

51262



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

POSIBLE PAPEL ASIMETRICO DE LOS OVARIOS Y DEL SISTEMA COLINERGICO SOBRE LA SECRECION DE HORMONAS ESTEROIDES EN EL DIA DEL ESTRO. LA RATA ADULTA COMO MODELO

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA DE LOS SISTEMAS HUMANOS)**

PRESENTA:

ANA ISABEL BARCO GONZALEZ

DIRECTORA DE TESIS: **DRA. MARIA ESTHER CRUZ BELTRAN**

U. N. A. M
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D.F.



ZARAGOZA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

2005

m343432



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"

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

POSIBLE PAPEL ASIMÉTRICO DE LOS OVARIOS Y DEL SISTEMA
COLINÉRGICO SOBRE LA SECRECIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES EN EL DIA
DEL ESTRO. LA RATA ADULTA COMO MODELO

Autor: Ana Isabel Barco González

Directora: Dra. María Esther Cruz Beltrán

La tesis fue desarrollada en el laboratorio de Neuroendocrinología de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo de CONACyT convenios 29006-N y 40300-Q.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Ana Isabel Barco
González
FECHA: 14-Abril-05
FIRMA: Ana Isabel Barco

Dedicatorias:

A mi esposo Carlos por que lo amo, por su paciencia e impaciencia, por su confianza y por que a pesar de todo me ha demostrado ser un excelente compañero.

A mi hijo Tonathiu quien siempre tiene una sonrisa, un abrazo y una palabra de aliento para mí, por que es muy importante en mi vida. Te amo mi niño.

A mis padres Guadalupe y Aurelio por que los quiero, los admiro, por todo el apoyo que me han dado y por haberme enseñado valores, entre ellos la honestidad.

A mis hermanos Soledad, Lupe, Elena, Roberto y Amalia, por que mi vida no sería igual sin ellos, porque cada uno es importante para mí y por que siempre tengo su ayuda y su comprensión.

A mis tíos Adrián y Ana porque siempre los veré como mis padres, ya que son excelentes personas y por que siempre he recibido sus bendiciones.

A mis amigos de siempre Claudia, Lidia, Carmelita, Víctor y Angélica porque se que desde lejos me recibo su ayuda y apoyo.

A mis nuevos amigos:

Josefina por haberme enseñado y ayudado en el manejo de los animales y lo más importante por brindarme su amistad.

A Javier por ayudarme a salir de dudas en el manejo de la computadora y por escucharme.

A Socorrito porque de ella sólo escuche palabras de aliento, buenos consejos y muchas bendiciones. De manera general a toda la familia Figueroa y a Sarita, porque siempre he recibido su apoyo.

Al Señor Angel y a Yola porque confían y se preocupan por mí. Gracias por sus buenos consejos.

¡A todos ellos mil gracias!

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES.

A la Dra. María Esther Cruz Beltrán por su tiempo y su comprensión, pero sobre todo porque la admiro y respeto y a quien considere más que mi asesora... ¡mi amiga!

Al Dr. Roberto Domínguez Casalá por su paciencia y sus acertados comentarios y ayuda en la elaboración de este trabajo. ¡Gracias!

A los miembros del jurado

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dra. María Luisa Fanjul

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Dr. Alejandro Domínguez González

Por las aportaciones tan valiosas y precisas en la revisión de la tesis.

Al Laboratorio de Hormonas Esteroides del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" y al Biol. Roberto Chavira por su colaboración en la realización de la técnica de Radio Inmundo Análisis.

A la Dra. Leticia Morales Ledesma, por ser tan bella persona y por el tiempo que me dedicó para aclarar mis dudas, lo cual le agradezco infinitamente.

ÍNDICE

RESUMEN	i
MARCO TEÓRICO	1
Compartimentos del ovario	1
Inervación ovárica	6
Nervios del ovario	7
Inervación colinérgica	9
Esteroidogénesis	12
Hormonas ováricas	15
Función de las hormonas esteroides sexuales	17
Rutas biosintéticas $\Delta 4$ y $\Delta 5$ de las hormonas esteroides ováricas	18
Factores que regulan la esteroidogénesis	21
Asimetrías funcionales del ovario	24
JUSTIFICACIÓN	27
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	
GENERAL	28
PARTICULARES	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
RESULTADOS	
• Efectos de la ovariectomía unilateral sobre las concentraciones séricas de progesterona, testosterona y estradiol	32
• Análisis de la participación del sistema colinérgico en la regulación de la secreción de hormonas esteroides ováricas en el día del estro	40
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	58
PERSPECTIVAS	59
REFERENCIAS	60
CONGRESOS	73

RESUMEN

En este estudio se analizaron los efectos, de la extirpación de uno o ambos ovarios en el día del estro, sobre la concentración sérica de progesterona (P_4), testosterona y 17β -estradiol (E_2). También se estudió la participación del sistema colinérgico en la regulación de la secreción de estas hormonas. Con la finalidad de conocer si existen diferencias en la capacidad de secreción de estas hormonas entre los ovarios, se evaluaron los efectos una hora después de extirpar uno de ellos. Para analizar la capacidad de adaptación del ovario remanente (ovario *in situ*), se estudiaron los efectos de la falta de la gónada izquierda o derecha 24 horas después de realizada la extirpación de un ovario.

Veinticuatro horas después de la anestesia con éter durante siete minutos se observó aumento en la concentración sérica de testosterona. La operación simulada o perforación del peritoneo modificó de manera diferente la concentración de las hormonas en función del lado del peritoneo perforado. Una hora después de la perforación del lado izquierdo resultó en aumento de la concentración sérica de E_2 , mientras que la perforación del peritoneo del lado derecho provocó aumento de las concentraciones de P_4 y testosterona. A las 24 horas de la perforación unilateral del peritoneo no se produjo modificaciones en la concentración de estas hormonas.

Una hora después de la extirpación del ovario izquierdo disminuyó la concentración sérica de E_2 y aumentó la de testosterona. La extirpación del ovario derecho no modificó significativamente la concentración sérica de las hormonas esteroides, en ninguno de los tiempos estudiados. La extirpación de ambos ovarios provocó aumento en las concentraciones de P_4 y testosterona y disminución en la de E_2 .

La inyección subcutánea de sulfato de atropina resultó en aumento de las concentraciones de P_4 (una y 24 horas) y testosterona (a las 24 horas), pero no de E_2 .

El bloqueo del sistema colinérgico antes de la perforación del peritoneo resultó en la disminución transitoria (a la hora) de la concentración de P_4 . En animales tratados de la misma forma pero sacrificados 24 horas después, la concentración de testosterona

disminuyó luego de la perforación del peritoneo del lado derecho. Este tratamiento no modificó la concentración de E_2 .

El bloqueo del sistema colinérgico previo a la extirpación de uno de los ovarios, provocó disminución de la concentración de P_4 24 horas después de la cirugía. Los efectos de la extirpación de uno de los ovarios en animales con bloqueo del sistema colinérgico sobre la concentración de testosterona, dependieron del ovario extirpado y del tiempo transcurrido: una hora después de la extirpación del ovario izquierdo se observó disminución en la concentración de la hormona, mientras que la extirpación del ovario derecho resultó en aumento. Veinticuatro horas después la extirpación de alguno de los ovarios, no se observaron diferencias en la concentración de testosterona respecto al grupo testigo. El bloqueo de los receptores colinérgicos antes de la extirpación de uno de los ovarios no modificó la concentración de E_2 .

