



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

19
lej

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

**MODIFICACIONES EN EL CRECIMIENTO Y
DIFERENCIACION DEL FOLICULO EN EL OVARIO DE
LA RATA JUVENIL INDUCIDAS POR LA SECCION
UNILATERAL O BILATERAL DEL NERVI
OVARICO SUPERIOR.**

T E S I S

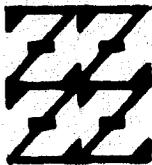
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

CAROLINA MORAN RAYA

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO FIRMADO EN
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA

MEXICO, D. F.

FEBRERO DE 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

**MODIFICACIONES EN EL CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN DEL FOLÍCULO
EN EL OVARIO DE LA RATA JUVENIL INDUCIDAS POR LA SECCIÓN
UNILATERAL O BILATERAL DEL NERVI OVARICO SUPERIOR.**

Tesis presentada por: Carolina Morán Raya

Directora de tesis: Dra. Leticia Morales Ledesma

Realizada en la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción de la
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo financiero de DGAPA
con clave IN210893 y PUIS U.N.A.M.

Dedico con todo mi amor
este humilde trabajo a Victoria Raya,
mi madre, quien ha sido y será mi principal
motivo de superación.

A mi padre: quien con su ejemplo de vida
me ha enseñado a valorar las bondades
del trabajo y de la vida.

A mis hermanos: Rodolfo, Jaime, Susana
y Maricela por su cariño y apoyo incondicional.

A Maricela por su sacrificio y constante estímulo.

A Edgar por regalarme los instantes más hermosos
de mi vida y por existir en mí.

A mis amigos: Manuel, Marco y Benigno
por compartir conmigo esas VOCES del alma
y convertirlas en amistad.

A Juanita y Lorena, las autoras
de una de las lecciones más
importantes, la amistad.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Leticia Morales Ledesma por ayudarme a crecer profesional y espiritualmente, por su empeño y dedicación.

Al Dr. Roberto Domínguez por hacernos sentir importantes.

A los miembros del jurado:

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dra. Ma. Elena Ayala Escobar

Dra. Patricia Rosas Saucedo

M. en IBSH José Luis Morán Perales

Biol. Carlos Martínez Montoya

por sus valiosas aportaciones durante la realización y la revisión de este trabajo.

A Ma. Luisa Illscas por su apoyo en el difícil trabajo de realizar cortes histológicos.

A mis compañeros de la Unidad de investigación en Biología de la Reproducción, ya que cada uno de ellos representa un sitio especial en el funcionamiento de esta nave.

A dos grandes mujeres:

Ma. Luisa Morán y Angela Morán, pues su hospitalidad y apoyo moral fueron vitales en el transcurso de mi formación.

ÍNDICE

RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	
• Pubertad.....	1
• Anatomía e histología de la innervación del ovario.....	6
• Participación de la innervación catecolamérgica en la función del ovario.....	9
• Aspectos morfofuncionales del desarrollo del folículo ovárico.....	13
• La participación de la innervación catecolaminérgica en el desarrollo folicular..	16
• Atresia folicular.....	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	26
MATERIAL Y MÉTODO	26
RESULTADOS	
• Peso corporal.....	30
• Peso de órganos.....	31
• Población folicular.....	32
de los animales con operación simulada.....	32
de los animales con sección del nervio ovárico superior.....	34
en función del diámetro folicular.....	40
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	56

RESUMEN

El sistema nervioso central modula la maduración del ovario por dos vías, una hormonal y otra neural. La primera involucra la liberación de factores hipotalámicos que controlan la secreción de las gonadotropinas y la segunda la comunicación entre el sistema nervioso central y el ovario, vía los nervios peptidérgicos y adrenérgicos. Se sabe que la innervación perifolicular modula la acción de las gonadotropinas sobre el desarrollo del folículo. Por lo que en este trabajo se analizó la participación de la información neural que llega al ovario por el nervio ovárico superior sobre el crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico.

Se utilizaron ratas hembra de 16 días de edad a las que se les seccionó el nervio ovárico superior izquierdo, derecho o ambos nervios. Los animales fueron sacrificados 4, 8, 12 ó 16 días después de realizada la desnervación. Se realizó el estudio morfométrico tanto en el ovario izquierdo como en el derecho de los diferentes grupos experimentales.

A los 4 días después de la sección del nervio ovárico izquierdo, en ambos ovarios se observa disminución en el número de folículos *medianos* (350-499 μ m de diámetro), de los cuales aproximadamente el 10% de ellos son sanos. Mientras que la cantidad de folículos *preovulatorios* (>500 μ m de diámetro) aumenta en el ovario derecho (inervado) a los 4, 8, y 12 días postoperatorios, en donde la mayoría de ellos son atresícos. A 12 días posteriores a la cirugía, tanto en el ovario desnervado como el innervado aumenta el número folículos *pequeños* (< 350 μ m de diámetro), éste incremento se refleja en el número total de folículos.

La sección del nervio ovárico derecho disminuye en el ovario desnervado el número de folículos *medianos* a los 4 y 12 días post-desnervación, la gran mayoría de estos folículos son atresícos. La población de folículos *preovulatorios* no se modifica, sin embargo se sigue observando un alto índice de atresia.

Con la sección bilateral del nervio no se modifica la población total de folículos, sólo se observa disminución por parte del ovario derecho a los 16 días, éste descenso está dado por los folículos *pequeños*.

Estos resultados muestran que la información catecolaminérgica y peptidérgica que llega al ovario por el nervio ovárico superior participa en los procesos de selección de los folículos para que lleguen a ovular y su efecto sobre el crecimiento folicular depende del tiempo transcurrido después de la desnervación.

INTRODUCCIÓN

PUBERTAD

Los roedores al iniciar su vida reproductiva manifiestan una serie de cambios conductuales y neuroendócrinos que son indicadores de que han alcanzado la madurez sexual, a esta etapa de la vida del animal se le conoce como pubertad. La pubertad es el resultado de la integración final de varios procesos neurohormonales, muchos de los cuales se inician incluso antes del nacimiento (Ojeda y col., 1983; Ojeda y Urbanski, 1994).

En los roedores hembra el único signo exterior que señala el comienzo de la pubertad es la canalización de la vagina, que ocurre entre los 35 y 40 días de edad, dependiendo de la cepa del animal en estudio. Se ha descrito que al momento de producirse la canalización de la vagina, el frotis vaginal corresponde a un estro; sin embargo, en estos animales puede o no presentarse la primera ovulación (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Goldman, 1981).

La ovulación es precedida por un incremento en las concentraciones plasmáticas de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH), como respuesta a éste aumento el ovario incrementa su actividad esteroidogénica. En el útero, los estrógenos se unen a su receptor en donde inducen el crecimiento del endometrio y del miometrio, lo que se refleja en el aumento en el peso del órgano; a su vez, en el lumen del útero se incrementa la acumulación de fluido (Ojeda y col., 1980a).

Desde el nacimiento hasta la pubertad se producen una serie de cambios morfo-funcionales en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Ojeda y colaboradores

(1980b) han propuesto la siguiente clasificación en la que detallan los mecanismos que desencadenan la pubertad.

1. **Etapa neonatal.** Abarca desde el nacimiento hasta el día 7 de vida.
2. **Etapa infantil.** Del día 8 al 21.
3. **Etapa juvenil.** Del día 22 al 32.
4. **Etapa peripuberal.** A diferencia de las otras etapas, ésta es de duración variable y culmina con la ovulación.

ETAPA NEONATAL

El ovario de la rata presenta receptores a la FSH a partir del día 4 de vida, mientras que para la LH aparecen entre los días 5 al 9 (Sokka y Huhtaniemi, 1995). No obstante que los receptores a las gonadotropinas aparecen al final de la etapa neonatal, se ha descrito que estas hormonas existen en el plasma mucho antes del nacimiento. Las evidencias de la aparición tardía de los receptores a las gonadotropinas, apoyan la hipótesis de que el crecimiento folicular que se inicia en esta etapa es independiente de la influencia de estas hormonas (Peters y col., 1973; Ojeda y Urbanski, 1994; Malamed y col., 1992) y que una vez que se han rebasado los cuatro días de edad, las gonadotropinas, especialmente la FSH, estimulan la adquisición de sus propios receptores, el desarrollo de las células foliculares y del ovocito (Greenwald y Roy, 1994)

En esta etapa del desarrollo del animal, aún no se presenta el control de retroalimentación negativo que ejercen los esteroides en la secreción de las gonadotropinas, debido a que la mayor parte de los esteroides plasmáticos se encuentran unidos a la α -fetoproteína. Una de las funciones principales de la α -

fetoproteína es proteger al cerebro de los efectos deletéreos de la exposición a los estrógenos (Becú -Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

ETAPA INFANTIL

La concentración plasmática de la FSH alcanza su máximo por el día 12 de vida, y poco después comienza a disminuir gradualmente. La concentración de la LH en el plasma es elevada, pero esta elevación es menos evidente que la de la FSH (Goldman, 1981; Ben-Jonathan y col., 1984). En la rata, el sistema de retroalimentación negativo que ejercen los andrógenos sobre la hipófisis en la secreción de LH, es funcional desde los 10 días de vida, ya que los estrógenos reemplazan a los andrógenos a partir del día 16, con la disminución en la circulación de la α -fetoproteína (Sokka y Huhtaniemi, 1995).

Al parecer, el incremento en la concentración de la FSH en esta etapa puede deberse a tres factores: 1) que la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) sea en forma esporádica; 2) que los andrógenos 5α -reducidos faciliten la acción de la GnRH sobre la liberación de las gonadotropinas de la hipófisis anterior y 3) que en el hipotálamo aún no se presenta la retroalimentación negativa ejercida por los estrógenos (Ojeda y Urbanski, 1994).

Durante la etapa infantil el porcentaje de proliferación de los gonadotropos es alto, al igual que la respuesta de la hipófisis a la GnRH. Por otra parte, la FSH induce en el ovario un aumento en la actividad de las aromatasas, que se traduce en un incremento en la síntesis de estrógenos (Ojeda y Urbanski, 1994).

Durante la segunda semana de vida, los folículos ováricos están sujetos al control por parte de la FSH, de manera tal que el ovario tiene la capacidad de

responder al incremento endógeno de las gonadotropinas y como respuesta se da un incremento en la síntesis de hormonas esteroides.

Tomando en cuenta que en el adulto el desarrollo completo de un folículo toma aproximadamente de 15 a 19 días, es posible que muchos de los folículos que aparecen en esta etapa puedan alcanzar el estado preovulatorio y ovular en la primera ovulación (Ojeda y Urbanski, 1994).

ETAPA JUVENIL

A lo largo de esta etapa, la FSH plasmática continúa disminuyendo y las secreciones esporádicas de la LH tienden a desaparecer; se establece el modelo de liberación pulsátil de la LH con intervalos de pulsaciones de alrededor de 30 minutos. (Ojeda y col., 1983; Urbanski y Ojeda, 1985). En esta fase la unidad hipotálamo-hipófisis llega a responder completamente a los estrógenos plasmáticos, de manera que se hace evidente el mecanismo de retroalimentación que ejercen los estrógenos sobre el hipotálamo.

La baja respuesta de la hipófisis en esta etapa no refleja la falta de señales del hipotálamo, sino que más bien puede deberse, al menos en parte, a una disminución en la respuesta de los gonadotropos a la GnRH; los cuales no vuelven a incrementarla hasta un poco antes del primer proestro.

En la rata de 16 días de edad el bloqueo de la síntesis de catecolaminas da como resultado una elevación en las concentraciones plasmáticas de la LH, pero el mismo tratamiento en la rata de 30 días (periodo juvenil tardío), reduce las concentraciones de la hormona. Estas evidencias nos permiten sugerir que las catecolaminas juegan un papel dual, mientras que en los animales en la etapa infantil ejercen un efecto inhibitorio, para los que finalizan la etapa juvenil sería de tipo estimulador (Urbanski y Ojeda, 1985).

El ovario continúa creciendo bajo la influencia de la FSH y de la LH y se caracteriza porque se presentan oleadas de crecimiento folicular y atresia aunque en ningún caso los folículos alcanzan el estado ovulatorio (Greenwald y Roy, 1994).

La secreción de la GnRH es modulada por una serie de neurotransmisores y por las hormonas esteroides y peptídicas, los cuales ejercen cierto control en la secreción de éste factor liberador. Este control varía a lo largo de esta etapa; por ejemplo, la tasa de recambio de la noradrenalina (NA) y la dopamina (DA) hipotalámica se incrementa. La habilidad de la DA para estimular la actividad de la adenilato ciclasa disminuye, este efecto parece desarrollarse cuando incrementa la tasa de recambio de DA (Lamberts y Wuttke, W. 1981, citado en Ojeda y col. 1983).

ETAPA PERIPUBERAL

Durante la quinta semana de vida post-natal, tanto las concentraciones basales de la LH en torrente sanguíneo, como la amplitud de los pulsos llegan a ser más grandes en la tarde que en la mañana. Al parecer este modelo de secreción, puede ser importante para la activación peripuberal de la función del ovario (Urbanski y Ojeda, 1985).

El incremento en la respuesta de la hipófisis a la GnRH es esencial para que ocurra el surgimiento preovulatorio de las gonadotropinas. La cascada de eventos que dan lugar al pico preovulatorio de la LH se inicia por un incremento en la secreción de 17β -estradiol por parte del ovario. A su vez, las elevadas concentraciones de estradiol permiten, por un lado, la expresión de la señal neural que dispara la liberación de GnRH por parte del hipotálamo y por el otro, el incremento en la respuesta de los gonadotropos hipofisarios al factor liberador lo que provoca la liberación de la LH (Fink, 1988).

Durante los días que preceden al surgimiento preovulatorio de las gonadotropinas, la respuesta esteroidogénica del ovario se incrementa, lo que se refleja en el desarrollo progresivo de los folículos destinados a ovular en el primer estro vaginal (Espey y Lipner 1994).

ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DE LA INERVACIÓN DEL OVARIO

Estudios anatómicos, histológicos e histoquímicos muestran que el ovario está inervado entre otros, por componentes adrenérgicos y peptidérgicos del sistema nervioso autónomo, los cuales derivan del plexo ovárico y del nervio ovárico superior (Stefenson y col., 1981). En investigaciones posteriores, se ha mostrado la presencia de esta inervación desde las últimas etapas del desarrollo embrionario (Ojeda y Urbanski, 1994).

El plexo ovárico es una rama de los plexos aórtico y renal, cuyos cuerpos celulares preganglionares se localizan en los segmentos T10 y T11 de la médula espinal. Este plexo está formado por axones adrenérgicos embebidos en una matriz de colágena que reviste a la arteria y a la vena ovárica. Las fibras del plexo ovárico inervan a los oviductos, al ligamento ancho y se proyectan al interior del ovario junto con la arteria ovárica (Klein y Burden, 1988).

El nervio ovárico superior es una rama del plexo celiaco y sus cuerpos celulares están presentes en los segmentos T7 a L2 del ganglio de la raíz dorsal y en los segmentos T10 a L3 del ganglio paravertebral (Klein y Burden, 1988). El nervio ovárico transita por el borde del ligamento suspensorio (Fig. 1), un ligamento muscular que ocupa un pliegue en el peritoneo, e inerva al oviducto, al ovario y al útero (Lawrence y Burden, 1980).

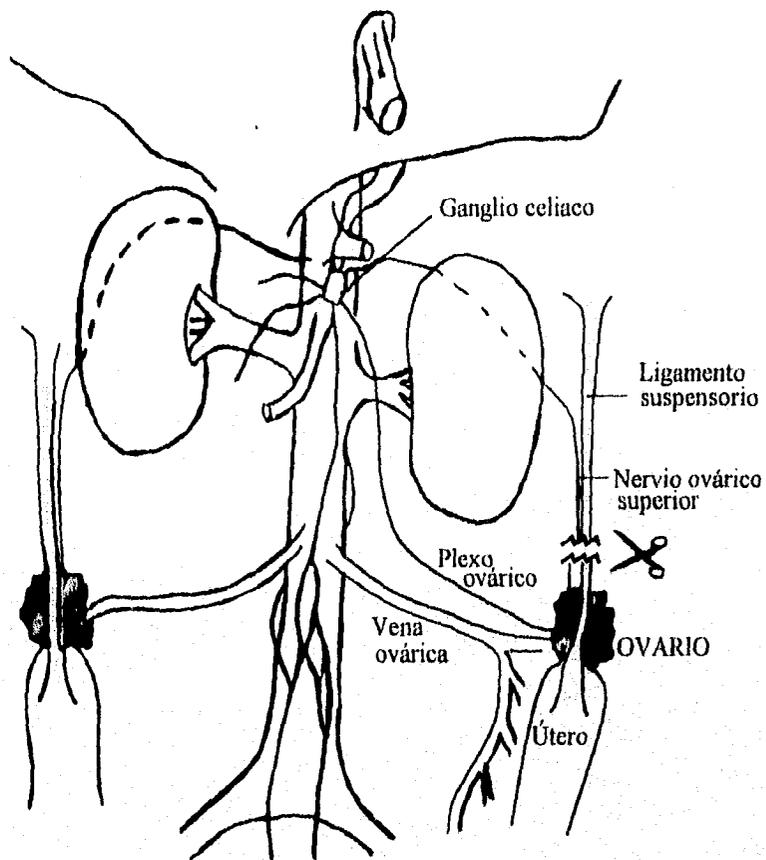


Fig. 1. Representación esquemática de la trayectoria del nervio ovárico superior (Tomada de Lawrence y Burden, 1980).

Los paquetes de fibras nerviosas provenientes del plexo ovárico y del nervio ovárico superior llegan al ovario y penetran al estroma ovárico, junto con los vasos sanguíneos. En algunas especies las terminales nerviosas se hallan en estrecha relación con los folículos primordiales y en crecimiento, pero nunca penetran a las células de la granulosa ni tampoco al cuerpo lúteo. En los folículos que presentan células tecales, la innervación adrenérgica llega hasta esta capa celular, pero no atraviesan la membrana basal (Bahr y Ben-Jonathan, 1985; Burden, 1985; Greenwald y Roy, 1994; Kannisto y col., 1986).

El nervio ovárico superior proporciona el mayor aporte de fibras noradrenérgicas al tejido esteroideogénico de la glándula, en tanto que el plexo inerva principalmente la vasculatura del ovario (Lawrence y Burden, 1980; Klein y Burden, 1988).

El ovario no sólo recibe información noradrenérgica por el plexo ovárico y por el nervio ovárico superior, sino también por vía sanguínea y que proviene de la médula suprarrenal. Una fuente más de noradrenalina es la producida *in situ* por el ovario (Ben-Jonathan y col. 1984). El sistema nervioso adrenérgico posee varios tipos celulares con una capacidad completa de sintetizar catecolaminas pero sin la morfología neural típica. Estos tipos celulares incluyen a las células cromafines de la médula adrenal, los cuerpos paraaórticos y las células de los ganglios periféricos que son intensamente fluorescentes. Sin embargo, aún no se sabe si alguna de estas células están presentes en el ovario y estén participando en el aporte de catecolaminas (Ben-Jonathan y col., 1984).

La gónada femenina además de la innervación catecolaminérgica, recibe fibras peptidérgicas, las cuales llegan por vías diferentes:

- La sustancia P (SP) y el neuropéptido Y (NPY) lo hacen por el plexo nervioso.

- El péptido intestinal vasoactivo (VIP) lo hace por el nervio ovárico superior (Ahmed y col., 1986; Kannisto y col., 1986).

PARTICIPACIÓN DE LA INERVACIÓN CATECOLAMINÉRGICA EN LA FUNCIÓN DEL OVARIO.

Actualmente es bien aceptado que la función del ovario es regulada no sólo por las hormonas, sino también por la influencia neural y trófica que recibe (Aguado y Ojeda, 1984; Domínguez y col., 1991). Tanto los ovarios de animales inmaduros como de los adultos contienen una población bien definida de receptores β adrenérgicos del subtipo β_2 , los cuales han sido identificados por criterios tanto funcionales como bioquímicos (Aguado y col., 1982).

Como ya se mencionó, la inervación simpática que llega al ovario es principalmente de tipo catecolaminérgico, de la cual, la noradrenalina es el neurotransmisor más abundante. El control noradrenérgico en la función del ovario se inicia a edades tempranas, esto es sugerido por la presencia de tirosina hidroxilasa (enzima que interviene en la síntesis de noradrenalina, en el paso de tirosina a L-DOPA) en ovarios de ratas fetales o neonatales (Ojeda y Urbanski, 1994). Ya en ovarios de ratas recién nacidas se detecta la presencia de NA, la cual incrementa su concentración a partir de los 5 días de edad hasta los 35. El contenido del neurotransmisor disminuye en el período peripuberal, coincidiendo con el incremento en las concentraciones plasmáticas de la FSH (Ben-Jonathan y col. 1984).

Se ha postulado que algunas de las funciones que realiza del ovario son moduladas, al menos parcialmente, por la inervación que llega a la gónada, entre las que se encuentran: la hipertrofia compensadora (Burden, 1985; Chávez y Domínguez, 1994; Gerendai y col., 1978) el desarrollo folicular (Curry y col., 1984;

Lara y col., 1990a, 1990b; Malamed y col., 1992) y la ovulación (Chávez y col., 1991; Domínguez y col., 1989; Morales y col., 1993).

Existen varios modelos que se utilizan para dilucidar la participación de la inervación periférica en las funciones del ovario. De los más utilizados y a los cuales se hará mención en este trabajo son los siguientes:

- Desnervación farmacológica.
- Desnervación quirúrgica o estimulación eléctrica de la inervación simpática.
- Bloqueo o estimulación de los receptores β -adrenérgicos.
- Bloqueo o estimulación de los factores de crecimiento.

En la rata adulta la desnervación con guanetidina (GTD), fármaco que inicialmente reemplaza a la noradrenalina en la terminal nerviosa (Boullin y col., 1966) y posteriormente destruye los nervios adrenérgicos (Lara y col., 1990a); provoca modificaciones en el ciclo estral, disminución en el número de ovocitos liberados y en el peso de los ovarios. La administración de éste fármaco en la rata recién nacida, induce retraso en la edad de la apertura vaginal, del primer estro y aumento en el número de ovocitos liberados (Flores y col. 1990). Los autores proponen una participación diferencial de la inervación en el proceso de la ovulación entre el animal adulto y el prepúber. Para el caso del animal prepúber, la información noradrenérgica del ovario pudiera inhibir la reactividad del folículo a las gonadotropinas, mientras que en el animal adulto las catecolaminas ejercerían un efecto estimulante.

En la rata hemicastrada el ovario remanente incrementa de peso, fenómeno que se conoce como hipertrofia compensadora. La administración local en el ovario

de 6-hidroxitriptamina (6-OHDA), neurotóxico que destruye las fibras simpáticas, es capaz de bloquear la hipertrofia compensadora de la gónada; estos resultados se han interpretado como que la inervación catecolaminérgica modula el crecimiento de la gónada remanente (Gerendai y col., 1978).

Tradicionalmente se ha explicado que la biosíntesis de esteroides por parte del folículo ovárico se produce en respuesta a la acción de las gonadotropinas sobre la teca interna y las células de la granulosa; sin embargo se presentan cada vez más evidencias que apoyan que la inervación simpática que llega al ovario, participa en los mecanismos que conllevan a la síntesis de esteroides. Así, el grupo de Aguado (1984) señala que en la rata adulta, la sección bilateral del nervio ovárico superior provoca disminución en la producción de estrógenos y progesterona durante los primeros minutos posteriores a la desnervación. En un estudio posterior se señala que en el día del proestro, la sección quirúrgica del nervio ovárico superior disminuye significativamente la concentración de progesterona durante los primeros treinta minutos y que se recupera a los 45 minutos. Por otro lado, la concentración de estrógenos no se modifica durante el estudio. La alteración en las concentraciones de progesterona se acompaña de la disminución en la conducta de lordosis (Erskine y Weaver, 1988). Estas evidencias han permitido postular que la inervación noradrenérgica es esencial en la biosíntesis de esteroides.

En ratas de 24 días de edad, la sección bilateral del nervio ovárico superior provoca disminución del 60% en el contenido de noradrenalina del ovario, sin afectar la edad de la apertura vaginal y la primera ovulación (Aguado y Ojeda, 1984). Resultados semejantes se observan cuando se utiliza a la rata con sección bilateral y se induce la ovulación por la administración de la gonadotropina del suero de yegua preñada (PMSG); en donde disminuye la concentración de NA sin que se modifique el número de cuerpos lúteos (Selstam y col., 1985). Los autores sugieren

que estos nervios probablemente no juegan un papel determinante en la ovulación, aunque no se descarta su participación dado que por la manipulación quirúrgica no se depleta por completo el neurotransmisor; o bien, que la falta de inervación noradrenérgica de como resultado el desarrollo de una hipersensibilidad de los receptores β -adrenérgicos a las catecolaminas, ya que aumenta la cantidad de receptores cuando se realiza este tipo de desnervación.

Resultados previos de nuestro laboratorio han mostrado que los efectos de una sección bilateral son diferentes a cuando sólo se elimina la información neural que proviene de uno de los nervios. En la rata prepúber la eliminación unilateral del nervio ovárico superior, provoca disminución en el número de ovocitos liberados por el ovario desnervado y aumento compensador por la gónada intervada; sugiriendo que el nervio ovárico superior modula la respuesta ovulatoria de manera estimulante y lateralizada (Morales y col., 1993). Así mismo, se ha mostrado que la sección quirúrgica del nervio ovárico superior izquierdo, realizada en la etapa infantil, provoca una caída en la concentración de NA del ovario desnervado y aumento compensador en el ovario inervado 24 horas después de la desnervación. Estos resultados son interpretados por los autores, como la posible existencia de una "comunicación neural" interovárica (Morales y col., 1993; Chávez y col., 1994).

Aunado a las evidencias ya mostradas, a principios de ésta década, se postuló que la actividad de los nervios catecolaminérgicos está modulada por las gonadotropinas (Ferruz y col., 1991). En estudios *in vitro* se ha mostrado que la estimulación eléctrica del ovario causa incremento en la liberación de la NA. Esto sólo se observa en el proestro y estro, indicando que la actividad de los nervios simpáticos del ovario aumenta durante las horas cercanas a la ovulación y que este evento estaría modulado por las gonadotropinas (Ferruz y col., 1991). Otros autores han observado que en el día del proestro el contenido de catecolaminas en el folículo

disminuye después de que se presenta el pico preovulatorio de las gonadotropinas (Ben-Jonathan y col., 1982).

De acuerdo con otros autores, Lara y colaboradores (1990a; 1990b), proponen que las catecolaminas ejercen un efecto facilitatorio en la función del ovario, amplificando el efecto estimulante de las gonadotropinas. Además, es conocido que las catecolaminas y las gonadotropinas sinergizan estimulando la secreción de esteroides por las células de la teca y la granulosa (Ojeda y Urbanski, 1994). Así, se ha mostrado que en cultivos de células teco-intersticiales la gonadotropina coriónica humana (hCG) estimula la producción de andrógenos, la cual se incrementa aún más en presencia de un activador de los receptores β -adrenérgicos como el isoproterenol. Los autores interpretan estos resultados como que la noradrenalina intraovárica y/o circulante puede interactuar directamente de una manera específica con las células teco-intersticiales, para incrementar la concentración de andrógenos, en particular de androstenediona y testosterona (Dyer y Erickson, 1985).

ASPECTOS MORFOFUNCIONALES DEL DESARROLLO DEL FOLÍCULO OVÁRICO.

La formación de folículos primordiales en el ovario es precedida por la migración de células mesenquimáticas las que forman una cavidad estromal, conteniendo presumiblemente grupos de células de la granulosa y el ovocito. Subsecuentemente las células mesenquimáticas circundan a los ovocitos formando una capa sencilla de células de la granulosa, constituyendo así los folículos primordiales (Hirshfield, 1992).

