata, el VPAC-1 y VPAC-2 se encuentran expresados en la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala, el tálamo y el hipotálamo (Min-Joo y col., 2005; Chul Lee y col., 2010). El VPAC-1 se encuentra en la mucosa del tracto digestivo y en el epitelio de diversos tejidos; en vasos sanguíneos de humano (Reubi, 2000) y roedores (Fahrenkrug y col., 2000); y está ampliamente distribuido en hígado, pulmón e intestinos (Delgado y col., 1996). En el humano y otras especies, el VPAC-2 se encuentra predominantemente en el músculo liso de los vasos sanguíneos y del tracto gastrointestinal (desde el esófago hasta el recto); en el sistema reproductor femenino se ha observado en las trompas de Falopio, el oviducto y el útero; y en machos en el epidídimo y conducto deferente (Harmar y col., 2004; Reubi, 2000; Usdin y col., 1994).

En el ovario de la rata, el VPAC-1 se ha observado en la pared de los vasos sanguíneos, en el estroma cercano a los folículos, en el hilio ovárico y en células teco-intersticiales. El VPAC-2 se localiza en el oviducto, células teco-intersticiales y células de la granulosa (Vaccari y col., 2006). En folículos preantrales de humano, ambos receptores se expresan

en citoplasma y núcleo de ovocitos, en células de la granulosa y en el estroma (Gabbay-Benziv y col., 2012).

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL VIP

Los GPCRs se pueden acoplar a proteínas $G\alpha_q$ (activan fosfolipasas) y $G\alpha_i$ (inhiben la activación de la enzima adenilato ciclasa) que estimulan las vías del fosfatidil inositol/calcio/PKC, mediadas por la fosfolipasa C (PLC) (Langer y col., 2001). Sin embargo, el VIP se acopla preferentemente a proteínas $G\alpha_s$ (estimuladoras de la adenilato ciclasa) (Fig. 10) (Johnston y Siderovski, 2007; Kobilka, 2007; Oldham y col., 2007).

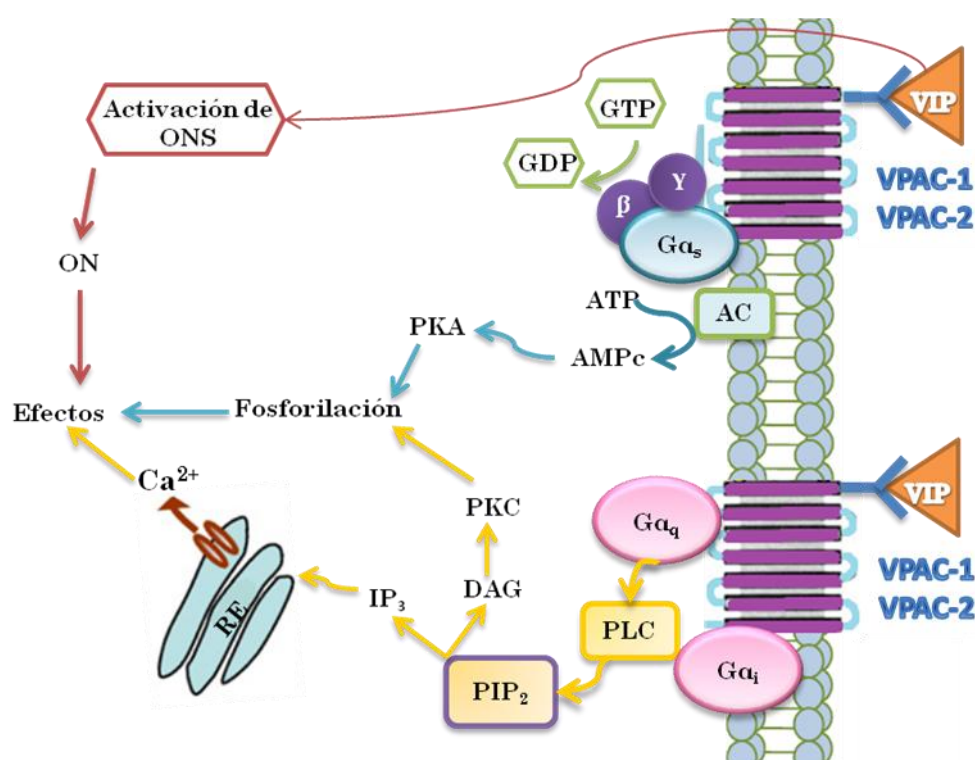


Figura 10. Mecanismos de acción del VIP mediado por sus receptores VPAC-1 y VPAC-2. El VIP se une a receptores acoplados a proteínas $G\alpha_s$ que activan la vía AMPc/PKA, y a receptores acoplados a proteínas $G\alpha_i$ y $G\alpha_q$ que activan las vías PKC e IP₃ a través de la PLC. AC, adenilato ciclasa; ONS, óxido nítrico sintetasa; PLC, fosfolipasa C; PLD, fosfolipasa D; DAG, diacilglicerol; PIP₂, fosfatidil inositol difosfato; IP₃, inositol trifosfato; RE, retículo endoplasmático; ON, óxido nítrico; Ca²⁺, calcio; GTP, guanosin trifosfato; GDP, guanosin difosfato; ATP, trifosfato de adenosin; AMPc, monofosfato de adenosina cíclico; PKA, proteína cinasa A; PKC, proteína cinasa C; VIP, péptido intestinal vasoactivo (Modificado de Groneberg y col., 2006; Dickson y Finlayson, 2009).

La vía de señalización de VIP se inicia con la unión a sus receptores acoplados a proteínas G α s. En su estado inactivo, la proteína G α forma un trímero con la subunidad $\beta\gamma$, donde la subunidad α está unida directamente a GDP (G α -GDP-G $\beta\gamma$). Cuando se produce la unión del ligando al receptor, la subunidad G α se transforma de su forma GDP a su forma GTP. La presencia del grupo fosfato del GTP, promueve cambios conformacionales que hacen que la subunidad G α se separe de la subunidad $\beta\gamma$ (Fig. 10) (Johnston y Siderovski, 2007; Kobilka, 2007; Oldham y col., 2007). A través de este proceso, el VIP estimula la activación de la adenilato ciclasa, la cual cataliza la conversión de ATP en AMPc, y ésta a su vez activa la vía PKA, que fosforila proteínas diana y modifica su actividad (Fig. 10) (Harman y col., 1998; Dickson y Finlayson, 2009).

Los receptores VIPérgicos, además de la activación del AMPc, pueden estimular la producción de calcio intracelular (Ca²⁺) (Langer y col., 2001), óxido nítrico (ON) (Grider y col., 1992), modulación la fosfolipasa D (PLD) (McCulloch y col., 2000), canales de calcio (Tompkins y col., 2008), la vía de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Moroo y col., 1988), monóxido de carbono, entre otras (Watkins y col., 2004).

En el ovario de la rata, el VIP estimula la esteroidogénesis en células de la granulosa a través de la activación de la PKA y la PKC, que incrementan la expresión de la StAR. Por medio de esta vía, el VIP estimula la fosforilación de CREB y cJUN, dos factores importantes en la transcripción de la StAR (Kowalewski y col., 2010). El Ca²⁺ se ha considerado como un segundo mensajero independiente de AMPc. Sin embargo, se ha descrito que un aumento en la concentración intracelular de Ca²⁺ puede estar mediado por intercambio de AMPc (Fung y col., 2011). En células de ovario de hámster, el VIP regula los niveles de Ca²⁺ intracelular (Langer y col., 2001), este efecto esta dado a través de la vía dependiente de IP₃/Ca²⁺ por medio de proteínas G α_q y G α_i . (Langer y col., 2002).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las funciones del ovario además de ser reguladas por las gonadotropinas y hormonas esteroides, son moduladas por las señales nerviosas que llegan al ovario vía los nervios sensoriales, simpáticos y parasimpáticos. El VIP es un neurotransmisor que ingresa al ovario predominantemente por el NOS. Este péptido regula de manera estimulante el desarrollo folicular, la ovulación y la esteroidogénesis. Dichos efectos son mediados a través de dos receptores, el VPAC-1 y el VPAC-2.

Por evidencias experimentales en diferentes especies, se ha descrito que los ovarios presentan una capacidad de respuesta asimétrica que ha sido atribuida a la inervación que recibe cada gónada. Recientemente se ha mostrado que los ovarios tienen diferente capacidad de secreción de progesterona, testosterona y estradiol en respuesta al estímulo VIPérgico que varía en función del estado neuroendocrino del animal. Por ello, en el presente estudio se analizó si la respuesta asimétrica de los ovarios al estímulo VIPérgico está dada por la expresión y distribución diferencial de los receptores del péptido en cada ovario, y si ésta varía en función del día del ciclo estral.

HIPÓTESIS

Dado que en los ovarios la capacidad de secreción de progesterona, testosterona y estradiol es asimétrica y varía a lo largo del ciclo estral, y que la estimulación VIPérgica modifica la secreción de hormonas esteroides en función del ovario estimulado y del estado neuroendocrino del animal, entonces es posible que la respuesta diferencial de los ovarios al VIP esté vinculada con una expresión diferente de sus receptores, que dependerá del ovario en estudio y del día del ciclo estral.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión y distribución de los receptores VIPérgicos en los ovarios de la rata adulta cíclica.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar en la rata adulta la distribución de los receptores VPAC-1 y VPAC-2 en las distintas estructuras anatómicas de los ovarios en cada etapa del ciclo estral.
- Analizar si existe asimetría en la distribución y el contenido de los receptores VPAC1 y VPAC2 entre el ovario izquierdo y derecho de la rata adulta cíclica, en los días del diestro 1, diestro 2, proestro y estro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembra adultas de 60 días de edad de la cepa CII-ZV, mantenidas en condiciones controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e iluminación, con 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad (luces encendidas de las 05:00 a las 19:00 horas). Durante el desarrollo de la parte experimental, se siguieron las normas establecidas por la Ley Mexicana de Protección Animal para el Uso de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio).

DISEÑO EXPERIMENTAL

El ciclo estral de las ratas fue monitoreado diariamente por el análisis citológico de la vagina, de las cuales se utilizaron aquellas que presentaron al menos dos ciclos estrales consecutivos de cuatro días. Las ratas fueron divididas al azar en cuatro grupos experimentales, cada uno de los cuales estuvo conformado por cuatro animales en diestro 1, diestro 2, proestro y estro. Todos los animales fueron inyectados con una dosis letal de pentobarbital sódico y posteriormente perfundidos (Fig. 11).

Para la técnica de inmunohistoquímica, se utilizaron anticuerpos primarios policlonales para el receptor VPAC-1, hecho en conejo; y para el receptor VPAC-2, hecho en cabra (sc-30019 y sc15960, respectivamente; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). Se utilizaron anticuerpos secundarios biotinilados contra conejo y contra cabra (PK-6101 y PK-6105, respectivamente; Vectastain elite kit del complejo avidina-biotina (ABC-peroxidasa, Vector, Inc., Burlingame, CA). La amplificación del marcaje se realizó por el método ABC-peroxidasa. La marca fue revelada con 3,3'-diaminobencidina (DAB; SK-4100, Vector, Inc., Burlingame, CA) y la contratinción se realizó con hematoxilina QS (H-3404, Vector, Inc., Burlingame, CA).

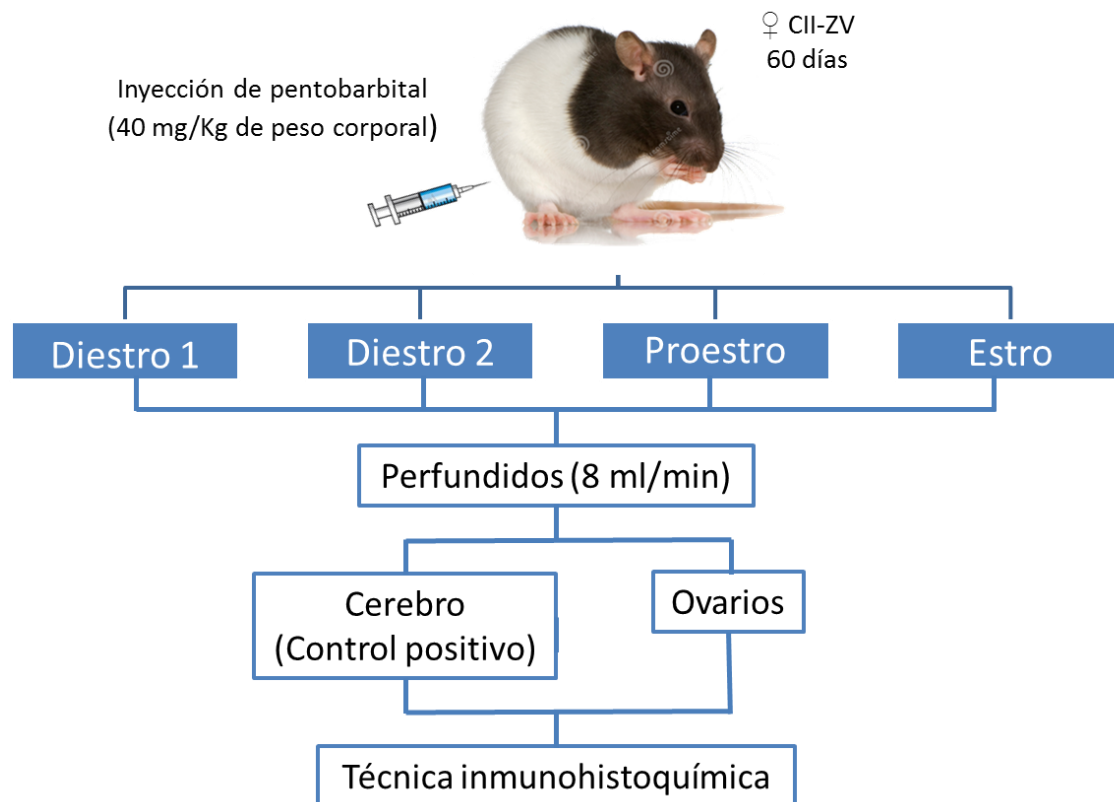


Figura 11. Esquema que muestra el diseño experimental utilizado para evaluar la expresión y distribución de los receptores VIPérgicos en los ovarios de ratas cíclicas.

PERFUSIÓN

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (40 mg/Kg de peso corporal) y se les realizó perfusión intracardíaca con una bomba peristáltica (PUMP MED FLOW 4.0-85.0 mL/min, Thomas Scientific), a través de la cual se pasaron 150 mL de solución salina (solución para limpiar los órganos), seguido de 150 mL de paraformaldehído al 4% (solución fijadora), a una velocidad de 8 mL/min. Al finalizar la perfusión con la solución fijadora, se extrajo el cerebro, el cual fungió como control positivo, y los ovarios. Ambos tejidos fueron mantenidos en paraformaldehído por 24 hrs. Posteriormente, los cerebros fueron colocados en buffer de fosfatos (PBS) por no más de 15 días para su posterior deshidratación; mientras que, los ovarios fueron enjuagados con PBS, y se mantuvieron en alcohol al 70% hasta el momento de la deshidratación (Anexo 1).