La extirpación de ambos ovarios después de la inyección del sulfato de atropina provocó disminución de las concentraciones de P_4 y testosterona, pero no la de E_2 .

Los resultados de este estudio nos permiten sugerir que en el día del estro, los ovarios no secretan de manera asimétrica P_4 , testosterona y E_2 . El sistema colinérgico regula de manera diferente la secreción de estas hormonas: sobre la P_4 es inhibitoria, mientras que sobre la testosterona depende del ovario *in situ*, esto es, sobre el izquierdo es inhibitoria, mientras que sobre el derecho es estimuladora. En cambio, la secreción de E_2 no es regulada por este sistema de neurotransmisión.

MARCO TEÓRICO

Los ovarios son los órganos responsables de la producción de ovocitos (ovogénesis) y de la secreción de hormonas esteroides: progesterona, testosterona y estradiol (esteroidogénesis) y de hormonas proteicas (inhibina, activina y folistatina). Las hormonas ováricas participan en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario y también ejercen sus efectos sobre los órganos del sistema reproductor y otros tejidos periféricos.

En el ovario se distinguen dos zonas: *la corteza* o capa externa que consta del estroma celular que contiene los folículos ováricos y la *médula* o zona interna que no contiene folículos y consta de tejido conectivo fibroblástico laxo que contiene muchos vasos sanguíneos en espiral, linfáticos y nervios de gran tamaño (Ver figura 1) (Humbrey y Janice, 1998).

Compartimientos del ovario

El folículo (del latín “saco” o “bolsa pequeña”) es la estructura anatómico-funcional primordial del ovario, de la cual se originan los tres compartimientos de la gónada: folicular, luteal e intersticial. Las funciones de los folículos son liberar al ovocito capaz de ser fecundado y secretar hormonas que estimulan el crecimiento y la diferenciación del propio folículo y de los órganos del aparato reproductor entre otras funciones. La apariencia de los folículos varía dependiendo del estado de desarrollo folicular, pero la organización celular es la misma (Ver Figura 1) (Domínguez y col., 1989; Humhrey y Janice, 1999).

Compartimiento folicular. Un folículo consiste de un ovocito I y una pared folicular que lo rodea. Entre estas dos estructuras hay una membrana fina y transparente, la zona pelúcida. La pared folicular está formada por una capa interna de células llamadas células de la granulosa que rodean al ovocito y está separada de las células de la teca externa por la membrana basal. En los folículos maduros, la teca puede ser dividida en teca interna, que contiene células diferenciadas que producen esteroides y en teca externa, que contiene

principalmente tejido conectivo. El aporte de sangre y la inervación terminan en la teca interna. En la granulosa no hay vasos sanguíneos en ninguno de los estados de crecimiento folicular (Domínguez y col., 1989; Humhrey y Janice, 1999).

En función del tipo de células, presencia o ausencia de antro y tamaño los folículos se clasifican en:

Los *folículos primordiales* consisten de un ovocito primario rodeado por una capa de células planas y la membrana basal, los cuales se transforman en *folículos primarios* cuando las células de la granulosa pasan de ser planas a cúbicas y las células del estroma, las que se ubican por fuera de la membrana basal se diferencian en las células de la teca. A medida que el folículo primario continúa su crecimiento, las células de la granulosa se dividen por mitosis hasta formar el *folículo secundario*, que consta de dos a seis capas de estas células y una sola de células tecales. Durante la formación del *folículo terciario*, las células de la granulosa secretan un fluido, llamado líquido folicular, que se acumula entre ellas; el espacio ocupado por este fluido se denomina antro o cavidad antral. El líquido folicular contiene esteroides y hormonas proteicas, anticoagulantes, enzimas y electrolitos en concentraciones semejantes a las del suero sanguíneo (Humhrey y Janice, 1999). Los *folículos terciarios* tienen más de cuatro capas de células de la granulosa y la teca se diferencia en tecas interna y externa. En los folículos terciarios, los ovocitos están suspendidos en el líquido folicular por un tabique de células de la granulosa, el *cumulus oophorus*, el cual está unido al ovocito por un anillo de células de la granulosa, la corona radiada. A este tipo de folículos se les denominan *folículos maduros* o *pre-ovulatorios* o de Graff en el caso de la mujer (Ver figura 1) (Humhrey y Janice, 1999).

Compartimiento luteal. Una vez que se produce la ovulación (con la liberación del ovocito II), la sangre proveniente de los vasos sanguíneos de la pared folicular infiltra a los folículos colapsados y resulta en la formación del cuerpo hemorrágico. Las células luteinizadas de la granulosa y de la teca se multiplican, invaden la cavidad antral y forman el cuerpo lúteo (del latín “cuerpo amarillo”). Los vasos sanguíneos de la teca crecen y penetran en la masa de células luteales. Si no ocurre el embarazo, el cuerpo lúteo degenera

y el tejido conectivo reemplaza las células luteales y en la mujer se forma el cuerpo *albicans* (del latín “cuerpo blanco”) (Figura 1) (Humhrey y Janice, 1998).

En el cuerpo lúteo se observan dos tipos de células, unas pequeñas y oscuras llamadas teco-luteínicas y otras grandes y claras llamadas granuloso-luteínicas (no todas las células de la granulosa se convierten en células granuloso-luteínicas). Esta población celular contiene todos los elementos estructurales de las células secretoras de esteroides: gotitas de lípidos, numerosas mitocondrias con crestas tubulares, abundante retículo endoplásmico liso y aparato de Golgi, es menos desarrollado en las células teco-luteínicas que en las granuloso-luteínicas. Estos cambios estructurales son similares en muchas especies de mamíferos (Gordon y Ferry, 1994; Harrison y Barbara, 1997; Zeleznik, 1999).

Además de la transformación de las células foliculares, se observa un cambio en los vasos sanguíneos del ovario. Las células de la granulosa son avasculares porque la red capilar que llega a los folículos maduros finaliza en la membrana basal. Después de la ovulación los vasos sanguíneos nacen de la capa de la teca y penetran entre las células granuloso luteínicas, de tal forma que durante la formación del cuerpo lúteo y al término de la luteinización hay una extensa red capilar que hace del cuerpo lúteo uno de los tejidos más vascularizados del cuerpo (Harrison y Barbara, 1997; Juengel y col. 1999; Zeleznik, 1999).

La función principal del cuerpo lúteo es la secreción de progesterona (Dominguez y col., 1991). Sin embargo, en los primates también es una fuente de estradiol, hecho que no ha sido observado en otras especies. Además, en la mujer, la cerda y la rata, el cuerpo lúteo produce relaxina; y en otras especies también se ha observado la producción de oxitocina, prostaglandinas y diversas hormonas peptídicas. El cuerpo lúteo secreta sustancias angiogénicas, por ejemplo una familia de factores de crecimiento celular endoteliales ligados a la heparina llamados factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de permeabilidad vascular (VPF) (Gordon y Ferry, 1994; Zeleznik, 1999).