La formación del folículo es gradual e involucra la organización y diferenciación de varios tejidos. El proceso de la foliculogénesis se inicia con el

paso de un ovocito desnudo a un folículo primordial, el cual contiene además del ovocito, una sola capa de células epiteliales foliculares planas conocidas como células de la granulosa delimitada por la membrana basal. Éste folículo continúa creciendo y las capas de células de la granulosa se incrementan y se transforman en cúbicas, los folículos con estas características se conocen como secundarios. Conforme se va diferenciando, el folículo alcanza el tamaño adecuado para ser ovulado, a esta estructura se le conoce como folículo preovulatorio o de Graaf, en él se puede distinguir la teca interna de la externa y el antro folicular (Fig. 2) (Greenwald y Roy, 1994).

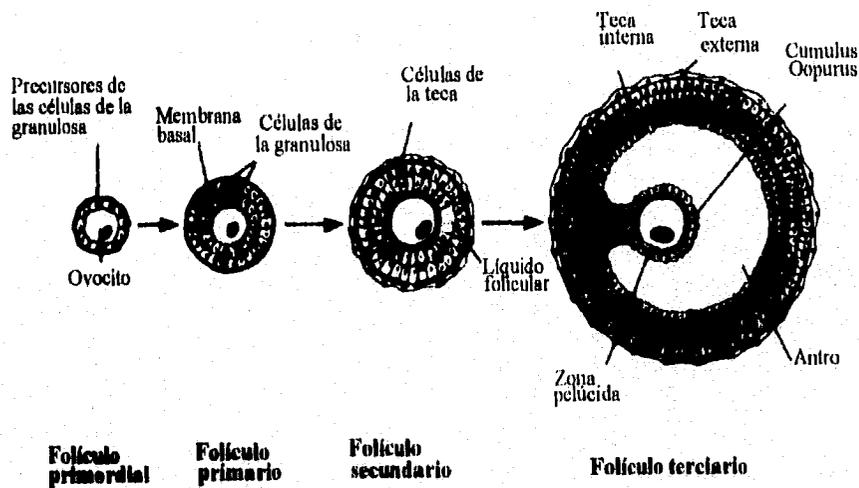


Fig. 2. Representación esquemática del desarrollo del folículo ovárico (Tomado de Ojeda, 1988).

Las células de la granulosa, son un componente importante dentro del folículo y forman una capa continua que rodea al ovocito y lo aísla del resto de los componentes del ovario. La proliferación de éstas células son un indicio de la diferenciación folicular y su crecimiento es estimulado por la FSH y los estrógenos (Chakravorty y col., 1993).

Varios autores sugieren que existen diferencias regionales entre las células de la granulosa de los folículos antrales como: la localización de receptores a péptidos, enzimas y capacidad esteroidegénica, entre otros. Estas diferencias estructurales y funcionales son originadas de la especialización regional de las células de la granulosa. Dentro de esta especialización podemos distinguir células de la granulosa en la parte periférica del folículo cerca de la membrana basal; células periantrales, las cuales se encuentran en contacto con el líquido folicular y por último la región que rodea al ovocito (*cumulus oopurus*). Los procesos metabólicos como el existente entre el ovocito y el *cumulus oopurus*, se refiere a la cooperación metabólica a través de las uniones comunicantes por donde son transportados varios compuestos en dirección de las células de la granulosa hacia el ovocito. Por otra parte, hay evidencias de que el ovocito puede influir en el desarrollo de las células de la teca y de la granulosa, a través de ciertos péptidos (Greenwald y Roy, 1994).

Conforme se van diferenciando, las células de la granulosa adquieren receptores a la FSH. La actividad más evidente de la FSH sobre las células de la granulosa se observa en los folículos secundarios y terciarios, donde es característica la formación del antro y el crecimiento folicular acelerado, debido al incremento en la actividad mitótica de las células de la granulosa y a la acumulación del fluido folicular. La mitosis es máxima en las células de la teca y la granulosa en los folículos de 200 a 300µm de diámetro. En esta etapa se adquieren también receptores a la LH y la capacidad de sintetizar las enzimas del citocromo P-450,

capaces de aromatizar a los andrógenos y convertirlos a estrógenos. (Hirshfield, 1991b).

Las células de la teca se diferencian en interna (esteroidogénica) y externa, se sitúan alrededor de la membrana basal y se considera que estas capas celulares se originan de las células indiferenciadas que rodean por fuera a la membrana basal (Hirshfield, 1991a).

Ambos compartimentos celulares, **granulosa y teca**, junto con la **membrana basal** actúan como un sincicio funcional caracterizado por la presencia de nexos y desmosomas al que se le ha llamado unidad proliferativa (Greenwald y Roy, 1994).

LA PARTICIPACIÓN DE LA INERVACIÓN CATECOLAMINÉRGICA EN EL DESARROLLO FOLICULAR

El proceso de crecimiento y diferenciación de los folículos ováricos está regulado por la FSH y la LH. Estas hormonas al actuar en el ovario regulan la foliculogénesis, la esteroidogénesis y la ovulación. La inervación catecolaminérgica que recibe el ovario actúa modulando la respuesta de los folículos al estímulo inducido por las gonadotropinas y las hormonas esteroides (Burden, 1985; Kannisto y col. 1985; Stefenson y col. 1981).

Evidencias recientes, sugieren que la diferenciación folicular puede estar influenciada por neurotropinas. Uno de los miembros de la familia de las neurotropinas es el Factor de crecimiento Neural (NGF, por sus siglas en inglés) (Lara y col., 1990b; Ojeda y Urbanski, 1994).

Es claro que tanto el inicio de la foliculogénesis, como la incorporación de los folículos al grupo en desarrollo, que da como resultado la formación de folículos antrales; es un fenómeno dependiente de las hormonas hipofisarias. Sin embargo,

hay evidencias de que el ovario de la rata responde al VIP aún antes de que se inicie la foliculogénesis y la respuesta de las células foliculares a las gonadotropinas, ya que la administración del VIP en ovarios fetales estimula la producción de AMPc e induce la actividad de las aromatasas. Estos resultados apuntan hacia el hecho que en la rata, el crecimiento del folículo ovárico puede estar modulado, además de las gonadotropinas, por los neurotransmisores que llegan a la gónada (Ahmed y col., 1986).

Cuando los ovarios fetales son incubados con FSH o LH no se observa actividad aromatasas, mientras que la administración de AMPc o la activación del sistema de adenilato ciclasa produce un incremento en la actividad de las aromatasas. Estos resultados permiten sugerir que éste mensajero intracelular puede actuar aún antes de que se inicie el crecimiento folicular (Ojeda y Urbanski, 1994).

La inervación aferente a la gónada participa en el crecimiento folicular. En apoyo a esta hipótesis se encuentran los trabajos del grupo de Malamed (1992) quienes muestran en el ovario fetal la presencia de fibras catecolaminérgicas, antes de que se manifiesten los folículos primordiales; lo que indicaría que la inervación estaría modulando la formación de los folículos. Conjuntamente se ha mostrado que la respuesta esteroidogénica del ovario a los neurotransmisores, se desarrolla antes del inicio de la foliculogénesis y a la obtención de la respuesta a las gonadotropinas (George y Ojeda, 1987).

Cuando se eliminan los nervios simpáticos y se disminuye la inervación sensorial del ovario, por la administración de anticuerpos al factor de crecimiento neural (ab-NFG), se produce:

A.- Disminución en la producción de andrógenos y estradiol

B.- Retraso en la edad de la primera ovulación

C.- Alteraciones del ciclo estral

D.- Retraso en el crecimiento folicular, traducido en disminución del número de folículos >450 μm de diámetro, acompañado de un incremento en el número de folículos pequeños menores de 300 μm de diámetro.

Los resultados han sido interpretados como que la inervación simpática perifolicular es importante para que el folículo alcance un estado preovulatorio. El incremento en el número de folículos totales es explicado por el aumento en el número de folículos preantrales, debido quizá a un mayor reclutamiento y/o freno del desarrollo folicular (Lara y col., 1990b).

En la rata recién nacida la administración de GTD, provoca una marcada acumulación de los folículos antrales pequeños y una relativa disminución en el número de folículos grandes. En cuanto al número total de folículos, se observa una disminución que está dada por la baja cantidad de folículos preantrales (Lara y col., 1990a). En estos dos modelos de desnervación (GTD y ab-NGF), se observa una acumulación de folículos antrales pequeños y la diferencia entre ambos, es que mientras la desnervación con GTD provoca disminución en el número de folículos preantrales, la inmunosimpatectomía con el ab-NGF induce aumento de éstos folículos. Estas diferencias han sido explicadas por los autores como que la administración de GTD no modifica la inervación sensorial, mientras que el ab-NGF disminuye éste tipo de inervación. Al parecer la información sensorial actuaría para que se de una comunicación intrafolicular; ya que la acumulación de folículos pequeños antrales inhibiría la formación de folículos preantrales, vía inervación sensorial (Lara y col., 1990a).

La desnervación con GTD en la etapa fetal provoca aumento en el número total de folículos al día del primer estro vaginal, de los cuales una gran proporción de ellos son atrésicos. Estas evidencias indican que la inervación catecolaminérgica está modulando la reactividad del folículo a las gonadotropinas, especialmente por parte de los folículos que se encuentran en crecimiento (Quiróz, 1994).

En el caso del ovario de la cobaya, que es una especie que presenta mayor densidad de fibras adrenérgicas que la rata, se ha sugerido que los nervios pueden servir como una influencia trófica en el desarrollo folicular (Burden, 1985). Cuando el ovario de la cobaya en etapa juvenil es sometido a una simpatectomía local por la inyección intrabursal de 6-OHDA, disminuye el número de folículos preantrales, incrementa el porcentaje de folículos medianos atrésicos y el número de folículos mayores de 700 μ m de diámetro, sin afectar el peso del ovario ni el número total de folículos. Apparently las influencia neurales sobre el desarrollo folicular puede variar con el tamaño del folículo e inhibir tónicamente el desarrollo de los folículos preantrales (Curry y col., 1984).

ATRESIA FOLICULAR

La atresia es el proceso durante el cual el folículo ovárico pierde su integridad funcional y es eliminado antes de que pueda llegar a ser ovulado. Morfológicamente es caracterizada por necrosis del ovocito y de las células foliculares (Biskov, 1978). Este fenómeno es característico de todos los mamíferos y vertebrados no mamíferos. A lo largo de la vida del individuo, un número considerable de folículos llegan a ser atrésicos. En la mayoría de las especies de mamíferos, del número inicial de folículos con el que nace un individuo, entre el 70 y 99.9% de ellos llegan a degenerar a lo largo de su vida reproductiva (Hsueh y col., 1994).

Los folículos pueden llegar a ser atrésicos en cualquier fase de su desarrollo y una vez que el folículo entra en la etapa de crecimiento éste tiene dos caminos: ovular o degenerar (atresia).

En la rata, existe un período crítico durante el desarrollo del folículo, en el cual se determina si éste va a ovular o si va a la atresia. Al parecer esto sucede cuando el folículo ya presenta antro (Fortune, 1994).

Con base a criterios morfológicos, Hsueh y colaboradores (1994) han propuesto que en aquellos folículos con antro, se pueden distinguir tres estados de atresia:

Estado I. Se caracteriza por un número pequeño (<10%) de células de la granulosa con núcleo picnótico, además de que las células de la granulosa presentan disminución en la incorporación de timidina³H].

Estado II. Presenta un porcentaje mayor (10-30%) de núcleos picnóticos en las células de la granulosa y una menor incorporación de timidina³H], existen pocas células en mitosis mientras que en el antro se manifiestan células de la granulosa descamadas. La membrana basal pierde su integridad y los leucocitos se infiltran a la capa de granulosa.

Estado III. Está caracterizado por la reducción en el número de células de la granulosa como una consecuencia de la falta de mitosis en este tipo celular. La capa de células de la teca se atrofia. El folículo se colapsa y tarda aproximadamente 4 días para disgregarse por completo.

Junto con los cambios morfológicos, se suscitan varias alteraciones bioquímicas:

- Disminución en la síntesis de ADN por las células de la granulosa.

- Supresión de la expresión de las proteínas conexinas 43, encargadas de las uniones (*gap junctions*) entre las células de la granulosa. Esto está asociado con los cambios estructurales en las células de la granulosa, una vez que se ha iniciado la atresia (Wiesen y Midgley, 1994).
- Disminución de los sitios de unión a las gonadotropinas.
- Disminución de la síntesis de estrógenos y a su vez un aumento de la producción de progesterona. Esto es atribuido a una disminución en la actividad de la enzima C₁₇₋₂₀ liasa que conduce a una disminución en el sustrato (que son los andrógenos) para la aromatización a estrógenos en las células de la granulosa y a una pérdida en la actividad de las aromatasas.

A diferencia de lo que sucede con las células de la granulosa, en las células teca las alteraciones morfológicas ocurren hasta varios días después de que es afectado el folículo. En la mayoría de las especies de mamíferos éstas células son dañadas exclusivamente en estadios avanzados de la atresia. Por otro lado, aunque el desarrollo morfológico de las células de la teca pueda ser normal, los autores han sugerido que una inmadurez bioquímica pudiera llevar al folículo a la atresia por una producción disminuida de los andrógenos, los cuales a su vez deprivan a las células de la granulosa de sustratos para la conversión a estrógenos, sin los cuales, el folículo se atrofia (Greenwald y Roy, 1994).

Apoptosis en los folículos ováricos

En muchos órganos, la regeneración y degeneración de los tejidos involucra un proceso activo llamado apoptosis. La apoptosis que se caracteriza por disminución del volumen celular, condensación de la cromatina y la formación de pequeños trozos esféricos de membrana, los cuales contienen fragmentos nucleares

llamados cuerpos apoptóticos; es un evento que toma lugar en los tejidos que experimentan cambios o responden a alteraciones por estímulos fisiológicos. Este proceso activo toma lugar en células con cantidades normales de ATP y por lo general requiere de ARNm y síntesis de proteínas (Schwartzman y Cidlowky, 1993).

