



UNIVERSIDAD  
NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
Carrera de Biología

**“Efectos agudos y subagudos del bloqueo del receptor  
de VIP, VPAC-1, sobre las funciones ováricas. La  
rata en Proestro como modelo de estudio”**

**Tesis**

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

**PRESENTA:**

Alma Angelica Salmoran Garcia

**Directora de tesis:**

Dra. Leticia Morales Ledesma

**Asesoras:**

Dra. Gabriela Rosas Gavilán

Dra. Elizabeth Vieyra Valdez

Investigación realizada gracias al Programa  
UNAM DGAPA- PAPIIT con clave IN 216519

Ciudad de México, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

# ÍNDICE

Páginas

<b>ABREVIATURAS</b> .....	i
<b>RESUMEN</b> .....	iii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	7
Histología del Ovario .....	7
Desarrollo Folicular .....	9
Ovulación y formación del Cuerpo Lúteo .....	14
Regulación Neuroendocrina del Desarrollo Folicular .....	16
Atresia Folicular .....	18
Ciclo Estral .....	20
Esteroidogénesis .....	23
Inervación Ovárica Intrínseca y Extrínseca .....	26
Péptido Intestinal Vasoactivo .....	28
Receptores VIPérgicos .....	30
Participación del VIP en la regulación de las Funciones Ováricas .....	32
Antagonista del receptor VPAC-1 .....	34
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	37
<b>HIPÓTESIS</b> .....	38
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	38
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	38
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	39
Diseño Experimental .....	39
Grupos Experimentales .....	40
Procedimiento de Autopsia .....	42
Ovulación .....	42
Cuantificación de Hormonas Esteroides en Suero .....	42
Morfología Ovárica y Desarrollo Folicular .....	43
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	44
<b>RESULTADOS</b> .....	45
Efectos agudos de la microinyección de agua inyectable o del antagonista de los receptores VPAC-1 en la bursa del ovario izquierdo o derecho de animales en proestro y sacrificados a los 60 minutos .....	45
Efectos subagudos de la microinyección de agua inyectable o del antagonista de los receptores VPAC-1 en la bursa del ovario izquierdo o derecho de animales en proestro y sacrificados al estro vaginal .....	48
<b>DISCUSIÓN</b> .....	58
<b>CONCLUSIONES</b> .....	69
<b>MODELO 1</b> .....	70
<b>MODELO 2</b> .....	72
<b>REFERENCIAS</b> .....	74

## *Agradecimientos*

A nuestra gran casa de estudios, la UNAM y en especial a la Facultad de estudios Superiores Zaragoza por haberme permitido formar parte de ella, al programa UNAM-DGAPA-PAPIIT No. IN 216519, por otorgarme la beca que me permitió concluir mis estudios.

A la Dra. Leticia Morales Ledesma por brindarme la gran oportunidad de formar parte de su laboratorio, por ser siempre tan paciente y haberme brindado sus conocimientos y apoyo durante todo este tiempo, que hicieron posible la realización de este trabajo.

A la Dra. Gaby por ser una gran persona, consejera y asesora, le agradezco enormemente por toda la paciencia y conocimientos que me ofreció durante todo este tiempo, que, no solo fueron para mejorar mi formación académica sino también para crecer como persona, es un gran ejemplo y motivación para mí, espero poder seguir aprendiendo aun más de usted.

A mi comité:

Dra. Lucila Álvarez Barrera

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dra. Gabriela Rosas Gavilán

Dra. Rosa Linares Culebro

Dra. Elizabeth Vieyra Valdez

Por haber brindado su valioso tiempo y conocimientos para mejorar este proyecto.

A las doctoras Azu, Andy y a mis compañeritos de laboratorio Karina, Fernanda, Adriana, Michelle, Paloma, Maya, Roberto, David, Otto, Diana, Gregorio por que el tiempo compartido con ustedes en laboratorio lo convirtió en un segundo hogar.

## *A ti Má*

No hay palabras que alcancen para agradecerle a la vida por la gran madre, persona, consejera y amiga que eres, que, sin importar la situación, sabes ver el lado bueno y que con una gran sonrisa, siempre me animas a luchar, por que mis sueños se vuelvan realidad, y gracias a todo tu esfuerzo hoy día, uno de los sueños que tanto hemos platicado se materializa.

## A ti *Pá*

Porque sin importar la distancia que pueda haber, siempre nos has demostrado que no hay nada más fuerte que nuestra propia determinación y entrega, siendo tú el mejor ejemplo, levantándote una y otra vez, haciendo que todo vaya para mejor y que con el tiempo, tu aguerrida personalidad se ha convertido en uno de mis más grandes motores de inspiración.

## A mi pequeño *gemelo*

Que desde tu llegada cambiaste mi pensar, mostrándome una nueva forma de ver la vida y, que con el paso del tiempo te convertiste en mi mejor confidente, amigo, y mi persona favorita, con la cual espero poder seguir compartiendo aún más momentos inolvidables y ser capaz de verte crecer aún más y llegar muy lejos, eres una personita muy talentosa, nunca dudes de ello.

## *Ena*

Me alegro de que por una inesperada confusión fui capaz de conocer la gran persona que eres, y que de ahí en adelante pudimos compartir un sin fin de aventuras, que, sin imaginar, nos convertiríamos en un gran apoyo el uno

para el otro, espero poder seguir aprendiendo de ti, compartir aún más aventuras,

*Leo*

Desde que nos conocimos has sido, eres y espero sigas siendo mi mejor amigo, no tienes idea lo mucho que me alegro de habernos conocido y compartir un sinfín de grandes charlas, de las cuales pude tomar los mejores consejos, espero que algún día no muy lejano pueda apoyarte tanto como tú lo has hecho conmigo.

¡¡¡**Tomas** Por ser el mejor kouhai que alguien puede tener, te deseo lo mejor para tu nueva aventura llamada tesis!!!!

A **Jess, Miry, Gili** por siempre ser grandes personas que tuve el placer de conocer durante la carrera y que me alegra poder considerarlas grandes amistades.

A mis pequeñas hermanitas menores de laboratorio **Mily y Litzy**, espero poder seguir aprendiendo de ustedes y poder compartir aún más momentos.

**Lunita** me alegro mucho ser capaz de llamarte amiga, eres una personita con una gran talento y carisma, que lograste animarme en los momentos que más lo necesitaba.

## ABREVIATURAS

**3 $\beta$ -HSD:** 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa

**17 $\alpha$ -HSD:** 17 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa

**17 $\beta$ -HSD:** 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa

**20 $\alpha$ -HSD:** 20 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa

**ACTH:** Hormona adenocorticotropa

**Ant:** Antagonista

**AMPc:** Monofosfato de adenosina cíclico

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**ATP:** Trifosfato de adenosín

**CGRP:** péptido relacionado con el gen que codifica a la calcitonina

**DHEA:** Dehidroepiandrosterona

**E:** Estro

**ERK:** Quinasa regulada por señales extracelulares

**FSH:** Hormona folículo estimulante

**OD:** Ovario derecho

**GCMS:** Ganglio celiaco mesentérico superior

**GLP:** Péptido similar al glucagón

**GnRH:** Hormona liberadora de las gonadotropinas

**GPCR:** Receptores acoplados a proteínas G

**GRF:** Factor liberador de la hormona del crecimiento

**hCG:** Hormona gonadotropina coriónica humana

**KL:** Ligando kit

**LH:** Hormona luteinizante

**NA:** Noradrenalina

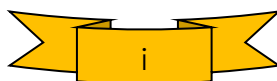
**NOS:** Nervio ovárico superior

**NPO:** Nervio del plexo ovárico

**NPY:** Neuropeptido Y

**NV:** Nervio vago

**OI:** Ovario izquierdo



**P:** Proestro

**PHM:** Péptido histidina-metionina

**P450<sub>scc</sub>:** Enzima citocromo P450 de escisión de la cadena lateral de colesterol

**PG97-269:** Antagonista de los receptores VPAC-1

**PACAP:** Polipéptido activador del adenilato ciclasa de la pituitaria

**PLC:** Fosfolipasa C

**PKA:** Proteína cinasa A

**PKC:** Proteína cinasa C

**REL:** Retículo endoplásmico liso

**SP:** Sustancia P

**STAR:** Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda

**TA:** Testigo absoluto

**Vh:** Vehículo

**VIP:** Péptido intestinal vasoactivo

**VPAC-1:** Receptor de VIP subtipo 1

**VPAC-2:** Receptor de VIP subtipo 2



## RESUMEN

El Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) es un neuropéptido que participa en la regulación del proceso de reproducción. En el ovario modula de manera estimulante el inicio del crecimiento folicular, la secreción de hormonas esteroides y eventos previos que culminan con la ovulación. Sus efectos biológicos son mediados a través de la unión del péptido a sus dos receptores, VPAC-1 y VPAC-2, que al igual que el VIP poseen una amplia distribución en el organismo. En el ovario, el receptor VPAC-1 tiene una mayor distribución que el VPAC-2, y que su expresión varía en función del día del ciclo estral.

Actualmente se desconocen las funciones específicas que ejerce el VIP en el ovario a través de la activación de cada uno de sus receptores. En el presente estudio se evaluó el papel del VIP en el animal cíclico en proestro sobre las funciones ováricas mediante el bloqueo selectivo de los receptores VPAC-1. Para ello se utilizaron ratas hembra adultas de la cepa CII-ZV de 60 días de edad que en el día del proestro fueron microinyectadas en la bursa del ovario izquierdo o derecho con 10  $\mu$ L de agua inyectable (Vh) o del antagonista selectivo de los receptores VPAC-1 (PG 97-269), a una concentración de 10 nM. Los animales fueron autopsiados a los 60 minutos de la cirugía o al presentar el estro vaginal inmediato. Como grupos de comparación se utilizaron animales testigo absoluto (TA) en proestro o estro.

En los animales sacrificados a los 60 minutos, la inyección del Vh en la bursa ovárica izquierda resultó en el aumento de la concentración de progesterona y testosterona en suero, mientras que al inyectar el Vh en la bursa derecha incremento la concentración de progesterona, testosterona y estradiol, respecto al TA. La inyección del antagonista de los receptores VPAC-1 en la bursa del ovario izquierdo resultó en una menor concentración de progesterona y testosterona, en comparación al grupo Vh; mientras que

la inyección en la bursa ovárica derecha disminuyó la de progesterona y estradiol.

En los animales sacrificados al estro, la inyección unilateral del Vh en la bursa ovárica resultó en el aumento de la masa ovárica y del peso del útero, en comparación al TA; mientras que la masa adrenal fue mayor cuando se administró el Vh en la bursa ovárica izquierda. En los animales con inyección del antagonista de los receptores VPAC-1 en la bursa ovárica derecha se observó un menor peso del útero respecto a su grupo Vh, así como un menor porcentaje de animales ovulantes y del número de ovocitos liberados respecto a su ovario contralateral.

La inyección del Vh en la bursa ovárica izquierda resultó en una mayor concentración de estradiol en suero, mientras que el mismo tratamiento en la bursa del ovario derecho incrementó la concentración de progesterona y testosterona en comparación al grupo TA. La inyección del antagonista de los receptores VPAC-1 en la bursa del ovario izquierdo disminuyó la concentración de progesterona, testosterona y estradiol, respecto al grupo Vh; mientras que, al inyectar el antagonista en la bursa del ovario derecho, la concentración de progesterona fue menor.

Los resultados del presente estudio muestran que el VIP, a través de la activación del receptor VPAC-1, regula de manera estimulante la secreción de progesterona en ambos ovarios, y de manera asimétrica la secreción de testosterona y estradiol, en función del tiempo de evolución entre el estímulo y la autopsia. Asimismo, muestran que el papel del VIP en el proceso de ovulación es asimétrico, siendo predominante en el ovario derecho, mediante la activación de los receptores VPAC-1.

# INTRODUCCIÓN

El ovario realiza dos funciones, la ovulación y la secreción de hormonas esteroideas. Ambas funciones se encuentran reguladas por dos vías: la neuroendocrina, a través de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Tresguerres, 2010) y la nerviosa, mediante señales nerviosas que llegan al ovario a través del nervio ovárico superior (NOS), el nervio del plexo ovárico (NPO) y el nervio vago (NV) (Dees y col., 1986; Dissen y Ojeda, 1999; Domínguez y Cruz-Morales, 2011).

Las fibras nerviosas que ingresan a los ovarios aportan diversos neurotransmisores que modulan las funciones ováricas, entre ellos, el péptido intestinal vasoactivo (VIP), un neuropéptido de 28 aminoácidos (Couvineau y Laburthe, 2012). El mayor aporte VIPérgico al ovario es de origen extrínseco e ingresa a la gónada principalmente por el NOS y en menor proporción a través del NV (Dees y col., 1986). Además, el VIP es sintetizado de manera local por las células de la granulosa del folículo ovárico (Hulshof y col., 1994).

Los efectos biológicos del VIP son mediados por la activación de dos receptores, el VPAC-1 y el VPAC-2 (Laburthe y col., 2007). En el ovario de ratas adultas, la expresión de los receptores VIPérgicos es asimétrica y varía en función del día del ciclo estral, donde, en comparación al ovario izquierdo, el derecho presenta una mayor expresión del receptor VPAC-1 en los días del diestro 2 y estro, y de VPAC-2 en el día del proestro. Asimismo, se ha observado que, en comparación a VPAC-2, el receptor VPAC-1 tiene una distribución más amplia en las estructuras del ovario, que el VPAC-2 (Ayala, 2017).

Por estudios *in vitro* se ha mostrado que en el ovario, el VIP estimula la ovulación (Schmidt y col., 1990) y la secreción de hormonas esteroides, mediante la activación de enzimas implicadas en la esteroidogénesis (Davoren y Hsueh, 1985; Ahmed y col., 1986; Tilly y Johnson, 1989). Bajo condiciones *in vivo* se ha mostrado que el VIP tiene efectos asimétricos sobre la secreción de hormonas esteroides que varían en función del día del ciclo estral (Rosas y col., 2015). Tales asimetrías ante el estímulo VIPérgico pudieran estar asociadas a las señales nerviosas que reciben los ovarios a través del NOS (Rosas y col., 2018) y a la expresión diferencial de los receptores (Ayala, 2017).

Actualmente se desconocen las funciones que ejerce el VIP a través de la activación específica de cada uno de sus receptores, por lo que en el presente estudio se analizó en el modelo de rata adulta cíclica en proestro, los efectos agudos (60 minutos) y subagudos (al estro inmediato) del VIP sobre las funciones ováricas, a través del bloqueo de los receptores VPAC-1 por la microinyección unilateral del antagonista específico PG 97-269 en la bursa ovárica.

# MARCO TEÓRICO

## Histología del Ovario

El ovario desempeña dos funciones, la producción de óvulos maduros y la secreción de hormonas esteroideas (estradiol, progesterona y testosterona) y proteicas (inhibina y activina) (Botella, 1995). En etapas tempranas del desarrollo, el ovario posee una superficie lisa que conforme avanza la edad reproductiva del animal, toma una textura rugosa debido al desarrollo folicular (Thews y col., 1983; Estrada y Uribe, 2002; Berne y Levy, 2006; Costanzo, 2011).

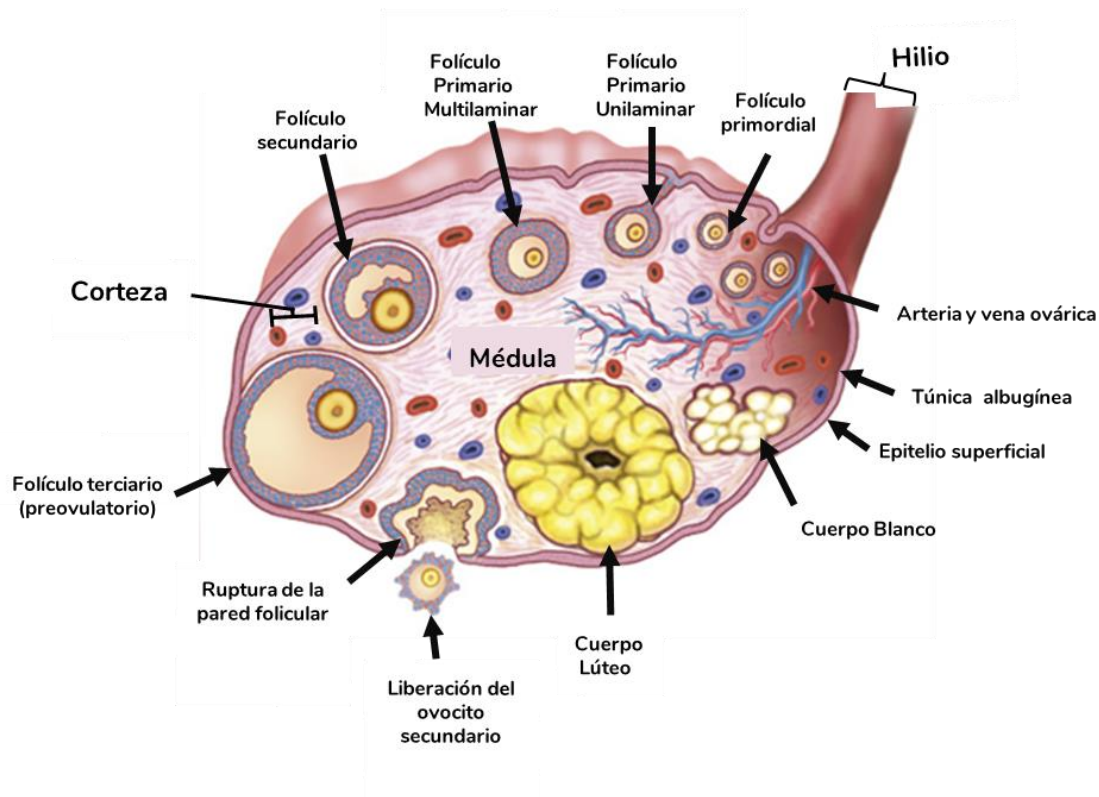
Los ovarios son órganos pares en forma de almendra, de color blanco rosáceo. Están situados en la cavidad pélvica, recubiertos por un pliegue del peritoneo, el mesoovario, que proporciona sostén, fijándolos a la superficie posterior del ligamento ancho (Thews y col., 1983; Estrada y Uribe, 2002). Están recubiertos por una capa de células cúbicas, el **epitelio superficial**, por debajo del cual se encuentra una capa de tejido conjuntivo denso, la **túnica albugínea**. En el ovario se pueden distinguir tres zonas (Figura 1): la corteza, la médula y el hilio (Ross y Pawlina, 2015).

La **corteza** es la zona externa del ovario y se encuentra tapizada por el epitelio superficial (Gartner y Hiatt, 2011; Ross y Pawlina, 2015). Está formada por una red de tejido conectivo llamada **estroma**, constituida por células fusiformes, fibras reticulares, células estomáticas y células fibroblásticas (Jabara y col., 2003). Las células del estroma proporcionan soporte estructural a los folículos y al cuerpo lúteo, además de que dan origen a las células de la teca (Inzunza y col., 2015). Asimismo, contiene **folículos** en diferentes estadios de maduración (Botella, 1995), al cuerpo lúteo y a la **glándula intersticial**. Esta última está formada por células epitelioides e

intersticiales que secretan andrógenos, principalmente testosterona y androstenediona (Botella, 1995; Kühnel, 2003).

La **médula** es la zona interna del ovario. Está formada por tejido conjuntivo laxo, células musculares, fibras nerviosas, así como vasos sanguíneos y linfáticos (Berne y Levy, 2006; Barret y col., 2013; Ross y Pawlina, 2015).

El **hilio** es la zona del ovario a través de la cual ingresan a la gónada vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. Está formado por tejido conectivo de sostén y por células estereidogénicas denominadas hiliares (Thews y col., 1983; Botella, 1995; Estrada y Uribe, 2002; Kühnel, 2003; Tresguerres, 2010; Gartner y Hiatt, 2011; Ross y Pawlina, 2015).



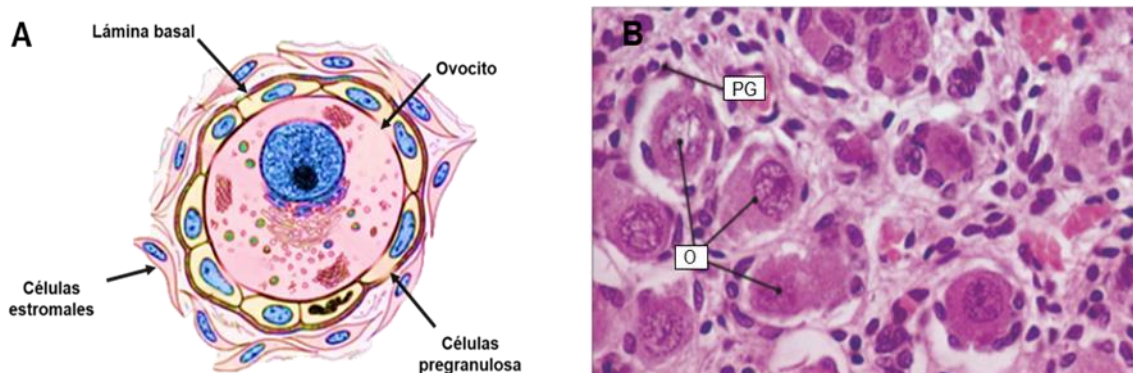
**Figura 1.** Estructura del ovario en la que se observa de manera secuencial el proceso de desarrollo folicular, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Tomado y modificado de Antonio, 2020).

## Desarrollo Folicular

El proceso de maduración de los ovocitos ocurre dentro de la corteza ovárica, en estructuras especializadas denominadas folículos, que están formados por un ovocito rodeado por células de la granulosa y la teca. Los folículos se encargan de proteger, nutrir y madurar al ovocito para el momento de la ovulación (Caracava y col., 2005). Al nacimiento, la mujer cuenta con aproximadamente 2 millones de folículos, de los cuales solo 400.000 folículos sobreviven hasta la pubertad y alrededor de 400 llegan a ser ovulados durante la vida reproductiva (Carlson, 2009). En la rata se ha descrito que al nacer, el ovario cuenta con aproximadamente 35,000 folículos que disminuyen conforme avanza la edad, siendo 11,000 a los 23 días de vida y alcanzan un valor de 6,000 a 7,000 después de la pubertad (Arai, 1920; Mulheron y col., 1989). El desarrollo folicular, comprende una serie de cambios morfológicos de los folículos, con base en los cuales se clasifican como:

### Folículos Primordiales

Son los folículos más abundantes del ovario. Se localizan en el estroma de la corteza, justo por debajo de la túnica albugínea (Comino y López, 2004).



**Figura 2.** Estructura esquemática (A) y fotomicrografía del folículo primordial (B), conformado por un ovocito (O) rodeado por células de la pregranulosa (Tomado y modificado de Ross y Pawlina, 2015; Stevens y Lowe, 2015).

Tras el inicio de la primera meiosis, el **ovocito primario**, queda detenido en la profase I (en la etapa de dictioteno en roedores y diploteno en humano) (Domínguez y col., 1991). En los folículos primordiales, el ovocito se encuentra rodeado por una capa de células epiteliales planas denominadas células foliculares o pregranulosas, alrededor de las cuales se encuentra la lámina basal que actúa como una barrera semipermeable que está en contacto con el estroma (Figura 2) (Moore y col., 2008; Carlson, 2009; Irving-Rogers y col., 2010; Inzunza y col., 2015; Ross y Pawlina, 2015).