DESHIDRATACIÓN E INCLUSIÓN

Los ovarios y cerebros de cada grupo experimental fueron deshidratados con alcohol a diferentes grados, y transferidos a xilol para facilitar la penetración del paraplast al tejido. Los ovarios y cerebros fueron incluidos en paraplast (Surgipath, Paraplast, REF 39601006, Tissuw Infiltration/Embedding Medium For Laboratory Use) (Anexo 1). Posteriormente, se realizaron cortes seriados a 8 μm de grosor de la parte media de cada ovario, y se colectaron cuatro cortes por laminilla, en un total de cuatro laminillas por ovario. Los cerebros fueron incluidos en paraplast por 8 h, se realizaron cortes seriados a 10 μm de grosor del hipocampo y corteza cerebral (zonas en las que se ha descrito la presencia de VPAC-1 y VPAC-2, Chul Lee y col., 2010), y se colectaron 2 cortes por laminilla.

INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunoreactividad de los receptores VIPérgicos se detectó usando un protocolo convencional basado en el método ABC-peroxidasa (Anexo 2):

1. Los cortes de cerebro (control positivo) y de ovario, fueron desparafinados e hidratados. Posteriormente se les realizó un lavado con PBS y después tres lavados con PBS+Tritón.
2. Se incubaron con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 1% para desactivar la peroxidasa endógena.
3. Después se incubaron con borohidruro de sodio (NaBH_4) al 1% para reducir los grupos aldehídos.
4. Para facilitar la interacción del anticuerpo con su antígeno se utilizó una solución de citrato de sodio+Tween 20 a 10 mM.
5. Los cortes de los tejidos se incubaron con los anticuerpos primarios para VPAC-1 o VPAC-2, ambos a una dilución de 1:25 durante 72 h a 4°C. Se realizaron tres lavados con PBS+Tritón (Fig. 12 a).

6. Posteriormente los cortes se incubaron por 24 h a 4°C con el anticuerpo secundario biotinilado para VPAC-1 o VPAC-2 a una dilución 1:100 ó 1:200, respectivamente (Fig.12 b).
7. Las laminillas fueron incubadas a temperatura ambiente con la solución ABC durante 1h (Fig.12 c).
 - NOTA: Después de cada incubación (punto 2 al 7), las laminillas fueron lavadas 3 veces con PBS+Tritón durante 10 min.
8. El revelado de la marca se realizó con DAB y las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina QS.
9. Posteriormente los cortes se hidrataron y se cubrieron con medio de montaje (Permanent Mounting Medium, VectaMount, H-5000; Vector, Inc., Burlingame, CA) para ser observados en el microscopio. Se utilizaron cortes de ovario como control negativo donde el anticuerpo primario se omitió, y se procedió como se mencionó anteriormente.

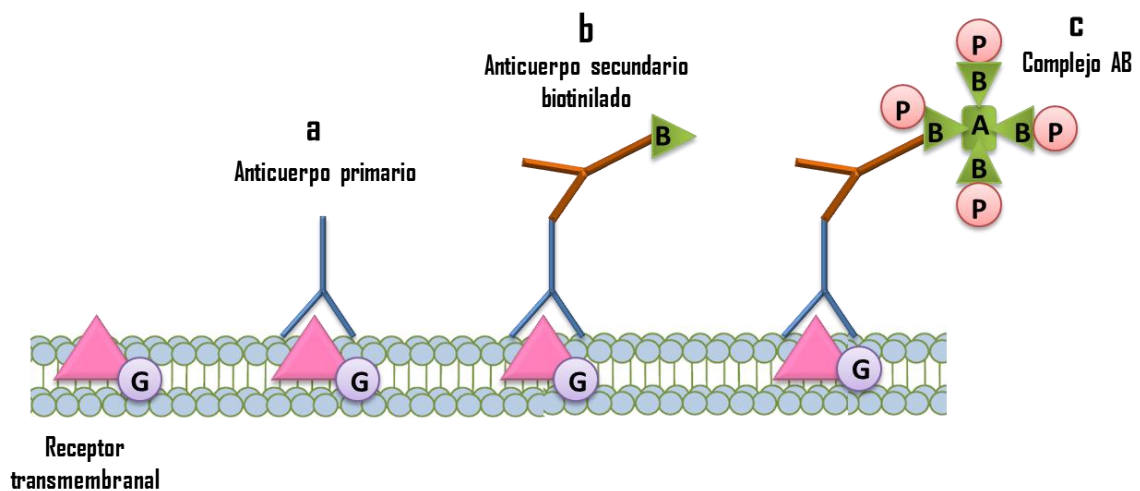


Figura 12. Técnica de inmunohistoquímica indirecta. Se observa la secuencia de adición del anticuerpo primario (a), el anticuerpo secundario (b) y finalmente el complejo AB-peroxidasa (c). A, avidina; B, biotina; P, peroxidasa; G, proteína G.

Para el análisis de la inmunoreactividad a VPAC-1 y VPAC-2 se tomaron fotomicrografías (a 100x, 400x y 600x) mediante microscopio óptico (Nikon ECLIPSE E400) con cámara digital (Nikon DS-U2) acoplada.

La cuantificación de la inmunoreactividad, medida en pixeles, se realizó con el software NIS-Elements (Nikon, software versión 3.0). Mediante ajuste de brillo y contraste se optimizaron las características morfométricas de la imagen para eliminar el ruido de fondo y resaltar el color positivo. Posteriormente, a partir de los controles positivos se estableció un rango de intensidad para los objetos positivos (rojo-marrón), donde el rango para VPAC-1 fue de 80-100 y para el VPAC-2 fue de 63-77. En cada fotomicrografía tomada a 100x, se delimitaron los folículos secundarios, los preovulatorios y los cuerpos lúteos, se seleccionó la intensidad establecida para cada receptor y se obtuvo el porcentaje de área inmunoreactiva. Este porcentaje de área se convirtió a porcentaje de pixeles basado en un área de campo total de 1920000 px² (establecida por el programa NIS-Elements). Para evitar un conteo doble, sólo se tomaron en cuenta aquellos folículos que presentaron núcleo y nucleolo.

La inmunoreactividad en el estroma y la glándula intersticial se analizó mediante un análisis semicuantitativo, basado en un rango de intensidad que va de 0 a 150 (rango de negro a blanco), la cual fue definida para cada receptor VIPérgico a partir de los controles positivos. Se colocaron cruces según el grado de intensidad: cuando fue baja (de 0 a 40), se colocó una cruz (+); para una intensidad media (de 40 a 110) se asignaron dos cruces (++); y para una intensidad alta (de 110 a 150) se colocaron tres cruces (+++).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las diferencias del porcentaje de pixeles para VPAC-1 y VPAC-2 entre ovario izquierdo y ovario derecho, fueron analizadas con la prueba “t” de Student. Las diferencias entre más de dos grupos se analizaron por la prueba de Análisis de Varianza Multifactorial (ANDEVA) seguido de la prueba Tukey-Kramer.

En todos los casos se consideraron como estadísticamente significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue menor o igual a 0.05.

RESULTADOS

La especificidad y validez de la técnica para la detección de la inmunoreactividad para VPAC-1 y VPAC-2 se comprobó por medio de los controles positivo y negativo. En la figura 13 A y B se observa la ausencia del color rojo-marrón en los ovarios (control negativo), mientras que en la figura 13 C-F, se observa el color rojo-marrón en corteza e hipocampo de cerebro (control positivo).

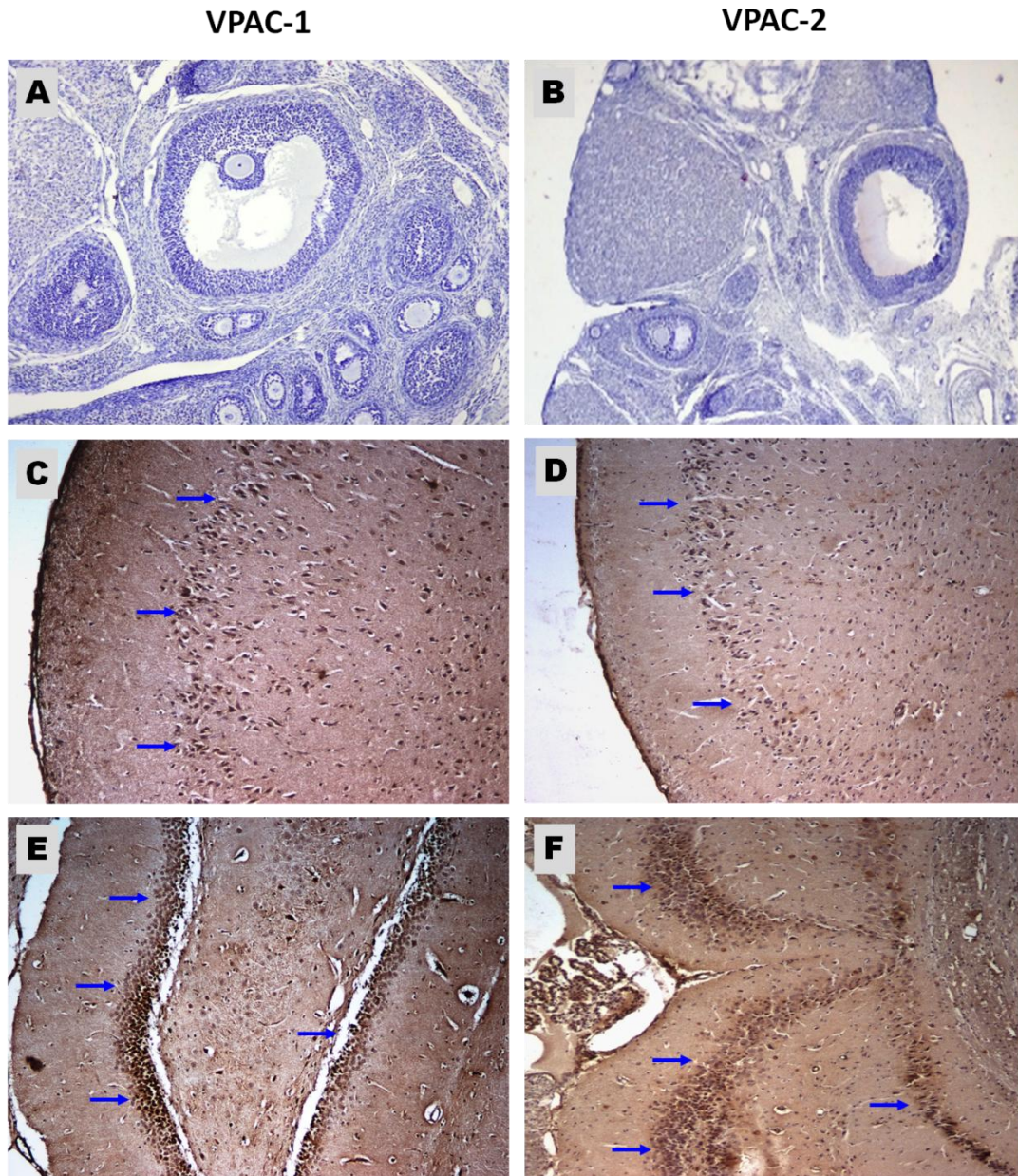


Figura 13. Fotomicrografías (100X) que muestran cortes de ovario como control negativo (A y B) y cortes del cerebro de la región de la corteza (C y D) y del hipocampo (E y F) como controles positivos para los receptores VPAC-1 y VPAC-2. Las flecha azules señalan las células inmunoreactivas a los receptores VIPérgicos.

Immunolocalización de los receptores VIPérgicos en el ovario

En los ovarios de la rata se observó que los vasos sanguíneos expresan únicamente el receptor VPAC-1, independientemente del día del ciclo estral analizado (Fig. 14).

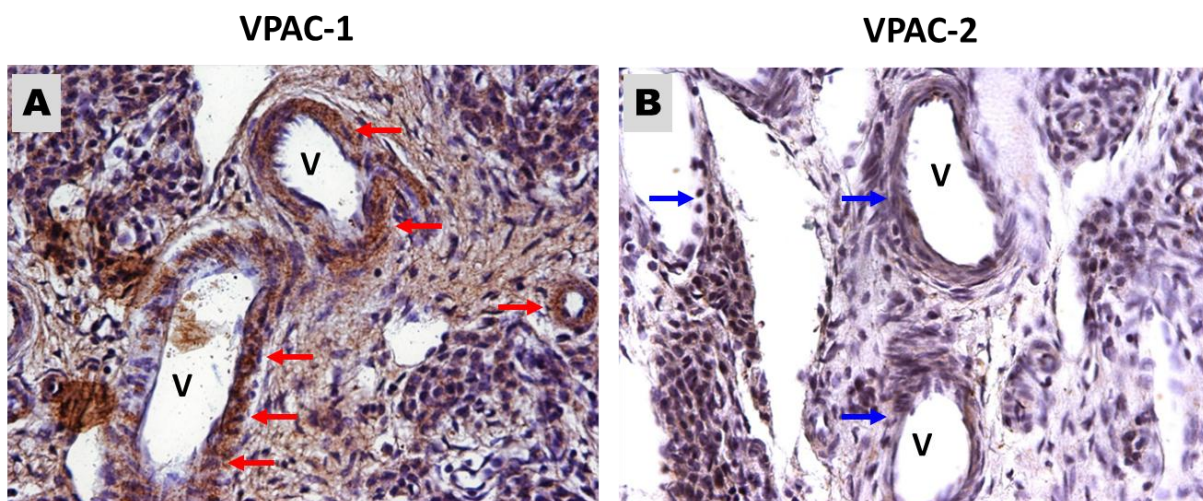


Figura 14. Expresión de los receptores VIPérgicos en los vasos sanguíneos de ratas adultas cíclicas. Las flechas rojas (A) indican la inmunoreactividad de VPAC-1 en vasos sanguíneos, en tanto que las flechas azules (B) muestran la ausencia de la inmunoreactividad de VPAC-2. V, vasos sanguíneos. Fotomicrografías tomadas a 400X.

El análisis histológico mostró que los receptores VPAC-1 y VPAC-2 se expresan en los ovarios de la rata en los cuatro días del ciclo estral. Ambos receptores se encuentran distribuidos en los folículos primarios, secundarios y preovulatorios, en el estroma, glándula intersticial y en cuerpos lúteos (Fig. 15 y 16).