En células de la granulosa y de la teca de los folículos sanos y atrésicos (clasificados por alteraciones morfológicas), se analizaron preparados de ADN por una fragmentación internucleosomal de folículos del mismo tamaño. En los folículos atrésicos se encontró fragmentación del ADN; pero no en los folículos sanos, hechos que sugieren que la apoptosis participa en la atresia folicular (Hsueh y col., 1994).

Han sido propuestos tres modelos teóricos que pueden ser contemplados para determinar la suerte de un folículo, este puede llegar a la atresia vía apoptosis o desarrollarse hacia un estado ovulatorio (Hsueh y col., 1994).

- Los folículos que llegan a la atresia pueden estar predeterminados por una deficiencia bioquímica o funcional inherente al ovocito, a las células foliculares o a su microambiente inmediato. Ya que la mayoría de los folículos son capaces de crecer bajo una estimulación hormonal apropiada, es improbable que éste mecanismo sea la base de la atresia.
- Los estímulos atretogénicos: andrógenos, GnRH ovárica, interleucina 6 (IL-6), entre otros.
- Los factores de supervivencia del folículo: gonadotropinas (FSH, LH), estrógenos y factores de crecimiento como: el NGF, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformador (TGF), el factor de crecimiento de

los fibroblastos básico (bFGF) y el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1).

Los factores que inducen la apoptosis o los que la previenen, son específicos para cada tipo celular. Las células pueden seguir varios caminos hasta llegar a la activación de las endonucleasas y a la muerte celular irreversible por apoptosis.

Las gonadotropinas son factores de supervivencia pues previenen la apoptosis folicular ya que se ha encontrado que al bloquear el surgimiento preovulatorio de estas hormonas se induce un adelanto de la atresia mismo que se previene con la administración de gonadotropinas. Cuando se mide la incidencia de ADN fragmentado en ratas hipofisectomizadas y estimuladas con la FSH, se observa que disminuye la apoptosis en las células de la granulosa (Chung y Col., 1994).

Por otra parte, se ha mostrado la presencia del EGF/TGF α y bFGF, y de sus receptores en el ovario, los cuales intervienen en la comunicación autócrina y parácrina, tanto de las células de la granulosa como de la teca. En el modelo de estudio de apoptosis, en el que a células de la granulosa de folículos preovulatorios se les administra PMSG, se observa fragmentación internucleosomal del ADN la cual depende del tiempo transcurrido; a éste cultivo se han agregado EGF/TGF α y bFGF por separado y se observa que estos factores inhiben la fragmentación del ADN (Hsueh y col., 1994).

En la rata, el péptido GnRH es un inhibidor de la diferenciación del folículo, actuando a través de receptores específicos en las células de la teca y la granulosa. Cuando este péptido es administrado a ratas hipofisectomizadas tratadas con estrógenos, induce la fragmentación del ADN (Billing y col., 1994).

El tratamiento con estrógenos aumenta el crecimiento folicular y el índice mitótico en las células de la granulosa. En contraste, los andrógenos disminuyen el peso de los ovarios de ratas hipofisectomizadas previamente tratadas con estrógenos y, causan deterioro folicular incrementando el número de núcleos picnóticos en las células de la granulosa (Hsueh y col., 1994). Se ha mostrado ampliamente que los andrógenos pueden inducir la atresia (Billing y col., 1993), los cuales inhiben la actividad de las aromatasas y estimulan la producción de la progesterona en las células de la granulosa.

Todas las evidencias mostradas llevan a plantear que solo aquellos folículos que llegan a determinado estado de desarrollo y coinciden con señales hormonales específicas son apartados de la atresia.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sistema nervioso central dirige la maduración del ovario por dos vías; una hormonal y otra neural. La primera involucra la secreción de factores hipotalámicos que controlan en la adenohipófisis la secreción de la LH, la FSH, la PRL y la hormona del crecimiento (GH), entre otras. La segunda involucra uniones directas entre el sistema nervioso central y el ovario, vía los nervios peptidérgicos y adrenérgicos. Al parecer la mayoría de estos factores reguladores llegan a manifestarse claramente durante la etapa juvenil (Ojeda y Urbanski, 1994).

En la rata de 16 días de edad, la sección del nervio ovárico superior, retrasó la edad de la apertura vaginal y disminuyó el número de ovocitos liberados por la gónada desnervada, que se acompaña de una disminución de más del 40% en el número total de folículos, hechos que sugirieron que la inervación noradrenérgica participa en la regulación del desarrollo folicular (Morales, 1991). Sin embargo, se desconoce si este retraso en el crecimiento del folículo se da de una manera gradual; por lo cual en este trabajo se decidió estudiar el efecto de la sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior realizada en la etapa infantil, sobre la distribución y diferenciación del folículo evaluado durante la etapa juvenil.

HIPÓTESIS

La inervación noradrenérgica que proviene del nervio ovárico superior, modula de manera estimuladora los procesos neuroendócrinos que culminan con la primera ovulación, los efectos de la desnervación uni o bilateral del nervio ovárico superior (principal fuente de inervación catecolaminérgica) en la etapa infantil de la rata, provocará retraso en el desarrollo del folículo, que dependerá del tiempo de evolución.

OBJETIVO

Analizar la participación del nervio ovárico superior, sobre el desarrollo y el crecimiento folicular durante las etapas infantil-juvenil de la rata.

METAS

- Estudiar los efectos de la sección del nervio ovárico superior sobre la incidencia de la atresia folicular y la distribución de los folículos en función de su diámetro.
- Analizar si el patrón de distribución de los folículos depende del tiempo transcurrido después de la desnervación.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron ratas hembra de la cepa CIIZ-V de 16 días de edad, mantenidas en condiciones controladas de iluminación: 14 horas luz y 10 horas oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 horas), con libre acceso a la madre hasta el destete (día 21) y desde éste momento al agua y alimento (*ad libitum*).

Al llegar a los 16 días de edad, los animales fueron distribuidos en grupos experimentales como a continuación se detalla (Fig. 3).

GRUPOS CON OPERACIÓN SIMULADA (OS)

Hembras de 16 días de edad fueron anestesiadas con éter etílico, a las cuales se les hizo una incisión lateral de piel y músculo, sin tocar los órganos internos. Terminada la laparotomía se procedió a suturar la herida.

GRUPOS CON SECCIÓN UNILATERAL DEL NERVIU OVÁRICO SUPERIOR

Al igual que en el caso anterior a los animales se les realizó la incisión de piel y músculo, se sacó el ovario derecho o izquierdo y una vez identificado el ligamento suspensorio se seccionó el nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD), aproximadamente a 1 cm de altura del ovario (ver Fig. 1). El ovario fue regresado a la cavidad abdominal y se suturó la herida.

GRUPOS CON SECCIÓN BILATERAL DEL NERVIU OVÁRICO SUPERIOR (SBNO).

Se realizó de la misma manera que la sección unilateral, pero en este caso se seccionaron el nervio ovárico superior izquierdo y el derecho.

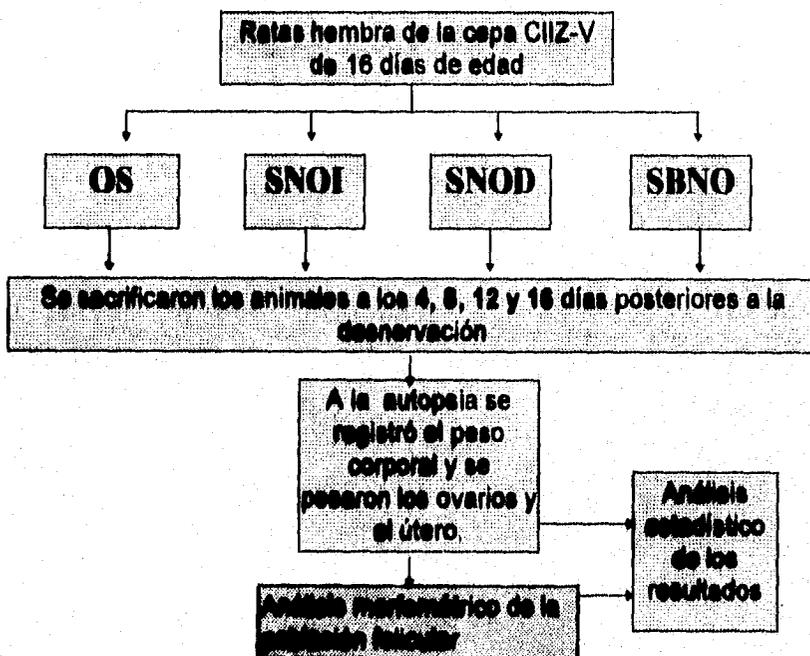


Fig. 3. Representación esquemática del protocolo experimental.

PROCEDIMIENTO DE AUTOPSIA

Para verificar que la sección del nervio ovárico superior se realizó correctamente, a la autopsia se observó que el ovario desnervado, unido al útero, se encontrara libre en la cavidad abdominal.

Los animales fueron pesados y sacrificados por decapitación a los 4, 8, 12 ó 16 días posteriores a la desnervación (20, 24, 28 ó 32 días de edad, respectivamente). Se disecaron y pesaron los ovarios y el útero.

Para el análisis de la población folicular los ovarios izquierdo y derecho de tres animales por grupo experimental, fueron fijados en solución de Bouin. Los ovarios se pasaron por alcohol a diferentes graduaciones (desde 70° hasta absoluto), posteriormente fueron incluidos en parafina, cortados en forma seriada a 10 µm de espesor y teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina.

En los cortes histológicos se midieron, con la ayuda de un ocular micrométrico, el diámetro mayor y el perpendicular a éste de todos aquellos folículos que presentaron ovocito con núcleo y nucleolo bien definido, reportándose un promedio de estas dos mediciones (Fig. 4).

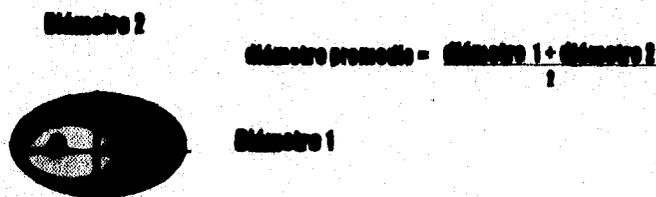


Fig. 4. representación esquemática del método utilizado para obtener el diámetro promedio de los folículos.

Los folículos fueron clasificados en función del diámetro promedio, como chicos ($<350\mu\text{m}$ de diámetro); medianos ($350\text{-}499\mu\text{m}$) y grandes ($>500\mu\text{m}$).

En todos los folículos medidos se analizó si se trataba de un folículo sano o atrésico. De acuerdo a los criterios establecidos por Hsueh y colaboradores (1994), se consideró como folículo atrésico aquél que presentó una o más de las siguientes características:

- Picnosis nuclear de las células de la granulosa
- Descamación de las células de la granulosa
- Engrosamiento de las capas de la teca folicular
- Alteraciones del ovocito

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media con su error estándar (eem). Los resultados del número de folículos, del diámetro promedio folicular, del peso corporal y de los órganos se analizaron por la prueba de análisis de varianza múltiple (ANDEVA), seguida por la prueba de Tukey. En todos los casos se consideraron estadísticamente significativos aquellas diferencias cuya probabilidad fuera menor o igual al 0.05.

RESULTADOS

PESO CORPORAL

El peso corporal de los animales intactos sacrificados a diferentes edades se incrementa con la edad (Fig. 5).

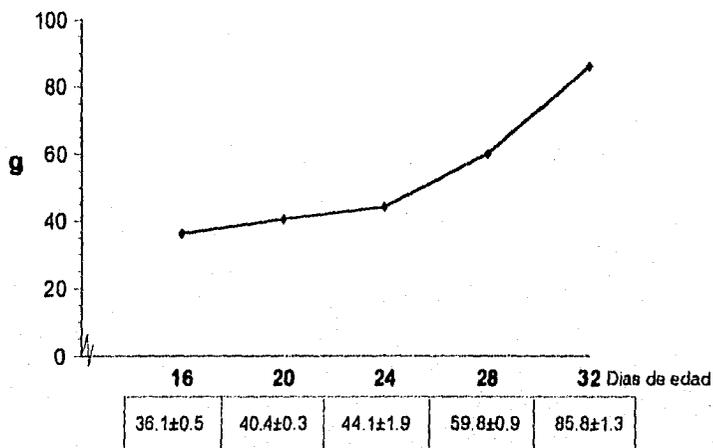


Fig. 5. Media del peso (g) de ratas testigo absoluto, sacrificadas a los 16, 20, 24, 28 ó 32 días de edad.

La operación simulada realizada a los 16 días de edad no modifica el peso corporal independientemente del tiempo post-cirugía. La desnervación unilateral o bilateral del nervio ovárico superior no altera el incremento de peso con la edad, excepto cuando se realiza la sección bilateral del nervio y es evaluada a los 16 días postoperatorios (Tabla 1).

Tabla 1. Media±eem del peso corporal (g) de las ratas con operación simulada (OS) o sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) a los 16 días y sacrificadas 4, 8, 12 ó 16 días después.

Días posteriores a la desnervación	OS	SNOI	SNOD	SBNO
4 días	38.0±0.8	40.2±0.9	39.3±0.3	37.3±2.1
8 días	58.0±1.5	61.5±1.2	61.6±1.9	56.1±0.8
12 días	67.5±3.3	72.7±2.9	73.1±2.1	62.0±0.9
16 días	94.1±2.3	97.9±1.7	96.6±2.3	77.4±3.1 *

* p<0.05 vs. OS (prueba de ANDEVA, seguida de Tukey)

PESO DE ÓRGANOS

En los animales con sección del nervio ovárico derecho y sacrificados 4 días después, se incrementa el peso de los ovarios y del útero, mientras que cuando se corta el nervio ovárico izquierdo sólo incrementa el peso del útero. Resultados semejantes se observan en el grupo con sección de ambos nervios.

Transcurridos 8 días de realizada la desnervación se aprecia que el peso del útero incrementa en los animales con sección unilateral respecto al grupo con operación simulada. Efecto contrario se presenta en las hembras con sección bilateral y sacrificadas 16 días después de la cirugía (Tabla 2).