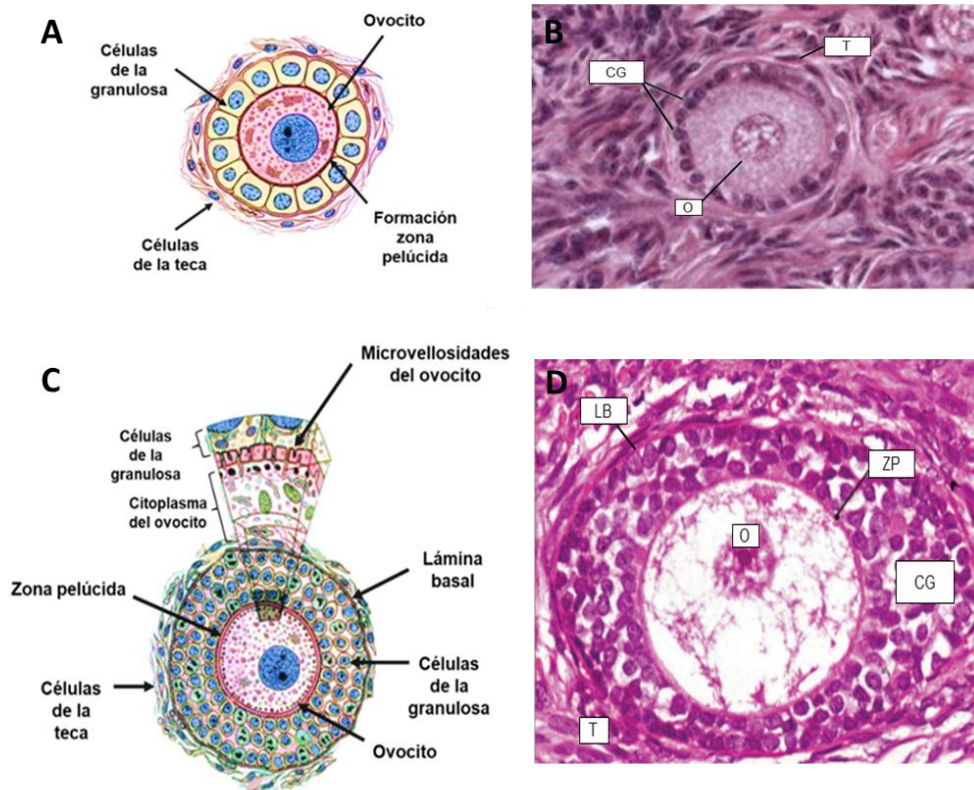
### **Folículos Primarios**

Son folículos que han iniciado su crecimiento. Se caracterizan por presentar un incremento en el tamaño del ovocito primario (Moore y col., 2008). Las células pregranulosas se tornan cuboidales y dan origen a las **células de la granulosa**, que comienzan a proliferar (Moore y col., 2008). De acuerdo con el número de capas de células de la granulosa que los conforma, los folículos primarios pueden ser clasificados como **unilaminares**, con una sola capa de células de la granulosa (Figura 3A) o **multilaminares**, con dos a 3 capas (Figura 3B) (Ross y Pawlina, 2015).

En esta etapa del desarrollo folicular, el ovocito es rodeado por la **zona pelúcida**, una membrana prominente, traslúcida, acidófila y retráctil compuesta por material glucoproteico, acelular y amorfo. El ovocito y las células de la granulosa establecen comunicación mediante microvellosidades y uniones nexo que permiten el intercambio de aminoácidos y metabolitos de la glucosa, necesarios para el crecimiento del ovocito. Las células de la granulosa secretan un factor inhibidor de la meiosis, responsable de mantener el primer bloqueo de la meiosis al ovocito (Moore y col., 2008).



Las células del estroma circundante comienzan a agruparse en capas concéntricas alrededor del folículo primario, formando la **teca folicular** (Ross y Pawlina, 2015).



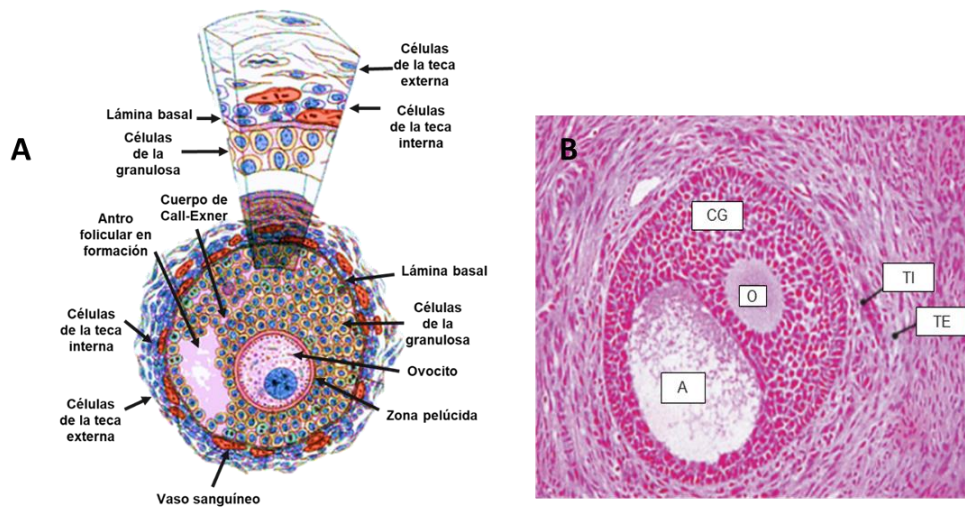
**Figura 3.** Representación esquemática y fotomicrografías del folículo primario unilaminar (A y B) y multilaminar (C y D) donde se observan estructuras como el ovocito (O), zona pelúcida (ZP), células de la granulosa (CG), células de la teca (T) y la lámina basal (LB) (Tomado y modificado de Ross y Pawlina, 2015; Syevens y Lowe, 2015).

### Folículos Secundarios

Las células de la granulosa proliferan hasta alcanzar de 6 a 12 capas, entre las cuales comienzan a formarse cavidades que reciben el nombre de cuerpos de Call-Exner. Estas cavidades contienen líquido folicular formado

por sustancias procedentes del plasma (proteínas y electrolitos), mucopolisacáridos, hialuronatos, hormonas gonadotrópicas, esteroideas. Parte de estas sustancias provienen de las secreciones granulares, cuya función es brindar nutrientes al ovocito y a las células de la granulosa (Carlson, 2009; Ross y Pawlina, 2015).

En esta etapa del desarrollo folicular, la teca se diferencia en dos capas (Figura 4): la **teca interna**, que posee células globosas, abundantes mitocondrias y un retículo endoplásmico liso prominente, que les confiere a estas células su capacidad de síntesis de hormonas esteroideas (Inzunza y col., 2015); y la **teca externa**, constituida por células de tejido conjuntivo, células musculares lisas y haces de fibras colágenas (Ross y Pawlina, 2015; Inzunza y col., 2015).



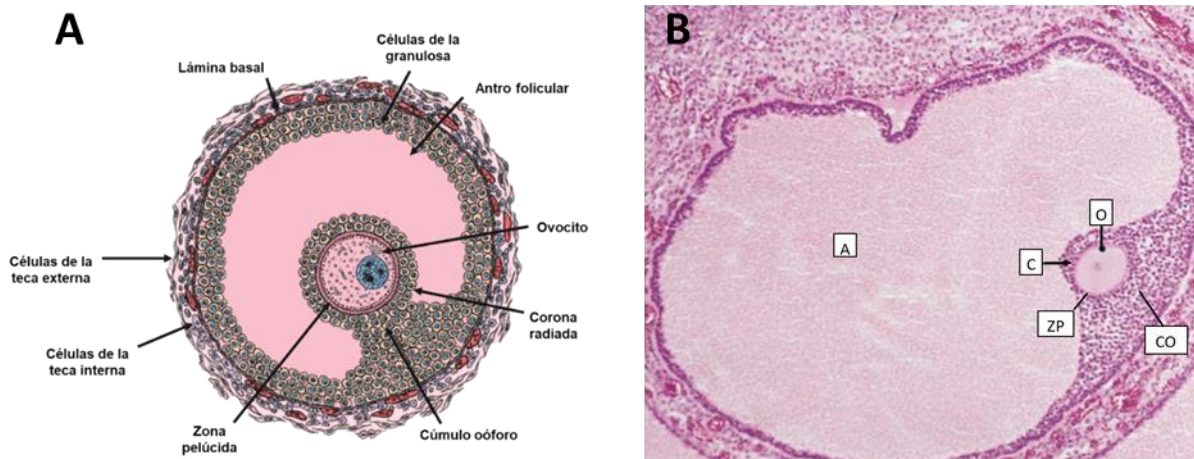
**Figura 4.** Estructura esquemática del folículo secundario (A) y fotomicrografía (B), donde se observa el ovocito (O), la cavidad antral (A), células de la granulosa y de la teca interna (TI) y externa (TE) (Tomado y modificado de Ross y Pawlina, 2015; Stevens y Lowe, 2015).

### Folículos Terciarios

Se caracteriza por la presencia de una cavidad en forma de semi luna denominada antro folicular (Figura 5). Tras el estímulo de la LH, el ovocito

primario completa la primera meiosis e inicia la segunda división meiótica, momento a partir del cual recibe el nombre de ovocito secundario, que ocupa una posición excéntrica dentro del folículo (Ross y Pawlina, 2015).

Proyectado dentro del antro, se forma un montículo de células de la granulosa denominado disco prolífero o **cúmulo oóforo**, que mantiene unido al ovocito secundario al resto del estrato granuloso, el cual estará presente hasta el momento de la ovulación. Las células del cúmulo oóforo que rodean al ovocito forman la **corona radiada** que contiene microvellosidades que penetran por la zona pelúcida, y brindan comunicación y transporte de nutrientes al ovocito (Figura 5) (Ross y Pawlina, 2015).



**Figura 5.** Estructura esquemática (A) y fotomicrografía del folículo terciario formado por un ovocito (O), la zona pelúcida (ZP), la corona radiada (C), el cúmulo oóforo (CO) y el antro folicular (Tomado y modificado de Tresguerres, 2010; Ross y Pawlina, 2015; Stevens y Lowe, 2015).

Se forma una prominencia en la superficie del ovario, denominada estigma, lugar donde se lleva a cabo la ruptura del folículo (Arce y col., 2006; Berne y Levy, 2006; Freeman, 2006; Ross y Pawlina, 2015).

## Ovulación y formación del Cuerpo Lúteo

La ovulación es el evento final del desarrollo folicular, que culmina con la ruptura del folículo terciario y la liberación del ovocito secundario (Berne y Levy, 2006; Tresguerres, 2010).

Este proceso se inicia por las elevadas concentraciones de estradiol que ejercen una retroalimentación positiva sobre el hipotálamo, donde estimulan una mayor secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). En consecuencia, incrementa la secreción de LH, que desencadena una serie de eventos en el folículo preovulatorio:

- ❖ El ovocito primario concluye su primera división meiótica e inicia la segunda meiosis, dando paso al ovocito secundario, que queda detenido en metafase II. La segunda división meiótica se concluye únicamente en caso de ocurrir la fecundación (Botella, 1995; Berne y Levy, 2006; Freeman, 2006).
- ❖ Incrementa el **activador del plasminógeno**, que cataliza la conversión de plasminógeno en plasmina, enzima proteolítica que actúa sobre el tejido conjuntivo de la teca y es capaz de degradar la membrana basal (Berne y Levy, 2006; Freeman, 2006; Moore y col., 2008).
- ❖ El ovocito junto con la corona radiada, se desprenden de la pared folicular y flotan en el antro (Berne y Levy, 2006; Freeman, 2006; Moore y col., 2008).
- ❖ Se eleva la secreción de colagenasas, capaces de producir degradación en las fibras colágenas que rodean al folículo (Berne y Levy, 2006; Freeman, 2006).
- ❖ Aumentan las concentraciones de prostaglandinas que inician una reacción inflamatoria local y contracciones en la pared del ovario, lo que facilita la ruptura de la pared folicular (Berne y Levy, 2006; Freeman, 2006; Levine, 2015).

En conjunto, estos eventos facilitan la ruptura de la pared folicular, la expulsión del ovocito y el colapso de la cavidad antral, que se llena de sangre extravasada. Además, ocurre una invasión de yemas capilares tejido conectivo procedente de la teca interna hacia las células de la granulosa, las cuales comienzan a proliferar e hipertrofiarse (Inzunza y col., 2015; Levine, 2015).

Posteriormente se forma el **cuerpo lúteo**, proceso durante el cual las células de la granulosa y de la teca del folículo remanente son luteinizadas por acción de la LH, dando lugar a la formación de las células granuloso-luteínicas y las teco-luteínicas. Estas células, contienen grandes inclusiones lipídicas como fuente para la síntesis de hormonas esteroideas, que secretan progesterona y en menores concentraciones estrógenos. Las células del cuerpo lúteo poseen una disposición en líneas radiales, separadas por septos que contienen vasos sanguíneos (Botella, 1995; Inzunza y col., 2015).

En especies mono-ovulantes como la mujer, con cada ovulación se forma un solo cuerpo lúteo, mientras que, en animales poli-ovulantes como los roedores, se desarrollan múltiples cuerpos lúteos (Caracava y col., 2005).

En caso de no ocurrir la fertilización del ovocito secundario, el cuerpo lúteo degenera y comienza a involucionar. En la rata, en caso de no ocurrir la fertilización, el cuerpo lúteo degenera 2 días después de la ovulación (Freeman, 2006), mientras que en la mujer este evento ocurre a los 14 días (Garther y Hiatt, 2011).

Los fibroblastos de la teca interna forman un tabique fibroso que ocupan el espacio de las células involucionadas, formando una masa ovalada, pobre en células, denominada **cuerpo blanco o albicans**, que permanece indefinidamente en el ovario (Inzunza y col., 2015).

Cuando ocurre la fertilización del ovocito, el embrión se implanta en el endometrio, y comienza a secretar la gonadotropina coriónica humana (hCG), hormona que evita la degeneración del cuerpo lúteo y que estimula en él, la secreción de progesterona y estradiol durante los dos primeros meses de embarazo en la mujer, y de 12 a 14 días en la rata; posteriormente la función del cuerpo lúteo es retomada por la placenta (Greep, 1981; Botella, 1995; Freeman, 2006; Carlson, 2009).

### **Regulación Neuroendocrina del Desarrollo Folicular**

Las funciones ováricas son reguladas por una serie de señales hormonales y nerviosas que recibe el ovario. El inicio del crecimiento folicular es independiente del estímulo gonadotrópico (Domínguez y col., 1991). En la mujer, este evento se inicia en la vida fetal, durante los primeros 3 meses de gestación, a diferencia de la rata, donde ocurre en los primeros días de vida posnatal, tiempo durante el cual se forman las ovogonias, seguido del ensamblaje y formación de los folículos primordiales (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Domínguez y col., 1991; Carlson, 2009). La activación de los folículos primordiales ocurre en respuesta a estímulos con péptidos como el VIP y factores de crecimiento como: el factor de fibroblastos, el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el factor inhibidor de leucemia (Zhang y Liu, 2015; Li y col., 2019).

Los folículos permanecen latentes hasta la pubertad, donde ocurren una serie de cambios como la maduración y activación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Casanueva y Vázquez, 1995; Berne y Levy, 2006).

Las neuronas provenientes del hipotálamo secretan diversos factores inhibidores o liberadores de hormonas. Entre ellos se encuentra la GnRH,



secretada de manera pulsátil, desde neuronas hipotalámicas hacia los capilares del sistema porta-hipofisario (Berne y Levy, 2006). La frecuencia de los pulsos de liberación de la GnRH en la mujer es mayor en la etapa folicular (un pulso cada 60-90 minutos) que en la lútea (un pulso cada 2-4 horas en la fase media y 8-12 horas en la fase tardía). La GnRH ingresa a la adenohipófisis donde estimula a los gonadotropos que secretan: la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), denominadas como gonadotropinas. Ante una mayor frecuencia de los pulsos de secreción de la GnRH, incrementa la liberación de LH, mientras que, al disminuir los pulsos de GnRH, se estimula una mayor secreción de FSH (Ronald y Moenter, 2014).

En la etapa folicular incrementan las concentraciones de FSH y de estrógenos que, en conjunto, estimulan el crecimiento y proliferación en las células de la granulosa y la formación de receptores a FSH (Domínguez y col., 1991). El desarrollo de los folículos genera un incremento en las concentraciones de estradiol lo que desencadena los picos de LH, que conllevan a la ovulación de los folículos preovulatorios.

La síntesis de gonadotropinas es regulada por medio de un mecanismo homeostático, conocido como retroalimentación positiva o negativa (Estrada y Uribe, 2002; Costanzo, 2011; Raff y Levitzky, 2013):

- ❖ **La retroalimentación positiva** se caracteriza por bajas concentraciones de estradiol que al actuar a nivel hipofisario (asa corta) e hipotalámico (asa larga), tienen un efecto estimulante sobre la síntesis de gonadotropinas o GnRH respectivamente.
- ❖ **La retroalimentación negativa** se caracteriza por altas concentraciones de estradiol, progesterona e inhibina que ejercen un efecto inhibitorio sobre la síntesis de gonadotropinas o de GnRH.

## Atresia Folicular

La atresia se define como un proceso normal por medio del cual son eliminados del ovario los folículos que, habiendo iniciado el proceso de crecimiento y diferenciación, no ovulan (Domínguez y col., 1991). Se presenta en cualquier etapa del desarrollo folicular, desde la vida fetal, prepúber, puberal y adulta. En mujeres, alrededor del 99 % de los folículos serán atrésicos (Gartner y Hiatt, 2007; Ross y Pawlina, 2015) mientras que, en otras especies de mamíferos, el rango de folículos atrésicos es del 70 - 99.9 % (Byskov, 1978).

El inicio de la atresia parece estar determinado por alteraciones en el ovocito, el cual pierde la capacidad para mantener el control metabólico. Además, las células de la granulosa pierden de manera gradual los receptores a gonadotropinas, lo que reduce su capacidad de aromatización de los andrógenos y, en consecuencia, se incrementa la concentración de estos dentro y alrededor del folículo (Domínguez y col., 1991).

Con base en las características morfológica que presentan los folículos (Hsueh y col., 1994; Braw y Tsafri, 1980), el grado de atresia se clasifica en:

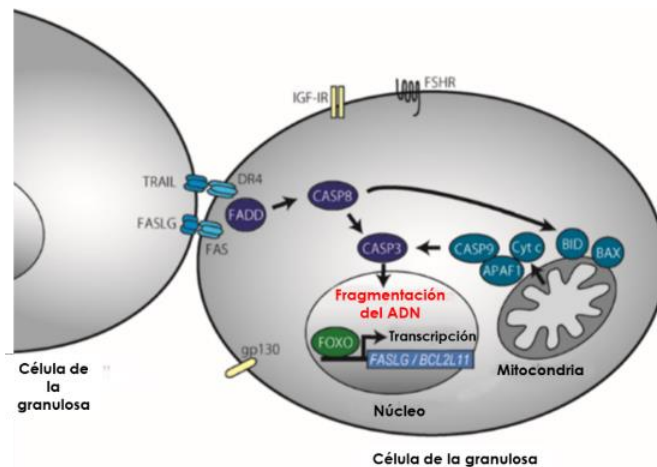
- ❖ **Estadio I.** Los folículos poseen menos del 10% de células de la granulosa con núcleos picnóticos (tinción irregular por la fragmentación del material genético) (Oliver y col., 1999), mientras que el resto de las células presentan mitosis (Hsueh y col., 1994).
- ❖ **Estadio II.** Incrementa el número de células de la granulosa picnóticas (10-30%), disminuye su mitosis y algunas se encuentran descamadas en el antro folicular (Hsueh y col., 1994).



- ❖ **Estadio III.** Disminuye el número de células de la granulosa, no se observa mitosis y las células de la teca se hipertrofian (Hsueh y col., 1994).

La atresia folicular es un mecanismo continuo, mediado por la **apoptosis** (muerte celular programada) de las células de la granulosa, durante la cual, se activan una serie de factores moleculares inmersos en dos vías de señalización (Flores y col., 2004):

1. **La vía extracelular:** se activa por las señales de muerte o por la falta de las señales de supervivencia (Figura 6), lo que disminuye el contacto entre las células de la granulosa y se estimula la unión del ligando FASL a su receptor FAS (denominado receptor de muerte), que activa la fosforilación y unión a la proteína adaptadora FADD. En consecuencia, se activan las caspasas 8 y 3 que inducen la fragmentación del ADN y la supresión del gen BCL2 (factor anti-apoptótico (Matsuda y col., 2012).



**Figura 6.** Mecanismo de activación de las vías extracelular (en morado) e intracelular (en azul) de la apoptosis de las células de la granulosa (Tomado de Matsuda y col., 2012).

2. **La vía intracelular:** se lleva a cabo en la mitocondria por la activación de BID y BAX (proteínas pro-apoptóticas), que promueven la liberación

del citocromo C al exterior de la mitocondria y forman un complejo activador de proteasa (APAF1), permitiendo la activación de la caspasa 9, encargada de fosforilar a la caspasa 3, que induce la fragmentación del ADN (Figura 6) (Matsuda y col., 2012).

La supervivencia celular depende de las señales que llegan al ovario (Alberts y col., 2010). Existen diferentes señales que inhiben el proceso de apoptosis en la gónada, tales como: las **gonadotropinas**, que estimulan el crecimiento y maduración de los folículos; los **estrógenos**, que aumentan el número de receptores a gonadotropinas y estimulan la proliferación celular; además de algunos factores como el factor de queratinocitos, el factor de crecimiento fibroblástico (FCF) y la vitamina C (Tilly y col., 1992; Billig y col., 1993; Murray y col., 2001).

La muerte celular puede ocurrir en respuesta a una serie de señales como: las altas concentraciones de **andrógenos** o de **progesterona**, que puede inhibir la proliferación en las células de la granulosa; la disminución de los receptores de gonadotropinas, que conllevan a una menor aromatización de estrógenos y a un incremento en la concentración de andrógenos; la expresión de las proteínas BID y BAX; la unión de FASL a su receptor FAS; así como la acumulación de **radicales libres** que estimulan la expresión del **gen p53**, que irrumpe el ciclo celular y resulta en la apoptosis (Markstrom y col., 2002; Flores y col., 2004; Noack y col., 2008).

## Ciclo Estral

El ciclo estral se define como el intervalo de tiempo existente entre los inicios de cada período de celo. La duración del ciclo difiere de una especie a otra, que, para el caso de la rata, tiene una duración de 4 a 5 días. El ciclo

estral resulta de una serie de cambios hormonales y se acompaña de cambios citológicos y conductuales característicos de cada etapa. Comprende cuatro etapas (Caravaca y col., 2005):

**Proestro:** Tiene una duración de 12 a 14 horas. Conforme ocurre el desarrollo folicular disminuye la concentración de progesterona, incrementa la concentración de LH, FSH y de estrógenos, que prepararan al endometrio para la posible implantación del cigoto (Figura 7). Los cuerpos lúteos a menudo se encuentran en regresión. El pH vaginal es de 5.4 y la citología de la vagina se caracteriza por la presencia de células epiteliales nucleadas (Marcondes y col., 2002; Caracava y col., 2005).