Compartimiento intersticial. En los mamíferos, las células intersticiales son largas y poliédricas, los organelos celulares son similares en muchos aspectos al de otras células secretoras de esteroides. Se encuentran en bloques, rodeadas por una banda de tejido conectivo y con residuos hialinos centrales, están llenas de gotitas que contienen fosfolípidos, triglicéridos y colesterol. La proporción de estos lípidos y de los ésteres de colesterol varían dependiendo de la especie y de célula a célula, las cuales a su vez varían dependiendo de la especie y del estado del ciclo reproductivo. La actividad de la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa también varía de célula a célula (Benoit, 1932; Gordon y Ferry, 1994; Harrison y Barbara, 1997).

Las células teco-intersticiales de los folículos atrésicos con antro pasan a formar parte de la glándula intersticial. En cambio, las que rodean a los folículos preantrales, en las que no se ha producido la diferenciación celular y que entran en atresia, no forman parte de esta glándula ya que carecen de receptores a la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés) (Domínguez y col., 1991). Lo mismo sucede con las células tecaes de los folículos preovulatorios que entran en atresia, las que tampoco forman parte de la glándula intersticial. Las células teco-intersticiales tienen receptores a LH, prolactina, hormona adrenocorticotrópica, noradrenalina, hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés) y estrógenos (Domínguez y col., 1991).

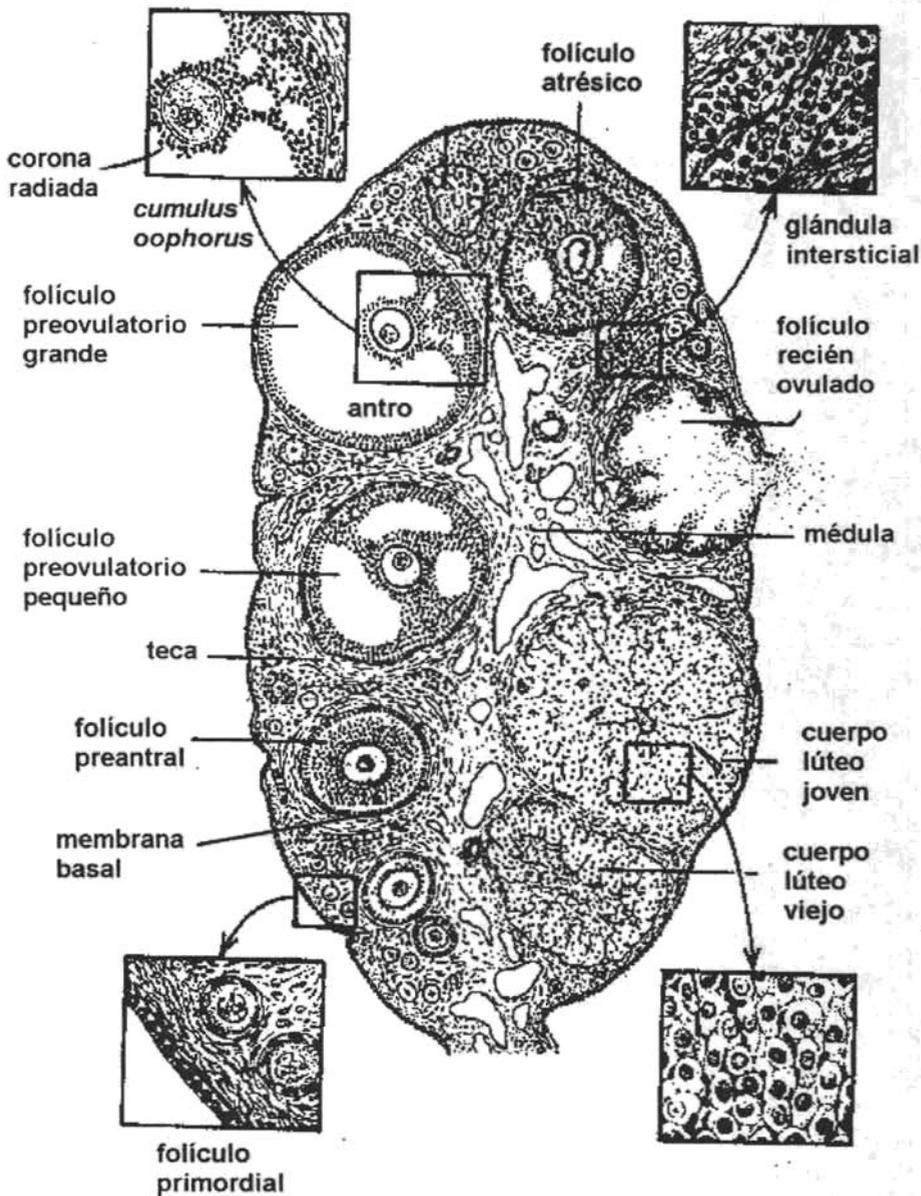


Figura 1. Modelo del ovario de mona, en el que se muestran sus compartimentos y se observan los folículos en diferentes etapas de desarrollo: folículos primordiales, folículos preantrales y folículos antrales. Estos últimos se dividen en pequeños y grandes, dependiendo del tamaño de su cavidad antral. Las células de la teca son secretoras de testosterona y progesterona, mientras que las células de la granulosa son productoras de estradiol. La glándula intersticial y el cuerpo lúteo producen de progesterona (Tomado de Gore-Langton y Armstrong, 1994).

Inervación ovárica

Las funciones reproductivas en la hembra están bajo control hormonal y nervioso. El ovario es una de las glándulas endocrinas inervada por neuronas del sistema nervioso periférico (Disen y Ojeda, 1999). Las fibras de las neuronas simpáticas y sensoriales llegan al tejido intersticial, a los vasos sanguíneos y a los folículos en desarrollo de tal forma que participan en la regulación del flujo sanguíneo, la estereidogénesis y el desarrollo folicular (Aguado, 2002; Disen y Ojeda, 1999; Burden, 1978; Sorger y col., 1983). Además, en el mesenterio ovárico y el oviducto hay terminales nerviosas simpáticas que acompañan a las ramas principales de los vasos sanguíneos (Sorger y col., 1983).

Inervación extrínseca de los ovarios. En los mamíferos, la inervación ovárica está compuesta principalmente por fibras sensoriales y muy poca participación de fibras parasimpáticas. Existen dos vías simpáticas que inervan al ovario, el plexo ovárico (PO) y el nervio ovárico superior (NOS) (Disen y Ojeda, 1999). La inervación simpática está constituida por neuronas catecolaminérgicas que contienen noradrenalina; peptidérgicas, que sintetizan el neuropéptido Y (NPY, por sus siglas en inglés); y fibras sensoriales que liberan sustancia P (SP), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP, por sus siglas en inglés), el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP, por sus siglas en inglés) (Disen y Ojeda, 1999).