Tabla 2. Media \pm em del peso absoluto (mg) de los ovarios y del útero de ratas con operación simulada (OS) o sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) a los 16 días y sacrificadas a los **4, 8, 12 ó 16** días después de la desnervación.

	Ovarios		Útero	Ovarios		Útero
	Izquierdo	Derecho		Izquierdo	Derecho	
	4 días			8 días		
OS	8.7 \pm 0.6	8.8 \pm 0.6	31.1 \pm 1.4	12.1 \pm 0.5	13.7 \pm 1.2	46.4 \pm 4.9
SNOI	9.1 \pm 1.0	10.4 \pm 0.5	38.0 \pm 1.6 *	16.5 \pm 2.5	16.8 \pm 1.4	76.4 \pm 4.2 *
SNOD	12.0 \pm 0.8 *	12.0 \pm 0.9 *	46.8 \pm 3.1 *	15.4 \pm 0.6 *	14.4 \pm 2.3	61.7 \pm 2.2 *
SBNO	12.4 \pm 1.0 *	11.5 \pm 1.3	39.4 \pm 1.5 *	11.0 \pm 0.5	12.1 \pm 2.6	48.7 \pm 4.2
	12 días			16 días		
OS	13.6 \pm 1.6	13.5 \pm 3.2	42.2 \pm 3.9	15.9 \pm 1.6	15.0 \pm 1.0	101.6 \pm 14.9
SNOI	12.3 \pm 1.9	16.8 \pm 1.2	53.9 \pm 3.9	14.5 \pm 1.1	14.9 \pm 3.4	98.4 \pm 8.7
SNOD	15.4 \pm 1.4	9.9 \pm 1.3	63.5 \pm 7.7	18.1 \pm 1.0	11.7 \pm 1.0	86.5 \pm 9.8
SBNO	13.6 \pm 0.9	12.2 \pm 0.6	44.5 \pm 4.6	11.4 \pm 1.1	11.1 \pm 0.8 *	53.4 \pm 2.3 *

* $p < 0.05$ vs. OS (prueba de ANDEVA, seguida de Tukey)

POBLACIÓN FOLICULAR

Análisis de la distribución de la población folicular de los ovarios de animales con operación simulada.

En el grupo de animales con operación simulada, el número total de folículos medidos disminuye conforme el animal se acerca a la pubertad. El número de folículos presentes en el ovario izquierdo no es diferente al del ovario derecho (Fig. 6).

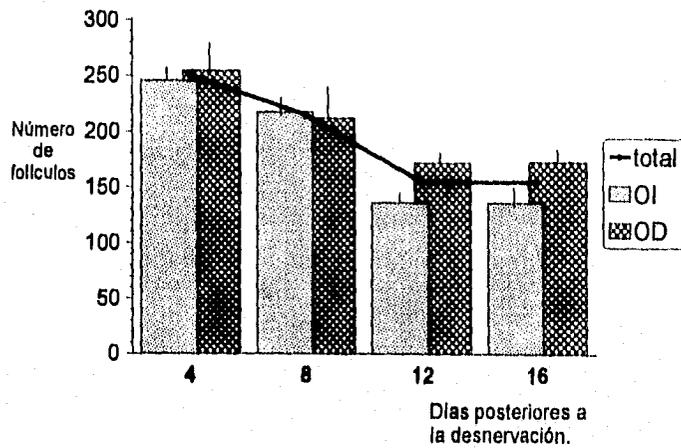


Fig. 6. Media \pm em del número total de folículos (en línea continua) y por ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) de ratas con operación simulada y sacrificadas a los 4, 8, 12 ó 16 días posteriores a la laparotomía.

En la tabla 4 se muestra la distribución de los folículos por rango en cada uno de los ovarios. Como se observa, el número de folículos pequeños ($<350\mu\text{m}$ de diámetro) disminuye conforme avanza el tiempo de evolución, mientras que los folículos medianos se mantienen de los 4 a los 8 días postoperatorios y tienden a disminuir a partir de los 12 días. El número de folículos preovulatorios se mantiene de manera semejante de los 4 a los 12 días y sólo disminuye en el ovario izquierdo a los 16 días. En ninguno de los tres tipos de folículos se observan diferencias entre el número de folículos presentes por el ovario izquierdo y el derecho.

Tabla 4. Media \pm error del número de folículos por rango en el ovario izquierdo (OI) y derecho (OD) de ratas con operación simulada realizada a los 16 días y sacrificadas a los 4, 8, 12 ó 16 días posteriores a la laparotomía.

Días posteriores a la desnervación	<350 μ m	350-499 μ m	> 500 μ m
4 días OI	206.0 \pm 20.0	27.6 \pm 7.1	11.6 \pm 1.8
OD	223.0 \pm 24.8	23.6 \pm 0.6	7.0 \pm 2.0
8 días OI	183.0 \pm 21.6	22.6 \pm 4.7	11.6 \pm 1.8
OD	181.6 \pm 27.1	22.6 \pm 3.9	6.3 \pm 1.7
12 días OI	113.3 \pm 15.3 *	12.0 \pm 2.0	11.0 \pm 1.5
OD	146.6 \pm 4.1 *	15.6 \pm 3.1	8.6 \pm 0.6
16 días OI	117.3 \pm 20.0 *	13.0 \pm 3.6	5.3 \pm 1.7
OD	151.0 \pm 6.4 *	21.0 \pm 7.0	12.0 \pm 3.0

* $p < 0.05$ vs. 4 días, mismo ovario (prueba de ANDEVA, segunda de Tukey)

Análisis de la distribución de la población folicular de los ovarios de animales con sección del nervio ovárico superior.

En la Fig. 7. se muestra el corte histológico del ovario de un animal con operación simulada (a) y de uno con sección del nervio ovárico izquierdo (b), sacrificados 12 días después de la cirugía. En el ovario desnervado se puede observar una apariencia normal de la gónada, diferentes tipos de folículos y una mayor proporción de folículos en la etapa de crecimiento, respecto al de operación simulada.

La desnervación uni o bilateral del nervio ovárico superior no modifica el número total de folículos medidos en ambos ovarios, excepto en el grupo con sección del nervio ovárico izquierdo y sacrificados 12 días posteriores a la desnervación, en donde se aprecia un aumento en la población de los folículos medidos (tabla 5).

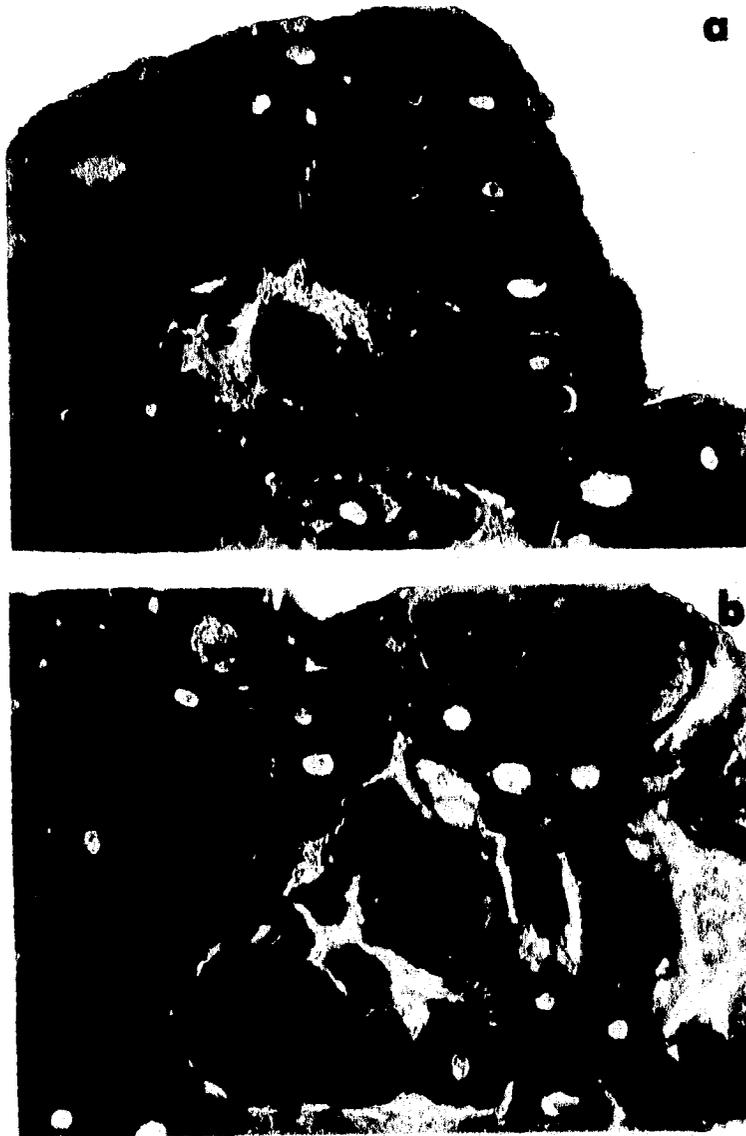


Fig. 7. Cortes histológicos del ovario de un animal con operación simulada (a) y del ovario desnervado de un animal con sección del nervio ovárico izquierdo (b).

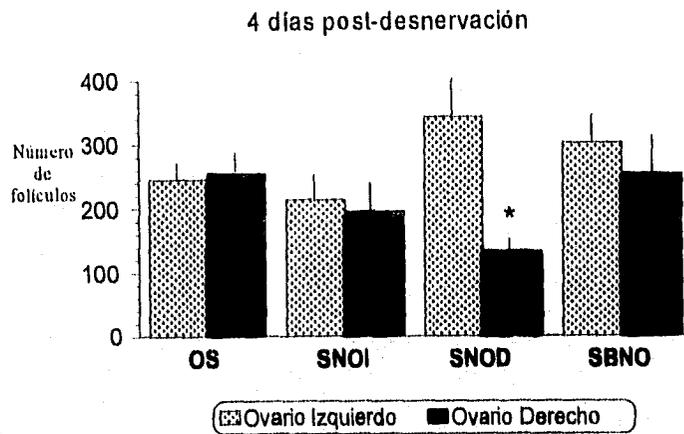
Tabla 5. Media \pm eem del número total de folículos presentes en ambos ovarios de ratas con operación simulada (OS) o sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) a los 16 días y sacrificadas 4, 8, 12 ó 16 días post-desnervación.

	4 días	8 días	12 días	16 días
OS	499.0 \pm 34.6	428.0 \pm 43.0	307.3 \pm 15.6	307.3 \pm 20.5
SNOI	406.6 \pm 39.8	521.6 \pm 158.0	494.0 \pm 42.0 *	317.6 \pm 25.6
SNOD	473.3 \pm 37.9	351.3 \pm 37.9	328.0 \pm 20.9	347.0 \pm 88.2
SBNO	552.0 \pm 117.2	332.3 \pm 34.6	339.0 \pm 9.7	270.6 \pm 34.6

* $p < 0.05$ vs. OS (prueba de ANDEVA, seguida de Tukey)

Los efectos de la sección del nervio sobre la dinámica del crecimiento folicular, tanto en la gónada intacta como en la desnervada, sobre el número total de folículos en ambos ovarios se describen a continuación:

La sección del nervio ovárico superior derecho provoca a los 4 días post-desnervación una disminución del número de folículos en el ovario desnervado, sin cambios en la gónada intacta. Mientras que la sección del nervio ovárico izquierdo o la de ambos nervios no modifica el total de folículos medidos 4 días después de la cirugía (Fig. 8).



* $p < 0.05$ vs. OS (prueba de ANDEVA seguida de Tukey)

Fig. 8. Media \pm error del número total de folículos en el ovario izquierdo y el derecho de ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos (SBNO) a los 16 días y sacrificadas 4 días después.

A los 8 días postoperatorios en ninguno de los grupos con desnervación se observan cambios en la población folicular comparado con su testigo (Fig. 9).

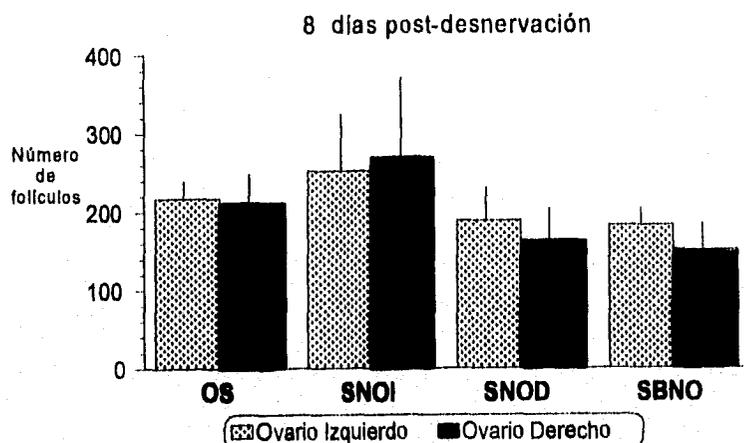


Fig. 9. Mediatem del número total de folículos en el ovario izquierdo y el derecho de ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos (SBNO) a los 16 días y sacrificadas 8 días después.

A los 12 días post-desnervación, la sección del nervio ovárico izquierdo provoca aumento en el número de folículos tanto en la gónada desnervada como en la que mantiene intacta su inervación. Con la sección del nervio derecho, el ovario desnervado no presenta modificaciones en la población total de folículos, mientras que el ovario intacto (izquierdo) muestra aumento del número de folículos medidos. Con la sección de ambos nervios no se modifica la población total de folículos (Fig. 10).