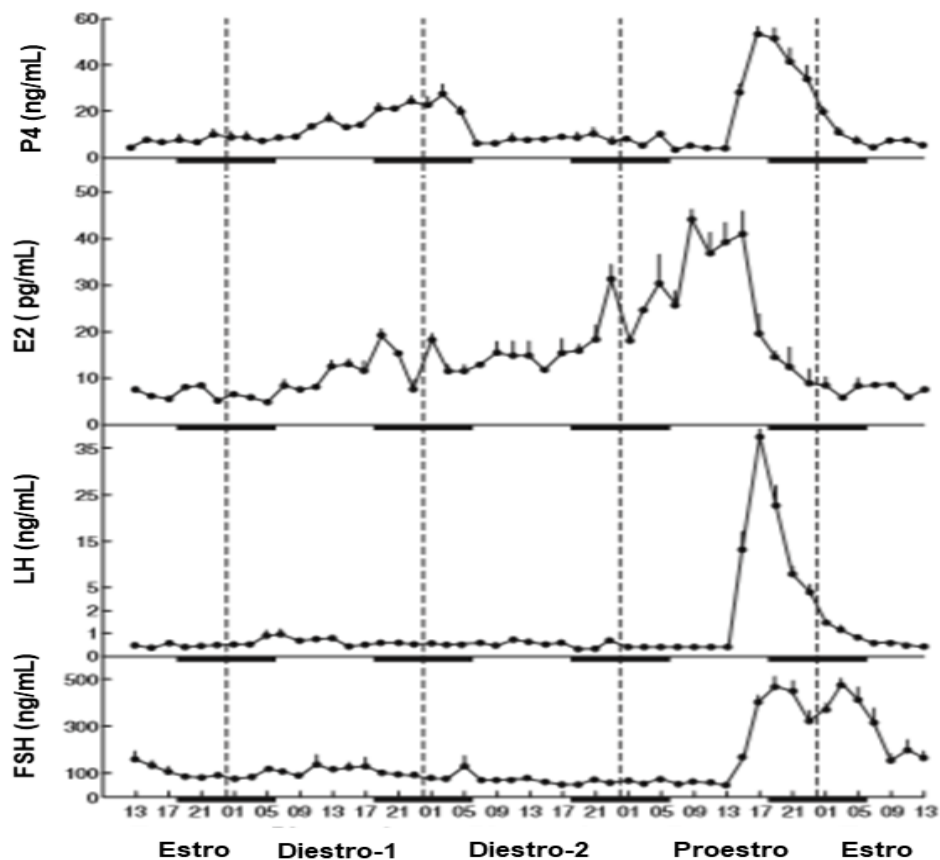
**Estro:** Tiene una duración de 25 a 27 horas. La secreción de estradiol regresa a concentraciones basales y se presenta el segundo pico de FSH, responsable de estimular el desarrollo folicular (Figura 7) (Freeman, 2006; Levine, 2015). En el útero se inicia la necrosis del epitelio de revestimiento, seguido de la perdida de actividad mitótica y de la infiltración de leucocitos. La vagina presenta un pH de 4.2, con células epiteliales cornificadas, debido al desprendimiento del epitelio vaginal (Caracava y col., 2005; Westwood, 2008).

Esta es la etapa de receptividad sexual de la hembra, caracterizada por tres componentes (Caracava y col., 2005; Levine, 2015):

- 1) **Atractividad:** Comprende los cambios fisiológicos que experimenta la hembra, que la hacen más atractiva al macho, tales como la coloración en la región perigenital y la emisión de feromonas.
- 2) **Propioceptividad:** involucra las conductas de brincoteo, arrancones, movimientos rápidos de la cabeza, denominado *orejeo*; además de que se observa un patrón de acercamiento y alejamiento denominado *pacing*.

**3) Receptividad:** es la fase consumatoria del apareamiento, durante la cual, la hembra muestra una conducta de lordosis, es decir, arquea el lomo, desvía la cola y permanece inmóvil para facilitar la monta y la cópula.

**Diestro 1 (Metaestro):** Dura de 6 a 8 horas y corresponde al período de crecimiento del cuerpo lúteo, responsable del incremento de progesterona (Figura 7) (Freeman, 2006). El epitelio endometrial uterino muestra regresión, sin embargo, se reactiva la mitosis (Caracava y col., 2005). El frotis vaginal presenta leucocitos con algunas células cornificadas y células basófilas (Westwood, 2008).



**Figura 7.** Representación esquemática de los cambios hormonales durante el ciclo estral de la rata. La barra negra representa el intervalo de oscuridad. P4: Progesterona; E2: Estradiol; LH: Hormona luteinizante; FSH: Hormona folículo estimulante (Tomado y modificado de Freeman, 2006).

**Diestro 2:** Es la etapa más larga del ciclo estral, con una duración de 55 a 57 horas y corresponde al período de inactividad sexual, en el cual comienzan a incrementar las concentraciones de estradiol (Figura 7) (Freeman, 2006). Esta etapa comprende desde la madurez del cuerpo lúteo hasta su regresión. El útero es pequeño y los cuernos carecen de vasculatura prominente. El pH vaginal es de 6.1 y en el frotis vaginal se observa moco con leucocitos acompañados por células epiteliales nucleadas (Caracava y col., 2005).

## Esteroidogénesis

La esteroidogénesis es el proceso de síntesis de hormonas esteroideas, las cuales se clasifican en: **esteroides sexuales** (progesterona, andrógenos y estrógenos), **glucocorticoides** (cortisol) y **mineralocorticoides** (aldosterona). Las hormonas esteroideas derivan de la molécula del colesterol y se caracterizan por ser liposolubles, lo que les permite pasar fácilmente a través de las membranas celulares y citoplasmáticas (Silverthorn, 2008). En el ovario, las fuentes de colesterol son (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Sánchez-Criado, 1999):

- ❖ La sangre, principalmente en forma de lipoproteínas circulantes.
- ❖ Los ésteres de colesterol, almacenados en gotas lipídicas.
- ❖ El sintetizado de novo en células ováricas, a partir de acetilcoenzima A.

En el ovario se secretan principalmente progesterona y estradiol, y en menor concentración androstenediona, testosterona y estrona. Su mayor aporte proviene de los folículos y cuerpos lúteos. En los folículos, la síntesis de

hormonas esteroideas comprende la participación de las células de la teca y de la granulosa (Tresguerres, 2010).

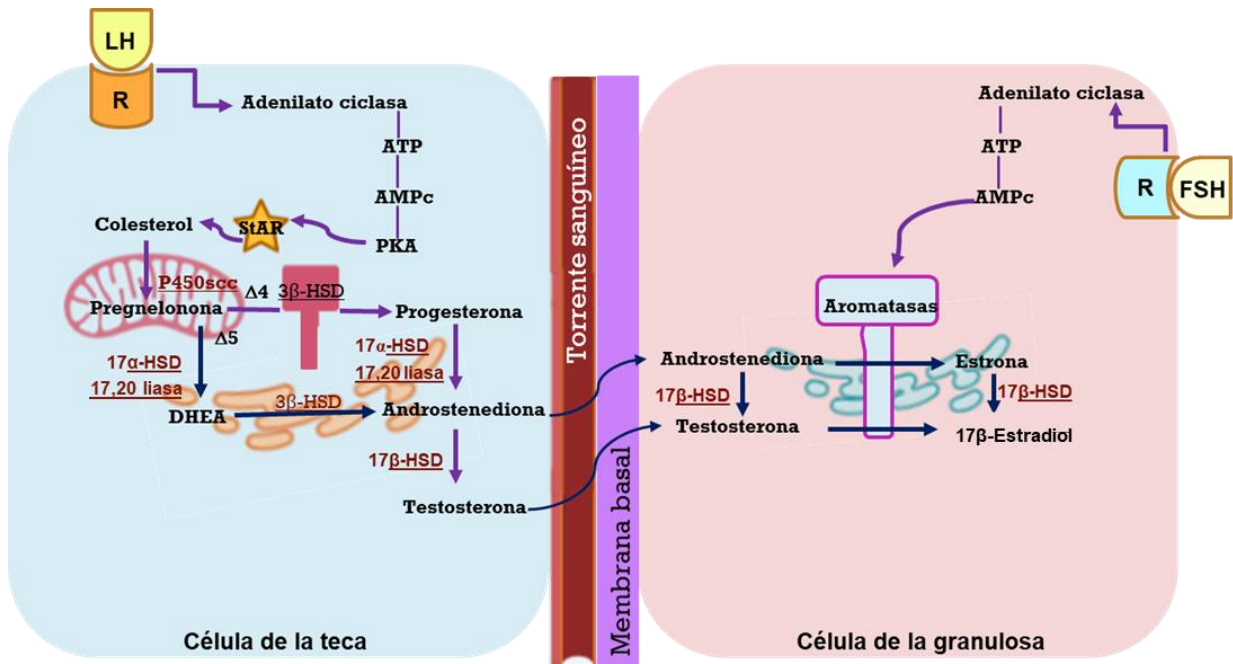
En las células de la teca, la unión de la LH a su receptor desencadena una cascada de señalización que conlleva a la activación de la enzima adenilato ciclasa que convierte el trifosfato de adenosina (ATP) en monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), el cual estimula la fosforilación de la proteína cinasa A (PKA) (Figura 8) (Silverthorn, 2008). La PKA, activa a la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR), encargada de internalizar el colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la interna (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Sánchez-Criado, 1999).

Una vez internalizado el colesterol, se activa el complejo enzimático que escinde la cadena lateral del colesterol, el P450<sub>scc</sub>. Para ello, se llevan a cabo tres reacciones consecutivas y por cada ciclo de reacción se consume una molécula de NADPH y una de oxígeno, con lo que se obtiene de manera secuencial 20 hidroxil-colesterol, 22 hidroxil-colesterol y finalmente pregnenolona, una molécula de 21 carbonos que sale de la mitocondria e ingresa al retículo endoplásmico liso (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Miller y Auchus, 2011). La pregnenolona puede seguir dos rutas metabólicas alternas (Figura 8):

La **vía  $\Delta$ -4**: la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD) transforma la pregnenolona en progesterona, que por acción de la 17 $\alpha$ -hidroxilasa se transforma en 17  $\alpha$ -hidroxiprogesterona, la cual se convierte en androstenediona por acción de la 17, 20 liasa (Yen, 2001). Esta vía ocurre principalmente en estructuras como el cuerpo lúteo y la placenta (Tresguerres, 2010).

La **vía  $\Delta$ -5**: la 17 $\alpha$ -hidroxilasa convierte la pregnenolona en 17  $\alpha$ -hidroxipregnenolona y posteriormente la 17,20 liasa, la transforma en

dehidropiandrosterona (DHEA), que por acción de la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 $\beta$ -HSD) es convertida en testosterona. Esta ruta se lleva a cabo primordialmente en células de la teca (Yen, 2001; Miller y Auchus, 2011).



**Figura 8.** Biosíntesis de hormonas esteroides en las células de la granulosa y de la teca. LH: hormona luteinizante; R: receptor; ATP: trifosfato de adenosina; AMPc: Monofosfato de adenosina cíclico; PKA: proteína cinasa A; StAR: proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda; P450scc: citocromo P450 de escisión de la cadena lateral de colesterol; 3 $\beta$ -HSD: 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 17 $\alpha$ -HSD: 17 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa; DHEA: dehidroepiandrosterona; 17 $\beta$ -HSD: 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa; FSH: hormona folículo estimulante (Tomado y modificado de Tresguerres, 2010).

La androstenediona y testosterona difunden de las células de la teca a las células de la granulosa, atravesando la membrana basal. Las células de la granulosa poseen receptores de FSH (Domínguez y col., 1991). Cuando la FSH se une a su receptor, se activa el adenilato ciclasa e incrementa la producción de AMPc y la fosforilación de la PKA, que activa a las aromatasas, enzimas encargadas de transformar el anillo aromático A de la androstenediona y la testosterona, en un anillo bencénico con tres dobles

enlaces, lo que resulta en la síntesis de estrona y estradiol, respectivamente (Gore-Langton y Armstrong, 1994).

## **Inervación Ovárica Intrínseca y Extrínseca**

La inervación del ovario participa en la modulación de las funciones de la gónada. De acuerdo con el origen de sus fibras, la inervación ovárica se clasifica en (Dissen y Ojeda, 1999, D'Albora y col., 2000):

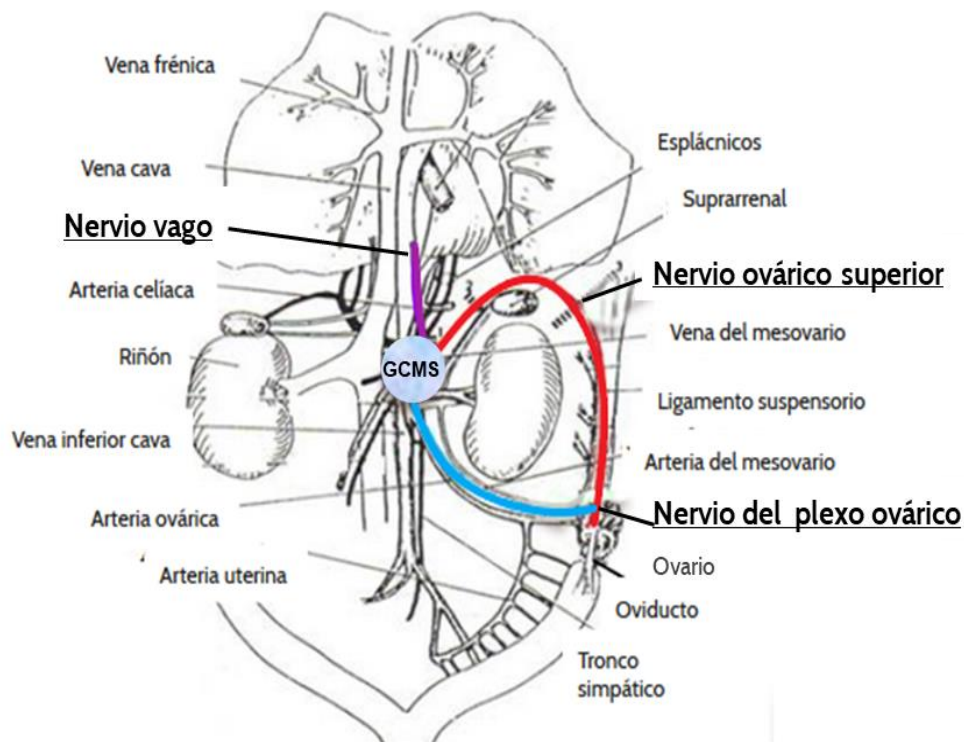
**Inervación intrínseca.** Está formada por un conjunto de neuronas intraováricas. Fueron observadas por primera vez en el mono, donde se describieron como pequeñas neuronas que expresan receptores al factor de crecimiento nervioso de baja afinidad, el p75, el cual reconoce a todos los miembros de las neurotrofinas. En roedores se ha descrito que la presencia de inervación intrínseca depende de la cepa. En ratas de la cepa Wistar, se detectaron neuronas intraováricas en estructuras como el hilio, el mesoovario, la corteza y la médula ovárica, a diferencia de lo observado en ratas de la cepa Long Evans y Sprague-Dawley, donde no fueron identificadas (D'Albora y col., 2000; Ojeda y Skinner, 2006). De acuerdo con D'Albora y colaboradores (2000), la presencia de este tipo de inervación en la cepa Wistar puede ser indicativo de una característica evolutiva de la especie.

**Inervación extrínseca.** Se conforma de neuronas cuyos somas se localizan por fuera del ovario (Figura 9). Sus fibras son de naturaleza simpática, parasimpática y sensorial, e ingresan al ovario a través de tres paquetes nerviosos (Dissen y Ojeda, 1999):

- ❖ **El nervio ovárico superior (NOS).** La inervación simpática del ovario se origina en los segmentos torácicos 11 a lumbar 4 de la médula espinal y hace sinapsis en el ganglio celiaco mesentérico superior (GCMS). Los



somas de las neuronas del NOS, corren a lo largo del ligamento suspensorio e inervan vasos sanguíneos, folículos y se distribuyen en el tejido intersticial. Sus fibras son de naturaleza simpática y liberan al ovario neurotransmisores como la noradrenalina (NA), el neuropéptido Y (NPY) y el (VIP) (Lawrence y Burden, 1980; Burden, 1985; Dissen y Ojeda, 1999).



**Figura 9.** Inervación extrínseca del ovario. GCMS: ganglio celiaco-mesentérico superior (Tomado y modificado de Lawrence y Burden, 1980).

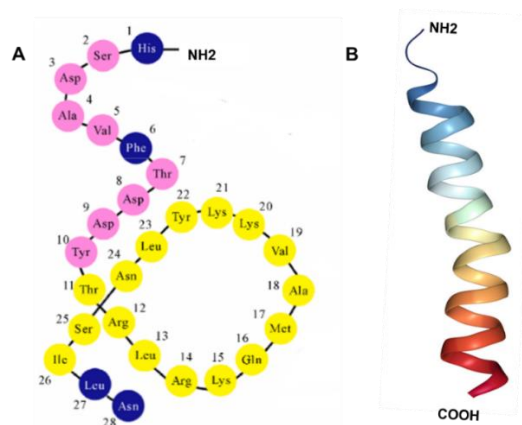
- ❖ **El nervio del plexo ovárico (NPO).** Sus fibras provienen del segmento torácico caudal (T9-T11) y el segmento lumbar craneal (L2-L4) de la médula espinal, y establece sinapsis en el GCMS. Viaja a lo largo de la arteria ovárica e inerva los vasos sanguíneos del ovario y los cuernos uterinos. El NPO es un nervio mixto que está conformado principalmente por fibras de naturaleza sensorial, que libera al ovario sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen que codifica a la

calcitonina (CGRP); y en menor proporción, fibras de naturaleza simpática que liberan NA y NPY al ovario (Burden y Lawrence, 1977; Baljet y Drukker, 1979; Botella, 1995).

❖ **El nervio vago (NV).** Las fibras que inervan al ovario se originan en el ganglio nodoso y en células ganglionares ubicadas en la raíz dorsal de los segmentos T10 a L2 de la médula espinal. Aporta al ovario fibras de naturaleza parasimpática, y en menor proporción fibras motoras y sensoriales. Secreta acetilcolina (ACh), SP, NPY, VIP, gastrina y somatostatina (Burden y col., 1983).

### Péptido Intestinal Vasoactivo

El VIP es un neuropéptido de 28 aminoácidos, con un pH básico debido a la presencia de varios aminoácidos de arginina y lisina. Posee una estructura en espiral en la porción N-terminal, fundamental para la interacción con su receptor, y una sección alfa hélice en la región C-terminal (Figura 10) (Fahrenkrug y col., 1977; Neumann y col., 2008; Umetsu y col., 2011).



**Figura 10.** Composición aminoacídica del VIP (A) y su representación gráfica en 3D (B) (Igarashi y col., 2002; Umetsu y col., 2011).

El nombre del VIP deriva de sus efectos vasodilatadores y de que fue aislado por primera vez del duodeno porcino (Said y Mutt, 1970). El VIP posee una distribución extensa en el sistema nervioso central y periférico, ejerce un efecto neuromodulador sobre funciones como el ciclo circadiano, el metabolismo y la respuesta inmune, además de que participa en la liberación de hormonas y en la regulación de los sistemas cardiovascular, respiratorio, digestivo y reproductivo (Said, 1986; Vertongen y col., 1997; Chul y col., 2010; Couvineau y Laburthe, 2011; 2012).

El VIP pertenece a la familia de los péptidos de la secretina (Cuadro 1), formada por péptidos de 27 a 44 aminoácidos, que comparten homologías estructurales entre sí, entre los que se encuentran: el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP), el péptido histidina-metionina (PHM), secretina, glucagón, el factor liberador de la hormona de crecimiento (GRF) y el péptido similar a glucagón 1 y 2 (GLP-1 y GLP-2) (Said, 1991; Couvineau y Laburthe, 2012).

Homología (%)	Péptidos	Secuencia de aminoácidos												
		.... 5	.... 10	.... 15	.... 20	.... 25	.... 30	.... 35	.... 40	.... 45				
100	VIP	HSDAV	FTDNY	TRLRK	QMAVK	KYLNS	ILN							
70	PACAP27	HSDGI	FTDSY	SRVYK	QMAVK	KYLAA	V							
50	PACAP28	HSDGI	FTDSY	SRVYK	QMAVK	KYLAA	VIGKR	YKQRV	KNK					
48	PHM	HADGV	FTSDF	SRLLG	QLSAK	KYLES	LI							
33	SECRETINA	HSDGT	FTSEL	SRLRD	SARLQ	RLIQG	LV							
21	GLUCAGÓN	HSQGT	FTSDY	SKYLD	SRRAQ	DFVQW	LMNT							
20	GRF	YADAI	FTNSY	RKVLG	QLSAR	KLQD	IMSRQ	QGESN	QERGA	RARL				
18	GLP-2	HADGS	FSDEM	NTILD	NLAAR	DFINW	LIQTK	ITDR						
17	GLP-1	HAEGT	FTSDV	SSYLE	GQAAK	EFLAW	LVKGR							

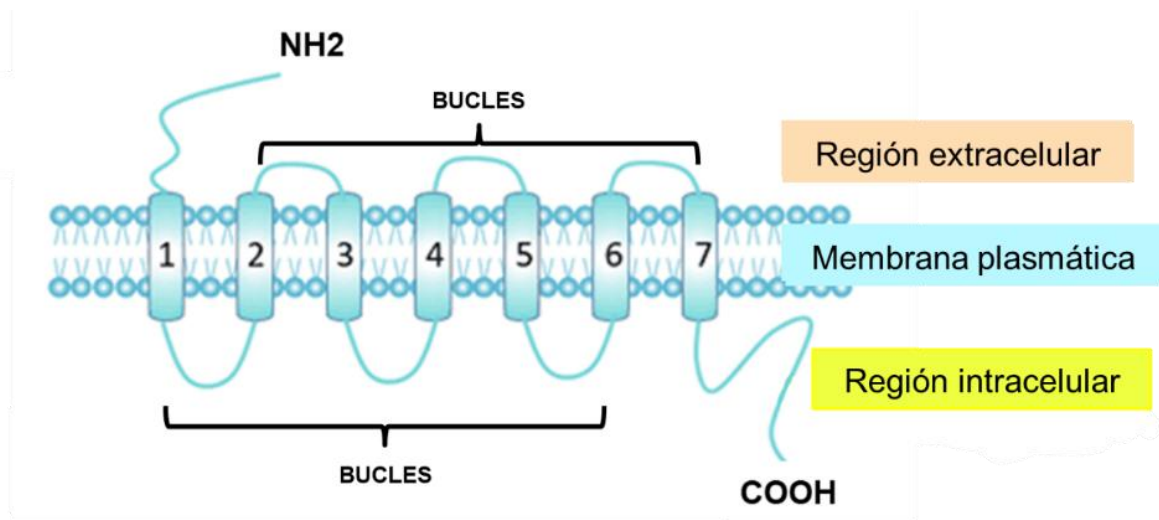
**Cuadro 1.** Secuencia aminoacídica de la familia de los péptidos de la secretina en mamíferos. Las homologías entre los péptidos están señaladas con recuadros. VIP: péptido intestinal vasoactivo; PACAP 27, 28: polipéptido activador del adenilato ciclasa de la pituitaria; PHM: péptido histidina-metionina; GRF: Factor liberador de la hormona de crecimiento; GLP 1, 2: péptido similar al glucagón (Tomado de Igarashi y col., 2002).