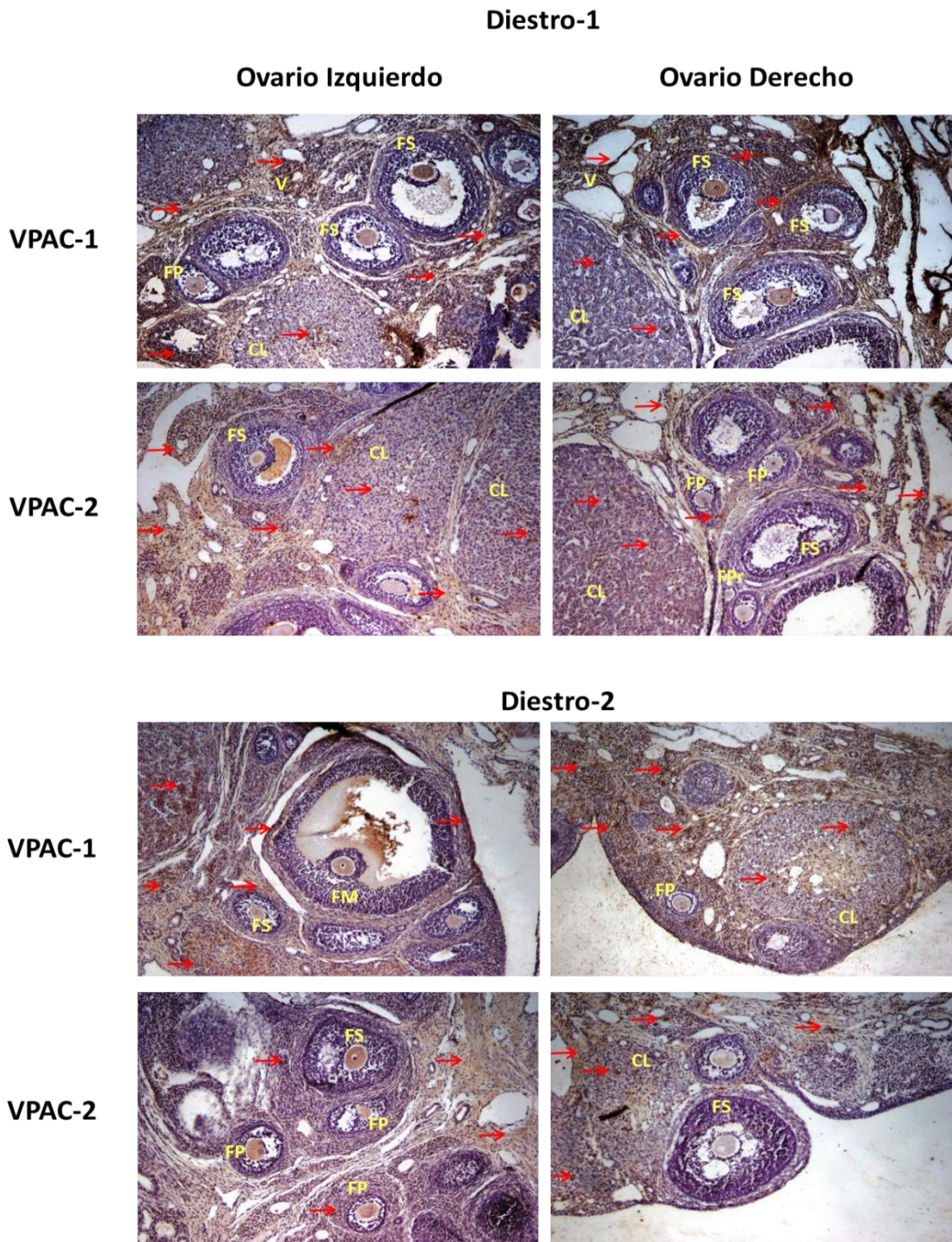


Figura 15. Fotomicrografías (100X) que muestran la inmunolocalización de los receptores VPAC-1 y VPAC-2 en el ovario izquierdo y derecho de ratas adultas cíclicas en los días del diestro. La expresión de los receptores VIPérgicos se observa en folículos en diferentes estadios de maduración, en el cuerpo lúteo, en la glándula intersticial y en el estroma. Las flechas rojas muestran la inmunoreactividad a los receptores VIPérgicos. FPr, folículo primordial; FP, folículo primario; FS, folículo secundario; FM, folículo maduro; CL, cuerpo lúteo.

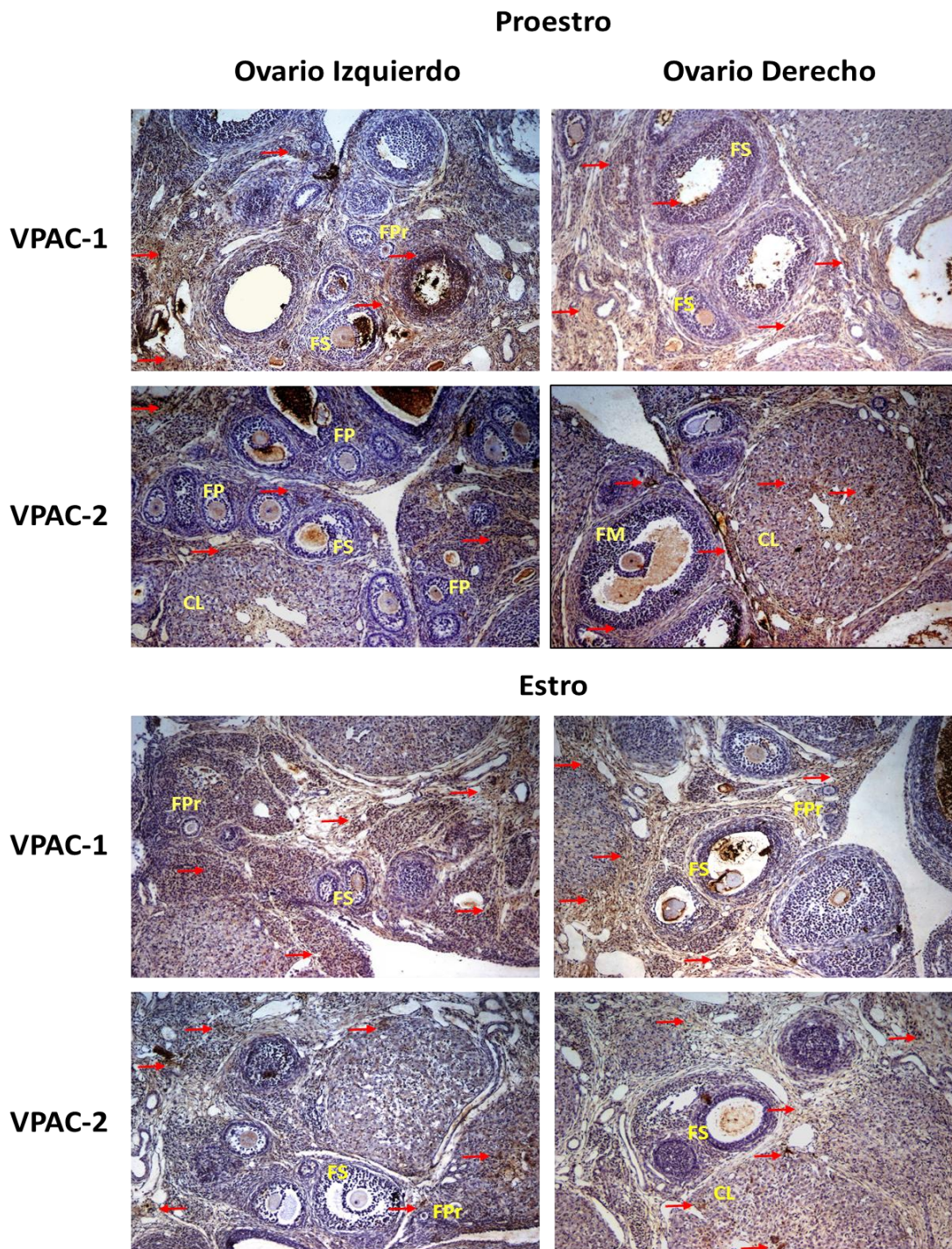


Figura 16. Fotomicrografías (100X) que muestran la inmunolocalización de los receptores VPAC-1 y VPAC-2 en el ovario izquierdo y derecho de ratas adultas cíclicas en los días del proestro y estro. La expresión de los receptores VIPérgicos se observa en folículos en diferentes estadios de maduración, en el cuerpo lúteo, en la glándula intersticial y en el estroma. Las flechas rojas muestran la inmunoreactividad a los receptores VIPérgicos. FPr, folículo primordial; FP, folículo primario; FS, folículo secundario; FM, folículo maduro; CL, cuerpo lúteo.

La expresión de los receptores VIPérgicos en la glándula intersticial y en el estroma de los ovarios, se analizó mediante rangos de intensidad de cada receptor en las cuatro etapas del ciclo estral. En el día del diestro 1, el ovario derecho presentó mayor intensidad para VPAC-1 que el izquierdo, mientras que, en el diestro 2 y proestro es el ovario izquierdo quien la presenta. En cuanto a VPAC-2, en el día del diestro 2 la intensidad fue mayor para el ovario derecho. En el día del estro, la intensidad para ambos receptores VIPérgicos fue semejante entre los ovarios (Cuadro 1 y Fig. 14 y 15).

Etapa del ciclo estral	VPAC-1		VPAC-2	
	OI	OD	OI	OD
Diestro 1	++	+++	++	++
Diestro 2	++	+	+	++
Proestro	++	+	++	++
Estro	+	+	+	+

Cuadro 1. Intensidad de la inmunoreactividad de los receptores VIPérgicos en la glándula intersticial y el estroma del ovario izquierdo (OI) y derecho (OD) de la rata adulta cíclica. Las cruces indican la intensidad de la marca del receptor en un rango que va de 0 a 150, donde + indica baja intensidad; ++, intensidad media y +++, mayor intensidad.

Immunolocalización de los receptores VIPérgicos en estructuras ováricas

El análisis de los cortes histológicos a mayor resolución (400 ó 600X) permitió observar la inmunoreactividad a VPAC-1 (Fig. 17) y VPAC-2 (Fig. 18) en un patrón similar en los diferentes estratos celulares tanto de estructuras foliculares como luteales, independientemente del día del ciclo estral, por lo que sólo se presentan imágenes representativas. Las células teco-intersticiales y de la granulosa de folículos secundarios (Fig. 17B y 18B) y preovulatorios (Fig. 17C y 18C) presentaron inmunoreactividad en todos los folículos analizados, en tanto que la marca en estas células de folículos primarios (Fig. 17A y 18A) sólo se observó en algunos de ellos, mientras que no se expresó en los folículos primordiales (Fig. 19). Las células del cuerpo lúteo presentaron marca para ambos receptores VIPérgicos (Fig.17D y 18D).

VPAC-1

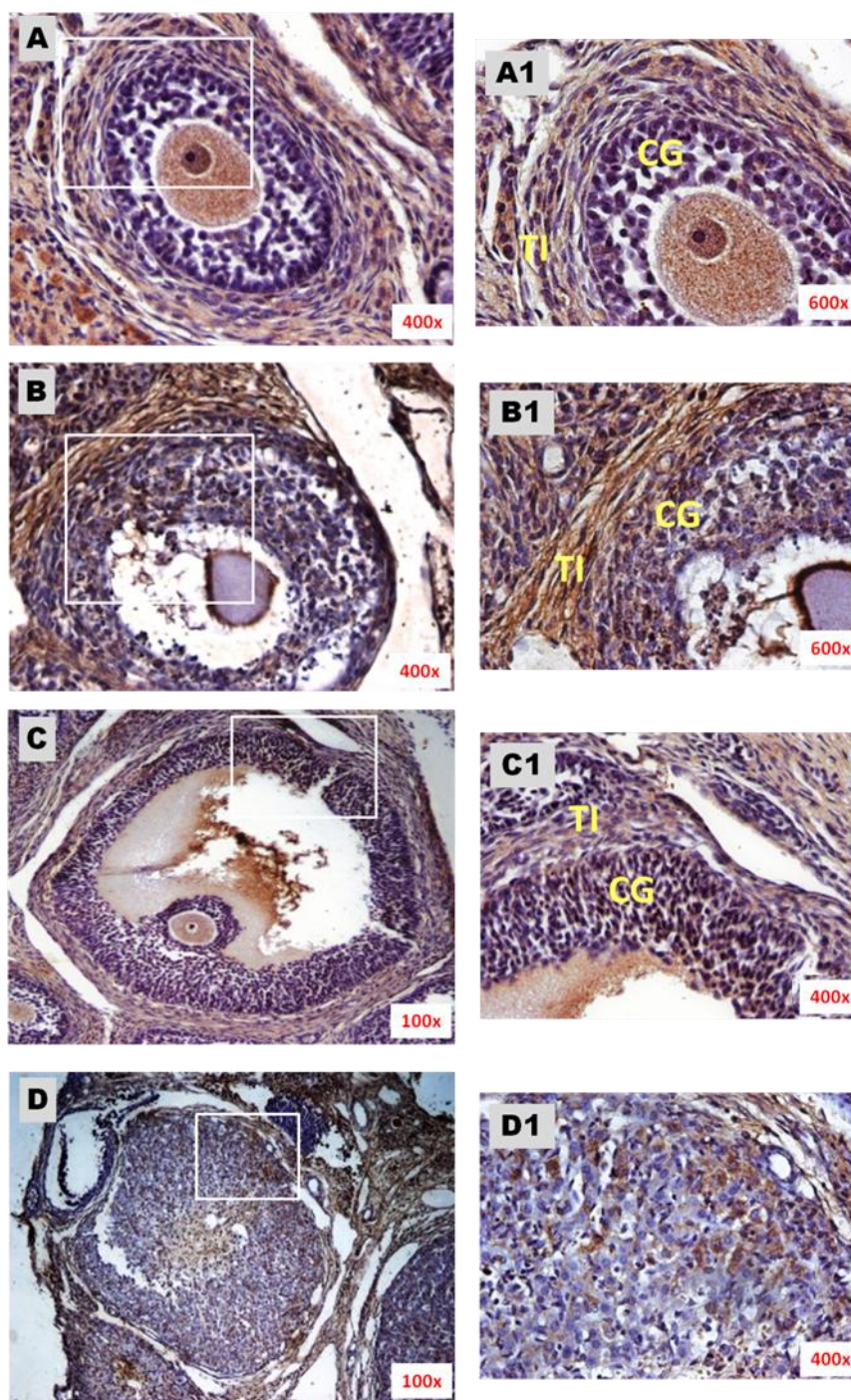


Figura 17. Inmunodetección del receptor VPAC-1 en estructuras foliculares y lúteas de ratas adultas cíclicas. El receptor VPAC-1 se expresa en folículos primarios (A), secundarios (B), preovulatorios (C) y en cuerpos lúteos (D). CG, células de la granulosa; TI, células teco-intersticiales. Las imágenes de la derecha son amplificadas a 400 o 600 x.