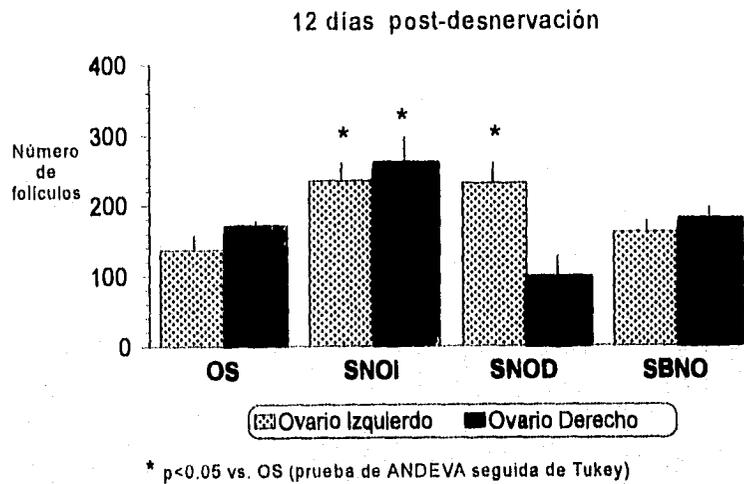


Fig. 10. Media \pm error del número total de folículos en el ovario izquierdo y el derecho de ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos (SBNO) a los 16 días y sacrificadas 12 días después.

Quando se analizan los efectos de la sección a los 16 días postoperatorios, en los grupos con desnervación uni o bilateral del nervio ovárico superior, la gónada derecha presenta disminución en el número de folículos, mientras que el ovario izquierdo no presenta diferencias respecto al grupo con operación simulada (Fig. 11)

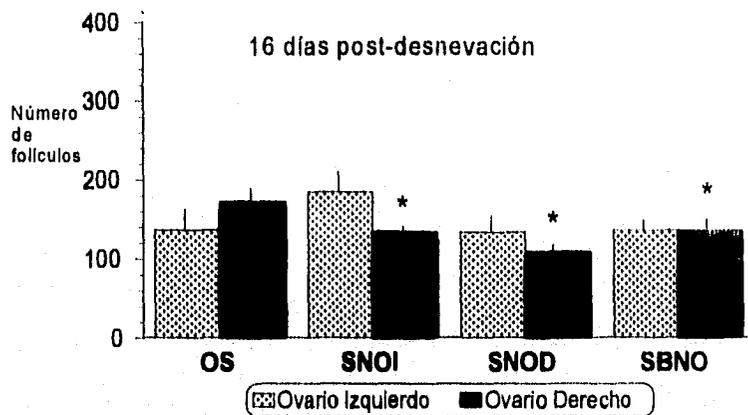


Fig. 11. Media \pm error del número total de folículos en el ovario izquierdo y el derecho de ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos (SBNO) a los 16 días y sacrificadas 16 días después.

Análisis de la población folicular en función de su diámetro.

Como se mostró en la Fig. 6, en el animal con operación simulada el número de folículos por el ovario izquierdo y el derecho fue similar. Se usó la media del número de folículos por ambos ovarios de estos animales con operación simulada y se utilizó como grupo testigo en el análisis de la población folicular del animal con sección del nervio ovárico superior.

En este apartado se muestra la dinámica del crecimiento folicular distinguiendo a los folículos por su tamaño y agrupándolos en tres grandes rangos.

En las siguientes figuras, las gráficas del panel izquierdo muestran la distribución del número total de folículos en función de su diámetro, por tipo de sección y en las diferentes edades estudiadas. En el panel derecho se muestra el número de folículos sanos, los cuales derivan del total (visto en el panel izquierdo) y donde el resto correspondería a los folículos atrésicos.

La sección del nervio ovárico superior izquierdo provoca aumento del número de *folículos pequeños* ($< 350\mu\text{m}$) a los 12 días postoperatorios en ambos ovarios y a los 16 días se observa disminución de este tipo de folículos en el ovario derecho (gónada inervada) (Fig. 12a). De éste total el número de folículos sanos con un diámetro menor a las $350\mu\text{m}$, disminuye en ambos ovarios a los 4 y 12 días posteriores a la desnervación y a los 16 días sólo por la gónada inervada, comparado con el grupo con operación simulada (Fig. 12b).

El número total de *folículos medianos* ($350-499\mu\text{m}$) presentes 4 días después de la desnervación está disminuido en ambos ovarios (Fig. 12c). La cantidad de folículos sanos en el ovario desnervado se mantiene baja hasta los 8 días posteriores a la desnervación y todos son atrésicos a los 12 días en los dos ovarios, mientras que el número se normaliza cuando han transcurrido 16 días (Fig. 12d).

Cuando se analiza la población de *folículos grandes* ($>500\mu\text{m}$) se observa que la gónada desnervada no presenta modificaciones en éste tipo de folículos a lo largo del estudio; mientras que el ovario derecho (la gónada que permanece inervada) aumenta el número de folículos a los 4, 8 y 12 días postoperatorios (Fig. 12e). Dicho aumento está dado por el incremento en el índice de atresia, ya que no se aprecian folículos sanos a los 4, 12 y 16 días, mientras que el ovario desnervado (izquierdo) no presenta folículos sanos a los 4 y 12 días (Fig. 12f).

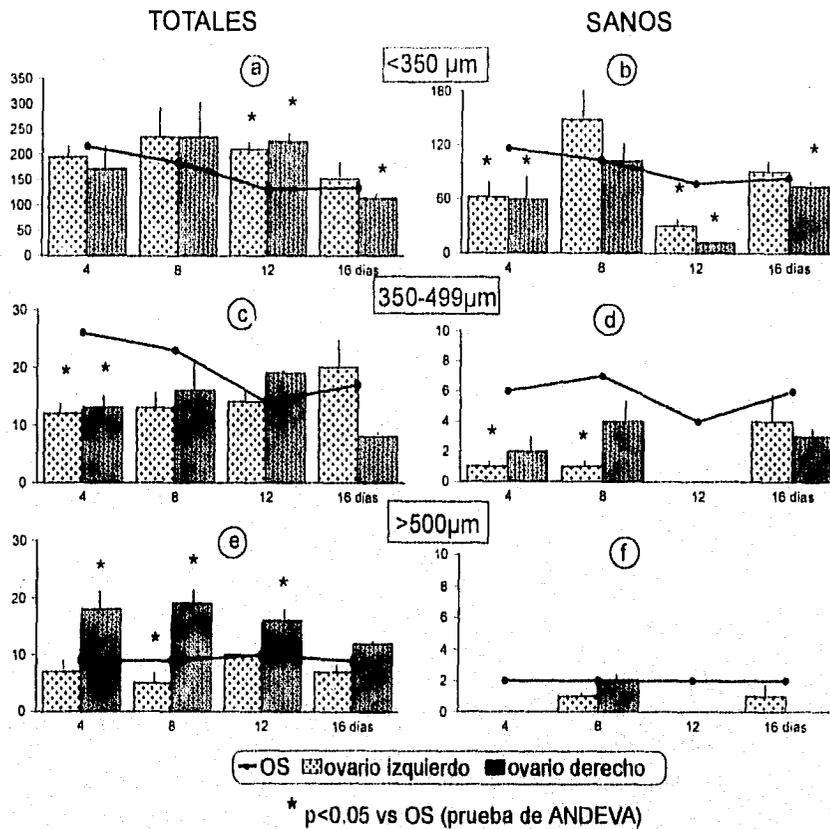


Fig. 12. Media \pm em del número total de folículos por rango (panel izquierdo) y de sanos (panel derecho) en el ovario izquierdo y derecho de ratas con operación simulada (OS) (raya continua) o sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) a los 16 días y sacrificadas 4, 8, 12 ó 16 días posteriores a la deservación.

La sección del nervio ovárico superior derecho induce en el ovario desnervado disminución del número de *foliculos pequeños* ($<350\mu\text{m}$) 4 días después de la sección, mientras que en el ovario izquierdo se observa aumento a los doce días (gónada inervada) (Fig. 13a). En el ovario desnervado el número de foliculos sanos está disminuido a los 4, 12 y 16 días (Fig. 13b).

El análisis de los *foliculos medianos* ($350-499\mu\text{m}$) también muestra una disminución por el ovario desnervado a los 4 y a los 12 días postoperatorios (Fig. 13c). A los 4 días la gónada desnervada no presenta foliculos medianos sanos, de igual manera a los 16 días post-desnervación disminuye la cantidad de foliculos sanos en el ovario intacto y no se modifica en el desnervado (Fig. 13d).

La población de *foliculos preovulatorios* ($>500\mu\text{m}$) no se ve modificada por la sección del nervio ovárico derecho, excepto a los 4 días donde ambos ovarios presentan una disminución en éste tipo de foliculos (Fig. 13e); igual a lo que se observa con los foliculos medianos, no se observan foliculos sanos en el ovario desnervado 4 días posteriores a la cirugía. A los 8 y 16 días de evolución no se ven cambios en la cantidad de foliculos sanos, mientras que a los 12 días tanto el ovario desnervado (derecho) como el inervado (izquierdo) no presentan foliculos preovulatorios sanos (Fig. 13f)

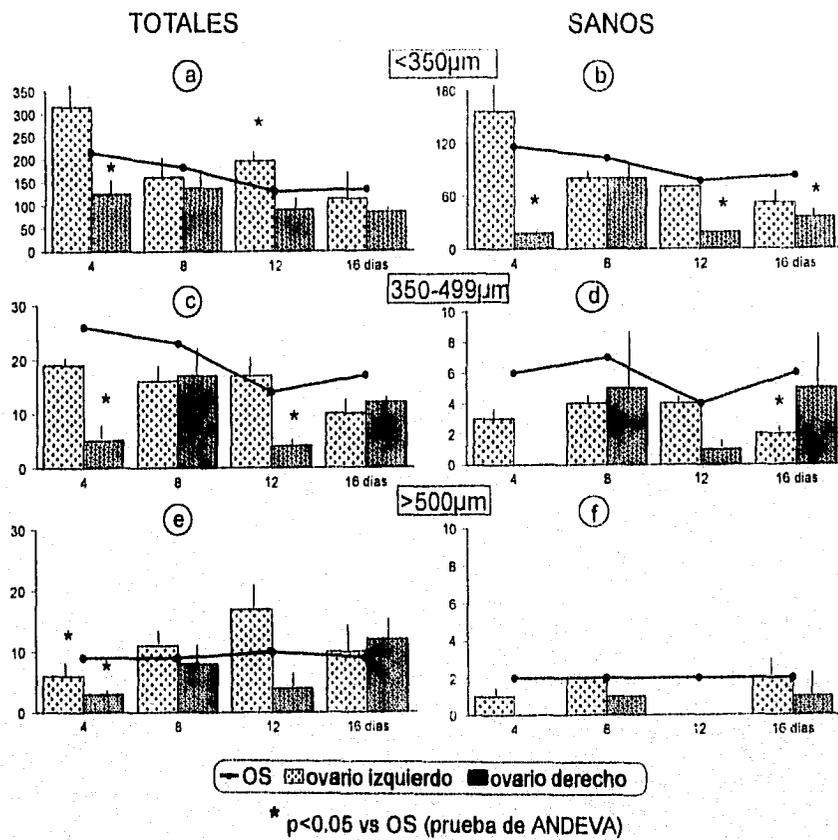


Fig. 13. Media \pm em del número total de folículos por rango (panel izquierdo) y de sanos (panel derecho) en el ovario izquierdo y derecho de ratas con operación simulada (OS) (raya continua) o sección del nervio ovárico superior derecho (SNOD) a los 16 días y sacrificadas 4, 8, 12 ó 16 días después.

La sección bilateral del nervio ovárico superior, solamente provoca disminución del número de *folículos pequeños* por el ovario derecho a los 16 días post-desnervación (Fig. 14a), sin embargo, el número de folículos sanos en ambos ovarios está disminuido a los 4 y 8 días y a los 12 días sólo por el ovario izquierdo, mientras que a los 16 días el número de folículos sanos pequeños no es diferente a la operación simulada (Fig. 14b)

En el número de *folículos medianos* (350-499 μ m) hay disminución de folículos en el ovario derecho a los 4 y 8 días después de la desnervación y a partir de los 12 días éste ovario se recupera (Fig. 14c). Este comportamiento se refleja en el número de folículos sanos por el ovario derecho, ya que desde los 4 días se da disminución y a los 8 días no se observan. El ovario izquierdo se ve afectado en su cuota de folículos medianos sanos a los 8 y 12 días (Fig. 14d).

La sección bilateral del nervio ovárico superior no modifica el número total de *folículos grandes* (>500 μ m), independientemente del tiempo post-desnervación (Fig. 14e). Cuando se analizan cuántos de éstos folículos son sanos se observa que en el ovario izquierdo no se ve modificado este tipo folicular a los 4 ó 16 días, mientras en la gónada derecha no hay folículos preovulatorios a los 4 y 8 días; y a los 16 días éste ovario presenta un aumento en la cantidad de sanos (Fig. 14f).

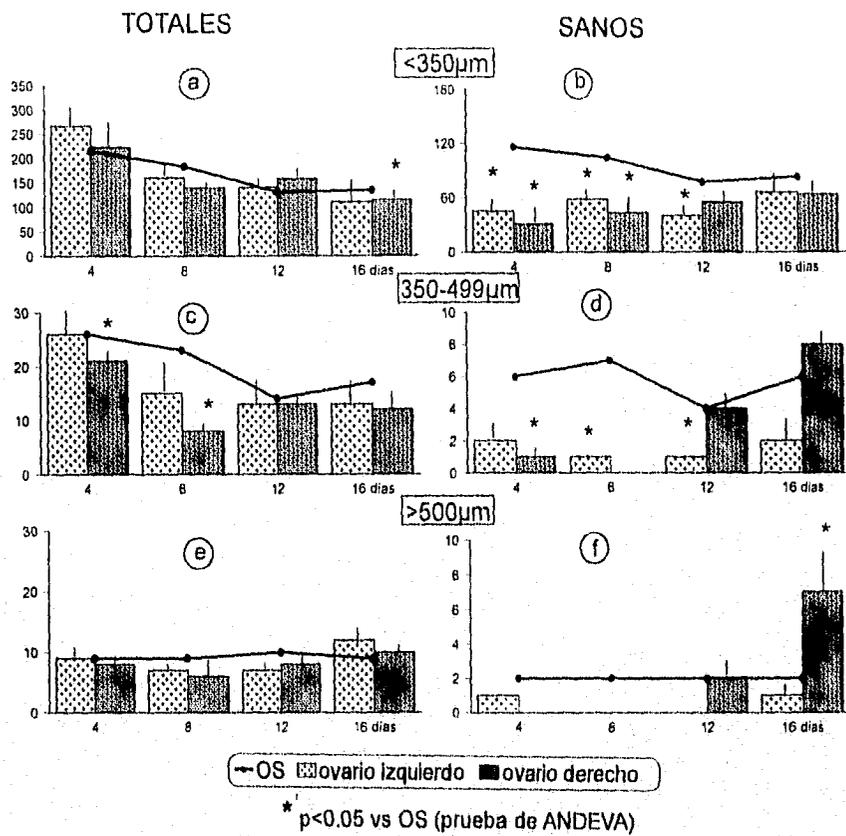


Fig. 14. Media \pm em del número total de folículos por rango (panel izquierdo) y de sanos (panel derecho) en el ovario izquierdo y derecho de ratas con operación simulada (OS) (raya continua) o sección bilateral del nervio ovárico superior (SBNO) a los 16 días y sacrificadas 4, 8, 12 y 16 días después.