Inervación intrínseca de los ovarios. Está constituida por neuronas que contienen catecolaminas cuyas prolongaciones llegan a los vasos sanguíneos e inervan al estroma ovárico, el tejido intersticial y a la teca folicular, pero no llegan a las células de la granulosa ni al cuerpo lúteo. La distribución de la inervación, pero no la densidad de las fibras catecolaminérgicas, es similar entre las especies. La glándula intersticial recibe numerosas fibras adrenérgicas. La presencia de músculo liso y nervios adrenérgicos en la teca externa es interpretado como una prueba de la regulación de que estos últimos participan en las contracciones musculares durante el proceso de la ovulación (Mayerhofer y col., 2003). En el ovario del *Macaco rhesus* el número de neuronas catecolaminérgicas intrínsecas

disminuye marcadamente al final de la vida reproductiva. En el ovario de la rata Wistar, específicamente en el hilio y en la médula, se han encontrado grupos de neuronas en un número constante desde el desarrollo postnatal hasta a la edad adulta. Por el contrario, las neuronas aparecen en la corteza ovárica únicamente durante la segunda semana de vida. Para este hecho se han propuesto dos explicaciones: 1) que las neuronas alcanzan la corteza después de que migran desde el hilio y la médula y 2) que estas neuronas deriven de los normoblastos (células madre) que salen de la corteza y alcancen la diferenciación terminal después de la primera semana de vida (Anesetti y col., 2001).

En mamíferos como la vaca, borrega, gata y cobaya, el estroma cortical de los folículos, en diferentes estados de desarrollo, está ricamente inervado por nervios adrenérgicos, y también se han encontrado terminales nerviosas en la teca externa y en los vasos sanguíneos. Mientras que la mujer, cerda, perra y gata tienen una inervación intermedia, y en los ovarios de la coneja, ratona y el criceto el aporte es más escaso. La inervación colinérgica está menos desarrollada en estas especies, pero la distribución es semejante (Sporrong y col., 1985; Springer y Deutsh, 1985). Además de la inervación simpática, los ovarios de la mona Rhesus, la mujer y la rata poseen una fuente adicional intraovárica de catecolaminas (Mayerhorfer y Fritz, 2002).

Nervios del ovario

Los nervios ováricos se originan del ganglio celíaco, el ganglio mesentérico y el nervio esplénico lumbar, los cuales nacen en el ganglio localizado a lo largo de la aorta cerca del inicio de la arteria renal. La porción simpática de la inervación ovárica se origina desde los segmentos torácicos once hasta el lumbar cuatro de la cadena simpática de los ganglios y hacen sinapsis en los ganglios celíaco y mesentérico.

En los mamíferos existen tres vías principales que inervan al ovario.

1) Nervio del Plexo Ovárico (NPO). Corre a lo largo de la arteria ovárica. En la rata es una extensión de los plexos aórtico y renal. Los cuerpos celulares de las fibras simpáticas pre-ganglionares ováricas están localizados en los segmentos de la médula espinal T-10 y T-11. Las fibras sensoriales acompañan a las fibras simpáticas y entran al cordón espinal a la altura del segmento vertebral T-10. Inervan a los oviductos, al ligamento ancho y a los ovarios; en el ligamento ancho se comunica con fibras del plexo uterino y de esta forma inerva al útero. Mediante este nervio llegan fibras que contienen NPY, muchas de las cuales contienen NA e inervan los vasos sanguíneos del ovario (Lawrence y col., 1980; Payer, 1978).

2) Nervio Ovárico Superior (NOS). Está asociado con el ligamento suspensorio, inerva al ovario, oviducto y caudalmente la musculatura del útero (Lawrence y col., 1980; Payer, 1978). Es una rama del plexo celíaco 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 para-vertebral. Por este nervio llegan fibras que contienen VIP que inervan al tejido intersticial, los folículos (donde estimulan la secreción de estrógenos y andrógenos) y a los vasos sanguíneos (Morán y col., 2000; Nance y col., 1988).

Se ha sugerido que por medio de NOS llega información adrenérgica al ovario y que ésta contribuye, junto con las gonadotropinas, en el mantenimiento de la secreción de esteroides ováricos en el día del proestro (Aguado y Ojeda, 1984).

3) El Nervio Vago. Es un haz nervioso de tipo colinérgico, en el cual viajan también fibras vipérgicas y otras que contienen SP. en roedores como la rata y el ratón, la vagotomía, produce cambios en el ciclo estral (Burden, 1978), y en un animal hemicastrado el crecimiento (Trkulja y Lackovic, 2001) y la ovulación compensadora del ovario in situ (Chávez y col., 1987).

Es posible que los nervios ováricos participen en la regulación del proceso de selección de folículos maduros, dado que al desnervar uno de los ovarios de la ratona inmadura, el ovario desnervado no madura, mientras que el contralateral presenta cuerpos lúteos y folículos maduros. En ratonas prepúberes también se ha observado que desnervar ambos ovarios provoca retraso en la apertura vaginal, y ausencia del ciclo estral normal (Disen y Ojeda, 1999).

Mediante la utilización de técnicas de infección neuronal por el virus de la rabia se han estudiado las diferentes áreas del sistema nervioso central involucradas en la señal nerviosa que transcurre por el nervio vago y que regulan las funciones ováricas. Las zonas en las que se detectó la inmunotinción al virus son: área postrema, núcleo del tracto solitario, complejo vagal dorsal, núcleo ambiguo, grupo de células A7, núcleo de Barringtons, *locus coeruleus*, área gris periacueductal e hipotálamo dorsal (Gerendai y col., 2000).

Inervación colinérgica

Hay pocas evidencias de la participación de la acetilcolina (ACh) en la regulación de las funciones ováricas. Estudios *in vitro* muestran que los receptores a ACh de células de la granulosa (CG) son funcionales (Batra y col., 1993; Arellano y col., 1999; Luck, 1990; Mayerhofer y col., 1992). Luck (1990) mostró que la estimulación colinérgica a CG de bovinos resulta en el aumento de la producción de esteroides. En otro estudio realizado con CG humanas se encontró que la ACh tiene un efecto modulador estimulante sobre la producción de esteroides estimulada por gonadotropinas (Kornya y col., 2001). Por el contrario, Morley y col. (1992) no encontraron incremento en la producción de P₄ por CG, hecho que concuerda con un estudio *in vivo* realizado en la cabra por Cooke y Payne (1988). De acuerdo a los estudios realizados Casper y Cotterell (1984) y Kasson y Hsueh (1985), las drogas colinérgicas tienen acciones inhibitorias sobre la esteroidogénesis de las

CG en presencia de estradiol o de la hormona estimulante del folículo (FSH, por sus siglas en inglés).

En teoría, la fuente principal de la ACh en los ovarios serían los nervios ováricos parasimpáticos los cuales llegan a los vasos sanguíneos, las células intersticiales, las células de la teca y posiblemente el cuerpo lúteo. Sin embargo, las células de la granulosa, que son las células blanco de la ACh, no hacen contacto con las fibras nerviosas, dado que estas últimas no cruzan la lámina basal que separa a las células de la teca y la granulosa. (Cooke y Cotterell, 1988). Esto hace pensar que la ACh llegaría por difusión a las células de la granulosa. Sin embargo, hay que considerar que este neurotransmisor es una molécula lábil de vida corta, la cual es degradada rápidamente por la butirilcolinesterasa contenida en el suero y probablemente en el fluido intersticial y folicular del ovario, por lo que sería poco probable que la ACh liberada por los nervios llegara a las CG y activara a los receptores colinérgicos (Mayerhorfer y col., 1999).