VPAC-2

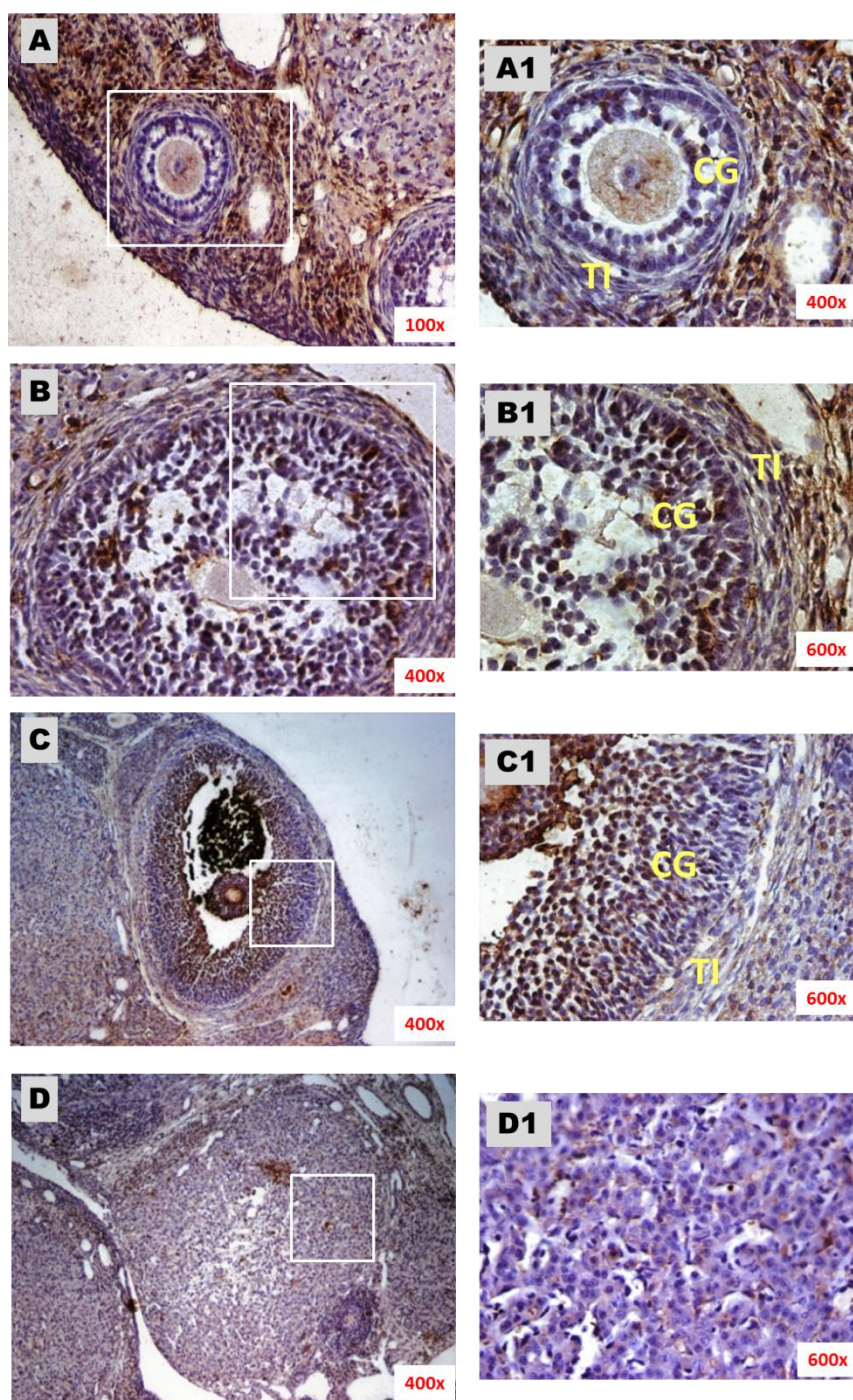


Figura 18. Inmunodetección del receptor VPAC-2 en estructuras foliculares y lúteas de ratas adultas cíclicas. El receptor VPAC-2 se expresa en folículos primarios (A), secundarios (B), preovulatorios (C) y en cuerpos lúteos (D). CG, células de la granulosa; TI, células teco-intersticiales. Las imágenes de la derecha son amplificadas a 400 o 600 x.

Los folículos primordiales no expresan ninguno de los receptores VIPérgicos. No obstante, se observó inmunoreactividad a VPAC-1 y VPAC-2 en el estroma que los rodea, siendo más intensa en los ovarios de animales sacrificados en los días del diestro (Fig. 19 A y B) que en los días del proestro y estro (Fig. 19 C y D).

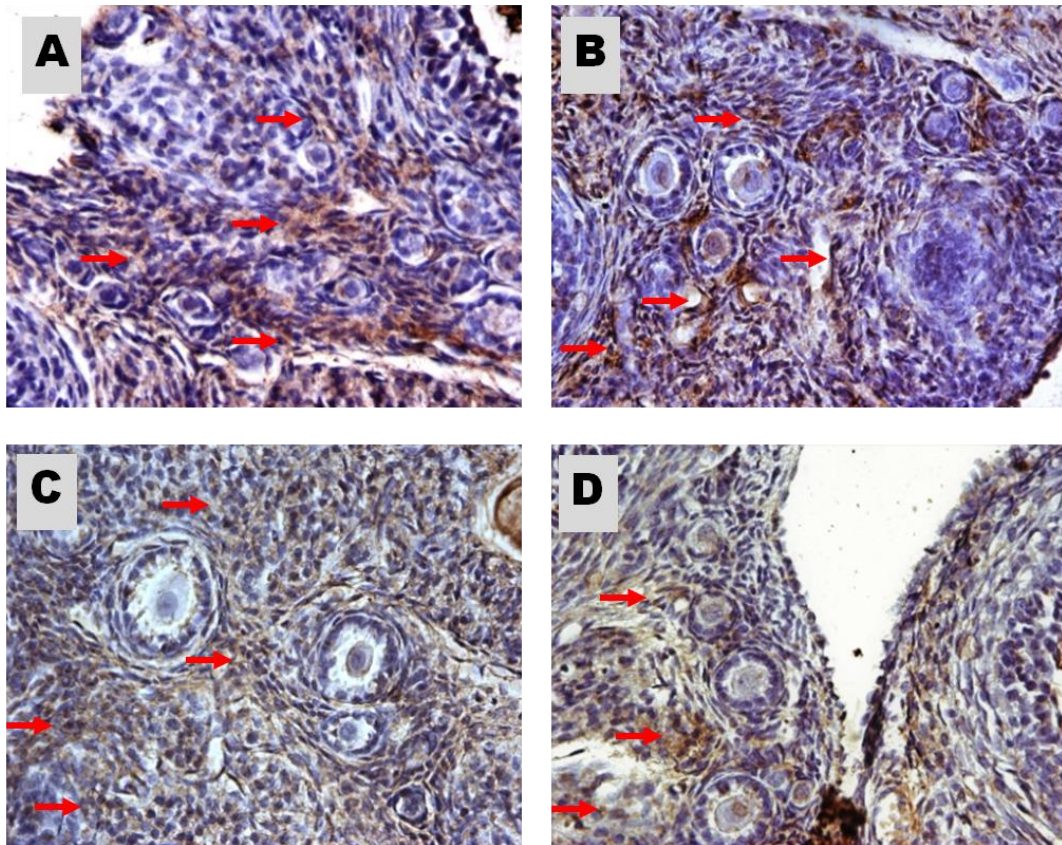


Figura 19. Inmunolocalización del VPAC-1 y VPAC-2 en el estroma que rodea a los folículos primordiales de ratas en Diestro 1 (A), Diestro 2 (B), Proestro (C) y Estro (D). Las flechas rojas indican la inmunoreactividad a los receptores VIPérgicos. Fotomicrografías tomadas a 400X.

Expresión de los receptores VIPérgicos en el ovario izquierdo y derecho.

Al analizar el porcentaje de píxeles por ovario, sin considerar el tipo de estructura ovárica, se observa que en el ovario derecho de animales sacrificados en diestro 2 o estro el VPAC-1 tiene un mayor porcentaje de píxeles, comparado con el ovario izquierdo y con VPAC-2. En el día del proestro, el VPAC-2 presenta mayor expresión en el ovario derecho que en el izquierdo. En el resto de los días se observaron asimetrías entre ambos ovarios, aunque no llegaron a ser estadísticamente significativas (Fig. 20).

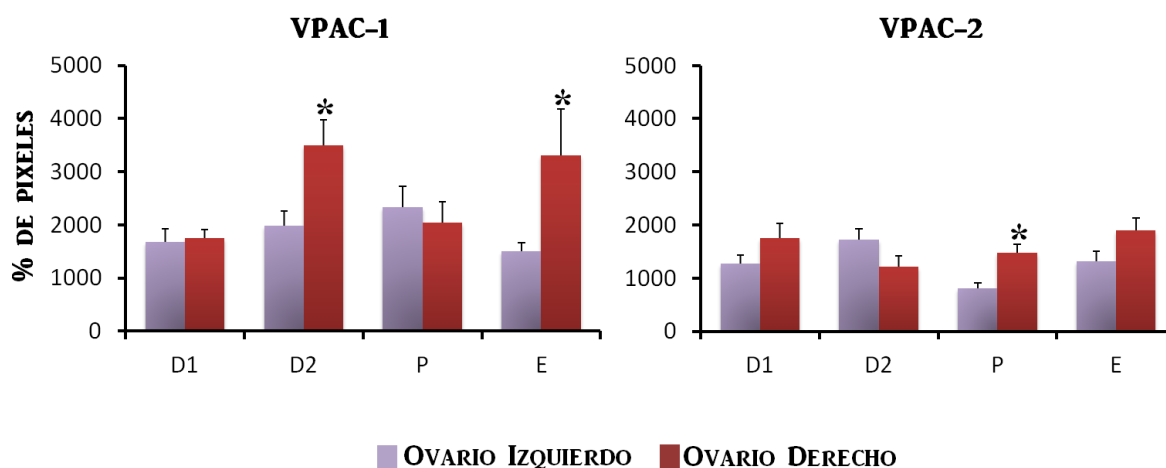


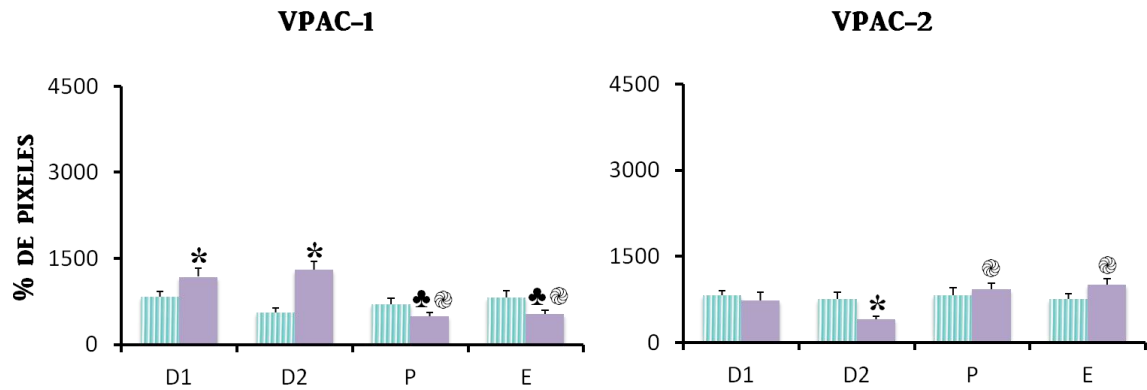
Figura 20. Media \pm eem del porcentaje de píxeles de VPAC-1 y VPAC-2 en diferentes estructuras del ovario izquierdo o derecho (folículos secundarios, preovulatorios y cuerpos lúteos) de ratas en Diestro 1 (D1), Diestro 2 (D2), Proestro (P) y Estro (E). * $p < 0.05$ vs. su respectivo ovario izquierdo (Prueba “t” de Student).

Los **folículos secundarios** del ovario derecho de animales sacrificados en diestro 1 o diestro 2 presentaron un mayor porcentaje de pixeles a VPAC-1 en comparación con los del ovario izquierdo (1179.1% *vs.* 837.8% y 1305.6 *vs.* 550.89%, respectivamente). A diferencia de lo que se observó con VPAC-2 en el día del diestro 2, donde hay mayor expresión en el ovario izquierdo que en el derecho (758.4 *vs.* 407.5%) (Fig. 21).

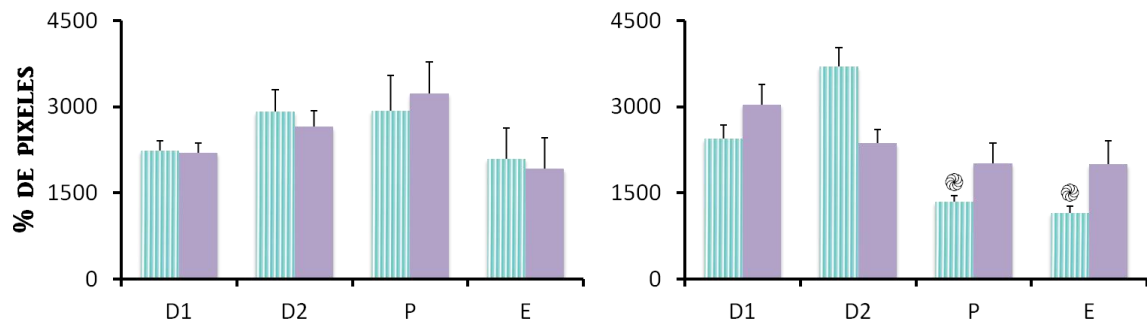
En **folículos preovulatorios** no se encontraron diferencias significativas en la expresión de VPAC-1 entre el ovario izquierdo y derecho, en cualquiera de los días del ciclo estral. La expresión de VPAC-2 en el ovario izquierdo de ratas sacrificadas en proestro o estro, fue menor que en el ovario izquierdo de ratas en diestro 2 (Fig. 21).

En cuanto a los **cuerpos lúteos**, el ovario derecho de animales sacrificados en diestro 2 presenta mayor porcentaje de pixeles a VPAC-1 en comparación con el ovario izquierdo (7995.4 *vs.* 2704%). El ovario derecho de animales sacrificados en estro presenta mayor porcentaje de pixeles a VPAC-1 comparado con los ovarios en los demás días del ciclo estral, y con su respectivo ovario izquierdo. La expresión de VPAC-2 en el proestro fue mayor para el ovario derecho que para el izquierdo (2520 *vs.* 573.2%) (Fig. 21).