## Receptores VIPérgicos

El VIP ejerce sus efectos biológicos a través de la activación de dos receptores, VPAC-1 y VPAC-2. Ambos receptores presentan una afinidad similar por el VIP, aunque solo comparten un 55% de homología entre sus secuencias aminoacídicas. Pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), compuesta por los receptores de: VIP, PACAP, secretina, GLP-1 y GLP-2, calcitonina, CGRP, la hormona del crecimiento, la hormona paratiroidea, y el factor liberador de corticotropina (Rampelbergh y col., 1997; Harmar y col., 1998; Laburthe y col., 2007; Couvineau y Laburthe, 2012).

Los receptores de esta familia se caracterizan por presentar (Figura 11) (Fredriksson y Schiöth, 2006; Moody y col., 2011; Couvineau y Laburthe, 2012):

- ❖ Siete dominios transmembranales.
- ❖ Un dominio N-terminal extracelular (>120 residuos), que contiene una alta concentración de residuos de cisteína, que permite la interacción adecuada para la unión al ligando.
- ❖ Un dominio C-terminal intracelular.
- ❖ Tres bucles extracelulares, de los cuales, los dos primeros poseen altas concentraciones de cisteína que participan en enlaces disulfuro, esenciales para mantener la unión a su ligando.
- ❖ Tres bucles intracelulares.



**Figura 11.** Modelo estructural de los GPCR de clase II. Se observan los siete dominios transmembranales, así como los bucles extracelulares e intracelulares (Tomado y modificado de Groneberg y col., 2006).

La unión del VIP a sus receptores ocasiona la activación de las proteínas G y el cambio conformacional de sus subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). La principal vía de activación del VIP es mediada por la proteína **Gas**, que activa al adenilato ciclasa (Yajima y col., 1998). Además, el VIP activa proteínas **Gaq**, que activan a la fosfolipasa C, o **Gai**, que inhiben la acción del adenilato ciclasa (Dickson y Finlayson, 2009).

En la mayoría de los tejidos, los receptores VPAC-1 y VPAC-2 se acoplan principalmente a las proteínas Gas, desencadenando la activación del adenilato ciclasa y la producción de AMPc (Harmar y col., 1998; Laburthe y col., 2007). En la célula, la acumulación de AMPc resulta en la activación de la PKA que estimula diferentes vías de señalización como la vía ERK, que promueve la diferenciación y proliferación celular (Pechon-Vallée y col., 2000). Asimismo, se ha reportado que ambos receptores son capaces de activar a la fosfolipasa D (McCulloch y col., 2000), a la proteína cinasa C (PKC) (Onoue y col., 2001) y estimular la liberación de calcio intracelular (Dickson y col., 2006). La vía de señalización por la que actúa el VIP,

depende del tipo celular y del subtipo del receptor predominante en la célula (Groneberg y col., 2006; Onoue y col., 2008).

Al igual que el VIP, sus receptores expresan una amplia distribución en el organismo y se han descrito en el cerebro, tálamo, amígdala, tracto digestivo, aparato respiratorio, hígado y páncreas (Usdin y col., 1994; Delgado y col., 1996; Reubi, 2000). En el aparato reproductor femenino, los receptores VIPérgicos se expresan en el útero, trompas de Falopio y oviducto (Usdin y col., 1994; Reubi, 2000). En los ovarios de la rata, el VPAC-1 y VPAC-2 se expresan en células tecales y de la granulosa de folículos primarios, secundarios y preovulatorios, en estructuras como el estroma, el hilio, la médula y el cuerpo lúteo (Vaccari y col., 2006; Ayala, 2017). En la cepa de ratas CII-ZV, los vasos sanguíneos expresan únicamente al receptor VPAC-1 (Ayala, 2017). De acuerdo con Ayala (2017), la expresión de los receptores VIPérgicos es asimétrica y varía en función del ciclo estral, siendo mayor la expresión de VPAC-1 en el ovario derecho de ratas en los días del diestro 2 y estro, y de VPAC-2 en el día del proestro.

### **Participación del VIP en la regulación de las Funciones Ováricas**

En el ovario, el VIP es principalmente de origen extrínseco, aportado principalmente por el NOS y en menor proporción por el NV (Said y Rosenberg, 1976; Dees y col., 1986). Además, el VIP es sintetizado de manera local por las células de la granulosa del folículo ovárico (Hulshof y col., 1994).

Las fibras VIPérgicas del ovario se han identificado alrededor de folículos preantrales, antrales, en el tejido intersticial, y asociadas a venas y arteriolas (Dees y col., 1986; Hulshof y col., 1994).

El VIP participa en la regulación de las funciones del ovario. Algunos estudios han mostrado que el péptido modula de manera estimulante el inicio del crecimiento folicular a través de varios mecanismos como: 1) la activación de la vía ERK-mTORC1 implicada en el proceso de proliferación y diferenciación celular (Li y col., 2019); 2) Estimula la expresión del ARNm del ligando Kit (KL), asociado en el paso de folículos primordiales a primarios (Chen y col., 2012); y 3) Promueve la formación de receptores a FSH (Mayerhofer y col., 1997).

El VIP promueve la supervivencia folicular al actuar como un factor anti-apoptótico en las células de la granulosa (Li y col., 2019) donde inhibe las caspasas y estimula la expresión del gen Bcl-2, el cual actúa como un elemento anti-apoptótico (Wang y col., 2012). Así mismo, revierte los primeros estadios de atresia folicular por medio de la activación de la ruta AMPc-PKA y la regulación de enzimas que catalizan la ruptura del ADN (endonucleasas) (Flaws y col., 1995).

El VIP participa en eventos previos que culminan con la ovulación. Promueve la maduración meiótica del ovocito (Törnell y col., 1988), estimula la actividad del activador del plasminógeno, asociado a la ruptura de la pared folicular (Beers, 1975; Reich y col., 1985; Paniagua y col., 2007) eventos que finalmente culminan con la ruptura del folículo y la expulsión del ovocito (Schmidt y col., 1990).

En cultivo de células de la teca, de la granulosa o de ovarios completos se ha mostrado que el VIP regula de manera estimulante la síntesis de progesterona, andrógenos y estradiol (Davoren y Hsueh, 1985; Ahmed y col., 1986; Tilly y Johnson, 1989). Mediante un estudio *in vivo* realizado en la coneja en estro, se observó que la infusión intravenosa de VIP incrementa de manera tiempo y dosis dependiente la secreción de progesterona en suero (Fredericks y col., 1983). Previamente hemos mostrado que, en la rata adulta



cíclica, la microinyección de VIP en la bursa ovárica izquierda o derecha resulta a los 60 minutos o a las 24 horas del estímulo, en la secreción asimétrica de hormonas esteroides, que varía en función del día del ciclo estral y depende del tiempo transcurrido entre la cirugía y la autopsia (Rosas y col., 2015). Los efectos asimétricos del VIP parecen estar asociados tanto a la expresión diferencial de los receptores VIPérgicos en cada ovario (Ayala, 2017) como a la inervación simpática que reciben las gónadas a través del NOS (Rosas y col., 2018).

Con base en diversas investigaciones se ha observado que los efectos estimulantes del VIP sobre la secreción de hormonas esteroides se deben a la activación de enzimas clave que intervienen en la ruta esteroidogénica, donde el VIP estimula:

- ❖ El aumento del ARNm que codifica para la síntesis de la proteína **StAR** (Kowalewski y col., 2010).
- ❖ La actividad del complejo enzimático **P450scc** (Trzeciak y col., 1986).
- ❖ Una mayor actividad de la enzima **3β-HSD**, además de que disminuye la actividad de la 20α-hidroxiesteroide deshidrogenasa (**20α-HSD**) (Davoren y Hsueh, 1985), enzima que convierte la progesterona en su forma biológicamente inactiva, la 20α-hidroxiprogesterona (Nanjidsuren y col., 2011).
- ❖ La síntesis del ARNm de la **17α-hidroxilasa** (Johnson y col., 1994).
- ❖ Promueve la actividad de las **aromatasa**s (George y Ojeda, 1987).

### **Antagonista del receptor VPAC-1**

El mecanismo de acción de un antagonista consiste en bloquear la unión de la molécula de interés a su receptor y, en consecuencia, inhibir sus efectos (Lorenzo, 2008). Se han desarrollado diferentes tipos de antagonistas



para el VIP, basados en la modificación estructural de la región N-terminal del péptido, región que se ha observado, es fundamental para la activación del receptor (Robberecht y col., 1989). Los antagonistas del VIP se han clasificado en cuatro categorías (Reddix y col., 1994; Gourlet y col., 1997):

- ❖ **Análogos del GRF.** Se origina de un derivado de la molécula del GRF, con una acetilación en su dominio N-terminal (Ac-Try1hGRF). Se ha descrito que los análogos del GRF tienen efectos agonistas o antagonistas, dependiendo del tejido. En el hígado de rata tienen efectos estimulantes sobre la actividad del adenilato ciclasa (Rouyer y col., 1989), mientras que en el colon tiene un efecto antagónico (Robberecht y col., 1992).
- ❖ **Análogos del VIP.** Su estructura está formada a partir de la molécula del VIP, con sustitución de los aminoácidos 12 a 19 por  $\gamma$ -amino butiril (Leroux y col., 1994).
- ❖ **Fragmentos del VIP.** En estos antagonistas, la sección N-terminal de la molécula del VIP es eliminada (Robberecht y col., 1989).
- ❖ **Péptidos quimera.** Se denominan péptidos híbridos o quimeras debido a que se originan a partir de la molécula del VIP, con una secuencia de otra molécula. El PG 97-269 es un antagonista híbrido, diseñado específicamente para el receptor VPAC-1. Su estructura deriva de la secuencia 1-7 del VIP y de la secuencia 8-27 del GRF. El PG 97-269 se une, al igual que el VIP, en el dominio N-terminal del receptor VPAC-1, pero en subdominios distintos (Ceraudo y col., 2008).

El antagonista PG 97-269 ha sido probado en diferentes tejidos:

En membranas de ovario de rata y humano, tratadas con el PG 97-269 a una concentración de 0.1 a 10,000 nM se observó una inhibición dosis-dependiente de la síntesis de AMPc (Gourlet y col., 1997).

El receptor VPAC-1 se sobre-expresa en muchos tipos de cáncer humano (Reubi y col., 2000; Collado y col., 2005). En células cancerígenas de pulmón, el uso del antagonista a una concentración de 0.01 a 1000 nM, ejerce un efecto inhibitorio sobre el desarrollo tumoral, al inhibir la producción de AMPc y la proliferación celular (Pan y col., 2008).

El VIP es abundante en los nervios autonómicos que rodean el acino prostático, donde tiene un efecto estimulante sobre la proliferación celular y la secreción prostática (Crowe y col., 1987; Lange y Unger, 1990; Guijarro y col., 1996). En ratas macho adultas se utilizó el antagonista a una concentración de 1, 10,000 y 30,000 nM, y se observó una inhibición dosis dependiente en la concentración de AMPc y una disminución de la proliferación y secreción prostática (Juarranz y col., 1999).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El VIP es uno de los neurotransmisores que participan en la regulación de las funciones ováricas. Por estudios *in vitro* se ha mostrado que el VIP regula de manera estimulante el desarrollo folicular, la producción de hormonas esteroides y la ovulación. *In vivo* se ha descrito que sus efectos sobre la secreción de hormonas esteroides son asimétricos y varían en función del día del ciclo estral y del tiempo transcurrido entre el estímulo y la autopsia.

Sus efectos biológicos son mediados por dos receptores, VPAC-1 y VPAC-2, que expresan afinidad similar por el VIP. Recientemente mostramos que el receptor VPAC-1 tiene una localización más amplia en el ovario que el VPAC-2. Además, en el día del proestro, durante el cual suceden una serie de eventos hormonales esenciales para que ocurra la ovulación, el ovario izquierdo expresa una mayor cantidad del receptor VPAC-1 que de VPAC-2, tanto en folículos preovulatorios como en cuerpos lúteos, mientras que el ovario derecho tiene un número similar de ambos receptores en dichas estructuras.

Actualmente se desconocen las funciones específicas que ejerce el VIP en el ovario a través de cada uno de sus receptores. Por lo que en el presente estudio se analizó el papel del péptido en ratas en proestro sobre las funciones ováricas, mediante el uso de un antagonista específico para los receptores VPAC-1.

## **HIPÓTESIS**

El VIP estimula en el ovario el desarrollo folicular, la producción de hormonas esteroides y la ovulación mediante la activación de sus receptores. Si los efectos del VIP son mediados específicamente por el receptor VPAC-1, entonces el bloqueo selectivo de este receptor disminuirá las funciones que regula el VIP en el ovario, eventos que dependerán del periodo de evolución entre el bloqueo del receptor y la autopsia.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar los efectos del VIP mediante el bloqueo unilateral de los receptores VPAC-1 en el ovario de ratas adultas cíclicas en proestro, sobre las funciones ováricas.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar los efectos agudos (60 minutos) del bloqueo de los receptores VPAC-1 por la microinyección del antagonista PG 97-269 en la bursa del ovario izquierdo o derecho de ratas en proestro sobre el peso corporal, el peso relativo de los órganos y la concentración de progesterona, testosterona y estradiol en suero.
- Analizar los efectos subagudos (estro vaginal), del bloqueo de los receptores VPAC-1 por la microinyección del antagonista PG 97-269 en la bursa del ovario izquierdo o derecho de ratas en proestro sobre el peso corporal, el peso relativo de los órganos, el desarrollo folicular, la respuesta ovulatoria y la concentración de progesterona, testosterona y estradiol en suero.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Para 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). El protocolo experimental utilizado en este estudio fue aprobado por el comité de bioética de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. Se realizó lo posible para minimizar la cantidad de animales utilizados y su sufrimiento.

### **Diseño Experimental**

Se utilizaron ratas hembra de la cepa CII-ZV de 60 días de edad que fueron mantenidas en cajas de acrílico, bajo condiciones controladas de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e iluminación, con 14 horas de luz por 10 horas de oscuridad (luces encendidas de las 05:00 a las 19:00 horas) y con libre acceso al agua y al alimento (Purina S.A., México) hasta el momento de la autopsia.

El ciclo estral de las ratas se monitoreo mediante la citología vaginal, siguiendo la metodología previamente descrita por Marcondes y col. (2002). Para ello, los frotis vaginales fueron tomados diariamente entre las 9:00 y 10:00 horas, con un asa de inoculación estéril. Las células vaginales fueron colocadas en un portaobjetos, teñidas por la técnica de hematoxilina-eosina y observadas en un microscopio óptico. Se utilizaron únicamente aquellos animales que presentaron al menos dos ciclos estrales consecutivos de cuatro días.

El procedimiento quirúrgico se realizó entre las 10:30 y las 11:30 horas del día del proestro. Previo a la cirugía, las ratas fueron anestesiadas con una

mezcla de ketamina (40 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg), inyectada vía intraperitoneal.

## **Grupos Experimentales**

Los animales fueron asignados al azar en uno de los siguientes grupos experimentales, cada uno formado por 10 ratas (Figura 12):

**Testigo absoluto (TA) en proestro o estro.** Ratas cíclicas en el día del proestro o estro, que sin haber sido sometidas a ningún tipo de procedimiento quirúrgico fueron sacrificadas entre las 11:30 y las 12:30 horas.

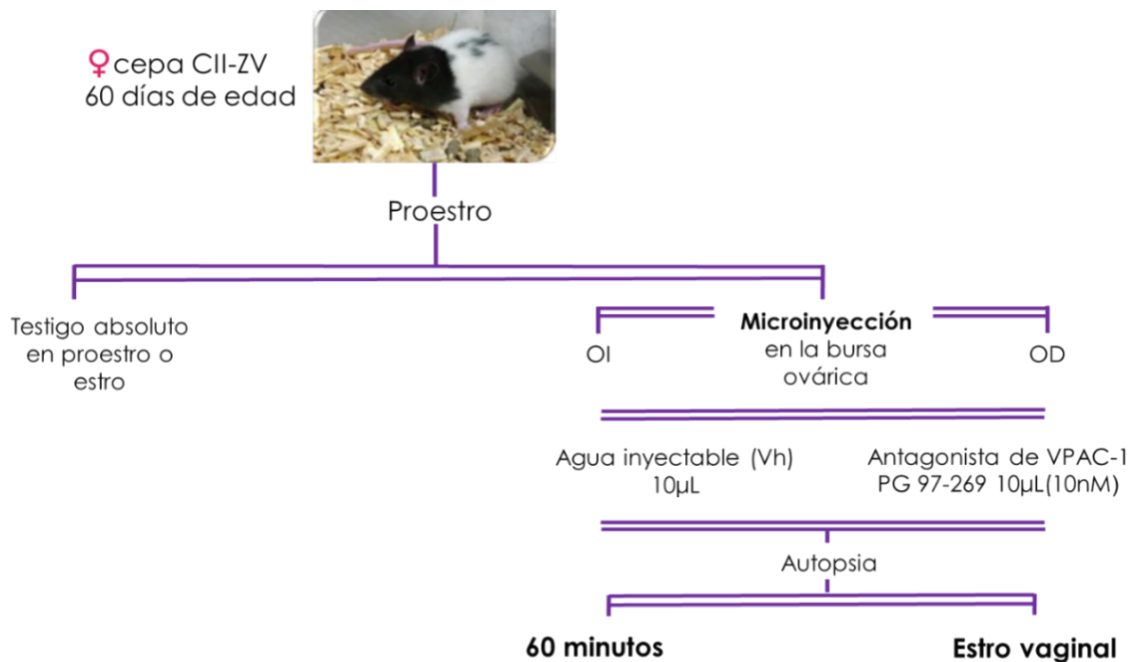
### **Microinyección de agua inyectable o del antagonista del receptor VPAC-1.**

Animales en proestro fueron anestesiados y sometidos a una incisión dorso-lateral de piel, músculo y peritoneo. Posteriormente se extrajo uno de los ovarios, el izquierdo (OI) o el derecho (OD), y en la bursa ovárica se realizó la microinyección de agua inyectable (vehículo, Vh) o del antagonista (Ant) de los receptores VPAC-1, el PG 97-269 (BACHEM, E.U). Para ello, se utilizó una aguja de calibre 25 G x 3/4'' (0.5 x 19 mm), que fue conectada a una jeringa Hamilton de 25 µL, con un tubo de teflón (0.65 mmx0.12 mm). La jeringa Hamilton fue colocada en una bomba de microinyección (CMA/100; BAS, Estocolmo, Suecia). La aguja fue introducida en la bursa ovárica izquierda o derecha y se inyectaron 10 µL del Vh o del Ant a una concentración de 10 nM. La concentración del Ant utilizado en este estudio se estableció con base en un ensayo en el que se evaluaron los efectos de 10 y 100 nM, dosis previamente utilizadas por otros grupos de investigación (Moody y col., 2004; Vu y col., 2014). Se observó que la microinyección del Ant en la bursa ovárica a una concentración de 10 nM resultó a los 60 minutos en una menor concentración de progesterona respecto a su grupo control, mientras que al microinyectar el Ant a 100 nM no se modificó dicho

parámetro, razón por la cual se decidió utilizar en este estudio la concentración de 10 nM (Figura 12).

Las soluciones (Vh o Ant) fueron inyectadas en la bursa ovárica a una velocidad de 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ , durante dos minutos. La aguja se mantuvo dentro de la bursa ovárica por dos minutos más para evitar la salida de la solución inyectada y asegurar de esta forma su difusión en todo el tejido ovárico. Posteriormente se retiró la aguja, se adiciono una gota de pegamento quirúrgico (Dermabond), y una vez seco, el ovario fue regresado a la cavidad abdominal y se suturó la herida (Figura 12).

Los animales fueron sacrificados por decapitación a los 60 minutos de realizada la cirugía o al presentar el estro vaginal inmediato (Figura 12).



**Figura 12.** Representación esquemática del diseño experimental utilizado para evaluar los efectos agudos y subagudos de la microinyección del antagonista de los receptores VPAC-1 (PG 97-269). Animales en proestro fueron microinyectados en la bursa del ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) con agua inyectable (Vh) o el antagonista de los receptores VPAC-1, y sacrificados a los 60 minutos o al estro vaginal inmediato.

## **Procedimiento de Autopsia**

A la autopsia, los animales fueron pesados en una balanza granataria y posteriormente fueron sacrificados por decapitación entre las 11:30 y 12:30 horas del día del proestro o al momento que presentaron un estro vaginal.

Los ovarios, el útero y las glándulas adrenales fueron disecados y pesados en una balanza analítica. La sangre del tronco se colectó en tubos de ensayo y se dejó coagular por 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 15 minutos. Posteriormente se separó el suero del botón celular y se dividió en alícuotas. Las muestras de suero se almacenaron a -20 °C hasta el momento de la cuantificación de hormonas esteroides.

## **Ovulación**

La ovulación se analizó únicamente en aquellos animales sacrificados al estro vaginal. Los oviductos se observaron en un microscopio estereoscópico y con ayuda de un par de agujas de disección se buscó el ámpula, se rasgó y se realizó el conteo de los ovocitos liberados.

## **Cuantificación de Hormonas Esteroides en Suero**

La cuantificación de progesterona, testosterona y estradiol se llevó a cabo por medio de un ensayo quimioluminescente, competitivo secuencial (IMMULITE). Las pruebas fueron realizadas en el Laboratorio de Hormonas Esteroides del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

Se usó fosfatasa alcalina conjugada con un anti-ligando (anti-progesterona, anti-testosterona o anti-estradiol) en solución tampón y como sustrato



quimioluminiscente, un anticuerpo policlonal de conejo (anti-progesterona, anti-testosterona o anti-estradiol) el cual se encontraba recubriendo una microesfera.

Al adicionar el suero (aprox. 500  $\mu$ L), la hormona marcada que compite con la de la muestra, reacciona generando una coloración violeta para el caso de progesterona, verde oscuro para testosterona, o rosa oscuro para estradiol. Para la lectura de progesterona, la mezcla se dejó incubar por dos ciclos de 30 minutos, mientras que para testosterona y estradiol se requirió sólo un ciclo de 60 minutos.

La intensidad de la señal fue cuantificada con un luminómetro. Dicha intensidad es inversamente proporcional a la concentración de la hormona dentro de la muestra.

La concentración de progesterona en suero se expresó en ng/mL, y la de testosterona y estradiol en pg/mL. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo para progesterona fueron de 6.7% y 7.9%, para testosterona de 6.4% y 7.3%, y para estradiol de 7.1% y 8.3%.

## **Morfología Ovárica y Desarrollo Folicular**

De las ratas autopsiadas en el día del estro, los ovarios de 3 animales por grupo experimental fueron fijados en una solución de Bouin por 24 horas, deshidratados en alcohol (al 70, 80, 96 y 100%) y cloroformo e incluidos en paraplast. Posteriormente se realizaron los cortes histológicos de manera seriada a 10  $\mu$ m de grosor y fueron teñidos con la técnica de Hematoxilina-Eosina.