Estudios de tinción histoquímica realizados por Burden y Lawrence (1978) revelaron que las fibras de nervios simpáticos del ovario poseen actividad ACh-esterasa, la enzima responsable de la degradación de la ACh en el sistema nervioso. Los resultados fueron tomados como indicador de la presencia del neurotransmisor en las fibras nerviosas simpáticas. Estos autores sugirieron que algunas fibras del nervio vago pueden llevar fibras simpáticas al ovario, un modelo de inervación colinérgica del ovario similar al de los nervios catecolaminérgicos.

Se ha sugerido que en los tejidos no neurales, como el tejido embrionario mesenquimal, la ACh tiene un papel estimulante en la proliferación celular y en la morfogénesis (Gutkind y col., 1991; Lauder y col., 1999; Mount y col., 1994). En el ovario del adulto ocurren eventos de remodelación de tejido, los cuales incluyen proliferación y diferenciación celular, asociados con el crecimiento folicular, la atresia, la ovulación y la formación y regresión del CL. En el tejido embrionario no existen neuronas como fuente de ACh. Por lo tanto, las células no neurales serían la única fuente posible de ACh. En el

adulto existen varios tejidos que permanecen libres de innervación pero que poseen receptores funcionales a ACh. Algunos de estos tejidos incluyen células inmunes, células epiteliales y endoteliales. Algunas células de la placenta son capaces de producir ACh (Kawashima y Fujii, 2000; Wessler y col., 1999).

Mediante estudios de inmunohistoquímica se mostró que en las CG de los folículos en crecimiento de roedores y primates está presente la enzima colino acetil transferasa (CAT), no así en los folículos pequeños y con señales morfológicas de apoptosis. En el ovario, estas células son una fuente no neural de acetilcolina (Fritz y col., 1999; Fritz y col., 2001). Utilizando la técnica de HPLC se mostró que las CG luteinizadas de folículos preovulatorios de pacientes con fertilización *in vitro* y las CG de rata puede producir ACh. Además, las CG expresan el gen de la enzima carnitina transferasa (CRAT, por sus siglas en inglés), la cual también es capaz de catalizar la síntesis de ACh, lo que indica una vía alternativa en la biosíntesis del neurotransmisor (Fritz y col., 2001). Estos resultados indican que dado que la innervación colinérgica no fue detectada en el ovario de la rata, la mona y la mujer, por lo tanto la ACh es producida por células endocrinas del ovario.

Según Fritz (1999 y 2001) las CG de humano y otros primates poseen receptores muscarínicos (MR) de los tipos M1, M3 y M5. Utilizando la técnica de RT-PCR e inmunohistoquímica se mostró que los receptores M3 están presentes en el ovocito, mientras que los genes de los receptores M1 y M5 se expresan en las CG. Estos hechos llevaron a sugerir que la ACh producida por las CG foliculares y luteinizadas pueden actuar de manera autócrina y parácrina sobre el ovocito, las CG luteales o ambas. Los sitios de producción y acción están cercanos, por lo tanto, la ACh ejerce su acción inmediatamente después de liberarse y antes de ser degradada por las esterasas del fluido folicular (Mayerhorfer y col., 2003).

Se ha sugerido que la activación de los receptores M1 y M5 resulta en la proliferación de las CG, dado que *in vivo*, las CG inmunoreactivas a CAT coexpresan el

marcador de proliferación PCNA (antígeno nuclear de células proliferativas, por sus siglas en inglés) (Fritz y col., 2001; Mayerhorfer y Fritz, 2002; Mayerhofer y col., 2003).

Esteroidogénesis

La estereoidogénesis es el proceso por el cual el colesterol es convertido en hormonas esteroideas por glándulas como las adrenales, las gónadas y la placenta. En los vertebrados hay sitios como el cerebro, el tejido adiposo, la piel, el hueso y numerosos tejidos fetales en donde también se sintetizan estas hormonas (Hinshelwood, 1999). La síntesis de las hormonas esteroideas depende de las enzimas presentes en el tejido, así como también del sustrato disponible (Conley y Bird, 1997).

Los esteroideas son moléculas lipídicas que forman parte de un grupo de sustancias químicas que incluyen a muchas hormonas y vitaminas. Las hormonas esteroideas son agrupadas en cinco clases: progestágenos, andrógenos, estrógenos, mineralocorticoides y glucocorticoides (Voet y Voet, 1995). Según su estructura química, las hormonas secretadas por las gónadas incluyen a las tres primeras clases. El colesterol, precursor de estas hormonas, está formado por el núcleo esteroide o núcleo ciclopentano perhidrofenantreno, con grupos metilo unidos entre los anillos A y B y entre C y D, y una cadena lateral unida al carbono 17. La ruptura de la cadena entre los carbonos 20 y 22 da lugar a los esteroideas de 21 carbonos (serie del pregnano). La ruptura de la cadena de los carbonos 17 y 20 produce esteroideas de 19 carbonos (serie del androstano). Finalmente, la pérdida del grupo metilo en el carbono 10, origina esteroideas de 18 carbonos y la aromatización del anillo A (grupo del estrano) como se observa en la figura 2 (Gore-Langton y Armstrong, 1994).