FOLÍCULOS SECUNDARIOS



FOLÍCULOS PREOVULATORIOS



CUERPOS LÚTEOS

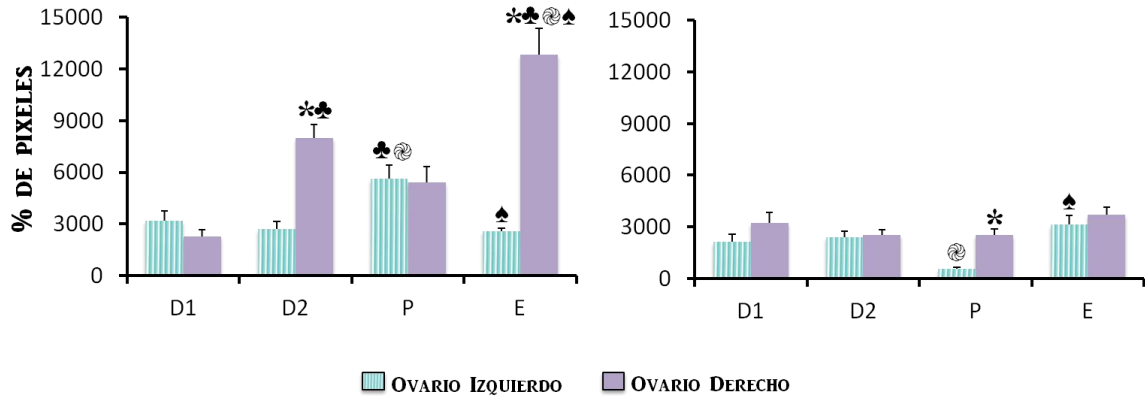


Figura 21. Media \pm eem del porcentaje de píxeles de VPAC-1 y VPAC-2 en folículos secundarios, preovulatorios y cuerpos lúteos de ratas en Diestro 1 (D1), Diestro 2 (D2), Proestro (P) y Estro (E). * $p < 0.05$ vs. su respectivo ovario izquierdo (Prueba “t” de Student); ♣ $p < 0.05$ vs. su respectivo ovario en D1; ⌘ $p < 0.05$ vs. su respectivo ovario en D2; ♠ $p < 0.05$ vs. su respectivo ovario en P (Prueba de ANDEVA seguida por la Prueba de Tukey-Kramer).

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que los receptores VIPérgicos, VPAC-1 y VPAC-2, están presentes en los ovarios de la rata adulta cíclica, cuya expresión varía en función del día del ciclo estral, del ovario en estudio y de la estructura ovárica. En cada día del ciclo estral, dichos receptores se expresan en el estroma que rodea a los folículos, en la glándula intersticial, en células de la teca y de la granulosa de folículos en diferentes estadios de maduración, así como en los cuerpos lúteos.

Morrelli y col., (2008) mostraron que en células granuloso-luteínicas cultivadas en presencia de FSH y LH, se estimula la expresión del ARNm que codifica para ambos receptores VIPérgicos. Durante el ciclo estral la secreción de gonadotropinas es pulsátil (Smith, 2009), lo que nos permite explicar la presencia continua de ambos receptores en el ovario en las cuatro etapas del ciclo estral.

En el ovario de ratón y rata Sprague-Dawley se ha mostrado la presencia del ARNm que codifica para ambos receptores VIPérgicos en células de la granulosa de folículos preovulatorios (Ko y Park-Sarge, 2000; Barberi y col., 2007). En la rata Wistar la expresión de ambos receptores fue mostrada en células teco-intersticiales, mientras que en células de la granulosa sólo se identificó el VPAC-2 (Vaccari y col., 2006). Bukowski y Wasowicz (2015) mostraron que en el ovario de cerdo, el ARNm y la proteína del receptor VPAC-1 se expresa en la pared de folículos primarios, en las células de la granulosa, en el ovocito y en los vasos sanguíneos. En ovarios de fetos de humano de 22 semanas de gestación, así como en ovarios de niñas o mujeres adultas se ha observado VPAC-1 y VPAC-2 en células de la granulosa, el ovocito y el estroma (Gabbay-Benziv y col., 2012). En el presente estudio se observó que ambos receptores se expresan en el estroma, en la glándula intersticial, en el cuerpo lúteo, y en células de la teca y de la granulosa de folículos primarios, secundarios y preovulatorios. Estos resultados nos permiten sugerir que la expresión y la distribución de los receptores VIPérgicos difieren según la especie y la cepa en estudio.

La presencia de fibras VIPérgicas alrededor de los vasos sanguíneos (Ahmed y col., 1986) y la acción vasodilatadora del péptido (Said, 1980), sugiere su participación en la regulación del flujo sanguíneo ovárico (Jorgensen y col., 1991; Hulshof y col., 1994). En los folículos preovulatorios incrementa el flujo sanguíneo después de que se produce la liberación preovulatoria de LH (Acosta y col., 2003). Al recibir un mayor aporte sanguíneo se facilita el ingreso de las gonadotropinas a las células de la granulosa de folículos preovulatorios (Redmer y Reynolds, 1996). En el presente estudio se observó que únicamente se expresa el receptor VPAC-1 alrededor de los vasos sanguíneos del ovario, por lo que sugerimos que el efecto vasodilatador del VIP se da a través de la activación de este receptor.

En la rata, las fibras nerviosas que liberan VIP al ovario se localizan alrededor de vasos sanguíneos, en la glándula intersticial, en asociación con la teca externa de folículos antrales y ocasionalmente entre folículos primordiales (Ahmed y col., 1986; Schmidt y col., 1990). La presencia de fibras VIPérgicas cerca de folículos en desarrollo y la expresión de sus receptores en folículos en diferentes estadios de maduración, tal como fue observado en el presente estudio, apoyan la idea de que el VIP participa en el desarrollo y la supervivencia de los folículos (Mayerhofer y col., 1997; Chen y col., 2012).

En ovarios de ratas neonatas, la exposición *in vitro* al VIP estimula el inicio del crecimiento folicular, a través del incremento del ARNm de receptores a FSH y del ligando Kit (que promueve la transición de folículos primordiales a primarios) (Mayerhofer y col., 1997; Chen y col., 2012). Además, cuando los ovarios fueron pretratados con VIP y después expuestos a FSH, se incrementó el número de folículos en crecimiento (Mayerhofer y col., 1997). Estos resultados indican que es importante la activación de los receptores VIPérgicos, presentes en células de la granulosa y teca, para estimular el desarrollo folicular. No descartamos que el desarrollo folicular se dé en respuesta a un efecto paracrino que se establece entre las células del estroma y las células de la pregranulosa de folículos primordiales, debido a un incremento del AMPc, producido por la activación de los receptores VIPérgicos, lo que da como resultado la proliferación celular y por ende el crecimiento del folículo. En apoyo a esta interpretación, Erickson y Danforth (1995), sugieren que el inicio del crecimiento folicular en el ovario de

mamíferos es un evento independiente de las gonadotropinas y que existen factores parácrinos que regulan la activación del desarrollo de folículos primordiales.

En el presente estudio se observó que independientemente del día de ciclo estral, los folículos secundarios y preovulatorios expresan ambos tipos de receptores VIPérgicos en células de la granulosa, por lo que es posible que a través de la activación de ambos receptores, el VIP module la supervivencia folicular. En apoyo a esta idea, se ha mostrado que en cultivo de células de la granulosa, el VIP tiene un efecto antiapoptótico, en tanto que en folículos antrales inhibe la picnosis nuclear y la descamación de células de la granulosa, signos indicativos de atresia folicular (Flaws y col., 1995).

Se ha descrito que durante el pico preovulatorio de LH, las células de la granulosa de folículos preovulatorios de ovario de bovino expresan inmunoreactividad al VIP, por lo que los autores sugieren que el péptido participa en los eventos finales del desarrollo folicular (Hulshof y col., 1994). Schmidt y col., (1990), mostraron en un sistema *in vitro*, que la estimulación de ovarios de rata de 28 días de edad con VIP estimula la liberación del ovocito. En cultivo de células de la granulosa y del complejo cúmulo-ovocito de rata inmadura, el VIP estimula al activador del plasminógeno (sintetizado en células de la granulosa), que cataliza la conversión del plasminógeno en plasmina lo que resulta en la debilitación de la pared folicular y finalmente la liberación del ovocito (Liu y col., 1987). En cambio, en folículos preovulatorios, el VIP estimula la maduración meiótica del ovocito (Törnell y col., 1988). En el presente estudio se observó que el VPAC-1 y VPAC-2 se expresan en células de la granulosa de folículos preovulatorios, por lo que sugerimos que el papel estimulante del VIP en eventos previos que culminan con la ruptura folicular y la expulsión del ovocito, ocurren vía la activación de ambos receptores VIPérgicos.

Estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que el VIP incrementa la actividad de enzimas que participan en la síntesis de hormonas esteroides. En cultivo de ovarios el VIP incrementa las concentraciones de progesterona, andrógenos y estradiol (Davoren y Hsueh, 1985; Parra y col., 2007). La distribución asimétrica de los receptores VIPérgicos observada en el presente estudio podría, al menos en parte, explicar el efecto que tiene VIP sobre la secreción las hormonas esteroides, ya que la microinyección del VIP en la bursa del ovario izquierdo o derecho modifica la secreción de hormonas esteroides, lo que depende del ovario estimulado y del día del ciclo estral (Rosas y col., 2015).

En el cultivo de células de cuerpos lúteo de vaca, la exposición al VIP incrementa la secreción de progesterona de manera dosis dependiente (Miyamoto y col., 1992). Este mismo efecto se ha mostrado en cultivo de ovario y células de la granulosa de ratas inmaduras (Davoren y Hsueh, 1985; Garraza y col., 1994; Wasilewska-Dziubińska y col., 2002). Previamente en el laboratorio se mostró que una o 24 horas después de la estimulación VIPérgica del ovario derecho de animales en diestro 2 incrementa la concentración de progesterona, no así cuando es el ovario izquierdo el estimulado (Rosas y col., 2015). Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio sugerimos que este efecto asimétrico del VIP es mediado por el receptor VPAC-1, cuya expresión es alta tanto en folículos secundarios como en los cuerpos lúteos del ovario derecho de ratas en diestro 2. En el día del proestro observamos que los cuerpos lúteos del ovario izquierdo presentan una mayor expresión del receptor VPAC-1 en relación al resto de los días del ciclo estral, lo que pudiera explicar el efecto estimulante del VIP en la bursa del ovario izquierdo sobre la secreción de progesterona (Rosas y col., 2015).

En cultivo de ovarios de ratas cíclicas, el VIP estimula la secreción de andrógenos en todas las etapas del ciclo, excepto en el proestro tardío (Parra y col., 2007), a diferencia de lo que ocurre bajo condiciones *in vivo*, donde la inyección de VIP en la bursa del ovario izquierdo de ratas en diestro 1 ó 2 incrementa la concentración de testosterona (Rosas y col., 2015). Es posible que en el día del diestro 2 este efecto se deba a la mayor expresión del receptor VPAC-1 que se observa en la glándula intersticial del ovario izquierdo, aunque no descartamos la participación del VPAC-2.

En el día del estro se observó una baja expresión de los dos receptores de VIP en la glándula intersticial del ovario izquierdo y derecho, aún cuando se ha mostrado que en este día del ciclo estral la inyección del péptido en la bursa del ovario incrementa la concentración de testosterona, independientemente del ovario estimulado (Rosas y col., 2015), lo que nos permite sugerir que ambos receptores pudieran expresar una alta afinidad al VIP.

Dado que es el ovario derecho el que presenta una mayor expresión de los receptores a VIP, se podría sugerir que esta respuesta se debe al hecho de que este ovario recibe un mayor número de fibras que el ovario izquierdo, las cuales se proyectan desde el ganglio celiaco-mesentérico superior hacia el ovario a través del NOS y el NPO (Klein y Burden,

1988). No descartamos que en la rata cíclica, la asimetría esté vinculada con la respuesta ovulatoria, ya que el ovario derecho libera dos ovocitos más que el izquierdo (Domínguez y col., 2003).

En cultivo de células de cáncer de mama humano se ha mostrado que el estradiol tiene un efecto inhibitorio sobre la expresión de VPAC-1 (Madsen y col., 2001). En el presente estudio se observó una menor expresión de los receptores VIPérgicos en el estroma y la glándula intersticial de cualquiera de los ovarios de ratas en estro, esto podría deberse al pico preovulatorio de estradiol que precede al día del estro.

Las concentraciones de VIP en el ovario de la rata fluctúan a lo largo del ciclo estral, alcanzando su concentración máxima en diestro 2, y declinando hacia el proestro (Parra y col., 2007). En nuestros resultados se observó que el porcentaje de pixeles del VPAC-1 es mayor en el ovario derecho de animales sacrificados en diestro 2, disminuyendo en el proestro. Por lo que es posible que la expresión de los receptores VIPérgicos este modulada, no sólo por el estradiol y las hormonas gonadotrópicas, sino que también por el mismo VIP. El grupo de Kakurai (2000) mostró que en cultivo de la línea de células de queratinocitos epidérmicos humanos, el VIP incrementa la expresión del receptor VPAC-1 (Kakurai y col., 2000).

Los resultados del presente estudio permiten sugerir que existe una distribución asimétrica de los receptores VIPérgicos que varía en función del estado neuroendócrino del animal, que podría ser uno de los factores involucrados en la respuesta fisiológica diferencial del ovario izquierdo y derecho (Fig. 22).

MODELO

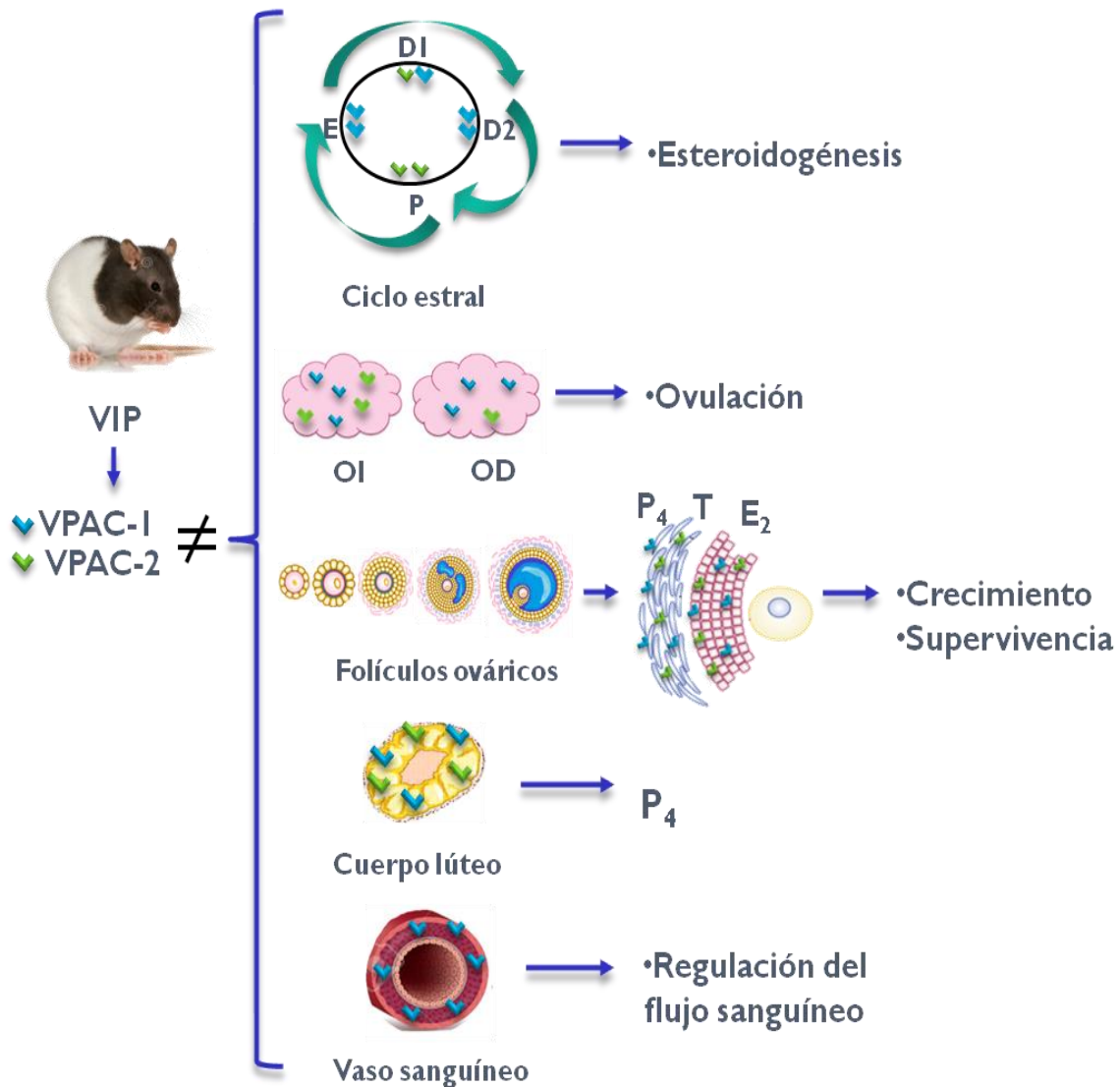


Figura 22. Modelo que muestra la distribución de los receptores VPAC-1 y VPAC-2 en el ovario de la rata adulta cíclica. Los receptores VIPérgicos presentan un patrón de distribución asimétrica que depende del ovario, de la estructura ovárica y del día del ciclo estral. Sólo el VPAC-1 se expresa en vasos sanguíneos y ambos receptores en cuerpos lúteos, estroma y en células teco-intersticiales y de la granulosa de folículos en diferentes estadios del desarrollo. El VIP al unirse a sus receptores estimula el crecimiento y supervivencia folicular, la ovulación, el flujo sanguíneo ovárico y la esteroidogénesis. VIP, péptido intestinal vasoactivo; OI, ovario izquierdo; OD, ovario derecho; P₄, progesterona; T, testosterona; E₂, estradiol.