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que en la rata prepúber la falta de información neural que transcurre por el nervio ovárico superior, incrementa la atresia folicular, lo que permite sugerir que la inervación aferente al ovario modula de manera estimuladora la diferenciación del folículo ovárico.

La información neural que transcurre por el nervio ovárico superior no es fundamental en el control del peso corporal, ya que la sección uni o bilateral de éste nervio realizada en la etapa infantil de la rata, no lo modifica aún después de haber transcurrido 16 días. Resultados semejantes pero en la etapa juvenil (Aguado y Ojeda, 1984), muestran que la sección bilateral del nervio ovárico superior no provoca modificaciones en el peso corporal, ni observan cambios en la concentración plasmática de la GH. A diferencia de lo que se presenta cuando la desnervación se realiza con GTD, en donde se ha mostrado que la administración de éste fármaco provoca disminución del peso corporal (Lara y col., 1990a; Flores y col., 1990). Es posible que la GTD al actuar sobre todas las fibras catecolaminérgicas del sistema nervioso periférico, se este modificando la secreción de la GH, evento que no ocurre al eliminar sólo la información que llega por el nervio ovárico superior.

Previamente ha sido mostrado que la sección del nervio ovárico superior en el animal prepúber, induce alteraciones en el peso del ovario evaluado al día del primer estro vaginal (Morales y col., 1993), así como en la rata adulta (Chávez y col., 1991). En el presente estudio los cambios en el peso del ovario dependen del nervio seccionado y del tiempo transcurrido después de la desnervación. El hecho que la sección del nervio derecho sea capaz de inducir incremento del peso de los ovarios, mientras que la sección del nervio izquierdo no, pone de manifiesto que la

información neural de cada uno de los ovarios es diferente, tal y como se ha postulado que ocurre en la rata adulta (Klein y Burden, 1988), o bien, que existe una señal neural interovárica que se traduce dependiendo del ovario que queda inervado. Sin embargo, es importante resaltar que el peso de glándula no necesariamente es el reflejo de la actividad del órgano.

El peso del útero se utiliza como un indicador biológico de la actividad esteroidogénica del ovario. La sección uni o bilateral del nervio ovárico superior en la etapa infantil, provoca aumento del peso del útero 4 días posteriores a la cirugía. Es posible que éste incremento se deba a una mayor actividad esteroidogénica por parte de la gónada, sin embargo, no se tienen evidencias que apoyen ésta interpretación. Al momento, se sabe que éste tipo de desnervación produce disminución inmediata de la tasa de liberación de estrógenos y progesterona, hasta aproximadamente 30 minutos después de realizada la intervención, pero no se conoce que este efecto ocurra en tiempos posteriores (Aguado y Ojeda, 1984; Erskine y Weaver, 1988).

Dado que en este estudio la desnervación quirúrgica se realizó a los 16 días de edad, donde las crías aún son alimentadas por la madre, se debe tener presente que algunas de las alteraciones en el patrón de crecimiento folicular, pueden estar dadas por un mecanismo adicional de origen maternal. La leche de la rata contiene un péptido similar a la GnRH (GnRH-like), el cual se une a receptores específicos en las células de la teca y de la granulosa (Ojeda y Urbanski, 1994). Ya que en los animales con sección del nervio ovárico superior se observa que incrementa el índice de atresia, es posible sugerir que la inervación de la gónada está modulando la acción del GnRH-like, la cual presenta efectos inhibitorios en la diferenciación del folículo e induce apoptosis celular (Hsueh y col., 1994).

Además de los factores ya señalados que participan en el desarrollo del ovario, se debe tener presente las condiciones neuroendócrinas del animal al momento en que se realiza la desnervación. Así, existen trabajos donde se muestra que en el ovario de la rata durante la etapa infantil, se presenta una dinámica folicular alta, incluso mayor a la que se observa en la etapa juvenil (Hirshfield, 1991a; Greenwald y Roy, 1994). El que la sección del nervio ovárico superior en la etapa infantil provoque modificaciones sobre el crecimiento folicular que dependen del tiempo post-desnervación, permite sugerir que la información aferente al ovario está modulando las etapas del desarrollo y diferenciación del folículo ovárico, y que esta modulación es diferente para cada ovario.

La mayoría de los trabajos en los que se evalúa el efecto de una desnervación sobre el crecimiento folicular, no consideran si existen o no respuestas lateralizadas en el ovario (Lara y col., 1990a; 1990b; Malamed y col., 1992). En este trabajo se observa que los efectos de la desnervación sobre la dinámica de crecimiento y diferenciación de los folículos dependen del nervio que se secciona, del ovario que se evalúa y del tiempo que transcurre posterior a la desnervación. Ante la sección uni o bilateral del nervio ovárico superior, el ovario derecho es más susceptible a presentar disminución en la población folicular; este efecto se visualiza sobre todo en aquellos grupos en donde han transcurrido 16 días de realizada la operación; resultados que indican la existencia de una asimetría funcional.

En el ratón, la sección unilateral del ligamento suspensorio provoca una disminución significativa del número de folículos maduros en el ovario desnervado (Grob, 1974). En el presente trabajo, la sección unilateral del nervio modifica la población de manera diferencial según el ovario evaluado. Así, en los animales con sección del nervio ovárico superior izquierdo, el número de folículos presentes tanto en la gónada intacta como desnervada se incrementa a los 12 días posteriores a la

desnervación y sólo en el ovario derecho disminuye a los 16 días. En tanto que, con la sección del nervio derecho el ovario intacto incrementa el número de folículos y el desnervado tiende a presentar menor desarrollo folicular. Estos resultados apoyan la hipótesis de la existencia de una comunicación interovárica, que al parecer no se presenta en el ratón.

Los efectos de la sección sobre el crecimiento del folículo dependen también del nervio seccionado. En los animales con sección del nervio ovárico superior izquierdo, el ovario intacto (derecho) presenta un efecto compensador en el número de folículos preovulatorios de los 4 a los 12 días post-desnervación, aunque la mayoría de estos folículos son atrésicos. Estos resultados apoyan la hipótesis de que existe una comunicación interovárica (Morales y col., 1993), ya que se comporta como el modelo del animal hemicastrado. La posible existencia de esta vía de comunicación puede explicar la ovulación compensadora que presenta el ovario innervado al primer estro vaginal (Morales y col., 1993). Sin embargo, se hace evidente que los mecanismos implicados en el crecimiento de los folículos son diferentes a los que participan en la diferenciación de estos; es decir, que los folículos son capaces de crecer, pero no necesariamente son sanos.

Con la sección del nervio derecho, el ovario intacto (izquierdo) es incapaz de responder con un aumento del número de folículos en cualquiera de los estadios del desarrollo del folículo. Como ya se había mencionado, la gónada derecha posee una mayor capacidad de respuesta a diferentes estímulos que la izquierda. Estas evidencias nos permiten sugerir que la traducción de la información que llega al ovario, a través del nervio ovárico superior es diferente para cada ovario.

El análisis de los resultados de una sección bilateral, refleja que no es la sumatoria de los efectos de la sección del nervio ovárico izquierdo y derecho.

Cuando ambos nervios son seccionados, prácticamente no se ve alterada la población de folículos presentes en los dos ovarios, excepto en aquellos animales que se sacrificaron 16 días después de la desnervación, en donde sólo el ovario derecho presenta disminución comparado a la operación simulada.

En el modelo con desnervación bilateral, es posible que las gónadas desnervadas desarrollen una hipersensibilidad a las catecolaminas que provienen de la médula adrenal, del plexo ovárico y a las sintetizadas por el propio ovario (Aguado y Ojeda, 1984; Ben-Jonathan y col., 1984). O bien, que a la falta de información que llega por el nervio ovárico superior, otros sistemas de control (información catecolaminérgica y peptidérgica del plexo ovárico o incluso del nervio vago) participen en la modulación de la función del ovario.

La población de folículos pequeños y grandes no se ve modificada en el ovario izquierdo y derecho de los animales con sección bilateral, mientras que los folículos medianos presentan una disminución inicial por parte del ovario derecho. Podríamos hablar entonces, de fases diferenciales en la respuesta de los ovarios a la desnervación, que dependen del tiempo de evolución.

La sección del nervio ovárico superior en la etapa infantil no modifica el número total de folículos, excepto en los animales con la sección del nervio ovárico izquierdo donde se observa un incremento transcurridos 12 días. Estas evidencias muestran que se requiere de un lapso de tiempo para que los folículos presentes en el grupo de reserva pasen al de crecimiento. Otros autores han mostrado que en la cobaya prepúber la desnervación local con 6-OHDA no modifica el total de folículos presentes en la gónada desnervada (Curry y col., 1984), mientras que la administración de GTD desde el nacimiento los incrementa (Riboni y Domínguez, 1995); contrario a lo mostrado en la rata (Lara y col., 1991a), donde la

administración de GTD disminuye significativamente el número total de folículos. Las discrepancias observadas entre el animal con sección del nervio ovárico superior y el desnervado con fármacos, radican en que al quitar el nervio ovárico no sólo eliminamos la información catecolaminérgica, sino también la del tipo peptidérgico (Ahmed y col., 1986). Además de tener presente el modelo de animal en estudio, dado que se ha descrito que existen diferencias por especie en cuanto a la cantidad de fibras nerviosas catecolaminérgicas que inervan al ovario (Stefenson y col., 1981).

Son varios los reportes que han mostrado que la inervación aferente al ovario participa en la regulación del crecimiento folicular (Brink y Grob, 1972; Burden, 1985; Curry y col., 1984; Grob, 1974; Lara y col., 1990a, 1990b; Morales y col., 1993). Al parecer esta información neural permite que las gonadotropinas, principalmente la FSH, actúen sobre el folículo facilitando su crecimiento, el reclutamiento de los folículos que van a responder al pico preovulatorio de la LH, la inducción y estimulación de la actividad de las aromatasas y en la inducción de receptores a LH en los folículos grandes (Ben-Jonathan y col., 1982; Greenwald, 1994). Es posible sugerir que la falta de información catecolaminérgica y peptidérgica que llega por el nervio ovárico superior, modifica la expresión de los receptores a las gonadotropinas, más que la respuesta del folículo a las mismas; ya que en animales con sección unilateral del nervio ovárico, la estimulación con PMSG o hCG no restablece la cuota ovulatoria por el ovario desnervado (Morales y Chávez, 1994). El hecho de que la sección uni o bilateral del nervio ovárico superior reduce el número de folículos totales por el ovario derecho 12 días después de la desnervación, podría indicar que la información catecolaminérgica y peptidérgica que llega por el nervio ovárico superior actúa como un amplificador de la señal gonadotrópica.

En los mecanismos implicados en el crecimiento y diferenciación del folículo participan además una serie de factores de crecimiento entre los que se encuentran el NGF, EGF, TGF α , bFGF, IGF-I los cuales estimulan el desarrollo folicular. Recientemente se ha mostrado que las células de la teca producen factores de crecimiento (como el TGF y el EGF) los cuales influyen en la proliferación de las células de la granulosa de los folículos terciarios (Greenwald y Roy, 1994). Las células de la teca se encuentran inervadas por el nervio ovárico superior, por lo que se piensa que en el animal con sección de éste nervio, los cambios sobre la dinámica del crecimiento folicular se deban, al menos en parte, a las alteraciones en la acción de los factores de crecimiento. Estas evidencias apoyarían la interpretación de que el nervio ovárico superior modula de manera inhibitoria la atresia folicular, quizás mediado por una deficiencia en los factores de crecimiento (Fig. 15).

Otra posible explicación del incremento de la atresia, podría estar dada por un aumento en la síntesis de andrógenos provocada por la desnervación, o bien por una disminución en la tasa de conversión de los andrógenos a estrógenos por las células de la granulosa (Greenwald y Roy, 1994). Sin embargo se requieren de más estudios para aceptar o descartar esta posibilidad. Todos nuestros resultados apuntan hacia la participación de la inervación aferente a la gónada no sólo en el crecimiento del folículo, sino también en la diferenciación del mismo.

En conjunto, los presentes resultados permiten sugerir que en la rata prepúber, la información catecolaminérgica y peptidérgica que viaja por el nervio ovárico superior, modula de manera inhibitoria la atresia folicular, mientras que su participación en el crecimiento del folículo depende del tiempo post-desnervación y del ovario del que se trate.