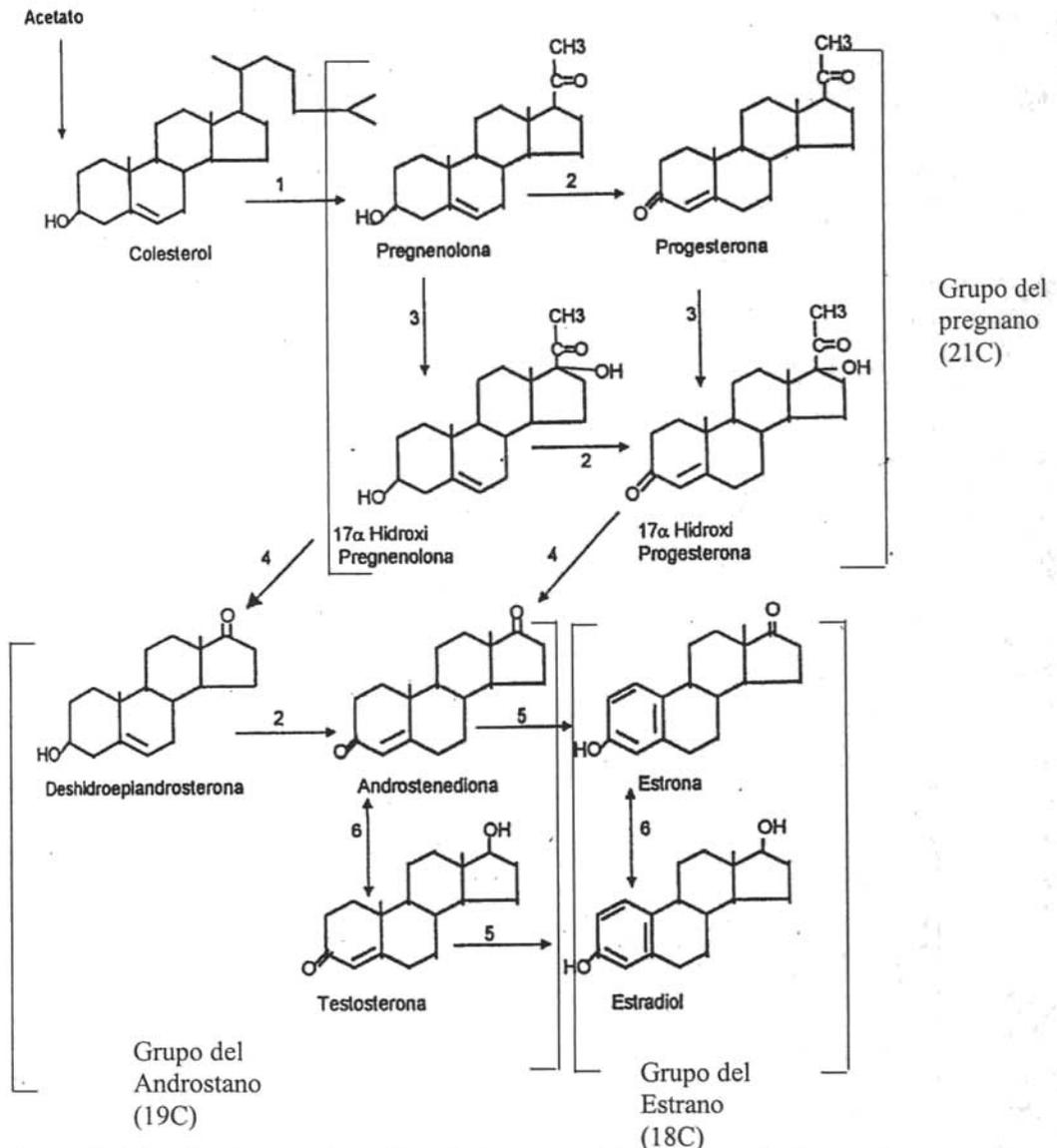


Figura 2. Esteroidogénesis ovárica. El colesterol es metabolizado y reducido en el número de carbonos dando lugar a tres principales categorías de hormonas esteroideas: las progestinas (serie del pregnano), entre las que la progesterona es la principal de este grupo y es secretada por la glándula intestinal y el cuerpo lúteo; los andrógenos (serie del androstano), del cual la más importante es la testosterona producida por las células de la teca. Y finalmente los estrógenos (serie del estrano), el estradiol es el más importante de éstos, producidos por las células de la granulosa. Las enzimas que participan en la esteroidogénesis son: 1(20,22 desmolasa); (P450scc), 2 (3β-HSD); 3 (P45017α); 4 (17,20-esteroide liasa (desmolasa)); 5 (P450arom); 6(17β-HSD), (Tomado y modificado de Gore-Langton y Armstrong, 1998; Douglas, 1999; Hinshelwood, 1999).

El colesterol llega a las células esteroideogénicas de tres fuentes: 1) síntesis *de novo* a partir de acetyl-CoA; 2) fuentes exógenas, mediadas por receptores de lipoproteínas de baja (LDL, por sus siglas en inglés) y de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés); y 3) hidrólisis de los ésteres de colesterol, los cuales se almacenan en las gotitas de lípidos (Stocco, 1999). La concentración de colesterol intracelular es regulada y balanceada por dos mecanismos. Primero, por la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa, la cual es el paso limitante en la biosíntesis del colesterol y el colesterol que es tomado de LDL y la HDL, cuyo suministro es controlado por la concentración de sus receptores. Además de estos mecanismos, el exceso de colesterol en la célula es esterificado y almacenado en gotitas de lípidos (reserva de colesterol libre). La hidrólisis del éster de colesterol a colesterol es catalizada por la enzima colesterol-estearasa, que puede ser activada por la LH (Hinshelwood, 1999).

La biosíntesis de esteroides es llevada a cabo por la acción de dos principales familias de enzimas. Las primeras son las hidroxilasas, codificadas por genes de la súper familia del citocromo P450. Las enzimas P450 se encuentran en la mitocondria y utilizan a la ferredoxina reductasa (una flavoproteína) y la ferredoxina (una proteína hierro/sulfuro) como donadores de electrones. La primera recibe los electrones de NADPH y luego los trasfiere a la ferredoxina, la cual a su vez los pasa a la P450. Y la segunda familia, la esteroide dehidrogenasa que incluye a dos grupos diferentes: la familia de cadena corta (alcohol dehidrogenasa reductasa) y la aldoceto reductasa. Estas enzimas, junto con la P450 son necesarias para la biosíntesis de esteroides, tanto en la adrenal como en las gónadas y la placenta (Hinshelwood, 1999; Walter, 2002).

Hormonas ováricas

Además de la liberación de los ovocitos, el folículo ovárico secreta diversas hormonas, entre ellas los esteroides:

- **Progestágenos.** La pregnenolona es el precursor de todas las hormonas esteroides (ver figura 2). Por su función de mantener el embrión durante la gestación, la progesterona (4-pregnen-3,20-diona; P₄) es la hormona más importante de este grupo; su nombre deriva del latín *pro* a favor y *gestare* llevar (Hinshenwood, 1999). En la mujer, esta hormona es sintetizada principalmente en el retículo endoplásmico liso de las células del cuerpo lúteo (Hsueh y cols., 1984; Hutchison y cols., 1986). Su síntesis es regulada por la LH, FSH y prostaglandinas (Graham y Clarke, 1997; Burris, 1999). En el humano se ha mostrado que la síntesis de la P₄ también se lleva a cabo en la corteza suprarrenal, la placenta (Pomata y cols., 2000) y el testículo. Este último sintetiza la P₄ como intermediario de la formación de otras hormonas esteroides (Weisz y Ward 1980). La P₄ circula en sangre unida a la albúmina y a transcortina; los metabolitos resultantes de la biotransformación hepática son eliminados por la orina y en una menor cantidad por las heces (Serrano y Serrano, 2003). La vida media plasmática de la progesterona natural es de 5 minutos (Remington's, 1975). Otra progestina es la 17 α -OH-progesterona, precursor de los andrógenos aromatizables.
- **Andrógenos.** Son la dihidroepiandrosterona y la androsterona, que a su vez son transformados en testosterona (ver figura 3). Dichos cambios o transformaciones se llevan a cabo en la teca de los folículos. La androstenediona y la testosterona son precursores de los esteroides estrogénicos estrona y 17 β -estradiol, respectivamente (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Stocco, 1999). En los mamíferos, el principal andrógeno es la testosterona. En el macho es secretada por las células de Leydig de manera pulsátil por estímulo de la LH y por AMPc (Douglas, 1999). También es secretada por los ovarios y suprarrenales de las hembras en cantidades variables. En muchos tejidos blanco en donde actúan los andrógenos, la testosterona se reduce en

la posición 5 α y forma la dihidrotestosterona (DHT), el andrógeno natural más potente. También puede aromatizarse y producir estradiol en diversos tejidos no glandulares, como ocurre en algunas áreas del SNC, lo que explica la mayor parte de la síntesis de estrógenos en los machos y en las mujeres postmenopáusicas (Simpson, 2000). Esta hormona circula en la sangre unida a la proteína transportadora de andrógenos. (Serrano y Serrano, 2003). La vida media de la testosterona en el plasma es menor a dos horas (Remington's, 1975).