CONCLUSIONES

- ❖ Los receptores VPAC-1 y VPAC-2 se expresan en los ovarios de la rata adulta en los cuatro días del ciclo estral. Ambos receptores se expresan en la glándula intersticial, en el estroma, en cuerpos lúteos, y en células de la teca y de la granulosa de folículos en diferentes estadios de desarrollo.
- ❖ En los vasos sanguíneos únicamente se expresa el receptor VPAC-1, independientemente del día del ciclo estral y del ovario en estudio.
- ❖ En los días del diestro 2 y estro, el ovario derecho presenta una mayor expresión de VPAC-1.
- ❖ La expresión del receptor VPAC-2 fue mayor en el ovario derecho de animales sacrificados en proestro.
- ❖ Los receptores VIPérgicos muestran una expresión asimétrica que depende del día del ciclo estral, de la estructura ovárica y del ovario en estudio, lo que pudiera, al menos en parte, ser la responsable de la respuesta esteroidogénica diferencial que presentan los ovarios al estímulo VIPérgico.

BIBLIOGRAFÍA

- **Acosta TJ, Hayashi KG, Ohtani M, Miyamoto A. (2003).** “Local changes in the flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows”. *Reproduction*. 125:759-767.
- **Ahmed CE, Dees WL, Ojeda SR. (1986).** "The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP)-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion". *Endocrinology*. 118:1682-1689.
- **Albarrán VS, Martínez-Rivera JI, Ponce-Bravo S. (2016).** “Biología del desarrollo humano”. En: Ponce-Bravo S. (eds.). *Histología Básica. Fundamentos de Biología celular y del desarrollo*. Editorial Médica Panamericana. México. Cap 6. pp. 108-111.
- **Albertini DF. (2015).** “The mammalian oocyte”. En: Knobil y Neill’s (Eds.) *Physiology of Reproduction*. 4a edición. Editorial academic press. EUA. Cap. 2. pp. 59-97.
- **Apa R, Lanzone A, Mastrandrea M, Miceli F, Macchione E, Fulghesu M, Caruso A, Canipari R. (1997).** “Effect of pituitary adenylate cyclase-activating peptide on meiotic maturation in follicle-enclosed, cumulus-enclosed, and rat oocytes”. *Biology of Reproduction*. 57:1074-1079.
- **Apolonio J, Morales L, Domínguez R. (2000).** "Efectos de la denervación sensorial sobre la hipertrofia compensadora del ovario". XX Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas. Cancún, México. Abstr C177.
- **Arteaga-Martínez SM, García-Peláez MI. (2014).** “Embriología humana y biología del desarrollo”. 1a edición. Editorial Médica Panamericana, México. Cap.4. pp. 89-100
- **Auersperg N, Woo MM (2004).** “Development and differentiation of ovarian surface epithelium: cues for the easis of malignant potential”. En: Leung P, Adashi EY. (Eds) *The Ovary*. 2a edición. Editorial Elsevier academic press. Canada. Cap. 35. pp. 57-590.
- **Ayalon D, Tsafirifi A, Lindner HR, Cordova T, Harell A. (1972).** “Serum gonadotrophin level in pro-oestrous rats in relation to the resumption of meiosis by the oocytes”. *Journal of Reproduction and Fertility*. 31:51-80.
- **Barberi M., Muciaccia B., Beatrice M., Stefanini M., Cecconi S., Canipari R. (2007).** “Expression localization and functional activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, vasoactive intestinal polypeptide and their receptor in mouse ovary”. *Reproduction*. 134:281-292.
- **Barco AI, Flores A, Chavira F, Damián-Matzumura P, Domínguez R, Cruz ME. (2003).** “Asymmetric effects of acute hemiovariectomy on steroid hormone secretion by the *in situ* ovary”. *Endocrine*. 21:209-215.
- **Botella LJ. (1995).** "El ovario en los vertebrados". En: Botella LJ. (Coord.). *El ovario: fisiología y patología*. Editorial Díaz de Santos S.A., Madrid, España. Cap.1. pp. 1-22.

- **Brüel A, Christensen EI, Tranum-Jensen J, Qvortrup K, Geneser F. (2015).** "Geneser histología". 4a edición. Editorial Médica Panamericana. México.
- **Bukowski R., Wasowicz K. (2015).** "Expression of VPAC1 receptor at the level of mRNA and protein in the porcine female reproductive system". Publish Journal of Sciences. 18:199-206.
- **Burden HW, Leonard M, Smith CP, Lawrence IE. (1983).** "The sensory innervation of the ovary. "A horseradish peroxidase study in the rat". The Anatomical Record. 207:623-627.
- **Burden HW. (1978).** "Ovarian Innervation". En: Jones RE. (eds.) The vertebrate ovary comparative biology. Plenum Press. New York. pp. 615-628.
- **Carlson BM. (2014).** "Embriología humana y biología del desarrollo". 5a edición. Editorial Elsevier. Barcelona España. Cap. 2. pp. 7-11.
- **Cataldo NA, Rabionovici J, Fujimoyo V, Jaffe RB. (1994).** "Follistatin antagonizes the effects of activin-A on steroidogenesis in human luteinizing granulosa cells ". The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 79:272.
- **Chávez R, Cruz M, Domínguez R. (1987).** "Diferences in the ovulation rate of the right or left ovary in unilaterally ovariectomized rats: Effect of ipsi- and contralateral vagus nerve on the remaining ovary". Journal of Endocrinology. 113:197-401.
- **Chen N, Li Y, Wang W, Ma Y, Zhang Q. (2012).** "Vasoactive intestinal peptide can promote the development of neonatal rat primordial follicles during invitro culture". Biology of Reproduction. 88:1-8.
- **Christensen AP, Patel SH, Grasa P, Christian HC, Williams. (2015).** "Oocyte glycoproteins the form and function of the follicle basal lamina and theca cell". Developmental Biology. 401:287-298.
- **Chul Lee J, Jin Cho Y, Kim J, Kim, N Gu Kang B, Ik Cha C, Min Joo K. (2010).** "Region-specific changes in the immunoreactivity of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC2 and VPAC1 receptor) in the age rat brains". Brain Reserch. 1351:32-40.
- **Couvineau A, Laburthe M. (2011).** "The family B1 GPCR: Structural aspects and interaction whit accessory proteins. Current Drug Targets. 13:103-115.
- **Couvineau A, Laburthe M. (2012).** "VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction whit accessory proteins". British Journal of Pharmacology. 166:42-50.
- **Cruz ME, Flores A, Palafox MT, Meléndez G, Rodríguez JO, Chavira R, Domínguez R. (2006).** "The role of the muscarinic system in the regulating estradiol

secretion varies during the estrus cycle: the hemiovariectomized rat model". *Reproductive Biology and the Endocrinology*. 4:43.

- **D'Albora H, Anesetti G, Lombide P, Less DW, Ojeda SR. (2002).** "Intrinsic neurons in the mammalian ovary". *Microscopy Research and Technique*. 59:484-489.
- **D'Albora H, Lombide P, Ojeda SR. (2000).** "Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study". *Cell Tissue Research*. 300(1):47-56.
- **Davoren JB, Hsueh AJ. (1985).** "Vasoactive intestinal peptide: a novel stimulator of steroidogenesis by cultured rat granulosa cells". *Biology of Reproduction*. 33:37-52.
- **Dees WL, Ahmed CE, Ojeda SR. (1986).** "Substance P and vasoactive intestinal peptide-containing fibres reach the ovary by independent routes". *Endocrinology*. 119:638-64
- **Dees WL, Hiney CE, Schultea TD, Mayerhofer A, Danilchik M, Dissen GA, Ojeda SR. (1995).** "The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing neuregulin factor receptors". *Endocrinology*. 136:5760-5768.
- **Delgado M, Martínez C, Johnson MC, Gomariz RP y Ganea D. (1996).** "Differential expression of vasoactive intestinal peptide receptors 1 and 2 (VIP-R1 and VIP-R2) mRNA in murine lymphocytes". *Journal of Neuroimmunology*. 68:27-32.
- **Dickson L, Finlayson K. (2009).** "VPAC and PAC receptors: from ligands to function". *Pharmacology and Therapeutics*. 121:294-316.
- **Dissen G, Ojeda SR. (1999).** "Ovarian innervation". *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press. USA. 3:583-589.
- **Domínguez R, Cruz M, Chávez R. (1988).** "Differences in the ovulation ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation". *Growth factors and the ovary*. Plenum Press Nueva York. pp. 321-325.
- **Domínguez R, Morales L, Cruz M. (2003).** "Ovarian asymmetry". *Review of Biomedical Sciences*. 5:95-104.
- **Domínguez R, Cruz-Morales SE. (2011).** "The ovarian innervation participates in the regulation of ovarian functions". *Endocrinology and Metabolic Syndrome*. 1-10.
- **Erickson GF., Danforth DR. (1995).** "Ovarian control of follicle development". *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 72:736-747.
- **Fahrenkrug J, Hannibal J, Tams J, Georg B. (2000).** "Immunohistochemical localization of the VIP1 receptor (VPAC1R) in rat cerebral blood vessels: relation to PACAP and VIP containing nerves". *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 20:1205-1214.

- **Findlay JK. (1993).** “An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis”. *Biology of Reproduction*. 48:15-23.
- **Flaws JA, Desanti A, Tilly KI, Javid RO, Kugu K, Johnson AL, Hirshfield AN, Tilly JL. (1995).** “Vasoactive intestinal peptide-mediated suppression of apoptosis in the ovary: potential mechanisms of action and evidence of conserved antiatretogenic role through evolution”. *Endocrinology*. 136:4351-4359
- **Flores A, Rodríguez JO, Palafox MT, Melénez G, Barco A, Chavira R, Cruz ME, Domínguez R. (2006).** “The acute asymmetric effects of hemiovariectomy on testosterone secretion vary along the estrous cycle. The participation of the cholinergic system”. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 4:11.
- **Fredericks CM, Lundquist LE, Mathur RS, Ashton SH, Landgrebe SC. (1983).** “Effects of vasoactive intestinal polypeptide upon ovarian steroids, ovum transport and fertility in the rabbit”. *Biology of Reproduction*. 28:1052-1060.
- **Freeman ME. (2006).** “Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat”. En: Jeong KH, Kaiser UB. (*Eds*). *Physiology of Reproduction*. 3ª edición. Editorial Elsevier. Cap. 43. pp. 2327-2388.
- **Fung JC, Yue GC, Fung KP, Ma X, Yao XQ, Ko WH. (2011).** “Cordyceps militaris extract stimulates Cl⁻ secretion across human bronchial epithelial by both Ca²⁺ and cAMP-dependent pathways”. *Journal of Ethnopharmacology*. 138:201-211.
- **Gabbay-Benziv R, Ao A, Fisch B, Zhang L, Oron G. Kessler-Icekson G, Ben-Haroush A, Krissi H, Abrir R. (2012).** “Vasoactive intestinal peptide and its receptors in human ovarian cortical follicle”. *Plos one*. 7:1-7.
- **Gartner LP, Hiatt JL. (2015).** “Atlas en color y texto de Histología”. 6ª edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid España. Capítulo 17.
- **Garraza MH, Aguado LI, De Bortoli MA (2004).** “In vitro effect of neuropeptides on ovary celiac ganglion affects the release of progesterone from ovaries in the rat”. *Medical Science Monitor*. 12:440-446.
- **Geneser F. (2000).** “Órganos de la Reproducción”. En: *Histología sobre las bases Biomoleculares*. 3ª edición. Editorial Médico Panamericana. Buenos Aires. Cap. 22. pp. 613-638.
- **George FW, Ojeda SR. (1987).** “Vasoactive intestinal peptide enhances aromatase activity in the neonatal rat ovary before development of primary follicles o responsive to Follicle-Stimulating Hormone”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 84:5803-5807.
- **Gerendai, Tóth IE, Blodogkoi Z, Halász B. (2009).** “Recent findings on the organization of central nervous system structures involved in the innervation of

endocrine glands and other organs; observations obtained by the transneuronal viral double-labeling technique". *Endocrine*. 36:179–188.