En los cortes histológicos se analizó la presencia de cuerpos lúteos y de folículos preantrales y antrales, sanos o atrésicos. Se clasificaron como folículos preantrales aquellos que presentaron una o más capas de células de la granulosa, sin presencia de cavidad antral. Como folículos antrales se definieron aquellos folículos con al menos 5 capas de células de la granulosa y una cavidad antral (Curry y col., 1984; Lara y col., 1990, 2000). Se consideraron como folículos atrésicos aquellos que presentaron al menos una de las siguientes características: picnosis nuclear de las células de la granulosa, descamación de éstas en la cavidad antral e hiperplasia de las células tecales (Greenwald y Roy, 1994).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados son expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (eem). El análisis estadístico fue realizado con el software GraphPad InStat3, Inc (San Diego, CA, U.S.A.).

El peso corporal, el peso relativo de los órganos (ovarios, útero y glándulas adrenales) y la concentración de progesterona, testosterona y estradiol en suero, se analizaron mediante un análisis de varianza multifactorial (ANDEVA), seguido de la prueba de Tukey-Kramer. La comparación entre dos grupos se realizó mediante la prueba "t" de Student.

El número de ovocitos liberados se analizó por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la prueba de Dunn; la comparación entre dos grupos se realizó mediante la prueba de U de Mann Whitney. El porcentaje de animales ovulantes y de folículos (atrésicos totales, preantrales y antrales) se analizó por la prueba de Fisher.

Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue menor o igual a 0.05.

## RESULTADOS

### Efectos agudos de la microinyección de agua inyectable o del antagonista de los receptores VPAC-1 en la bursa del ovario izquierdo o derecho de animales en proestro y sacrificados a los 60 minutos

#### Peso corporal y peso de los órganos

La microinyección unilateral del Vh o del antagonista de los receptores VPAC-1 en la bursa ovárica de animales en proestro y sacrificados a los 60 minutos no modificó el peso corporal, la masa ovárica, la masa adrenal ni el peso del útero en comparación a sus respectivos grupos control (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Media  $\pm$  eem del **peso corporal (g) y del peso relativo (mg/100g) de la masa ovárica, masa adrenal y del útero** de animales testigo absoluto (TA) o microinyectados en el día del proestro (P) con agua inyectable (Vh) o el antagonista PG 97-269 (Ant) de VPAC-1 en la bursa del ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) y sacrificados a los 60 minutos de la cirugía.

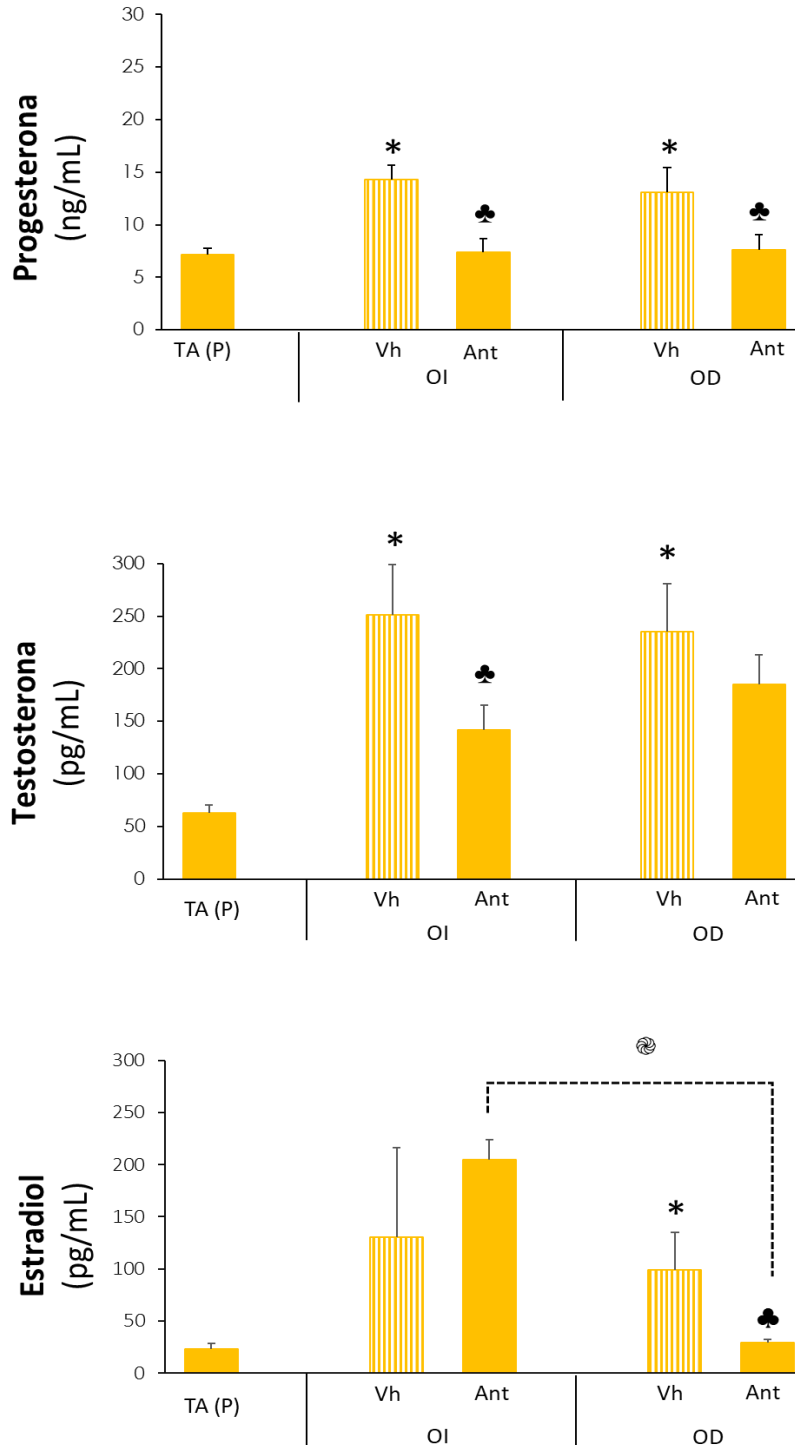
GRUPO	n				
		Peso Corporal	Masa Ovárica	Masa Adrenal	Útero
TA (P)	10	225.2 $\pm$ 4.0	26.6 $\pm$ 2.1	22.2 $\pm$ 1.3	176.6 $\pm$ 9.1
Vh OI	10	225.3 $\pm$ 4.0	27.5 $\pm$ 1.4	24.5 $\pm$ 1.2	183.2 $\pm$ 6.8
Ant OI	14	235.7 $\pm$ 4.9	25.8 $\pm$ 0.9	23.3 $\pm$ 0.9	159.4 $\pm$ 4.9
Vh OD	10	227.8 $\pm$ 6.7	28.9 $\pm$ 1.2	24.6 $\pm$ 0.9	167.9 $\pm$ 6.8
Ant OD	10	215.9 $\pm$ 5.1	29.3 $\pm$ 0.9	24.6 $\pm$ 0.9	170.7 $\pm$ 6.7

## Concentración de Hormonas Esteroides en suero

La inyección del Vh en la bursa del ovario izquierdo o derecho resultó a los 60 minutos en el incremento de la concentración de **progesterona**, respecto al TA; a diferencia de lo observado en animales microinyectados con el antagonista de los receptores VPAC-1 en cualquiera de los ovarios, donde la concentración de progesterona fue menor en comparación con sus respectivos grupos Vh (Figura 13).

La concentración de **testosterona** fue mayor en animales con microinyección unilateral del Vh, respecto al grupo TA. Mientras que la microinyección del antagonista de los receptores VPAC-1 en la bursa izquierda disminuyó la concentración del andrógeno en comparación a su respectivo grupo Vh (Figura 13).

La microinyección del Vh en la bursa ovárica derecha resultó en una mayor concentración de **estradiol** en suero respecto al TA; mientras que al microinyectar el antagonista en la bursa ovárica derecha, la concentración del estrógeno fue menor en comparación a su respectivo grupo Vh y al grupo inyectado con el antagonista en la bursa izquierda (Figura 13).



**Figura 13.** Media  $\pm$  eem de la concentración de **Progesterona, Testosterona y Estradiol** en suero de animales testigo absoluto (TA) o microinyectados en el día del proestro (P) con Vh o el antagonista PG 97-269 (Ant) de VPAC-1 en la bursa del ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) y sacrificados a los 60 minutos de la cirugía. \*  $p < 0.05$  vs. TA (P); ♣  $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo Vh (Prueba de ANDEVA seguida por la Prueba de Tukey-Kramer); ⊗  $p < 0.05$  vs. Ant OI (Prueba "t" de Student).

## Efectos subagudos de la microinyección de agua inyectable o del antagonista de los receptores VPAC-1 en la bursa del ovario izquierdo o derecho de animales en proestro y sacrificados al estro vaginal

### Peso corporal y peso de los órganos

La microinyección del Vh en la bursa del ovario izquierdo realizada en el día del proestro resultó en el aumento de la masa ovárica, masa adrenal y peso del útero, sin cambios en el peso corporal, en comparación al grupo TA. Cuando el Vh fue inyectado en el ovario derecho se observó un incremento de la masa ovárica y del peso del útero respecto al TA y una disminución del peso corporal respecto al grupo TA y de la masa adrenal en comparación al grupo Vh OI (Cuadro 3).

La inyección del antagonista de los receptores VPAC-1 en la bursa del ovario izquierdo no modificó el peso corporal ni el peso relativo de los órganos analizados respecto su grupo Vh; a diferencia de lo observado ante la microinyección del antagonista en la bursa del ovario derecho donde se observó un menor peso del útero en comparación al grupo Vh (Cuadro 3).

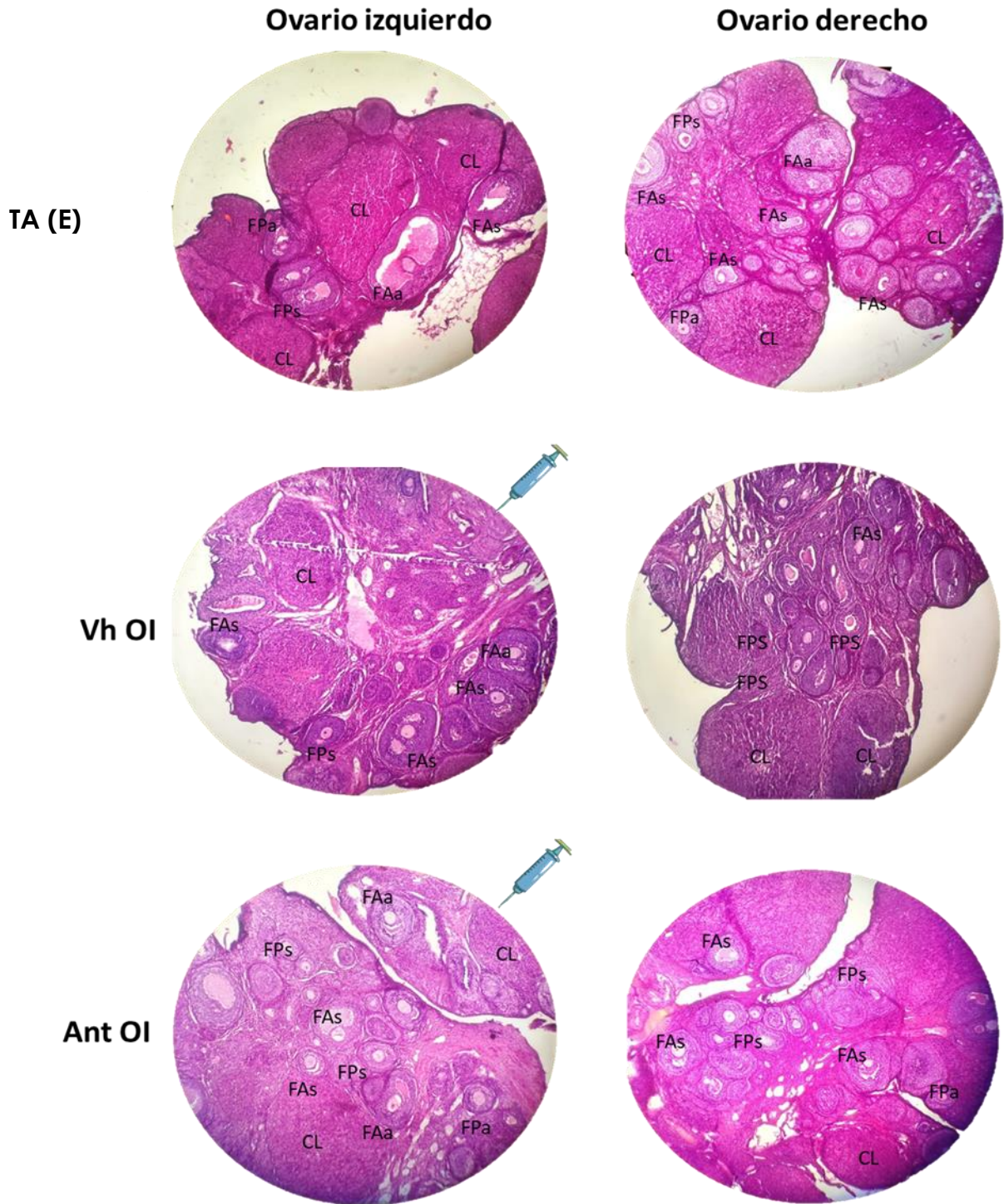
**Cuadro 3.** Media  $\pm$  eem del **peso corporal (g) y del peso relativo (mg/100g) de la masa ovárica, masa adrenal y del útero** de animales testigo absoluto (TA) en estro (E) o microinyectados en el día del proestro con agua inyectable (Vh) o el antagonista PG 97-269 (Ant) de VPAC-1 en la bursa del ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) y sacrificados al estro vaginal.

GRUPO	n	Peso Corporal	Masa Ovárica	Masa Adrenal	Útero
TA (E)	10	233.0 $\pm$ 3.6	22.6 $\pm$ 1.3	22.5 $\pm$ 1.1	138.1 $\pm$ 8.0
Vh OI	10	212.0 $\pm$ 12.7	29.7 $\pm$ 1.1*	32.3 $\pm$ 2.2*	178.1 $\pm$ 9.9*
Ant OI	10	210.6 $\pm$ 4.4	28.6 $\pm$ 1.0	27.6 $\pm$ 1.6	168.0 $\pm$ 6.4
Vh OD	13	214.7 $\pm$ 3.7*	29.8 $\pm$ 1.0*	25.5 $\pm$ 1.6 ■	166.0 $\pm$ 7.4*
Ant OD	11	228.7 $\pm$ 6.0	28.0 $\pm$ 0.8	27.1 $\pm$ 1.3	145.5 $\pm$ 4.8▲

\*p<0.05 vs. TA; ■ p<0.05 vs. Vh OI; ▲ p<0.05 vs. Vh OD (Prueba "t" de Student).

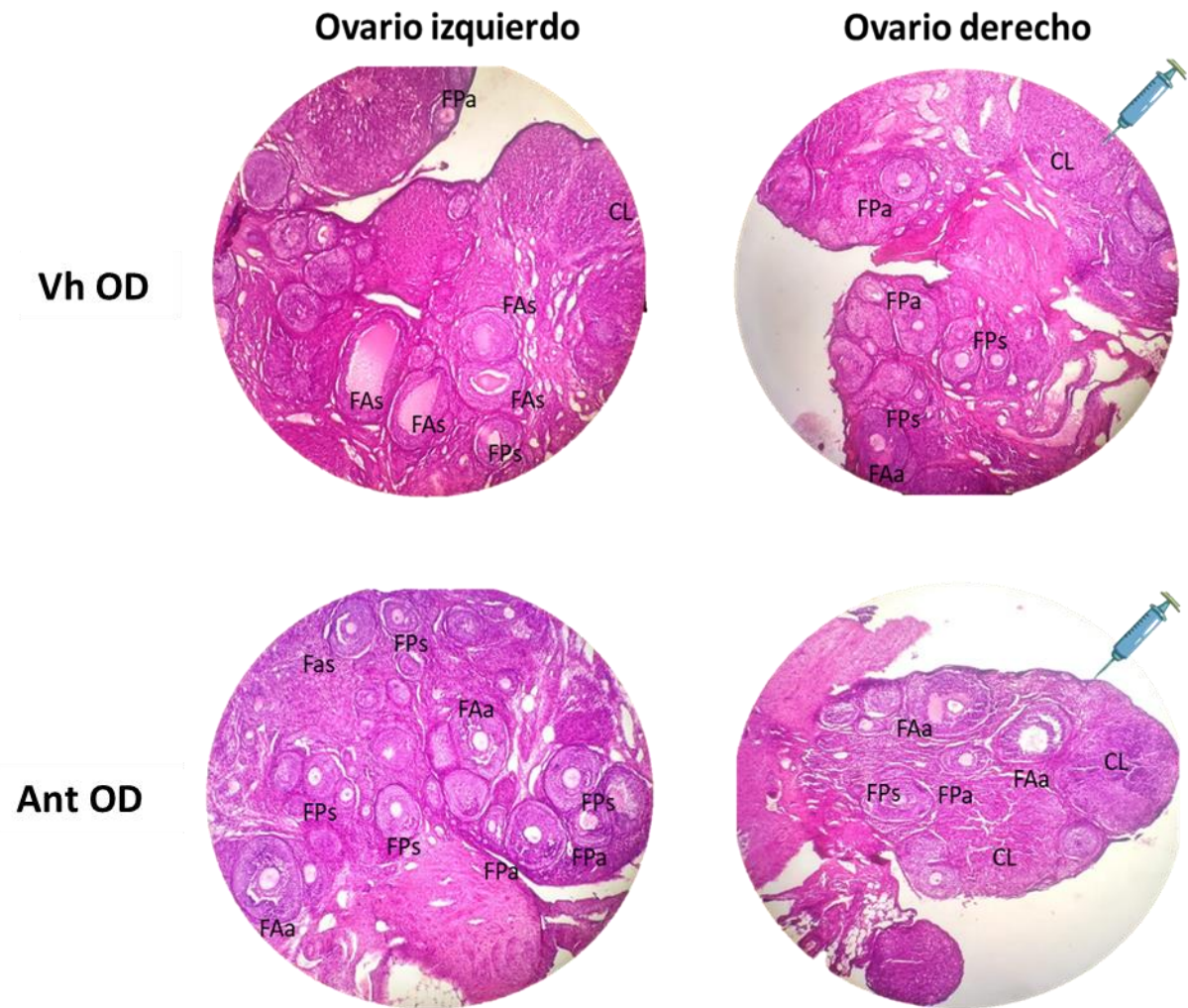
## **Morfología ovárica y Desarrollo folicular**

Similar a lo observado en el grupo TA, los ovarios de las ratas tratadas con el Vh en la bursa del ovario izquierdo (Figura 14) o derecho (Figura 15) y sacrificadas al presentar el estro vaginal inmediato, mostraron cuerpos lúteos y folículos en diferentes estadios del desarrollo, la mayoría de los cuales fueron sanos. La administración del antagonista de los receptores VPAC-1 en la gónada izquierda (Figura 14) o derecha (Figura 15) de animales sacrificados al estro vaginal inmediato resultó en la presencia de folículos preantrales y antrales, con un aumento de la población de folículos atrésicos, y la presencia de cuerpos lúteos.



**Figura 14.** Fotomicrografías representativas del ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) de animales testigo absoluto (TA) en estrus (E) o inyectados en la bursa del **ovario izquierdo** con el vehículo (Vh) o el antagonista de los receptores VPAC-1 (Ant) y sacrificados al estrus vaginal inmediato. Se muestran fotomicrografías tomadas a 10x donde se pueden observar cuerpos lúteos (CL), folículos preantrales sanos (FPs), folículos preantrales atrésicos (FPa), folículos antrales atrésicos (FAs) y antrales atrésicos (FAa).

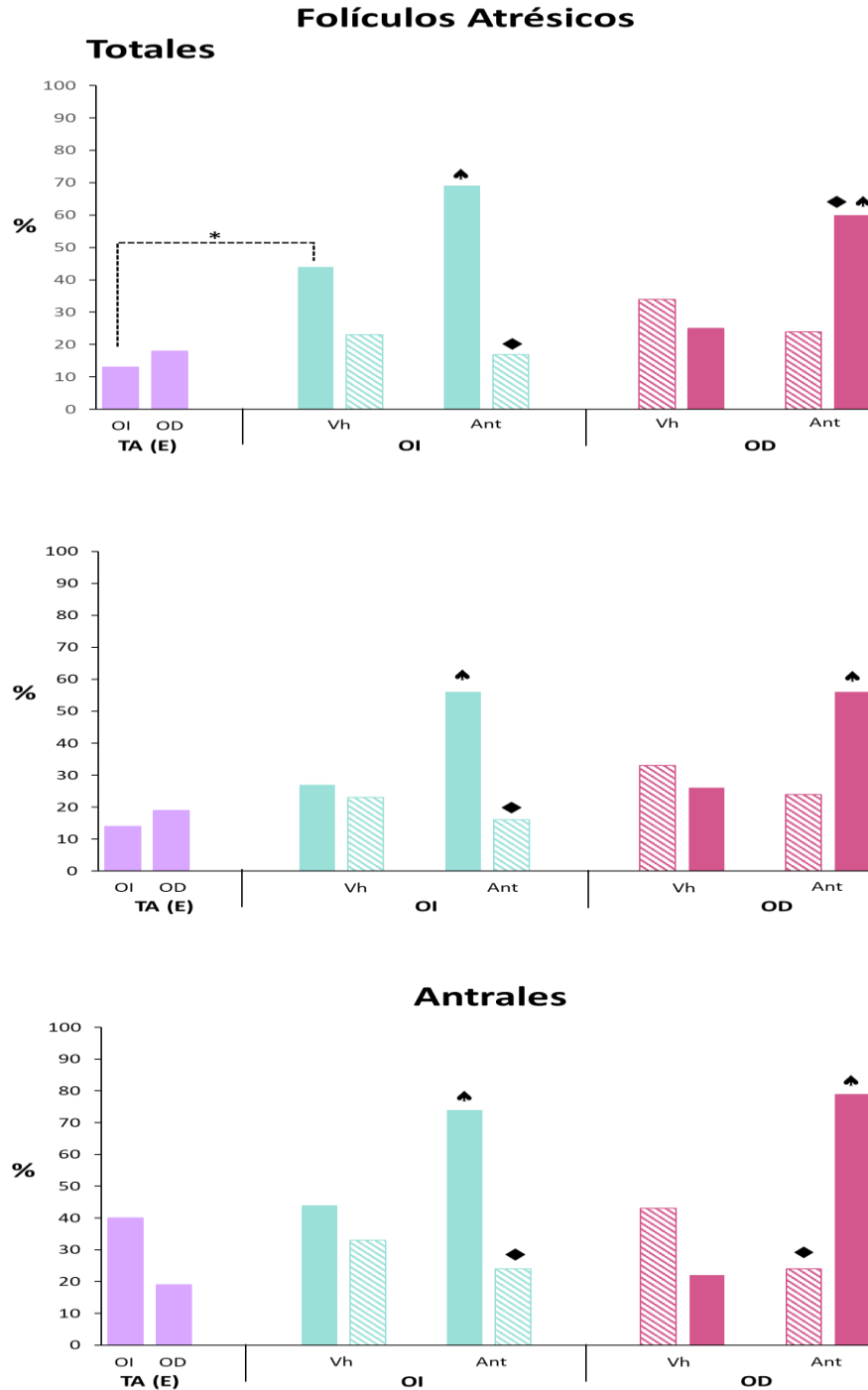




**Figura 15.** Fotomicrografías representativas del ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) de animales testigo absoluto (TA) en estro (E) o inyectados en la bursa del **ovario derecho** con el vehículo (Vh) o el antagonista de los receptores VPAC-1 (Ant) y sacrificados al estro vaginal inmediato. Se muestran fotomicrografías tomadas a 10x donde se pueden observar cuerpos lúteos (CL), folículos preantrales sanos (FPs), folículos preantrales atrésicos (FPa), folículos antrales atrésicos (FAs) y antrales atrésicos (FAa).