- **Estrógenos.** Los estrógenos más importantes son la estrona y el 17 β -estradiol (E₂), con actividades biológicas idénticas pero diferente potencia. El E₂ es aproximadamente diez veces más potente que la estrona (Gore-Langton y Armstrong, 1994). En la mujer, además de estas dos hormonas también se sintetizan el α -estradiol y estriol, sintetizados sólo por la placenta (ver figura 4) (Shao-Yao y Zhong Zhang, 1999). El nombre de estrógenos se debe al papel que tiene para inducir la receptividad sexual (estro) en los mamíferos hembra, aun cuando éstos tienen otros papeles en la fisiología reproductiva. En el ovario, los estrógenos son sintetizados por las células de la granulosa (Humhrey y Janice, 1999; Smith, 1999; Uphose y Maswood, 1999).

Mediante la 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa el E₂ se oxida de manera reversible hasta formar estrona; estos dos estrógenos pueden revertirse y formar estriol. Dichas transformaciones ocurren principalmente en el hígado (Shoham y Schacher, 1996). La vida media en plasma del estradiol es de una hora, debido a que es rápidamente metabolizado por el hígado (Remington's, 1975). En la sangre se une hasta en un 80 % a las β -globulinas fijadoras de hormonas sexuales (SHBG, por sus siglas en inglés) y a la albúmina. Aproximadamente el 65 % de la hormona se excreta por la orina, el 10 % en las heces y del resto se desconoce su destino (Serrano y col., 2003).

Las células de la granulosa y las células luteales secretan otras hormonas de tipos peptídico y proteico:

- *Inhibina y activina.* La principal fuente de estas hormonas es el folículo maduro y el cuerpo lúteo. La función de la inhibina es inhibir la secreción de la FSH en la hipófisis, mientras que la función de la activina estimula la secreción de la FSH en la hipófisis, se produce en las células de la granulosa (Humher, Janice, 1998; Sha-Yao, Zhong, 1998).
- *Relaxina.* Esta hormona es producida en el cuerpo lúteo, su función es relajar el cervix y la vagina para el paso del feto durante el parto y promover el crecimiento de las mamas. También actúa en tejidos no reproductivos tales como la piel y el tracto gastrointestinal (Humher y Janice, 1998; Sha-Yao y Zhong, 1998).
- *Factores de crecimiento.* El ovario produce factores de crecimiento mediante los cuales coordina las actividades de sus diferentes compartimentos. Algunos de estos factores de crecimiento son: el factor semejante a la insulina, factor de crecimiento epidermal y factor transformante del crecimiento (Humher y Janice, 1998; Sha-Yao y Zhong, 1998).

Función de las hormonas esteroides sexuales

Estas hormonas cumplen importantes funciones en la regulación de la reproducción. Al ser transportadas en la circulación actúan en una gran variedad de tejidos blanco, como el Sistema Nervioso Central (SNC), músculo esquelético, sistema cardiovascular, sistema inmune, hígado, tejido adiposo y la piel (Gore-Langton, y Armstrong, 1994).

Las hormonas esteroides al actuar sobre la hipófisis y el hipotálamo regulan la liberación de LH, FSH y GnRH. Los esteroides sexuales tienen actividades termoreguladoras y participan en cambios conductuales y del humor (Genazzani y col., 1997).

En el SNC de los mamíferos las hormonas sexuales participan en la regulación de la diferenciación neural, organización sexual del cerebro, reproducción, conducta sexual y excitabilidad neuronal (Alonso y López Coviella, 1998; Keefe, 2002). En los roedores, la inyección de altas concentraciones de estradiol (E_2) o testosterona durante los primeros cinco días de la vida producen cambios en la fisiología reproductiva durante la etapa adulta. En la rata hembra, la administración de estas hormonas en la etapa postnatal provoca desfeminización o androgenización, síndromes que se caracterizan por defectos en la fisiología reproductiva normal de estos animales en la etapa adulta, como son: estro vaginal permanente, desarrollo anormal de los genitales externos, falta de ovulación y formación del cuerpo lúteo, alteración permanente de la secreción de gonadotropinas, supresión de la conducta sexual femenina y esterilidad (Arnold y Gorski, 1984; Marut y Hodgen, 1982).

En el SNC los estrógenos regulan la expresión de varios genes, entre ellos los que codifican para su propio receptor (receptor a estrógenos) y el receptor a progesterona (RP), enzimas de síntesis de neurotransmisores y neuropéptidos, así como para otros factores de transcripción como en el caso del proto-oncogen c-fos (McEwen, 1983).

Rutas biosintéticas $\Delta 4$ y $\Delta 5$ de las hormonas esteroideas ováricas

La esteroidogénesis se lleva a cabo mediante reacciones secuenciales y dependientes, las cuales pueden seguir dos vías o rutas metabólicas relacionadas entre sí, por lo que su regulación puede ocurrir en diferentes pasos. Una característica de algunas de las enzimas que participan en la síntesis de esteroideos es su capacidad para actuar en más de un sustrato; de aquí que la $P450_{c17}$, puede actuar sobre la pregnenolona (P_5) y la progesterona (P_4). La 3β HSD puede actuar sobre P_5 y dehidroepiandrosterona (DHEA, por sus siglas en inglés). Puesto que $P450_{c17}$ puede llevar a cabo ambas reacciones, la hidroxilasa (OHLasa) y la liasa (liasa), da lugar a las vías alternativas conocidas como vías $\Delta 4$ y $\Delta 5$ (figura 4). Así, la $P450_{scc}$ actúa sobre el colesterol rompiendo la cadena lateral y da lugar a la

formación de P_5 . En la vía $\Delta 4$ (la llevan a cabo la mujer, otros primates, vaca y borrega) la 3β HSD actúa sobre la P_5 dando lugar a la producción de P_4 , sobre la cual actúa la enzima $P450_{C17(OH)lisa}$ y se produce la $17OH-P_4$ a partir de la cual se forma la androstenediona (A_4) por acción de la enzima $P450_{C17\Delta 4-lisa}$, por acción de la $P450_{arom}$ se produce la estrona (E_1) y por último se produce el 17β -estradiol (E_2) por acción de la 17β -HSD. La vía $\Delta 5$ (la llevan a cabo las ratas, ratón y cerda), se inicia con la participación de la $P450_{C17(OH)lisa}$ en la producción de $17OH-P_5$, sobre la que actúa $P450_{C17\Delta 5-lisa}$ y forma la dehidroepiandrosterona (DHEA) a partir de la cual se produce la androstenediona por acción de la 3β HSD. Seguida de esta reacción y con la participación de la 17β -HSD se produce la testosterona que finalmente por la acción de la $P450_{arom}$ se produce el E_2 (ver figura 4) (Conley y Bird, 1997; Hinshelwood, 1999).