- **Gerendai I y Halász B. (1997)**. "Neuroendocrine asymmetry". *Frontiers in Neuroendocrinology*. 18:354-381.
- **Giachetti A, Said SI, Reynolds RC, Koniges FC. (1977)**. "Vasoactive intestinal polypeptide in brain: localization in and release from isolated nerve terminals". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74:3424 –3428.
- **Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. (2007)**. "The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies". *Birth Defects Research (part B)*. 80:84-97.
- **Gore-Langton RE, Armstrong DT. (1994)**. "Follicular steroidogenesis and its control". En: Knobil E. Neill JD. (Eds.) *The Physiology of Reproduction*. 2a edición. Editorial Raven Press. New York. Vol. 2. Cap. 11. pp. 571-611.
- **Gougeon A. (2004)**. "Dynamics of human follicular growth: morphologic, dynamic, and functional aspects". En: Leung P, Adashi E. *The Ovary*. 2a edición. Elsevier Academic Press. San Diego, USA. pp 25-43.
- **Gozes I, Tsafiriri A. (1986)**. "Detection of vasoactive intestinal peptide-encoding messenger ribonucleic acid in the rat ovaries". *Endocrinology*. 119:2606-2610.
- **Greenwald GS, Roy SK. (1994)**. "Follicular development and its control". En: Knobil E, Neill JD. (eds.) *The Physiology of Reproduction*. 2a edición. Editorial Raven Press. New York. Vol.2. Cap. 12. Pp. 629-724.
- **Grider JR, Murthy KS, Jin JG, Makhlof GM. (1992)**. Stimulation of nitric oxide from muscle cells by VIP: prejunctional enhancement of VIP release. *American Journal of Physiology*. 262:774-778.
- **Groneberg AD, Rabe FK, Fischer A. (2006)**. "Novel concepts of neuropeptide-based drug therapy: vasoactive intestinal polypeptide and its receptors". *European Journal of Pharmacology*. 533:182-194.
- **Guo Q, Kumar TR, Woodruff T, Hadsell LA, DeMayo F., Matzuk MM. (1998)**. "Overexpression of follistatin causes reproductive defects in transgenic mice". *Molecular Endocrinology*. 12:96-106.
- **Gupta SK. (2015)**. "Role of zona pellucida glycoproteins during fertilization in humans". *Journal of Reproductive immunology*. 108:90-97.
- **Hall JE. (2014)**. "Neuroendocrine Control of the Menstrual Cycle". En: Strauss JF (Eds.) *Reproductive Endocrinology*. 7a edición. Elsevier. Cap. 8. pp. 141-156.

- **Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR. (1998).** "International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide". *Pharmacol Rev.* 50:265–270
- **Harman AJ, Sheward W J, Morrison CF, Waser B, Gugger M, Reubi JC. (2004).** "Distribution of the VPAC2 receptor in peripheral tissues of the mouse". *Endocrinology.* 145:1203–1210
- **Hoffman BL, Schorge J, Schaffer J, Halvorson L, Bradshaw K, Cunningham F. (2012).** "Endocrinología de la reproducción" En: Williams Ginecología. Editorial McGraw-Hill Educación. pp. 423-432.
- **Hsueh AJ, Adashi AY, Jones PBC, Welsh TH. (1984).** "Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells". *Endocrine Reviews.* 5:76-127.
- **Hulshof SCJ, Dijkstra G, Van Der Beek EM, Bevers MM, Figueiredo JR, Beckers JF, Van Hurk R. (1994).** "Inmunocytochemical localization of vasoactive intestinal peptide and neuropeptide Y in the bovine ovary". *Biology of Reproduction.* 50:553-560.
- **Irving-Rogers HF, Hummitzsch K, Murdiyarso LS, Bonner WM, Sado Y, Ninomiya Y, Couchman JR, Sorokin LM, Rodgers RJ. (2010).** "Dynamics of extracellular matrix in ovarian follicles and corpora lutea of mice" *Cell Tissue Research.* 339:613–624.
- **Jabara S, Christenson LK, Wang CY. (2003).** "Stromal cells of the human postmenopausal ovary display a distinctive biochemical and molecular phenotype". *The Journal of Clinical Endocrinology.* 88:484-492
- **Jaroli DP, Lall SB. (1987).** "Comparasion of histoenzymological alteration in the contralateral ovary of nulliparous females of the bat *Taphozous melanopogon* Temmnick (Microchiptera, Mammalia) displaying absolute dextral domince of the genital tract". *Acta Anatomica (Basel).*29:217-222.
- **Johnson AL, Jean ZL, Malamed S. (1994).** "Vasoactive intestinal polipeptide induced expression of cytochrome p450 cholesterol side chain cleavage and 17 α -hidroxilase enzyme activity in hen granulosa cells". *Biology of Reproduction.* 51:327-333.
- **Johnston CA, Siderovski DP. (2007).** "Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: current structural insights". *Molar Pharmacology.* 72:219-230.
- **Jorgensen JC. (1991).** "Interaction between norepinephrine, NPY and VIP in the ovarian artery". *Peptides.* 12:831-837.
- **Kakurai M., Fujita N., Murata S., Furukawa Y. (2000)** "Vasoactive intestinal peptide regulates its receptor expression and function of human keratinocytes via type I vasoactive intestinal peptide receptors". *The journal of investigative dermatology.* 116:743-749.

- **Klein CM, Burden HW. (1988).** "Anatomical localitation of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary". *Neuroscience Letters*. 85:217-222.
- **Ko C., Park-Sarge OK. (2000).** "Progesterone receptor activation mediates LH-induced type-I pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor (PAC₁) gene expression in rat granulosa cells". 277:270-279.
- **Kobilka N. (2007).** "Conformational complexity of G-protein-coupled receptors". *Trends in Pharmacological Sciences*. 28:397-406.
- **Kowalewski MP, Dyson MT, Boos A, Stocco DM, (2010).** "Vasoactive intestinal peptide (VIP)-mediated expression and function of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in granulosa cell". *Molecular and Cellular Endocrinology*. 328:93-103.
- **Kühnel W. (2005).** "Atlas color de Citología e Histología". 11a edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 518.
- **Laburthe M, Couvineau A, Tan V. (2007).** "Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: Structure, models of activation and pharmacology". *Peptides*. 28:1631-1639.
- **Laburthe M, Couvineau A. (2002).** "Molecular pharmacology and structure of VPAC Receptors fo VIP and PACAP". *Regulatory Peptides*. 108:165-173.
- **Langer I, Perret J, Vertongen P, Waelbroeck M, Robberecht P. (2001).** "Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates (Ca²⁺) and cyclic AMP in CHO cell expressing Galpha 16". *Cell Calcium*. 30:229-234.
- **Lawrence LE, Burden HW. (1980).** "The origin of extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary". *Anatomic Record*. 196:51-59.
- **Levine J. (2015).** "Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat". En: Knobil and Neill`s (eds.). *Physiology of the Reproduction*. 4a edición. 2:1199-1257.
- **Liu YX, Kasson BG, Dahl KD, Hsueh AJW. (1987).** "Vasoactive intestinal peptide stimulates plasminogen activator activity by cultured rat granulosa cells and cumulus-oocyte complexes". *Peptides* 8:29-33.
- **Madsen B, Georg B, Madsen MW, Fahrenkrug J. (2001).** "Estradiol dow regulates expression of vasoactive intestinal polypeptide receptor type-1 in breast cancer cell lines". *Molecular and Cellular Endocrinology*. 172:203-211.
- **Mandl AM. (1963).** "Pre-ovulatory changes in the oocyte of the adult rat". *Proceeding of the Royal Society B*. 158:105-118.
- **Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR. (1997).** "A role for neurotransmitters in early follicle development: introduction of functional follicles-

stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary". *Endocrinology*. 138:3320-3329.

- **McCulloch D, Lutz E, Johnson M, Mackenzie C, Michell R (2000)**. "Differential activation of phospholipase D by VPAC and PAC1 receptors". *Ann N Y Acad Sci*. 921:175-185.
- **McDonald JK, Dess GA, Ahmed CE, Noe BD, Ojeda SR. (1987)**. "Biochemical and Immunocytochemical Characterization of Neuropeptide in the Immature Rat Ovary". *Endocrinology*. 120:1703-1710.
- **Mendiola P, Penalva A, Pérez-Llamas F. (1993)**. "Ciclo estral de la rata". En: de Costa J, Madrid JA, Zamora S. (eds.). *Manual de clases prácticas de fisiología animal*. Secretaria de Publicaciones Universidad de Murcia. pp. 147-148.
- **Miller WL., Styne DM. (2001)**. "Pubertad femenina y sus trastornos". En: Yen, Jaffe, Barberi. (Eds.) *Endocrinología de la Reproducción: fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. 4ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Cap.15. pp. 412-415.
- **Miller WL. (2008)**. Steroidogenic enzymes. *Endocrine Development*. 13:1-18.
- **Min-Joo K, Chung YH, Lim H, Hoon-Lee K, Ik-Cha C. (2005)**. "Reduced immunoreactivities of a vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor (VPAC1 receptor) in the cerebral cortex, hippocampal region and amygdala of aged rats". *Brain Research*. 1064:166-172.
- **Miyamoto A., Bruckmann H., Lutzow H., Schams D. (1992)**. Multiple effects of neuropeptide Y, substance P and vasoactive intestinal polypeptide on progesterone and oxytocin release from bovine corpus luteum *in vitro*. *Journal of Endocrinology*. 138:451-458.
- **Molina PE. (2008)**. "Sistema reproductor femenino". En: *Fisiología Endócrina*. Editorial McGraw-Hill. pp. 213-221.
- **Moroo I, Tatsuno I, Uchida D, Tanaka T, Saito J, Saito Y. (1998)**. "Functional characterization of structural alterations in the sequence of the vasodilator peptide maxadilan yields a pituitary adenylate cyclase-activating peptide type I receptor-specific antagonist". *J Biol Chem*. 274:23103-23110.
- **Morrelli MB, Barberi M, Gambardella A., Borin A., Cecconi S. (2008)**. "Characterization, expression and functional activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors in human granulosa-luteal cells. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 93:4924-4932.
- **Nakamura T, Takio K, Eto Y. (1990)**. "Activin-binding protein from rat ovary is follistatin". *Science*. 247:836-838.

- **Netter FH. (2005).** "Sistema nervioso: anatomía y fisiología". 10ª edición. Editorial Masson. Barcelona, España.
- **Neumann JM, Couvineau A, Murail S, Lacapere JJ, Jamin N, Laburthe M. (2008).** "Class-B GPCR activation: is ligand helix capping the key?". Trends in Biochemical Science. 33:314-319.
- **Odor DL. (1955).** "The temporal relationship of the first maturation division of rat ova to the onset of heat". American Journal of Anatomy. 97:461-491.
- **Ojeda SR., White SS., Aguado LI., Advis JP., Andersen JM. (1983).** "Abdominal vagotomy delays the onset of puberty and inhibits ovarian function in the female rat". Neuroendocrinology. 36:261-267.
- **Ojeda SR, Lara HE. (1989).** "Role of sympathetic nervous system in the regulation of ovarian function". En: Pirke KM, Wuttke W, Schweiger U (eds.). The menstrual cycle and its disorders. Springer-Verlag, Berlin. pp.26-32.
- **Oldham WM, Van Eps N, Preininger AM, Hubbell WL, Hamm HE. (2007).** "Mapping allosteric connections from the receptor to the nucleotide-binding pocket of heterotrimeric G proteins". Proceedings of National Academy of Science USA. 104:7927-7932.
- **Pangas S, Rajkovic A. (2015).** "Follicular development: mouse, sheep and human models". En: Knobil y Neill's (Eds.) Physiology of Reproduction. 4a edición. Editorial academic press. EUA. Cap. 21. pp. 947-995.
- **Parra C, Fiedler JL, Luna SL, Greiner M, Padmanabhan V, Lara HE. (2007).** "Participation of vasoactive intestinal polypeptide in ovarian steroids production during the rat estrous cycle and in the development of estradiol valerate-induced polycystic ovary". Reproduction. 133:147-154.
- **Piper PJ, Said SI, Vane JR. (1970).** "Effects on smooth muscle preparations of unidentified vasoactive peptides from intestine and lung". Nature. 225:1144-1146.
- **Redmer DA., Reynolds LP. (1996)** "Angiogenesis in the ovary". Reviews of Reproduction. 11:182-192.
- **Reubi JC. (2000).** "In vitro evaluation of VIP/PACAP receptors in healthy and diseased human tissues. Clinical implications". Ann. N. Y. Acad. Sci. 921:1-25.
- **Rosas G, Ramírez MI, Linares R, Trujillo A, Domínguez R, Morales-Ledesma L. (2015).** "Asymmetric steroidogenic response by the ovaries to the vasoactive intestinal peptide". Endocrine. 48:968-977.
- **Rosas G. (2015).** Tesis de doctorado: "Interacción de la inervación noradrenérgica y vipérgica en la rata adulta con o sin síndrome de ovario poliquístico". Facultad de Estudios superiores Zaragoza. UNAM. CDMX.

- **Ross MH, Pawlina W. (2012).** "Histología, texto y atlas color con biología celular y molecular". 6a edición. Editorial Médica Panamericana. Barcelona, España. Cap. 23 pp. 200-213.
- **Ross MH, Pawlina W. (2015).** Histología, texto y atlas color con biología celular y molecular. 7a edición. Editorial Médica Panamericana. Barcelona, España. Cap. 23. pp.831-837.
- **Said S, Mutt V. (1972).** "Isolation from porcine-intestinal wall of a vasoactive intestinal peptide related to secretin and to glucagon". *European Journal of Biochemistry*. 28:199-204.
- **Said SI, Rosenberg RN. (1976).** "Vasoactive intestinal peptide: abundant immunoreactivity in neural cell lines and normal nervous tissue". *Science*. 192:907.
- **Said SI. (1986).** "Vasoactive intestinal peptide". *Journal of Endocrinology Investigation*. 9:191-200.
- **Said, S. I. (1980).** "VIP: Isolation, distribution, biological actions, structure-function relationships, and possible functions". En: *Comprehensive Endocrinology* (series edited by Luciano Martin). *Gastrointestinal Hormones*, edited by G. B. Jerzy Glass. New York: Raven Press, pp. 245-273.
- **Schmidt G, Jorgensen J, Kannisto P, Liedberg F, Ottesen B, Owman Ch. (1990).** "Vasoactive intestinal polypeptide in the PMSG primed immature rat ovary and its effect on ovulation in the isolated rat ovary perfused in vitro". *Journal of Reproduction and Fertility*. 90:465-472.
- **Schultea TD, Dess LW, Ojeda SR. (1992).** "Postnatal development of sympathetic and sensory innervation of the rhesus monkey ovary". *Biology of Reproduction*. 47:760-767.
- **Sepúlveda JS. (2014).** "Texto atlas de histología: biología celular y tisular". McGraw-Hill Interamericana. México. Cap. 15. pp. 220-225
- **Sepúlveda SJ. (2012).** "Sistema reproductor femenino". En: Sepúlveda (eds.) *Texto Atlas de Histología, Biología Celular y Tisular*. McGraw-Hill. México. Cap.16. pp. 218-222.
- **Silverthorn DU. (2013).** "Reproducción y desarrollo". En: *Fisiología Humana un Enfoque Integrado*. 6ª edición. Editorial Médica Panamericana. México. Cap. 26. pp. 867-874
- **Smith MS. (2009).** "Estrus and menstrual cycles: neuroendocrine control". En: Squire LR. (eds.) *Encyclopedia of Neuroscience*. Elsevier. pp. 1-5.
- **Strauss JD, Williams CJ. (2014).** "The ovarian life cycle". En; Yen y Jaffe's. (eds.) *Reproductive Endocrinology*. 7a edición. pp. 157-191.