## **Porcentaje de folículos atrésicos**

La administración del Vh incremento el porcentaje total de folículos atrésicos al tratar el ovario izquierdo en comparación a su respectivo ovario del grupo TAE, y en comparación a su respectivo ovario contralateral en el total de folículos atrésicos, preantrales y antrales. Al bloquear los receptores de VPAC-1 en la gónada izquierda o derecha, resultó en el aumento de folículos atrésicos totales, preantrales y antrales, en comparación sus respectivos grupos tratados con el Vh y en comparación a su ovario contralateral (Figura 16).



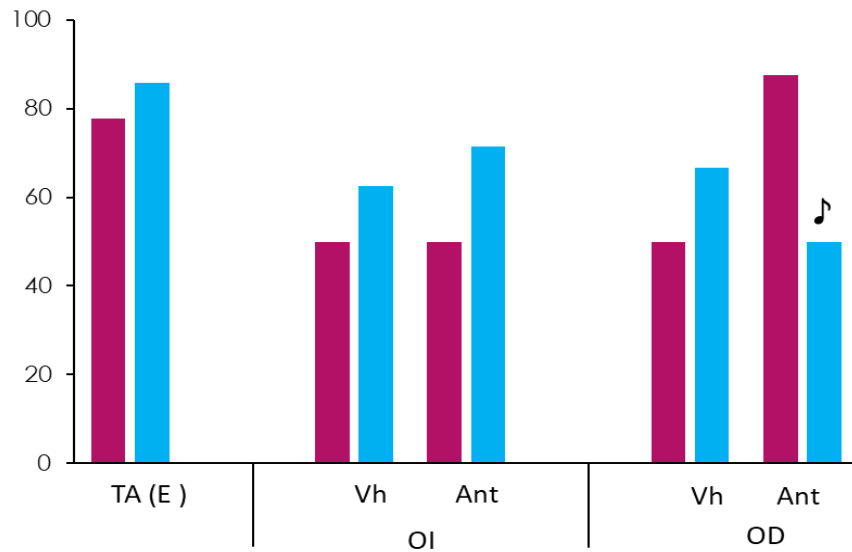
**Figura 16. Porcentaje de folículos atrésicos totales, preantrales y antrales** por el ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) de animales testigo absoluto (TA) en estró (E) o microinyectados en el día del proestro con agua inyectable (Vh) o el antagonista PG 97-269 (Ant) de VPAC-1 en la bursa del OI u OD y sacrificados al estró vaginal. \* $p < 0.05$  vs. Su respectivo ovario del grupo TA; ◆  $p < 0.05$  vs. Ovario contralateral; ▲  $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo Vh (Prueba de Fisher).

## Respuesta Ovulatoria

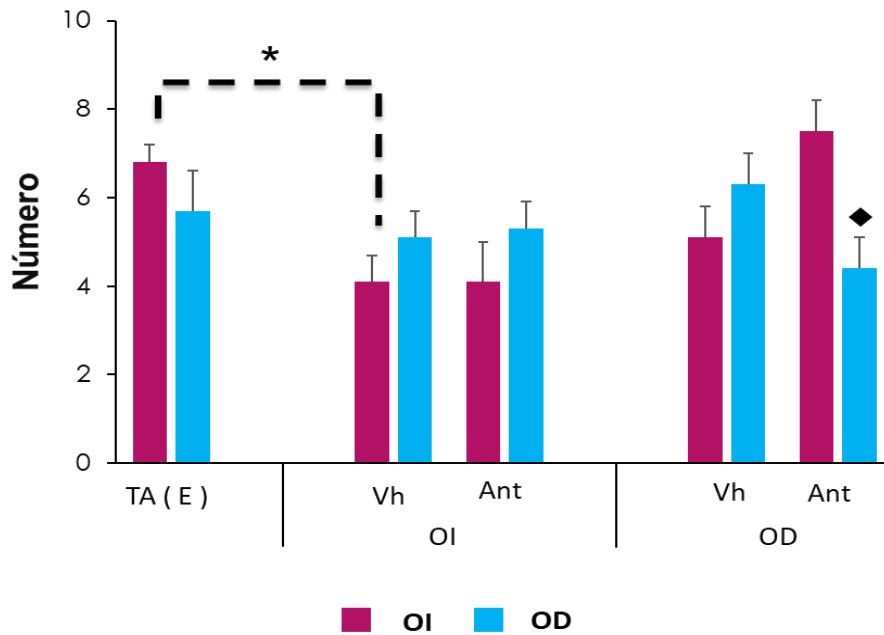
La microinyección del Vh en la bursa ovárica izquierda o derecha de ratas en proestro, sacrificadas al estro, no modificó el **porcentaje de animales ovulantes** en comparación al TA ni a sus respectivos ovarios contralaterales. Cuando los animales fueron microinyectados con el antagonista de los receptores VPAC-1 en el ovario derecho disminuyó el porcentaje de animales ovulantes respecto a su ovario contralateral (Figura 17).

La microinyección del Vh en el ovario izquierdo resultó en un menor **número de ovocitos liberados** comparado con el ovario izquierdo del grupo TA. Cuando se realizó el bloqueo de los receptores del VPAC-1 en la bursa del ovario derecho resultó en un menor número de ovocitos liberados en comparación a su ovario contralateral (Figura 17).

## Animales ovulantes



## Ovocitos liberados



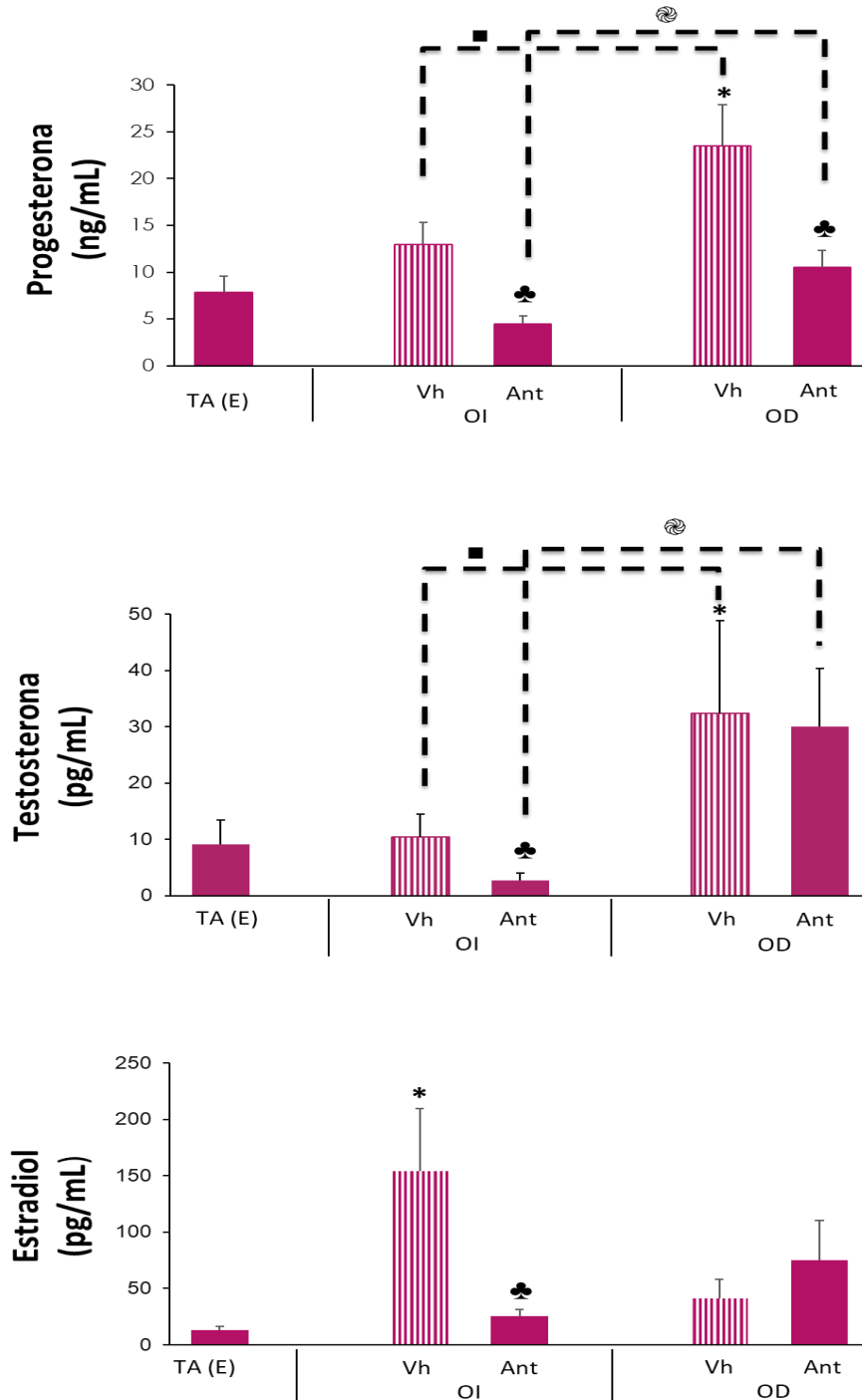
**Figura 17. Porcentaje de animales ovulantes** y media  $\pm$  eem del **número de ovocitos liberados** por el ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) de animales testigo absoluto (TA) en estro (E) o microinyectados en el día del proestro con agua inyectable (Vh) o el antagonista PG 97-269 (Ant) de VPAC-1 en la bursa del OI u OD y sacrificados al estro vaginal. ♪  $p < 0.05$  vs. Ovario contralateral (Prueba de Fisher). \* $p < 0.05$  vs. OI del grupo TA; ◆  $p < 0.05$  vs. Ovario contralateral (Prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la prueba de U de Mann-Whitney).

## Concentración de Hormonas Esteroides

La microinyección del Vh en la bursa del ovario derecho resultó en el incremento de la concentración de **progesterona**, respecto a los grupos TA y Vh OI; a diferencia de lo observado en animales con microinyección unilateral del antagonista de los receptores VPAC-1, donde la concentración de progesterona fue menor en comparación con sus respectivos grupos Vh (Figura 18).

La concentración de **testosterona** en animales microinyectados con el Vh en la bursa del ovario derecho fue mayor que la del TA y la del Vh OI. La microinyección del antagonista en la bursa ovárica izquierda resultó en una menor concentración de testosterona respecto a su Vh. Cuando el antagonista se microinyectó en la bursa del ovario derecho, la concentración del andrógeno fue mayor respecto a la del grupo microinyectado con el antagonista en el ovario izquierdo (Figura 18).

La microinyección del Vh en la bursa del ovario izquierdo resultó en una mayor concentración de **estradiol** en suero en comparación al TA; efecto opuesto se observó ante la microinyección del antagonista en la bursa del ovario izquierdo, donde disminuyó la concentración del estrógeno respecto a su grupo Vh (Figura 18).



**Figura 18.** Media  $\pm$  eem de la concentración de **Progesterona, Testosterona y Estradiol** en suero de animales testigo absoluto (TA) en estro (E) o microinyectados en el día del proestro con agua inyectable (Vh) o el antagonista PG 97-269 (Ant) de VPAC-1 en la bursa del ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) y sacrificados al estro vaginal. \*  $p < 0.05$  vs. su TA; ♣  $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo Vh; ■  $p < 0.05$  vs. Vh OI (Prueba de ANDEVA seguida por la Prueba de Tukey-Kramer); ☉  $p < 0.05$  vs. Ant OI (Prueba "t" de Student).

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que en el día del proestro, el VIP regula de manera estimulante las funciones del ovario a través de la activación del receptor VPAC-1, efectos que dependen del ovario tratado y del periodo transcurrido entre la cirugía y la autopsia. Además, apoyan la existencia de una comunicación nerviosa entre los ovarios.

La microinyección unilateral del Vh en la bursa ovárica de animales en proestro no modificó el **peso corporal** ni el **peso de los órganos** a los 60 minutos del tratamiento, tal como ha sido descrito por otros autores (Dallman, 1985; Rosas, 2011; Brann y Mamesh, 1991), resultados que atribuimos al corto periodo de tiempo transcurrido entre la cirugía y la autopsia.

Cuando los efectos de la microinyección unilateral del Vh se evaluaron al estro, se observó un incremento de la **masa ovárica**, similar a lo reportado por Rosas (2011) y Escalona (2018), como resultado de la microinyección de solución salina. Estos efectos pueden deberse al estrés que experimentan los animales durante y después del procedimiento quirúrgico (periodo de recuperación). Algunos grupos de investigación han mostrado que 60 minutos después de someter a los animales a un estrés agudo ocasionado por una intervención quirúrgica, incrementa la secreción de gonadotropinas (Lawton, 1972; Brann y Mamesh, 1991). Es posible que éstas sean las responsables del mayor desarrollo folicular observado en nuestros animales, que se acompañó del aumento de la masa ovárica.

En el presente estudio se observó que la **masa de las adrenales** aumenta únicamente ante la microinyección del Vh en el ovario izquierdo de animales sacrificados al estro. Previamente se ha descrito que la inervación supraespinal de los ovarios y las adrenales es más abundante hacia las



glándulas izquierdas que derechas (Tóth y col., 2007; Gerendai y col., 2009). Además, Tóth y colaboradores (2008) mostraron que en el sistema nervioso central existen neuronas que reciben una comunicación neural directa desde los ovarios y las adrenales, lo que sugiere la existencia de un circuito nervioso central que controla la función adrenal y ovárica. Con base en estas evidencias sugerimos que el incremento de la masa adrenal observado como resultado de la manipulación del ovario izquierdo se debe a la activación de las fibras nerviosas que comunican a los ovarios con las adrenales, tal como ha sido propuesto previamente (Rosas y col., 2015) y que pudieran ser fibras VIPérgicas dado que al bloquear unilateralmente con el antagonista de VPAC-1 la masa adrenal se ve disminuida.

No descartamos que el aumento de la masa adrenal se deba en parte al incremento de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en respuesta al estrés que experimentan los animales. En ratas sometidas a situaciones de estrés, como la operación simulada o la adrenalectomía unilateral, incrementa la concentración de la ACTH en suero (Dallman, 1985) la cual tiene un efecto mitogénico sobre la corteza suprarrenal (Fiala y col., 1956; Bransome y Reddy, 1961).

La inyección unilateral del antagonista en la bursa ovárica no modificó la masa ovárica ni adrenal de los animales sacrificados al estro, lo que apoyaría el hecho de que parte de los cambios en la masa de estos órganos se deben al estrés y/o a la activación de vías nerviosas, y no a la solución administrada.

En nuestros animales se observó que la microinyección unilateral del Vh en la bursa ovárica resultó al estro en el aumento del **peso del útero**. Spratto y Miller (1968) describieron que, en la rata adulta, la administración s.c. de estrógenos durante 3 días resulta, 24 horas después de la última inyección, en el incremento de la masa del útero. Los estrógenos al unirse a su receptor

en las células mesenquimales y estromales del útero desencadenan la producción de factores paracrinos que estimulan la mitosis de las células uterinas (Cooke y col., 1997). Con base en estas evidencias sugerimos que el incremento del peso del útero observado en nuestros animales se debe al aumento en la concentración de estradiol, aunque cabe destacar que esta sólo llegó a ser estadísticamente significativa cuando el Vh fue inyectado en el ovario izquierdo.

En el útero, el VIP estimula el proceso de decidualización, que consiste en la transformación morfológica del compartimiento endometrial y que ocurre a través de la activación del receptor VPAC-1 (Spong y col., 1999; Grasso y col., 2017). Se ha mostrado que entre los ovarios y el útero existe una intrincada comunicación nerviosa (Baljet y Drukker., 1979) y sanguínea, esta última dada a través de la arteria útero-ovárica (Burbank, 2009) y la arteria ovárica, que forma varias ramas que en los días del proestro y del estro generan anastomosis con las ramas segmentales craneales de la arteria uterina, irrigando así al cuerno uterino (Céspedes y col., 2006). En el presente estudio se observó que, el bloqueo de los receptores VPAC-1 en la bursa ovárica derecha disminuyó el peso del útero. Aun cuando la inyección del antagonista se realizó a nivel ovárico, es posible que la comunicación sanguínea que mantienen el ovario y el útero permitiera que parte del antagonista inyectado en el ovario viajara vía torrente sanguíneo hasta el útero ocasionando el bloqueo de los receptores VPAC-1 del útero. Desconocemos porque la disminución del peso del útero fue mayor al tratar el ovario derecho. En el mono se ha mostrado que la comunicación nerviosa entre el útero y los ovarios es mayor con la gónada en la que se forma el cuerpo lúteo (Nagle y col., 2005). Dado que la rata es un animal poli-ovulante, se esperaría que la comunicación del útero fuera similar con ambos ovarios, sin embargo, con base en los resultados parece no ser así.

El VIP tiene efectos antiapoptóticos en células de la granulosa y revierte los primeros estadios de la atresia folicular (Flaws y col., 1995; Wang y col., 2012). En el presente estudio se observó que la inyección del antagonista de los receptores VPAC-1 en la bursa ovárica izquierda o derecha resultó en una tendencia hacia la disminución de la población de folículos sanos y un incremento de folículos atrésicos. El grupo de Vaccari (2006) mostró que 24 horas después de incubar células de la granulosa de folículos antrales en un medio de cultivo con VIP y con el antagonista selectivo para los receptores VPAC-2, aumenta la apoptosis. Con base en estas evidencias sugerimos que el VIP juega un papel importante en la supervivencia de los folículos en diferentes estadios de maduración, efectos que al parecer son mediados por la activación de los dos receptores VIPérgicos.

En el presente estudio se observó un menor número de **ovocitos liberados** en los animales con microinyección del Vh en la bursa del ovario izquierdo, similar a lo descrito por Escalona (2018) ante la microinyección de solución salina. Efecto que atribuimos en parte a la existencia de asimetrías en las funciones ováricas, tal como se ha reportado anteriormente (Domínguez y col., 2003; Domínguez y Cruz-Morales, 2011). En los mamíferos existe dominancia por parte de un ovario sobre las funciones ováricas; para el caso de la rata se ha mostrado que el ovario izquierdo libera un mayor número de ovocitos que el derecho (Domínguez y col., 1989). Domínguez y colaboradores (1998) plantearon que la liberación de LH es regulada por una comunicación nerviosa entre ambas gónadas ya que observaron que en la tarde del proestro, el ovario izquierdo envía una señal al ovario derecho antes de que esta señal llegue al hipotálamo. Tomadas en conjunto, éstas evidencias nos permiten sugerir que el ovario izquierdo es más sensible que el derecho a estímulos como la manipulación y/o la inyección, lo que pudiera explicar la disminución del número de ovocitos liberados cuando el Vh se inyecta en el ovario izquierdo y no en el derecho.

Por estudios *in vitro* se ha descrito que el VIP tiene un efecto estimulante en eventos previos que culminan con la ovulación como son la activación del plasminógeno (Liu y col., 1987), la maduración meiótica del ovocito (Törnell y col., 1988) y la ruptura del folículo (Schmidt y col., 1990). En el presente estudio se observó que en animales en proestro, la microinyección del antagonista de los receptores VPAC-1 en el ovario derecho resultó en la disminución del porcentaje de animales ovulantes y del número de ovocitos liberados respecto a su ovario contralateral, efecto que no se observa cuando el antagonista se administra en el ovario izquierdo. En el 2017, Ayala mostró que en el día del proestro, los ovarios poseen un número similar de receptores VPAC-1, mientras que en el día del estro, momento en el que ocurre la ovulación, el ovario derecho expresa aproximadamente el doble de receptores VPAC-1 que el ovario izquierdo, lo que podría explicar que el efecto del bloqueo de los receptores sobre la ovulación haya sido más potente en el ovario derecho que en el izquierdo, resultando en una menor capacidad ovulatoria. Por lo cual proponemos que en el ovario derecho, el VIP modula la ovulación principalmente a través de la activación del receptor VPAC-1.

Cabe destacar que, ante la microinyección de cualquiera de las soluciones, se observó una tendencia hacia el incremento de la respuesta ovulatoria por parte de los ovarios contralaterales, que solo llegó a ser significativa cuando el antagonista se inyectó en el ovario derecho. Estos resultados evidencian la comunicación nerviosa que existe entre los ovarios, que se ha propuesto está dada por el NOS (Morales y col., 1993) y/o por el NV (Gerendai y col., 1998). Por estudios realizados en el mono se ha mostrado que después de la inyección de un trazador retrogrado en uno de los ovarios, se observa marca tanto en el ovario tratado, como en el contralateral, sugiriendo que la comunicación entre los ovarios podría ser una vía neural de asociación larga, que lleva información de un ovario al

otro (Nagle y col., 2005). Esta ruta de comunicación pudiera estar implicada en la regulación de la dominancia ovárica o de la selección del folículo dominante durante la ovulación (Nagle y col., 1994; 2005).

Los resultados del presente estudio son una evidencia más de la comunicación nerviosa que existe entre las gónadas, la cual parece estar dada en parte por las fibras VIPérgicas, lo que explicaría el hecho de que la ovulación se modifique de manera importante cuando se administra el antagonista de los receptores VPAC-1 en la bursa del ovario derecho y que estaría modulando de manera estimulante la ovulación en el ovario izquierdo.

En el presente estudio se observó que la microinyección del Vh en la bursa del ovario izquierdo o derecho resultó en el incremento de la secreción de **progesterona** cuando los animales fueron sacrificados a los 60 minutos o al estro vaginal. Resultados similares fueron obtenidos a una o 24 horas de la microinyección de solución salina en la bursa ovárica de animales en cada uno de los días del ciclo estral (Rosas y col., 2015), lo cual, de acuerdo con los autores pudo deberse a la distensión de la bursa ovárica que ocasionó la activación de una vía nerviosa de conexión entre los ovarios y las adrenales (Tóth y col., 2008).

No descartamos el hecho de que el incremento de progesterona se deba al estrés que experimentan los animales durante y después del procedimiento quirúrgico. Piva y colaboradores (1973) observaron que como respuesta al estrés se secreta ACTH, que estimula la liberación de progesterona de origen suprarrenal. Otra posibilidad es que las elevadas concentraciones de progesterona se deban al cambio en el microambiente ovárico debido a la inyección de agua. Cruz y colaboradores (2014) mostraron que la microinyección de agua destilada en el área preóptica hipotalámica anterior del lado izquierdo o derecho de ratas adultas

incrementa la concentración de progesterona en suero además de que modifica de manera asimétrica la respuesta ovulatoria, eventos que de acuerdo con los autores se deben a la respuesta diferencial de las células gliales y de las neuronas ante el estrés inducido por agua.