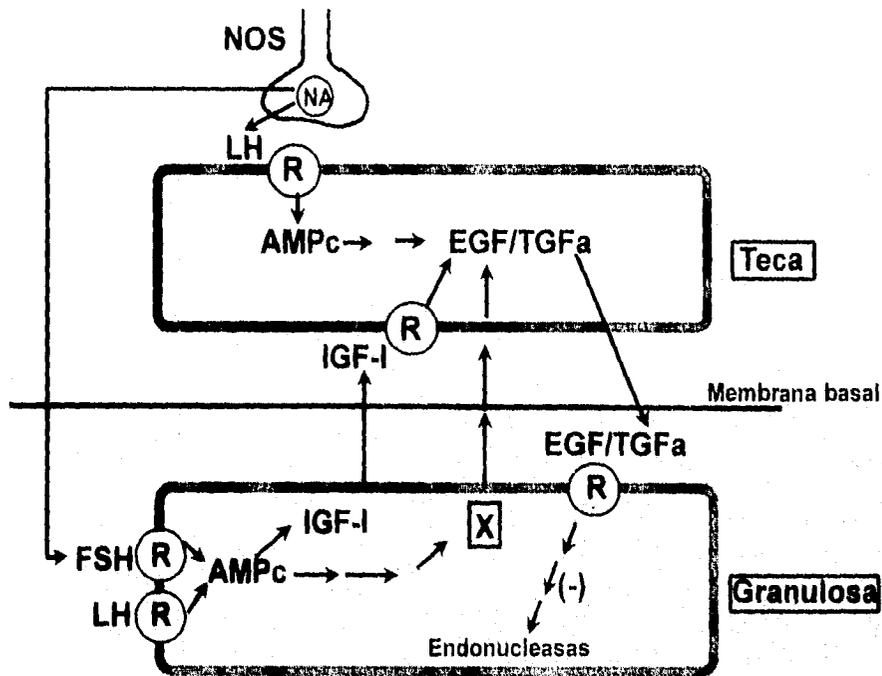


Fig. 15. Modelo propuesto para explicar la interacción entre la inervación que llega por el nervio ovárico superior (NOS), las gonadotropinas y los factores de crecimiento. La noradrenalina (NA) modularía, en las células de la teca y de la granulosa, la acción de las gonadotropinas; y una vez que estas se han unido a su receptor (R), controlarían los efectos del factor de crecimiento epidermal (EGF), del factor de crecimiento transformador (TGFα) y del factor de crecimiento parecido a la insulina I (IGF-I) [Tomado de Hsueh y col., 1994 con modificaciones].

CONCLUSIONES

- En la rata prepúber la gónada derecha es más susceptible de presentar modificaciones en el crecimiento folicular ante la sección del nervio ovárico superior, independientemente del lado que se secciona.
- La falta del nervio ovárico superior izquierdo durante la etapa infantil estimula el paso de folículos medianos a preovulatorios en la gónada inervada. La ausencia del nervio derecho no tiene el mismo efecto sobre el ovario izquierdo.
- La falta de inervación total aferente (sección bilateral), acelera la atresia folicular sin alterar el crecimiento de la población.
- En la rata prepúber, la información neural que llega al ovario por el nervio ovárico superior, modula de manera inhibitoria la atresia folicular.

BIBLIOGRAFIA

- Aguado, L.I. y Ojeda, S.R.** 1984. Prepubertal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. Role of noradrenergic innervation. *Endocrinology* 114(5):1845-1853.
- Aguado, L.I., Petrovic, S.L. y Ojeda, S.R.** 1982. Ovarian β adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology* 111:1124-1130.
- Ahmed, C.E., Dees, W.L. y Ojeda, S.R.** 1986. The immature rat ovary is innervated by Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology* 118(4):1682-1689.
- Bahr, J.N. y Ben-Jonathan, N.** 1985. Ovarian catecholamines during the prepubertal period and reproductive cycle of several species. En: Catecholamines as hormone regulators. N. Ben Jonathan, S. M. Bahr & R.I. Weiner (Eds.). Raven Press, New York. pp. 279-291.
- Becú-Villalobos, D. y Lacau-Mengido I.M.** 1990. Control hormonal del desarrollo puberal en la rata hembra. *Acta Physiological Pharmacology Latinoamericana* 40:1-17.
- Ben-Jonathan, N., Arbogast, L.A., Rhoades, T.A. y Bahr, J.M.** 1984. Norepinephrine in the rat ovary: Ontogeny and *de novo* Synthesis. *Endocrinology* 115(4):1426-1431.
- Ben-Jonathan, N., Braw, R.H., Laufer, N., Reich, R., Bahr, J.M. y Tsafirri, A.** 1982. Norepinephrine in graafian follicles is depleted by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 110(2):457-461.
- Billig H., Furuta, Y. y Haueh, A.J.** 1993. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 133(5):2204-2212.
- Billig, H., Furuta, I. y Haueh, A.** 1994. Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and *in situ* detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology* 134(1):245-252.
- Biskov, A.N.** 1978. Follicular atresia. En: The Vertebrate Ovary, Comparative Biology and Evolution. R.E. Jones (Ed.). Plenum Press. N.Y. 533-554 pp.

- Boullin, D.J., Costa, E. y Brodie, B.B.** 1966. Discharge of tritium-labeled guanethidine by sympathetic nerve stimulation as evidence that guanethidine is a false transmitter. *Life Sciences* 5:803-808.
- Brink, C.E. y Grob, H.S.** 1972. Response of the denervated mouse ovary to exogenous gonadotropins. *Biology of Reproduction* 9:108.
- Burden, H.W.** 1985. The adrenergic innervation of mammalian ovaries. In: Catecholamines as hormone regulators. N. Ben Jonathan, S. M. Bahr & R.I. Weiner (Eds.). Raven Press, New York; 261-278.
- Curry, T.E., Lawrence, I.E. y Burden, H.W.** 1984. Ovarian sympathectomy in the guinea pig II. Effects on follicular development during the prepubertal period and following exogenous gonadotropin stimulation. *Cell Tissue Research* 236:593-596.
- Chakravorty, A., Mahesh, V.B. y Mills, T.M.** 1993. Control of peptides regulating mitosis of granulosa cells in immature rat ovary by oestrogen and gonadotrophin. *Journal of Reproduction and Fertility* 97:91-100.
- Chávez, R., Carrizosa, L. y Domínguez, R.** 1991. Effects of superior ovarian nerve on spontaneous and induced ovulation in adult rats. *Medical Science Research* 19:41-42.
- Chávez, R. y Domínguez, R.** 1994. Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of compensatory ovarian hypertrophy: the effects of its section performed on each day of the oestrous. *Journal of Endocrinology* 140:197-201.
- Chávez, R., Morales, L., González, Ma. E. y Domínguez, R.** 1994. Ovarian norepinephrine content in prepubertal rats with superior ovarian nerve section: temporal studies. *Medical Science Research* 22:789-790.
- Chung, S.Y., Billig, H., Tilly, J., Furuta, Y., Tsafri, A. y Hsueh, A.J.W.** 1994. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 135:1845-1853.
- Domínguez, R., Cruz, M.E. y Chávez, R.** 1989. Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian En Growth factors and the ovary. A.N. Hirshfield (Ed). Serono symposia, Plenum Press, N.Y. 321-325 pp.

- Domínguez, R., Chávez, R. y Cruz, M.E.** 1991. La regulación del crecimiento y el desarrollo folicular. En: Tópicos selectos de biología de la reproducción. R.Domínguez (Ed). Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, U.N.A.M., México. 163-188 pp.
- Dyer, C.A. y Erickson, G.F.** 1985. Norepinephrine amplifies human chorionic gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by ovarian theca-interstitial cells. *Endocrinology* 116(4):71645-1652.
- Erskine M.S. y Weaver, E.J.** 1988. The role of ovarian sympathetic innervation in the control of estrous responsiveness in the rat. *Hormones and Behavior* 22:1-11.
- Espey, L.L. y Lipner, T.M.** 1994. Ovulation. En: The physiology of Reproduction. E. Knobil y J.D. Neill (Eds.). Raven Press, New York. 725-780 pp.
- Fink, G.** 1988. Gonadotropin secretion and its control. En: The physiology of Reproduction. E. Knobil y J. (Eds.). Raven Press. New York.
- Ferruz, J., Barria, A., Galleguillos, X. y Lara, H. E.** 1991. Release of norepinephrine from the rat ovary: local modulation by gonadotropins. *Biology of Reproduction* 45:592-597.
- Flores, A., Ayala, M.E. y Domínguez, R.** 1990. Does noradrenergic peripheral innervation have a different role in the regulation ovulation in the pubertal and the adult rat? *Medical Science Research* 18:817-818.
- Fortune, J.E.** 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction* 50:225-232.
- George, F.W. y Ojeda, S.R.** 1987. Vasoactive intestinal peptide enhances aromatase activity in the neonatal rat ovary before development of primary follicles or responsiveness to follicle- stimulating hormone. *Proceeding Natural Academic Science* 84:5803-5807.
- Gerendai, Y., Marchetti, B., Maugeri, S., Roxas, M.A. y Scapagnini, U.** 1978. Prevention of compensatory ovarian hypertrophy by local treatment of the ovary with 6-OHDA. *Neuroendocrinology* 27:272-278.
- Goldman, B. D.** 1981. Puberty. En: Neuroendocrinology of Reproduction. Physiology and behavior. N.T. Adler (Ed). Plenum Press, New York.

- Greenwald, G.S. y Roy, S.K. 1994. Follicular development and its control. En: The Physiology of reproduction. E. Knobil y J. Neill (Eds.). Raven Press. New York. 629-724 pp.
- Grob, H.S. 1974. Follicle growth in denervated ovaries of hypophysectomized mice. *Federation Proceeding* 33:213.
- Hirshfield, A.N. 1991a. Theca cells may be present at the outset of follicular growth. *Biology of Reproduction* 44:1157-1162.
- Hirshfield, A.N. 1991b. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int. Review of Cytology* 124:43-101.
- Hirshfield, A.N. 1992. Heterogeneity of cell populations that contribute to the formation of primordial follicles in rats. *Biology of Reproduction* 47:466-472.
- Hsueh, A.J.W., Billig, H y Tsafiri, A. 1994. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Review*. 15(6):707-724.
- Kannisto, P., Ekblad, E., Helm, G., Owan, Ch., Sjöberg, N.O., Stjernquist, F., Sundler, F. y Wallis, B. 1986. Existence and coexistence of peptides in nerves of the mammalian ovary and oviduct demonstrated by immunocytochemistry. *Histochemistry* 86:25-34.
- Kannisto, P., Owan, Ch. y Wallis, B. 1985. Involvement of local adrenergic receptors in the process of ovulation in gonadotrophin-primed immature rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 75:357-362.
- Klein, C.M. y Burden, H.W. 1988. Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neuroscience letters* 85:217-222.
- Lamberts, R. y Wuttke, W. 1981. Puberty of female rats may in part be explained by decrease hypothalamic dopamine receptor sensitivity. *Brain Research* 215:375-381.
- Lara, H.E., McDonald, J.K., Ahmed, C.E. y Ojeda, S.R. 1990a. Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. *Endocrinology* 127(5):2199-2209.
- Lara, H.E., McDonald, J.K. y Ojeda, S.R. 1990b. Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology* 126(1):364-375.

- Lawrence, I.E. Jr. y Burden, H. W.** 1980. The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The Anatomical Record* 196:51-59.
- Malamed, S., Gibney, J.A. y Ojeda, S.R.** 1992. Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat. *Cell Tissue Research* 270:87-93.
- Morales, L.** 1991. Estudio de la participación del nervio ovárico superior en el proceso de pubertad espontánea de la rata entera y hemicastrada. Tesis de maestría, ENEP Zaragoza. U.N.A.M México.
- Morales, L. y Chávez, R.** 1994. El nervio ovárico superior como modulador de la acción de las gonadotropinas. Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas, ALACF. P5/19:197.
- Morales, L., Chávez, R. y 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. *Medical Science Research* 21:15-17.
- Ojeda, S.R., Advis, J.P. y Andrews, W.W.** 1980a. Neuroendocrine control of the onset of puberty in the rat. *Federation Proceeding* 39:2365-2371.
- Ojeda, S.R., Andrews, W.W., Advis, J.P. y Smith white, S.** 1980b. Recent advances in the endocrinology of puberty. *Endocrine Review* 1:228-257.
- Ojeda, S.R., Aguado, L.I. y Smith, S.** 1983. Neuroendocrine mechanisms controlling the onset of female puberty: the rat as a model. *Neuroendocrinology* 37:306-313.
- Ojeda, S.R.** 1988. Female reproductive function. En: *Textbook of endocrine physiology*. J.E. Griffin y S.R. Ojeda (Eds.) Oxford University Press. 129-164.
- Ojeda, S.R. y Urbanski, H.F.** 1994. Puberty in the rat. En: *The Physiology of Reproductions*. E. Knobil & J.D. Neill (Eds.). Segunda edición. Raven Press, New York. 363-410 pp.
- Peters, H., Byskov, A.G., Lintern-Moore S., Faber, M. Anersen, M.** 1973. The effect of gonadotrophin on follicle growth initiation in the neonatal mouse ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* 35:139-141.

- Quiróz, L.U.** 1994. Efectos de la desnervación catecolaminérgica realizada durante la etapa fetal sobre la pubertad espontánea de la rata hembra o macho. Tesis de Licenciatura en Biología, FES Zaragoza U.N.A.M.México.
- Riboni, L. y Domínguez, R.** 1995. Noradrenergic peripheral denervation in new born female guinea pig results in the acceleration of follicular growth. En: Life cycle of the ovarian follicle. Final program and abstract book, Serono Symposia EUA.
- Schwartzman, R.A. y Cidowsky, J.A.** 1993. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine reviews* 14(2):133-151).
- Selstam, G. Norjavaara, E., Tegenfelt, T., Lundberg, S., Sandström, C. y Persson, S.** 1985. Partial denervation of the ovaries by transection of the suspensory ligament does not inhibit ovulation in rats treated with pregnant mare serum gonadotropin. *The Anatomical Record* 213:392-395.
- Sokka, T.A. y Huhtaniemi, I.P.** 1995. Functional, maturation of the Pituitary-Gonadal axis in the neonatal female rat. *Biology of Reproduction* 52:1404-1409.
- Stefenson, A. Owman, Ch., Sjöberg, N.O., Sporrang, B. y Walles, B.** 1981. Comparative study of the autonomic innervation of the mammalian ovary, with particular regard to the follicular system. *Cell Tissue Research* 215:47-62.
- Urbanski, H.F. y Ojeda, S.R.** 1985. The juvenile-peripubertal transition period in the female rat: Establishment of a diurnal pattern of pulsatile luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 117(2):644-649.
- Wiesen, J.F. y Midgley Jr., A.R.** 1994. Expression of connexin 43 gap junction messenger ribonucleic acid and protein during follicular atresia. *Biology of Reproduction* 50:336-348.