- **Tilly JL, Johnson AL. (1989).** "Regulation of androstenedione production by adenosine 3',5'-monophosphate and phorbol myristate acetate in Ovarian Thecal Cell of the Domestic Hen". *Endocrinology*. 125:1691-1699.
- **Tompkins JD, Hardwick JC, Locknar SA, Merriam L, Parsons RL. (2008).** "Markedly reduced white adipose tissue and increased insulin sensitivity in Adcyap1(Adenylate Cyclase Activating Polypeptide 1)-deficient mice". *Journal of Pharmaceutical Science*. 107:41-48.
- **Törnell J., Carlsson B., Hillensjö T. (1988).** "Vasoactive intestinal peptide stimulates oocyte maturation, steroidogenesis, and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production in isolated preovulatory rat follicles ". *Biology of Reproduction*. 38:213-220.
- **Tóth IE, Wiessel O, Boldogkoi K, Ba'lint K, Tapaszi I, Gerendai. (2007).** "Predominance of supraspinal innervation of the left ovary". *Microscopy Research and Technique*. 70:710-718.
- **Tresguerres HF. (2010).** "Fisiología del eje hipotálamo-hipófisis-ovario". En: Tresguerres JA (eds.) *Fisiología humana*. 4a edición. Editorial McGraw-Hill. Madrid, España. Cap. 75. pp.1042-1058.
- **Tresguerres JA, Castillo C. (2005).** "Fisiología del eje hipotálamo-hipófisis-ovario". En: Tresguerres JA (eds.) *Fisiología Humana*. 3ª edición Editorial McGraw-Hill. Madrid, España. Cap. 79. pp. 107-118.
- **Tresguerres JAF (1999).** "Introducción al sistema endócrino: Concepto de hormonas". En: Aguilar BLE, Romano PM, Tamargo MJ, Zarco GP. (Eds) *Fisiología Humana*. 2ª edición. Editorial Mc Graw Hill. Madrid España. Pp.814-844.
- **Trzeciak WH, Ahmed CE, Simpson ER, Ojeda SR. (1986).** "Vasoactive intestinal polypeptide induces the synthesis of the cholesterol side-chain cleavage enzyme complex in culture rat ovarian granulosa cell". *Proceedings of the National Academy of Science*. 83:7490-7494.
- **Usdin TB, Bonner TI, Mezey E. (1994).** Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions". *Endocrinology*. 135 2662-2680
- **Vaccari S, Latini S, Barberi M, Teti A, Stefanini M, Canipari R. (2006).** "Characterization and expression of different pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide receptors in the rat ovarian follicles". *Journal of Endocrinology*. 191:287-299.
- **Wasilewska-Dziubińska E, Borowiec M, Chmielowska M, Wolińska-Witori E, Baranowska B. (2002).** "Alfa 1 adrenergic potentiation of progesterone accumulation stimulated by vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase – activating polypeptide (PACAP) in cultured rat granulosa cells". *Neuroendocrinology Letters*. 23: 141-148.

- **Watkins CC, Boehning D, Kaplin AL, Rao M, Ferris CD, Snyder S. (2004).** "Carbonmonoxide mediates vasoactive intestinal polypeptide-associate noradrenergic/noncholinergic neurotransmission". Proceedings of National and Science USA. 101:2631-2635.
- **Yeh J, Adashi EY. (2001).** "El ciclo ovárico". En: Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RL. (eds.) Endocrinología de la Reproducción. 4a edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Cap. 17. pp.465-469.
- **Yen SSC. (2001).** "Ciclo menstrual humano: regulación neuroendócrina". En: Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RL. (eds.) Endocrinología de la Reproducción. 4a edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Cap. 7. pp. 212-216.
- **Zeleznik AJ, Plant TM. (2015).** "Control of the menstrual cycle". En: Knobil E, Neill JD (eds.). The Physiology of Reproduction. 4 edición. Raven Press. New York. Cap.28.

Anexo 1

Fijación e inclusión

Una vez perfundidos los animales, se disecan los ovarios y el cerebro para su posterior fijación e inclusión.

Ovario

1. Se mantienen en paraformaldehído al 4% durante 24 h
2. Enjuagar 2 veces con PBS y dejar en alcohol al 70% hasta el momento de la deshidratación.
3. Deshidratación:

Alcohol al 70 %	}	45 min c/u
Alcohol al 90 %		
Alcohol al 96 %		
Alcohol al 100 %		
Alcohol-xilol 1:1		
Xilol	}	1 h c/u
Xilol		

4. Después de la deshidratación los ovarios se incluyen durante 1 h 30 min en paraplast.

Cerebro

1. Se mantienen en paraformaldehído al 4% durante 24 h
2. Dejar en PBS hasta el momento de la deshidratación (máximo 15 días).
3. Deshidratación:

Agua destilada	→	3 h en agitación
Alcohol al 50 %	→	12 h en agitación
Alcohol al 70 %	}	1 h en agitación
Alcohol al 80 %		
Alcohol al 96 %		
Alcohol al 96 %		
Alcohol al 100 %		
Alcohol al 100 %		
Alcohol-xilol 1:1	}	12 h
Xilol		
Xilol	→	12 h

5. Después de la deshidratación los cerebros se incluyen durante 6 h en paraplast.

Anexo 2

Técnica de inmunohistoquímica

1. Cortes de tejido.
2. Colocar las laminillas en la mufla durante 45 min, para retirar el exceso de paraplast.
 - Preparar solución de PBS y PBS+Tritón, un día antes. Prepara Buffer de Citrato de Sodio-Tween 20.
3. Meter laminillas al tren de **hidratación**.

Xilol	→	10 min
Xilol	→	5 min
Alcohol al 100 % (2)	}	2 min. c/u
Alcohol al 96 % (2)		
Alcohol al 90 % (2)		
Alcohol al 70 % (2)		
Alcohol al 50 % (1)		
Agua destilada		
*(Número de cambios)		

4. Colocar laminilla por laminilla en PBS y mantener en agitación durante 10 min
5. Desechar PBS y adicionar PBS+Tritón (realizar 3 lavados de 10 min c/u y mantener en agitación).
6. Preparar solución de H₂O₂ al 1% y refrigerar
7. Desechar PBS+Tritón y adicionar la solución de H₂O₂ e incubar durante 10 min.
8. Desechar H₂O₂ 1% y realizar 3 lavados de 10 min c/u con PBS+Tritón.
9. Preparar solución de Borohidruro de Sodio al 1% (se prepara minutos antes del último lavado con PBS+Tritón).
10. Desechar PBS+Tritón y adicionar la solución de Borohidruro de Sodio y dejar en agitación durante 10 min.
11. Realizar varios lavados con PBS durante 5 min en agitación. Los lavados se realizan hasta que se dejen de observar burbujas.
12. Realizar 3 lavados con PBS+Tritón por 10 min c/u en agitación.
13. Desechar PBS+Tritón e incubar con solución de Citrato de Sodio durante 10 min en agitación.

Nota: el citrato debe adicionarse una vez que haya sido calentado en el horno de microondas hasta el punto de ebullición.
14. Preparar solución de Bloqueo para anticuerpos y mantenerla en hielo.
15. Preparar la cámara húmeda con H₂O destilada.
16. Se toma laminilla por laminilla y se limpia el exceso de Citrato de Sodio (con sanitas) de alrededor de la laminilla. Hacer cámara hidrofóbica con el lápiz pap pen.

Nota: Se debe tener cuidado de que los cortes de las laminillas siempre se mantengan húmedos.

17. Adicionar la solución de Bloqueo a cada laminilla y colocarlas en la cámara húmeda durante 1 h a temperatura ambiente (mantenerla cerrada).
18. Preparar el primer anticuerpo primario
19. Desechar solución de bloqueo laminilla por laminilla e ir adicionando a c/u de ellas el anticuerpo primario, cerrar la cámara húmeda y sellarlo con plástico auto-aderible.
20. Dejar incubar el anticuerpo primario por 48 h a 4° C (en cuarto frío).
21. Hacer 3 lavados con PBS+Tritón en agitación durante 10 min c/u.
22. Preparar anticuerpo secundario.
23. Retirar el exceso de PBS+Tritón de cada laminilla, delimitar nuevamente la cámara hidrofóbica y adicionar el anticuerpo secundario. Cerrar y sellar la cámara húmeda y dejar incubar el anticuerpo secundario por 24 h a 4 °C.
24. Desechar el anticuerpo secundario y hacer 3 lavados de las laminillas con PBS+Tritón en agitación durante 10 min c/u.
25. Preparar la solución Avidina-Biotina (AB).
26. Después del último lavado con PBS+Tritón, se toma laminilla por laminilla, se secan los costados, se acomodan en la cámara húmeda, se vuelve a delimitar la cámara hidrofóbica y se adiciona la solución AB. Se deja incubar a temperatura ambiente por 1 h en cámara húmeda sellada.
27. Retira laminilla por laminilla de la cámara húmeda, secar los costados y la parte inferior de cada laminilla y colocarlas en PBS+Tritón, hacer 3 lavados durante 10 min c/u en agitación.
28. El revelado de la marca se realiza con la DAB. Para lo cual se delimita la cámara hidrofóbica y a cada laminilla se le agrega DAB, que se deja incubar por no más de 10 min (en cámara hidrofóbica). Para desactivar la DAB las laminillas se colocan en agua destilada durante 5 min.

Nota: Los desechos de DAB de cada laminilla se depositan en un frasco ámbar. Todo el material usado se limpia con cloro para desactivar el cromógeno.

29. Retirar laminilla por laminilla del agua, secar los bordes y la parte inferior, y agregar a c/u hematoxilina QS para realizar la contratinción del tejido y dejar por 2 min. Retira el exceso de hematoxilina y colocar las laminillas en cajas coplin con agua destilada durante 2 min. Se realiza un segundo lavado por 2 min.

30. Se colocan los cortes en el tren de **deshidratación**.

Agua destilada	}	2 min.
Alcohol al 50 % (1)		
Alcohol al 70 % (2)		
Alcohol al 90 % (2)		
Alcohol al 96 % (2)		
Alcohol al 100 % (2)		
Xilol	}	5 min.
Xilol →		
*(Número de cambios)		

31. Laminilla por laminilla se va sacando del segundo cambio de xilol y se le adicionan de 1 a 2 gotas del medio de montaje y se coloca un cubreobjetos. Se dejan secar por 3 días.

Anexo 3

Preparación de reactivos.

1. Solución de PBS al 0.1 M para inmunohistoquímica

	1 L	4 L
Na ₂ HPO ₄ (anhídrido)	12.6 g	50.4 g
NaH ₂ PO ₄ (anhídrido)	1.4 g	5.6 g
NaCl	8.45 g	35 g

- Para un litro de PBS disolver las sales en 800 mL de agua destilada y ajustar el pH a 7.4.
 - Aforar a 1000 mL.
 - Almacenar a temperatura ambiente.
2. Solución de H₂O₂ al 1%
 - Se prepara el volumen que se va a usar a partir de H₂O₂ al 30% y se disuelve en PBS.
 3. Borohidruro de Sodio (NaBH₄) al 1%
 - Por cada 100 ml de PBS se agrega 1 g de NaBH₄
 - Ejemplo: para una caja coplin se preparan 90 mL.

$$100 \text{ mL} \rightarrow 1 \text{ g}$$

$$90 \text{ mL} \rightarrow x$$

$$x = 0.9 \text{ g de NaBH}_4$$

4. Buffer de Citrato de Sodio+Tween 20
 - Se prepara 1 L de la solución
 - Se toman 750 mL de H₂O desionizada y por cada litro se agregan 2.94 g de citrato de sodio, se ajusta el pH a 6 (con HCl). Posteriormente se agregan 500µl de Tween 20 y se afora a 1 L.
5. Solución de Bloqueo (SB)
 - La cantidad total a preparar debe ser para 3 soluciones: para la solución de bloqueo, para el anticuerpo primario y para el anticuerpo secundario.
 - Se necesita suero normal de bloqueo (SNB) al 3%, el cual viene en el kit del anticuerpo secundario, albúmina bovina al 3% y PBS.
 - Ejemplo: Se usarán 300 µL por laminilla y se tienen 10 laminillas
Cálculos:

300 μL de la solución \times 10 laminillas = 3 000 μL

1. SB	3 000 μL
2. Anticuerpo primario	3 000 μL
3. Anticuerpo secundario	3 000 μL
Volumen total:	9 000 μL

Suero Normal de Bloqueo 3%:

$$9\,000\ \mu\text{L} \rightarrow 100\%$$

$$x \rightarrow 3\%$$

$$x = 270\ \mu\text{L}$$

Cantidades totales de cada solución:

$$\begin{array}{r} 9\,000\ \mu\text{L} \\ 270\ \mu\text{L SNB} \\ \hline 0.270\ \text{g albúmina} \\ 14\,550\ \mu\text{L PBS} \end{array}$$

Nota: mantener en hielo las soluciones y ahora todos los reactivos se preparan con guantes.

6. Preparación de anticuerpo primario y anticuerpo secundario.
- Se deben hacer pruebas para determinar la concentración y tiempo de incubación adecuadas para cada uno de los anticuerpos.
 - Ejemplos:
 - ❖ Para el anticuerpo primario se usa una disolución 1:25

$$300\ \mu\text{L de la solución} \times 10\ \text{laminillas} = 3000\ \mu\text{L}$$

$$3000 \div 25\ (\text{concentración}) = 120\ \mu\text{L de Ac primario}$$

$$3000 - 120 = 2880\ \mu\text{L de SB}$$

- ❖ Para el anticuerpo secundario se usa una concentración de 1:100

$$3000 \div 100\ (\text{concentración}) = 30\ \mu\text{L de Ac primario}$$

$$3000 - 30 = 2970 \mu\text{L de SB}$$

7. Solución Avidina-Biotina (AB)

- Se agita en vortex y en un tubo cónico:

5 mL de PBS + 4 gotas de avidina + 4 gotas de biotina

8. Solución diamino-bencidina (DAB).

- Se disuelve con vortex y en un tubo cónico:

*6 ml de agua desionizada + 3 gotas de Buffer + 4 gotas de DAB +
3 gotas de H₂O₂ 3%*

Nota: El agua desionizada se usa fría para que la reacción ocurra lentamente. La DAB es altamente tóxica por lo que se deben utilizar guantes durante su preparación y uso. Se desactiva con cloro

Nota: El cálculo para la preparar cada uno de los reactivos se hace según el número de laminillas y tejido en cada laminilla.



LA ACADEMIA DE INVESTIGACIÓN EN
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN A.C.



Otorga la presente
CONSTANCIA
A


**Ayala-Martínez, Rocio Sarahy; Rosas, G.;
Linares, R.; Morán, C. y Morales-Ledesma, L.**

Por la presentación del trabajo

**“EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DEL PÉPTIDO INTESTINAL
VASOACTIVO, VPAC-1 Y VPAC-2, EN LOS OVARIOS DE LA RATA
ADULTA EN PROESTRO O ESTRO”**

XLII Reunión Anual de la AIBIR

Hotel Plaza Diana, Guadalajara, Jalisco. Del 22 al 24 de mayo de 2017


Dra. Carmen Aceves Velasco
Secretaría


Dra. Maricela Luna
Presidente AIBIR