Por estudios *in vitro* se ha mostrado que en el ovario, el VIP estimula la actividad de la enzima adenilato ciclasa e incrementa la producción de AMPc (Gourlet y col., 1997; Banks y col., 2005; Pan y col., 2008). Además, tiene un efecto estimulante sobre la síntesis de progesterona debido a la activación de proteínas acarreadoras o con actividad enzimática que intervienen en la ruta esteroidogénica, tales como la StAR, el complejo enzimático P450<sub>scc</sub> y la 3 $\beta$ -HSD (Davoren y Hsueh, 1985; Trzeciak y col., 1986; Kowalewski y col., 2010). En un modelo *in vivo*, Rosas y colaboradores (2015) mostraron que los efectos estimulantes del VIP sobre la secreción de progesterona son asimétricos, varían en función del día del ciclo estral y del periodo de evolución; y que las señales nerviosas del NOS modulan el papel del VIP en el ovario (Rosas y col., 2018).

Contrario a los efectos del VIP, el antagonista de los receptores VPAC-1 inhibe la actividad del adenilato ciclasa y disminuye la producción de AMPc (Gourlet y col., 1997). En el presente estudio se observó que independientemente de la gónada tratada y del tiempo de evolución entre la cirugía y la autopsia, el antagonista de los receptores VPAC-1 disminuyó la concentración de progesterona a valores similares a las del grupo TA, por lo que sugerimos que: 1) la distensión de la bursa ovárica podría involucrar la activación de fibras nerviosas que transportan VIP, de ahí los efectos opuestos observados con la administración del antagonista; y 2) el VIP tiene un efecto estimulante sobre la secreción de progesterona que es mediado, en ambos ovarios, a través de la activación de los receptores VPAC-1,

aunque no descartamos que su efecto también sea el resultado de su unión al receptor VPAC-2.

Rosas y colaboradores (2015) mostraron que la microinyección unilateral de solución salina en el día del proestro resultó a los 60 minutos en un incremento de testosterona al tratar el ovario derecho, mientras que al tratar el ovario izquierdo incrementaron las concentraciones de estradiol, efecto que los autores atribuyeron a la perforación del peritoneo. Se ha propuesto que la perforación del peritoneo activa una vía de comunicación que comprende el peritoneo y los ovarios, lo que se ve reflejado en la alteración de la secreción de hormonas esteroides (Barco y col., 2003). De acuerdo con Flores y col. (2008), la información nerviosa que proviene de diferentes zonas del peritoneo regula de manera diferente la secreción de hormonas esteroides. En ratas, la estimulación mecánica de la piel abdominal del lado izquierdo o derecho resulta en una mayor actividad del NPO, lo que se acompaña del aumento de la presión arterial y una disminución del flujo sanguíneo ovárico, efectos que los autores atribuyeron a la activación de una vía de comunicación nerviosa multisináptica entre la pared abdominal y los nervios que llegan al ovario (Uchida y col., 2005). En el presente estudio se observó que la microinyección unilateral del Vh resultó a los 60 minutos en el aumento de la concentración de **testosterona** y **estradiol**. Es posible que, durante el procedimiento quirúrgico, la manipulación mecánica de la piel abdominal en conjunto con la perforación del peritoneo haya modificado la actividad de algunas fibras nerviosas que inervan la pared abdominal y el peritoneo y que están involucradas en la regulación de la secreción de hormonas esteroides.

Cuando los efectos del Vh fueron evaluados al estro, incremento la concentración de testosterona ante la inyección en el ovario derecho y la de estradiol cuando se administró en el ovario izquierdo. Estos efectos fueron

diferentes a los observados por Rosas y colaboradores (2015), 24 horas después de la microinyección unilateral de solución salina. Dado que el procedimiento quirúrgico fue similar en ambos estudios, sugerimos que los diferentes efectos sobre la secreción de hormonas esteroideas dependen del vehículo utilizado.

Por estudios *in vitro* se ha mostrado que el VIP regula de manera estimulante la secreción de andrógenos, a través de la activación de la 17 $\alpha$ -hidroxilasa (Johnson y col., 1994). En la rata se observó que la administración unilateral de VIP en la bursa ovárica tiene un efecto asimétrico sobre la secreción de testosterona que depende del día del ciclo estral, lo que de acuerdo con los autores se debe a la sensibilidad diferencial de cada ovario al VIP, que parece variar en función del día del ciclo estral (Rosas y col., 2015).

En el presente estudio se observó que la microinyección del antagonista de los receptores VPAC-1 en la bursa del ovario izquierdo resultó a los 60 minutos o al estro en una menor concentración de testosterona, sin cambios cuando se administró en el ovario derecho. Morales-Ledesma y colaboradores (2020) mostraron que 60 minutos después de la microinyección de un antagonista no selectivo de los receptores VIPérgicos en la bursa ovárica izquierda de animales en estro, se depleta la concentración de testosterona, mientras que la inyección del lado derecho no modifica la concentración del andrógeno. Dado que la expresión de los receptores VPAC-1 en el ovario izquierdo y derecho es similar en el día del proestro y asimétrica en el día del estro, siendo mayor en el ovario derecho que en el izquierdo (Ayala, 2017), sugerimos que el VIP regula de manera diferente la secreción de testosterona en cada ovario, donde en el ovario izquierdo tiene un efecto estimulante en ambos días del ciclo, mientras que en el ovario derecho pareciera no estar participando en la regulación de la secreción de testosterona.



En ovarios de ratas neonatas se ha mostrado que el VIP estimula la actividad de las aromatasas, enzimas que participan en el metabolismo de los andrógenos a estrógenos (George y Ojeda, 1987). En el presente estudio se observó que a los 60 minutos de la microinyección del antagonista de los receptores VPAC-1 en el ovario derecho disminuyó la concentración de estradiol a valores normales, similar a lo observado cuando se administró el antagonista en la bursa del ovario izquierdo y se evaluaron los efectos al estro. Estos resultados muestran que el VIP tiene un efecto estimulante sobre la secreción de estradiol que es tiempo-dependiente, tal como ha sido descrito por estudios *in vitro* (Davoren y Hsueh, 1985; Ahmed y col., 1986) e *in vivo* (Rosas y col., 2015). Asimismo, estos resultados muestran que la regulación que ejerce el VIP sobre la secreción de estradiol, mediada por la activación del receptor VPAC-1, depende del ovario en estudio.

Previamente hemos mostrado a través del uso de un agonista no selectivo de los receptores VIPérgicos que en el día del proestro, el VIP tiene un efecto asimétrico sobre la secreción de estradiol a los 60 min, mientras que a las 24 horas su efecto es estimulante en ambos ovarios (Rosas y col., 2015). Por lo que, la falta de efectos del antagonista de los receptores VPAC-1 nos permite sugerir que en el ovario izquierdo de animales en proestro, y en el ovario derecho de animales en estro, el VIP regula la secreción de estradiol principalmente a través del receptor VPAC-2.

La disminución en la concentración de estradiol observada al estro pudiera estar asociada al aumento de la atresia folicular observada ante el bloqueo de los receptores VPAC-1.

Parra y colaboradores (2007) demostraron que el contenido de VIP en el ovario de la rata varía durante el ciclo estral. Los efectos del VIP en los ovarios son mediados por la inervación simpática del NOS (Rosas y col., 2018). Dado que el NOS es la principal fuente de inervación VIPérgica al

ovario (Dees y col., 1986) y que el ovario derecho recibe un mayor número de fibras del NOS que el izquierdo (Klein y Burden, 1988), es posible que la respuesta diferencial observada en el presente estudio por efectos del antagonista de los receptores VPAC-1 esté influenciada por el aporte VIPérgico que recibe cada gónada, sin embargo, se requieren más estudios para evaluar dicha posibilidad.

Tomados en conjunto, los presentes resultados nos permiten concluir que en la rata adulta cíclica, los efectos estimulantes del VIP sobre la secreción de progesterona y asimétricos sobre la secreción de testosterona y estradiol son mediados a través de la activación del receptor VPAC-1, efectos que dependen de la gónada tratada y del tiempo de evolución entre el estímulo y la autopsia. El proceso de ovulación es regulado de manera asimétrica por el VIP, siendo el ovario derecho donde el péptido parece estar actuando principalmente a través del receptor VPAC-1.

## CONCLUSIONES

Con base en el bloqueo específico de los receptores VPAC-1, los resultados del presente estudio muestran que el VIP:

- ❖ Modula de manera asimétrica la ovulación. En el ovario derecho su participación parece estar mediada principalmente por la activación del receptor VPAC-1.
- ❖ Regula de manera estimulante la secreción progesterona a través de la activación del receptor VPAC-1, independientemente de la gónada tratada y del tiempo transcurrido entre el estímulo y la autopsia.
- ❖ Modula de manera estimulante la secreción de testosterona en el ovario izquierdo por la activación de los receptores VPAC-1, independiente del tiempo transcurrido entre el estímulo y la autopsia.
- ❖ Regula de manera asimétrica la secreción de estradiol, efectos que varían en función del tiempo transcurrido entre el estímulo y la autopsia.

Tomados en conjunto, los resultados del presente estudio permiten concluir que en el día del proestro, el VIP regula de manera diferente las funciones de cada ovario a través de la activación de los receptores VPAC-1. Además, apoyan la existencia de una vía de comunicación nerviosa, entre los ovarios que pudiera estar dada por fibras de tipo VIPérgicas.

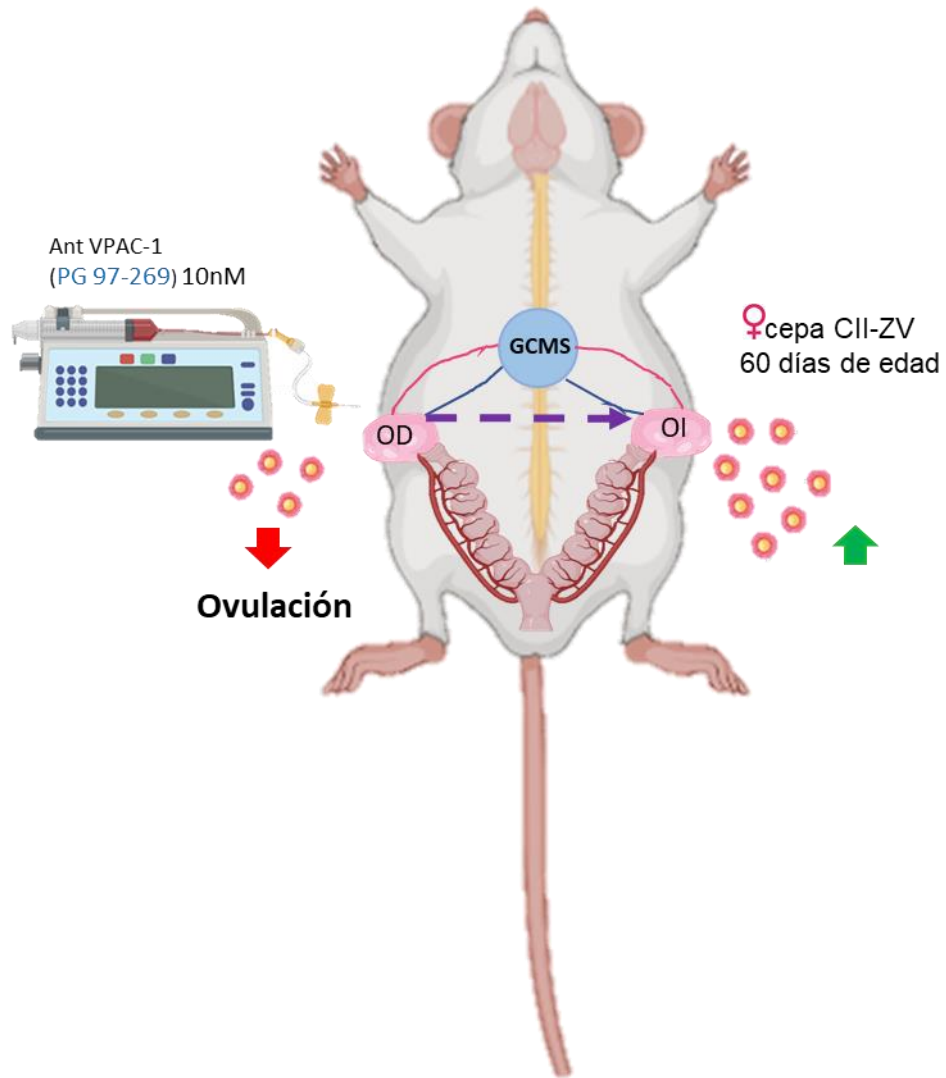
## MODELO 1

En ratas adultas cíclicas en proestro, el bloqueo selectivo de los receptores VPAC-1 en la bursa izquierda o derecha resulta en la disminución de la concentración de progesterona y regula de manera asimétrica la concentración de testosterona y estradiol. Por lo que proponemos que el VIP ejerce un efecto estimulante a través de la activación de los receptores VPAC-1 sobre la secreción de progesterona, efecto que no depende del momento de evaluación, mientras que la secreción de testosterona y estradiol, son moduladas de manera diferencial por el VIP.



## MODELO 2

En animales cíclicos en proestro, el bloqueo de los receptores VPAC-1 del ovario derecho resultó en la disminución de la cuota ovulatoria por el ovario tratado (ovario derecho) y el aumento, por el ovario contralateral (ovario izquierdo). No así, cuando el antagonista se inyecta en el ovario izquierdo. Dado que el número de receptores VPAC-1 en el día del proestro es similar en ambos ovarios, y que en el día del estro, el ovario derecho expresa aproximadamente el doble de receptores VPAC-1 que el izquierdo, sugerimos que en el ovario derecho el VIP regula el proceso de ovulación principalmente a través de la activación del receptor VPAC-1; y que ante la falta del estímulo VIPérgico se activa una vía de comunicación nerviosa, que pudiera ser de tipo VIPérgica, la cual promueve el intercambio de información desde el ovario derecho al izquierdo, y que resulta en el incremento de la ovulación por esta gónada.



**Modelo 2.** Efecto del bloqueo de los receptores VPAC-1 a través de la microinyección del antagonista específico PG 97-269 en la bursa ovárica derecha de ratas cíclicas en proestro, sacrificadas al presentar el estro vaginal inmediato. Receptor VPAC-1; GSMS, Ganglio celiaco mesentérico superior; OI, ovario izquierdo; OD, ovario derecho.

## REFERENCIAS

1. Advis J, Ahmed C, Ojeda R. (1989) Direct hypothalamic control of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) levels in the developing rat ovary. Brain Research Bulletin. 22: 605-610.
2. 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.
3. Alberts B, Bray J, Hopkin K, Lewis J, Raff M, Roberts K, Wallter P. (2010) Introducción a la Biología Molecular. 2a edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Cap.18. pp 629-633.
4. Antonio RA. (10 de septiembre de 2020) ilustraciones médicas y anatómicas, [ilusmedical.https://ilusmedical.com/ilustraciones-medicas-y-anatomicas](https://ilusmedical.com/ilustraciones-medicas-y-anatomicas).
5. Arai H. (1920) On the postnatal development of the ovary (albino rat) with especial reference to the number of ova. Am J Anat. 27:405-462.
6. Arce V, Catalina P, Mallo F. (2006) Endocrinología. Editorial Universidad de Santiago de Compostela. España. Cap. 12. pp 96-98.
7. Ayala RS. (2017) Expresión de los receptores del Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) en el ovario de la rata adulta cíclica. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. pp 37-47.
8. Baljet B, Drukker J. (1979) The Extrinsic Innervation of the abdominal organs in the Female Rat. Acta anat. 104: 243-267.
9. Banks MR, Farthing MJG, Robberecht P, Burleigh DE. (2005) Antisecretory actions of novel vasoactive intestinal polypeptide (VIP) antagonist in human and rat small intestine. British Journal of Pharmacology. 144: 994-1001.
10. Barco AI, Flores A, Chavira R, Matusumura DP, Domínguez R, Cruz ME. (2003) Asymmetric effects of acute hemiovariectomy on steroid hormone secretion by the *in situ* ovary. Endocrine. 21: 209-215.
11. Barret K, Barman S, Boitano S, Brooks H. (2013) Fisiología Médica. 24a Edición. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. España. pp 308.
12. Becú-Villalobos D, Lacau-Mengido I. (1990) Control Hormonal del Desarrollo Prepuberal en la Rata Hembra. Acta Physiol Pharmacol Latinoam, 40(1): 1-17.
13. Beers W. (1975) Follicular plasminogen and plasminogen activator and the effect of plasmin on ovarian follicular wall. Cell. 6(3): 379-386.
14. Berne RM, Levy MN. (2006) Fisiología. 4a edición, Editorial Elsevier-Science, Madrid, España. pp. 54-56.



15. Billig H, Furuta I, Hsueh A. (1993) Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa-cell apoptosis. *Endocrinology*. 133: 2204-2212.
16. Botella J. (1995) El ovario, fisiología y patología. Editorial Diaz de Santos. Madrid España. pp.49-57
17. Brann DW, Mahesh VB. (1991) Role of corticosteroids in female reproduction. *FASEB Journal*.5:2691-2698.
18. Bransome E, Reddy W. (1961) Studies of adrenal nucleic acids: the influence of ACTH, unilateral adrenalectomy and growth hormone upon adrenal RNA and DNA in the dog. *Endocrinology*. 69: 997-1008.
19. Braw R, Tsafirri A. (1980) Follicles Explanted from Pentobarbitone-treated Rats Provide a Model for Atresia. *Journal of Reproduction and Fertility*. 59: 259-265.
20. Burbank F. (2009) Fibromas, menstruación, parto y evolución: la fascinante historia de los vasos sanguíneos uterinos. Tucson: WHEATMARK INC. Cap 1 pp.1-33.
21. Burden H, Lawrence I. (1977) The Effect of denervation on compensatory ovarian hypertrophy. *Neuroendocrinology*. 23: 368-378.
22. Burden H, 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.
23. Burden HW. (1985) The Adrenergic Innervation of Mammalian Ovaries. En: Ben-Jonathan N, Barh JM, Weiner RI. (Eds.) *Catecholamines as Hormone Regulator*. Raven Press. New York. pp. 261-278.
24. Byskov A. (1978) Follicular atresia. En: Jones RE (Ed) *The vertebrate ovary* Plenum Press, Nueva York pp. 533-562.
25. Caracava F, Rodríguez J, Castel J, Guzmán J, Delgado M, Guerrero M, Alcalde M, Gonzáles P. (2005) *Bases de la Producción Animal*. Editorial Universidad de Cordoba. España. Cap.2. pp. 60-69.
26. Carlson B. (2009) *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*. 4ª edición. Editorial Elsevier. Ámsterdam. Cap.16. pp. 416-428.
27. Casanueva F, Vázquez G. (1995) *Endocrinología Clínica*. Editorial Diaz de Santos. España. pp. 41-445.
28. Ceraudo E, Tan Y, Pascal N, Couvineau A, Laburthe M. (2008) The N-Terminal Parts of VIP and Antagonist PG 97-269 Physically Interact with Different Regions of the Human VPAC1 Receptor. *Mol Neurosci*. 36: 245-248.

29. Céspedes R, Pradere J, Bermúdez V, Díaz T, Perozo, Riera M. (2006) Arterial and venous supply of the uterus and ovaries in the Bitch (*Canis familiaris*) and its relationship with ovarian activity. *Revista Científica*. 4: 353-363.
30. Chen N, Li Y, Wang W, Ma Y, Zhang Q. (2012) Vasoactive intestinal peptide can promote the development of neonatal rat primordial follicles during *in vitro* culture. *Biology of Reproduction*. 88: 1-8.
31. Chul L, Jin Cho, Kim J, Kim, Kang B, Cha C, Min Joo. (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 Research*. 1351: 32-40.
32. Collado B, Carmena M, Sánchez M, Ruíz A, Bajo A, Fernández A, Varga J, Schally A, Prieto J. (2005) Expression of Vasoactive Intestinal Peptide and Functional VIP Receptors in Human Prostate Cancer: Antagonistic Action of a Growth- Hormone Releasing Hormone Analog. *Int J Oncol*. 26: 1629-1635.
33. Comino R, López G. (2004) *Obstetricia y Ginecología*. Editorial Ariel. España. Cap. 3 pp. 24-38.
34. Cooke PS, Buchanan DL, Young P, Setiawan T, Brody J, Korach KS, Taylor J, Lubahn DB, Cunha GR. (1997) Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 6535-6540.
35. Costanzo LS. (2011) *Fisiología*. 4a edición. Editorial Elsevier. España. pp. 379-401.
36. Couvineau A, Laburthe M. (2011) The family B1 GPCR: Structural Aspects and Interaction with Accessory Proteins. *Current Drug Targets*. 13: 103-115.
37. Couvineau A, Laburthe M. (2012) VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins. *Br. J. Pharmacol*. 166: 42-50.
38. Crowe R, Milner P, Lincoln J, Burnstock G. (1987) Histochemical and biochemical investigation of adrenergic, cholinergic and peptidergic innervation of the rat ventral prostate 8 weeks after streptozotocin induced diabetes. *J Auton Nerv System*. 20: 103-112.
39. Cruz ME, Olvera E, Perez MJ, Min El, Flores A, Cárdenas M, Chavira R, Domínguez R. (2014) Effects of unilaterally microinjecting ethanol in the preoptic- anterior hypothalamic areas of rats on ovulation. *Alcohol Clin Exp Res*. 38: 1611-1621.

40. Curry TE, Lawrence IE, Burden HW. (1984) Effect of ovarian sympathectomy on follicular development during compensatory ovarian hypertrophy in guinea pig. *J Reproduction Fert.* 71: 39-44.
41. D´Albora H, Lombide P, Ojeda S. (2000) Intrinsic Neurons in the Rat Ovary: An Immunohistochemical Study. *Cell Tissue.* 300: 47-56.
42. Dallman MF. (1985) Control of adrenocortical growth *in vivo*. *Endocrine Research.* 10: 213-242.
43. Davoren JB, Hsueh AJ. (1985) Vasoactive intestinal peptide: a novel stimulator of steroidogenesis by culture rat granulosa cells. *Biology of Reproduction.* 33: 37-52.
44. Dees WL, Ahmed CE, Ojeda SR. (1986) Substance P and vasoactive intestinal peptide-containing fibers reach the ovary by independent routes. *Endocrinology.* 119: 638-664.
45. 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.
46. Dickson L, Aramori I, McCulloch J, Sharkey J, Finlayson K. (2006) A systematic comparison of intracellular cyclic AMP and calcium signaling highlights complexities in human VPAC/PAC receptor pharmacology. *Neuropharmacology.* 51:1086–1098.
47. Dickson L, Finlayson K. (2009) VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacol Ther.* 121: 294–316.
48. Dissen G, Ojeda SR. (1999) Ovarian Innervation. *Encyclopedia of Reproduction.* Academic Press. USA. 3: 583-589.
49. Domínguez R, Chávez R, Cruz M. (1991) La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: *Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción.* Miguel Ángel Porrúa. México. pp. 161-192.
50. Domínguez R, Cruz M, Chávez R. (1989) Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary related to ovary innervation. In *Growth Factors and the Ovary.* Ed. An Hirshfield Plenum Press. New York and London. pp. 321-325.
51. Domínguez R, Cruz M, Morán C. (1998) Differential effects of ovarian local anesthesia during pro-oestrus on ovulation by the right or left ovary in normal and hemi-ovariectomized adults rats. *Journal of Reproduction and Fertility.* 130: 185-190.

52. Domínguez R, Morales L, Cruz M. (2003) Ovarian asymmetry. Review of Biomedical Sciences. 5: 95-104.
53. Domínguez, Cruz- Morales SE. (2011) The ovarian innervation participates in the regulation of ovarian functions. Endocrinology y Metabolic Syndrome.1-10.
54. Escalona N. (2018) Efecto de la microinyección de atropina en la bursa ováricas obre la ovulación en ratas con o sin el síndrome de ovario poliquístico. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 46-50.
55. Estrada FE, Uribe MC. (2002) Atlas de histología de vertebrados. Ed. FOC. México: Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 149-160.
56. Fahrenkrug J, Schaffalitzky D, Muckadell OB. (1977) Vasoactive intestinal polypeptide occurs in nerves of the female genitourinary tract. Science.197: 1374–1375.
57. Fiala S, Sproul E, Fiala A. (1956) The action of corticotropin (ACTH) on nucleic acids and subcellular elements of the adrenal cortex. Biophysic and Biochem Cytol. 2: 115-126.
58. Flaws JA, DeSanti A, Tilly KI, Javid RO, Koji K, Jhonson AL, Hirshfield AN, Tilly JL. (1995) Vasoactive intestinal peptide mediated suppression of apoptosis in the ovary: Potential mechanisms of action and evidence of a conserved antiatherogenic role through evolution. Endocrinology. 136: 4351-4359.
59. Flores A, Gallegos A, Velasco J, Mendoza F, Everardo P, Cruz M, Domínguez R. (2011) Acute effects of unilateral sectioning the superior ovarian nerve of the rats with unilateral ovariectomy on ovarian hormones (progesterone, testosterone and estradiol) levels vary during the estrous cycle. Reproductive Biology and Endocrinology. 9:34.
60. Flores A, Gallegos A, Velasco J, Mendoza F, Montiel C, Everardo P, Cruz M, Domínguez R. (2008) The acute effects of bilateral ovariectomy or adrenalectomy on progesterone, testosterone and estradiol serum Levels depend on the surgical approach and the day of the estrous cycle when they are performed. Reproductive Biology and Endocrinology. 6: 48
61. Flores I, Velasco C, Pardo M, Martínez M. (2004) Apoptosis y atresia folicular: un binomio esencial en el desarrollo ovárico. Revista de Veterinaria. México. 36(01): 87-103.
62. Fredericks C, Lundquist L, Mathur R, Ashton S, Landgrebe S. (1983) Effects of Vasoactive Intestinal Peptide upon ovarian steroids, ovum transports, and fertility in the rabbit. Bio Reprod. 28: 1052-1060.

63. Fredriksson R, Schiöth M. (2006) G Protein-coupled receptors in human genome. In: Rognan D (Ed) Ligand Design for G Protein-Coupled Receptors. Wiley-VCH: Weinheim. 30: 1-27.
64. Freeman M. (2006) Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. En: Jeong K, Kaiser U. (Ed) Physiology of Reproduction. 3a edición. Editorial Elsevier. Cap. 43. pp. 2327-2388.
65. Gartner LP, Hiatt JL. (2011) Atlas en color y texto de Histología. 6a edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid España. Cap. 20. pp 272-280.
66. Gartner P, Hiatt L. (2007) Texto Atlas de Histología. 3ª edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana, pp. 218-225.
67. 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.
68. Gerendai I, Thóth I, Boldogkoi Z, Halász B. (1998) Neuronal labelling in the Rat Brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique. Reproductive Neuroendocrinology. 68: 244-256.
69. Gerendai I, Thóth I, Boldogkoi 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.
70. Gore-Langton R, Armstrong D. (1994) Follicular steroidogenesis and its control. En: Knobil E. Neil J. (Eds) The Physiology of Reproduction. 2a edición. Editorial Raven Press. New York. Vol. 2. Cap. 11. pp. 571-611.
71. Gourlet P, Neef PD, Cnudde J, Waelbroeck M, Robberecht P. (1997) *In vitro* properties of a high affinity selective antagonist of the vip1 receptor. Peptides. 18: 1555-1560.
72. Grasso E, Gori S, Papparini D, Soczeewski E, Fernández L, Gallino L, Salamone G, Martínez G, Irigoyen M, Ruhlmann F, Pérez C, Ramhorst R. (2017) VIP induces the decidualization program and conditions the immunoregulation of the implantation process. Mol. Cell. Endocrinol.1-26.
73. Greenwald GG, Roy SK. (1994) Follicular development and its control. En: Knobil E, Neill JD. The Physiology of Reproduction. 2a edición. Editorial Raven Press. New York. pp 629-724.
74. Greep R. (1981) Recent Progress in Hormone Research. Editorial Academic Press. Cap 2. pp. 190-200.

75. 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.
76. Guijarro L, Juarranz M, Marinero M, Pajuelo L, Carmena M, Prieto J. (1996) Modulation of cyclic AMP and inositol phosphate production in rat prostatic cultures by VIP/ PACAP, ATP and carbachol. Role in prostatic proliferation. *Ann NY Acad Sci*. 805: 723-728.
77. Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Robberecht P, Sreedharan SP, Wank SA, Waschek JA. (1998) International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of Receptors for Vasoactive Intestinal Peptide and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide. *Pharmacol. Rev*: 50: 265–270.
78. Hsueh A, Billig H, Tsfriri A. (1994) Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process. *Endocrinology Reviews*. 15(16): 707-724.
79. Hulshof SCJ, Dijkstra G, Van Der Beek EM, Bevers MM, Figueiredo JR, Beckers JF, Van Hurk R. (1994) Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal peptide and neuropeptide Y in the bovine ovary. *Biology of Reproduction*. 50: 553-560.
80. Igarashi H, Ito T, Tapas L, Mantey SA, Hous W, Coy HD. (2002) Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) and VIP Receptors-Elucidation of Structure and Function for Therapeutic Applications. *International Journal of Clinical Medicine*. 303: 445–460.
81. Inzunza O, Koenig C, Salgado G. (2015) *Morfología Humana*. Ediciones UC. Chile. Cap.9 pp. 61-73.
82. Irving-Rogers H, Hummitsch K, Murdiyarso L, Bonner W, Sado Y, Ninomiya Y, Couchman J, Sorokin L, Rodgers R. (2010) Dynamics of extracellular matrix in ovarian follicles and corpora lutea of mice. *Cell tissue research*. 339: 613-624.
83. 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.
84. Johnson AL, Jean ZL, Malamed S. (1994) Vasoactive intestinal polypeptide induced expression of cytochrome p450 cholesterol side chain cleavage and 17 $\alpha$ -hidroxilase enzyme activity in hen granulosa cells. *Biology of Reproduction*. 51: 327-333.
85. Juarranz M, De Neef P, Robberecht P. (1999) Vasoactive Intestinal Polypeptide receptor VPAC (1) subtype is predominant in rat prostate membranes. *Prostate* 41:1-

86. Klein C, Burden H. (1988) Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neurosci Lett.* 29: 217-222.
87. Kowalewski MP, Dyson MT, Boss A, Stocco DM. (2010) Vasoactive intestinal peptide (VIP)-mediated expression and function of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 328: 93-103.
88. Kühnel W. (2003) Atlas de color de Citología e Histología. Editorial Médica Panamericana. España. pp. 540-543.
89. 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.
90. Lange W, Unger J. (1990) Peptidergic innervation within the prostate gland and seminal vesicle. *Urol Res.* 18: 337-340.
91. Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, Ojeda SR. (2000) An increased intra ovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology.* 141: 1059–1072.
92. Lara HE, McDonald JK, Ahmed CE, Ojeda SR. (1990) Guanethidine- Mediated Destruction of Ovarian Sympathetic Nerves Disrupts Ovarian Development and Function in Rats. *Endocrinology.* 127: 2199-2209.
93. Lawrence LE, Burden HW. (1980) The origin of extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *Anatomic Record.* 196: 51-59.
94. Lawton E. (1972) Facilitatory feedback effects of adrenal and ovarian hormones on LH secretion. *Endocrinology.* 90: 575-579.
95. Leroux F, Goossens J, Pommery N, Hénichart J. (1994) A new vasoactive intestinal peptide antagonist discriminates VIP receptors on guinea pig trachea and human neuroblastoma cells. *Regulatory Peptides.* 52: 119-128.
96. 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.
97. Li S, Fan Q, Xie Y, Qiu Q, Liang Y, Zhang Q. (2019) VIP activates primordial follicles of rat through ERK-mTOR pathway in tissue culture. *Reproduction* 157: 475-484.
98. Liu Y, Kasson BG, Dahl KD, Hsueh AJW. (1987) Vasoactive Intestinal Peptide Stimulates Plasminogen Activator Activity by Cultured Rat Granulosa Cells and Cumulus-Oocyte Complexes. *Peptides.* 8: 29-33.



99. Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza JC, Moro MA, Portolés A. (2008) *Farmacología básica y clínica*. 18ª edición. Editorial Médica Panamericana. España. pp. 97-102.
100. Marcondes FK, Bianchi, FJ, Tanno AP. (2002) Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J. Biol.* 62: 609-614.
101. Markstrom E, Svensson E, Shao R, Svanberg B, Billig H. (2002) Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. *Reproduction*.123(1): 23-30.
102. Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S. (2012) Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: Regulation by Survival and Death of Granulosa Cells. *J Development y Reproduction*. 58(1): 44-50.
103. Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR. (1997) A Role for Neurotransmitters in Early Follicular Development: Induction of Functional Follicle-Stimulating Hormone Receptors in Newly Formed Follicles of the Rat Ovary. *Endocrinology*. 138: 3320-3329.
104. McCulloch D, Lutz E, Johnson M, MacKenzie C, Mitchell R. (2000) Differential activation of phospholipase D by VPAC and PAC1 receptors. *Ann N Y Acad Sci*. 921: 175–185.
105. Miller W, Auchus R. (2011) The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev*. 32: 81-151.
106. Moody TW, Dudek J, Zakowicz H, Walters J, Jensen RT, Petricoin E, Couldrey C, Green JE. (2004) VIP receptor antagonists inhibit mammary carcinogenesis in C3(q) SV40T antigen mice. *Life Sci*. 30(11): 1345-1357.
107. Moody TW, Ito T, Osefo N, Jensen RT. (2011) VIP and PACAP: Recent insights into their functions/roles in physiology and disease from molecular and genetic studies. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 18: 61–67.
108. Moore K, Persaud T, Torchia M. (2008) *Embriología clínica*. Editorial Elsevier. España. Cap 2 pp. 20-27.
109. Morales L, Chávez R, Domínguez R. (1993) Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve. *Med. Sci. Rei*. 21:15-17.
110. Morales-Ledesma L, Trujillo A, Ramírez I, Rosas G, Linares R. (2020) Administration of a VIP-antagonist in vivo modifies ovarian hormone secretion in a rat model with polycystic ovary syndrome. *Life Sciences* 265.
111. Morán C, Franco A, Morán L, Handal A, Morales L, Domínguez R. (2005) Neural activity between ovaries and the prevertebral celiac-superior mesenteric ganglia varies during the estrous cycle of the rat. *Endocrine*. 26: 147-152.



112. Mulheron G, Quaopani S, Nolin J. (1989) The ontogeny of immunoreactive, endogenous FSH and LH in the rat ovary during early folliculogenesis. *Society for experimental biology and medicine*. 190: 91-97.
113. Murray A, Molinek M, Baker S, Kojima F, Smith M, Hillier S, Spears N. (2001) Role of ascorbic acid in promoting follicles integrity and survival in tract mouse ovarian follicles in vitro. *Reproduction*. 121: 89-96.
114. Nagle C, Digiano L, Paul N. (1994) Interovarian communication for the control of follicular growth and corpus luteum function in the Cebus monkey. *Am. J. Primatol*. 34: 19-28.
115. Nagle C, Mendizábal A, Lahoz M, Porta M, Torres M. (2005) Transfer pathways between the ovaries and the uterus in the cebus monkeys (*Cebus apella*). *Gen Comp Endocrinol*. 144: 248-256.
116. Nanjidsuren T, Naidansuren P, Park CV, Yun, SJ, Sim BW, Kang, MH, Lee SR, Chang KT, Min, KS. (2011) Expression and localization of the 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) enzyme in the reproductive tissues of the cynomolgus monkey *Macaca fascicularis*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 127. 337-344.
117. Nequin G, Alvarez A, Campbell. (1975) Alterations in Steroid and Gonadotropin Release Resulting from Surgical Stress During the Morning of Proestrus in 5- Day Cyclic Rats. *Endocrinology*. 97: 718-724.
118. Neumann J, Covineau A, Murail S, Lacapère J, Jasmin N, Laburthe M. (2008) Class-B GPCR activation: is ligand helix-capping the key. *Trends Biochem Sci*. 333: 314-319.
119. Noack L, Sánchez M, Clavijo S. (2008) p53 y su papel en el epitelio superficial del ovario. *Scielo*. 49(4):561-593.
120. Ojeda S, Skinner M. (2006) Puberty in the Rat. En: Knobil E. Neil J. (Eds) *The Physiology of Reproduction*. 2a edición. Editorial Raven Press. New York. pp. 2061-2126.
121. Oliver RH, Chen GD, Yen J. (1999) Graafian Follicle. En Knobil E, Neill JD. (Eds) *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press. San Diego. Pp.565-568.
122. Onoue S, Misaka S, Yamada S. (2008) Structure-activity relationship of vasoactive intestinal peptide (VIP): potent agonists and potential clinical applications. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 377: 579-590.
123. Onoue S, Waki Y, Hamanaka K, Takehiko Y, Kashimoto K (2001) Vasoactive intestinal peptide regulates catecholamine secretion in rat PC12 cells through the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor. *Biomed Res*. 22: 77-82.

124. Pan C, Hamren S, Roczniak S, Tom I, DeRome M. (2008) Generation of PEGylated VPAC1-selective antagonist that inhibit proliferation of a lung cancer cell line. *Peptides*. 29: 479-486.
125. Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez M, Fraile B, Anadón R, Sáez F. (2007) *Citología e histología vegetal y animal: biología de las células y tejidos animales y vegetales*. 4ª edición. Editorial McGraw-Hill-Interamericana. España. Cap. 9. pp. 395-400.
126. Parra C, Fiedler J, Luna L, Greiner M, Padmanabhan V, Lara H. (2007) Participation of vasoactive intestinal polypeptide in ovarian steroids production during the rat estrus cycle and in the development of estradiol valerate- induced polycystic ovary. *Reproduction*. 133: 147-154
127. Pechon-Vallée C, Magalon K, Rasolonjamahary R, Enjalbert A, Gérard C. (2000) Vasoactive Intestinal Polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides stimulate mitogen activates protein kinase in the pituitary cell line GH4C1 by a 3', 5' cyclic adenosine monophosphate pathway. *Neuroendocrinology*. 72(1): 46-56.
128. Piva F, Gagliano P, Motta M, Martini L. (1973) Adrenal progesterone: Factors controlling its secretion. *Endocrinology*. 93: 1178-1184.
129. Raff H, Levitzky M. (2013) *Fisiología Médica: Un enfoque por aparatos y sistemas*. Editorial McGraw Hill. España. Cap. 9. pp 178-184.
130. Rampelbergh J, Poloczek P, Francoys I, Del-Porte C, Winand J, Robberecht P, Waelbroeck M. (1997) The pituitary adenylates cyclase activating polypeptide (PACAP I) and VIP (PACAP II VIP1) receptors stimulate inositol phosphate synthesis in transfected CHO cells through interaction with different G proteins. *Biochim. Biophys. Acta*. 1357: 249-255.
131. Reddix R, Kuwahara A, Wallace L, Cooke HJ. (1994) Vasoactive intestinal polypeptide: A transmitter in submucous neurons mediating secretion in guinea pig distal colon. *Pharmacol*. 269: 1124-1129.
132. Reich R, Miskin R, Tsafiriri A. (1985) Follicular plasminogen activator: Involvement in ovulation. *Endocrinology*. 116: 516-521.
133. Reubi JC, Waser BL, Gebbers JO, Robberecht P, Laissue A. (2000) Vasoactive Intestinal Peptide/ pituitary adenylate cyclase- activating peptide receptor subtypes in human tumors and their tissues of origin. *Cancer Res*. 60(11): 3105-3112.
134. Reubi JC. (2000) *In vitro* evaluation of VIP/PACAP receptors in healthy and diseased human tissues. Clinical implications. *Ann NY Acad Sci*. 921: 1-25.

135. Reynolds (1973) Blood and lymph vascular system of the ovary. En Domínguez R, Cruz M, Morán C. (1998) Differential effects of ovarian local anesthesia during pro-oestrus on ovulation by the right or left ovary in normal and hemiovariectomized adults rats. *Journal of Reproduction and Fertility*. 130: 185-190.
136. Robberecht P, Gourlet P, De Neef P, Woussen MC, Vandermeers-Piret, MC, Vand ermeers A, Christophe J. (1992) Receptor occupancy and adenylate cyclase activation in AR 4-2J rat pancreatic acinar cell membranes by analogs of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptides amino-terminally shortened or modified at position 1,2,3,20, or 21, *Mol. Pharmacol.* 42 :347–355.
137. Robberecht, P, Neef P, Gourlet, P, Cauvin, A, Coy D, Christophe J. (1989) Pharmacological characterization of the novel helodermin/VIP receptor present in human SUP-T1 lymphoma cell membranes. *Regul Pept.* 26: 117–126.
138. Ronald A, Moenter S. (2014) Reproductive neuroendocrine dysfunction in polycystic ovary syndrome. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 35: 494-511.
139. Rosas G, Linares R, Ramírez D, Vieyra E, Trujillo A, Domínguez R, Morales-Ledesma L. (2018) The neural signals of the superior ovarian nerve modulate in an asymmetric way the ovarian steroidogenic response to the vasoactive intestinal peptide. *Frontiers in Physiology.* 9: 1142.
140. 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.
141. Rosas G. (2011) Participación del péptido intestinal vasoactivo en la regulación de la ovulación y la secreción hormonal. La rata con síndrome del ovario poliquístico como modelo de estudio. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
142. Ross M, Pawlina W. (2015) *Histología, texto y atlas a color con biología celular y molecular.* 7a edición. Editorial Médica Panamericana. Barcelona, España. Cap. 23. pp.831-837.
143. Rouyer C, Couvineau A, Voisin T, Laburthe M. (1989) Ac-Tyr1 hGRF discriminates between VIP receptors from rat liver and intestinal epithelium. *Life Sci.* 45: 829–833.
144. Said SI, Mutt V. (1970) Polypeptide with broad Biological Activity: isolation from small Intestine. *Science.* 169: 121-1218.
145. Said SI, Rosenberg RN. (1976) Vasoactive Intestinal Peptide: Abundant Immunoreactivity in Neural Cell Lines and Normal Nervous Tissue. *Science.* 192: 907.

146. Said SI. (1986) Vasoactive intestinal peptide. *Journal of Endocrinology Investigation*. 9: 191-200.
147. Said SI. (1991) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in asthma. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 629: 305-318.
148. Sánchez-Criado J. (1999) Fisiología del Ovario. En: Tresguerres (Ed) *Fisiología Humana*. 2ª edición. pp 1020-1032.
149. Schmidt G, Jorgensen J, Kannisto P, Liedberg F, Ottesen B, Owman Ch. (1990) Vasoactive intestinal polypeptide in the PMMSG 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.
150. Silverthorn D. (2008) *Fisiología Humana, Un Enfoque Integrado*. 4ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
151. Spong C, McCune S, Gibney G, Abebe D, Brenneman D, Hill J. (1999) Regulation of post implantation mouse embryonic growth by maternal Vasoactive Intestinal Peptide. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 897:101-108.
152. Spratto GR, Miller JW. (1968) The effect of various estrogens on the weight, catecholamine content and rate of contractions of rat uterine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 161: 1-6.
153. Thews G, Mutschler E, Vaupel P. (1983) *Anatomía Fisiología y Patofisiología del Hombre*. Editorial Reverté. Barcelona. Cap. 19. pp 710.
154. Tilly J, Billig H, Kowalski K, Hsueh A. (1992) Epidermal growth-factor and basic fibroblast growth-factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa-cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocrinol*. 6: 1942-1950.
155. Tilly J, Johnson A. (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.
156. Törnell J, Carlsson B, Hillensjö T. (1988) Vasoactive intestinal peptide stimulates oocyte maturation, steroidogenesis, and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production in isolated preovulatory rat follicles. *Biology of Reproduction*. 39(2): 213-220.
157. Tóth IE, Banczerowski P, Boldogkoi Z. (2008) Cerebral neurons involved in the innervation of both the adrenal gland and the ovary: A double viral tracing study. *Brain Res*. 77: 306-311.

158. Tóth IE, Wiesel O, Boldogkoi Z, Bálint K, Tapaszti Z, Gerendai I (2007) Predominance of supraspinal innervation of the left ovary. *Microsc Res Tech.* 70: 710-718.
159. Tresguerres HF. (2010) *Fisiología humana*. 4a edición. Editorial McGraw-Hill. Madrid, España. Cap. 75. pp.1042-1060.
160. 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.
161. Uchida S, Kagitani F, Hotta H, Hanada T, Aikawa Y. (2005) Cutaneous mechanical stimulation regulates ovarian blood flow via activation of spinal and supraspinal reflex pathways in anesthetized rats. *The Japanese Journal of Physiology.* 55: 265-277.
162. Umetsu Y, Tenno T, Goda N, Shirakawa M, Ikegami T, Hiroaki H. (2011) Structural difference of vasoactive intestinal peptide in two distinct membrane-mimicking environments. *Biochim Biophys.* 1814: 724-730.
163. Usdin TB, Bonner TI, Mezey E. (1994) Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology.* 135: 2662-2680.
164. 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 rat ovarian follicles. *Endocrinology.* 191: 287-299.
165. Vertongen P, Schiffmann SN, Gourlet P, Robberecht P. (1997) Autoradiographic visualization of the receptor subclasses for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in rat brain. *Peptides.* 18: 1547-1554.
166. Vu J, Million M, Larauche M, Luong L, Norris J, Waschek A, Pothoulakis C, Pisegna J, Germano P. (2014) Inhibition of vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) induces resistance to dextran sodium sulfate (DSS) induced colitis in mice. *J Mol Neurosci.* 52: 37-47.
167. Wang S, Liu G, Ahmad S, Liu W, Riaz H, Jiang X. (2012). Vasoactive intestinal peptide suppresses ovarian granulosa cell apoptosis *in vitro* by up-regulating Bcl-2 gene expression. *Animal reproduction science.* 132: 201-206.
168. Westwood F. (2008) The female rat reproductive cycle: A practical histological guide to staging. *Toxicologic Pathology.* 36: 375-384.

169. Yajima Y, Akita Y, Saito T, Kawashima S. (1998) VIP induces the translocation and degradation of the alpha subunit of Gs protein in rat pituitary GH4C1 cells. *J Biochem.* 123: 1024–1030.
170. Yen S. (2001) Ciclo Menstrual Humano: Regulación Neuroendocrina. En: Yen S, Jaffe R, Barbieri R (Eds.). *Endocrinología de la Reproducción*. 4ª edición. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. Cap.7 pp. 212-216.
171. Zhang H y Liu K. (2015) Cellular and Molecular Regulation of the Activation of Mammalian Primordial Follicles: Somatic Cells Initiate Follicle Activation in Adulthood. *Human Reproduction Update*. 21:779-786.