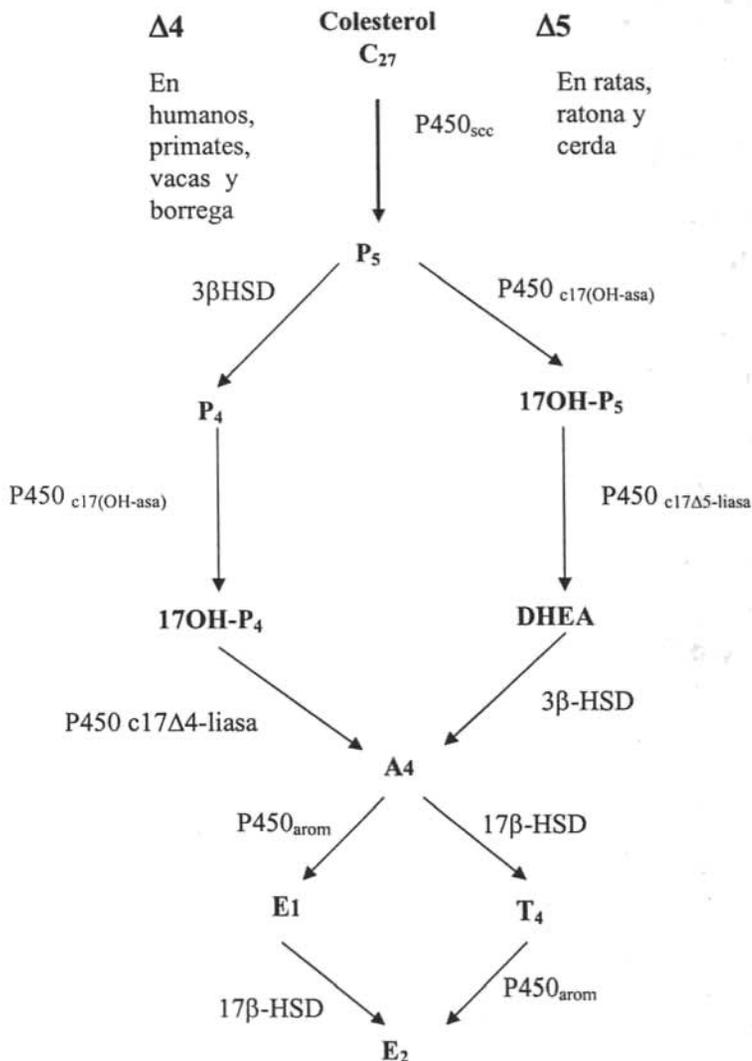


Figura 4. Esquema que muestra las vías $\Delta 4$ y $\Delta 5$ de la síntesis de esteroides gonadales. La pregnenolona (P_5) es el precursor de la progesterona (P_4), andrógenos y estrógenos. La P_5 es el sustrato de las enzimas $P450_{c17(OH-asa)}$ y la $3\beta HSD$, las que compiten por su sustrato. La vía $\Delta 4$ la llevan a cabo los humanos, otros primates, la vaca y la borrega, mientras que la vía $\Delta 5$ la llevan a cabo la rata, cerda y ratona (tomado de Conley y Bird, 1997).

Factores que regulan la esteroidogénesis

Aun cuando el ovario de rata produce estrógenos en pequeñas cantidades durante el desarrollo embrionario, la actividad aromática ocurre después del nacimiento y está temporalmente asociada al desarrollo folicular. El péptido intestinal vasoactivo (VIP), un neurotransmisor que se encuentra en el NOS y que tiene la capacidad de promover la esteroidogénesis en las gónadas, puede inducir la actividad aromatasa en las células de la granulosa antes de la foliculogénesis y la expresión de receptores a la FSH (Disen y Ojeda, 1987). El VIP no se sintetiza en el ovario, es de origen externo. Las fibras VIPérgicas están distribuidas alrededor de los vasos sanguíneos, más frecuentemente en las venas, y en el tejido intersticial del ovario; alrededor de folículos preantrales y antrales, cerca de la teca del folículo. Esta asociación del VIP con el tejido esteroidogénico lleva a sugerir que podría estar involucrado en la regulación de la síntesis de esteroides, dado que estimula la secreción de estradiol, progesterona y andrógenos (Ahmed y col., 1986; Davoren y Hsueh, 1985).

Se ha sugerido que el área hipotalámica lateral (LHA), el núcleo arcuato periventricular (ARC) y el núcleo hipotalámico ventromedial (VMH) podrían estar involucrados en la regulación de la esteroidogénesis ovárica sin necesidad de la participación de la hipófisis y la adrenal. En ratas hipofisectomizadas y adrenalectomizadas el estímulo eléctrico en LHA disminuye la transformación de esteroides de 19 carbonos a estrógenos y a 20α -OH pregn-4-en-3-ona (20α -OH-P). En cambio, la estimulación de ARC y VMH incrementa la transferencia de esteroides de 19C a estrógenos (Saito y col., 1990). Por otro lado, en un estudio realizado en ratas la estimulación eléctrica del NOS en el día del diestro, reduce la concentración plasmática de progesterona. La administración de fentanolamina (un antagonista de los receptores alfa adrenérgicos) previa a la estimulación eléctrica invierte este efecto, es decir aumenta la concentración de P_4 , lo que llevó a sugerir que la esteroidogénesis puede ser incrementada por de la estimulación de receptores beta o inhibida si se estimulan los receptores alfa adrenérgicos (Weis y col., 1982).

Las células esteroideogénicas no almacenan cantidades significativas de hormonas, por lo que la secreción está directamente relacionada a la síntesis de esteroides. La síntesis es regulada de manera aguda y crónica; la primera se da como una respuesta rápida al estrés, y lo que se regula es la concentración de colesterol dentro de la mitocondria. La respuesta rápida es facilitada por la proteína reguladora de la esteroideogénesis aguda (StAR, por sus siglas en inglés). La estimulación crónica que va de horas a semanas, está mediada por el aumento de la transcripción de los genes que codifican enzimas esteroideogénicas. Así, el paso agudo es regulado por la disponibilidad del sustrato a las enzimas esteroideogénicas y el paso crónico es regulado por la cantidad de enzimas (Walter, 2002). La StAR es una proteína sintetizada en los ribosomas e importada a la matriz mitocondrial, donde se mantiene en reposo. Su actividad se lleva a cabo en la membrana externa de la mitocondria (Bose y col., 2002).

En el ratón macho esta proteína, junto con las hormonas tiroideas, regulan la biosíntesis de las hormonas esteroides (Manna y cols., 2001). Estudios recientes han mostrado que la StAR incrementa la conversión del colesterol a pregnenolona, facilitando la entrada de colesterol al compartimento interno de la mitocondria (Douglas, 1999), donde se encuentra el complejo esteroideogénico citocromo P450_{scc} (Ver figura 5). Mediante estudios de inmunohistoquímica, Western blot y RT-PCR se observó que en el ovario de rata inmadura esta proteína se expresa en respuesta a las inyecciones secuenciales de PMSG (gonadotropina de la yegua preñada) y hCG (gonadotropina coriónica humana) (Ronen-Fuhrmann y cols., 1998).

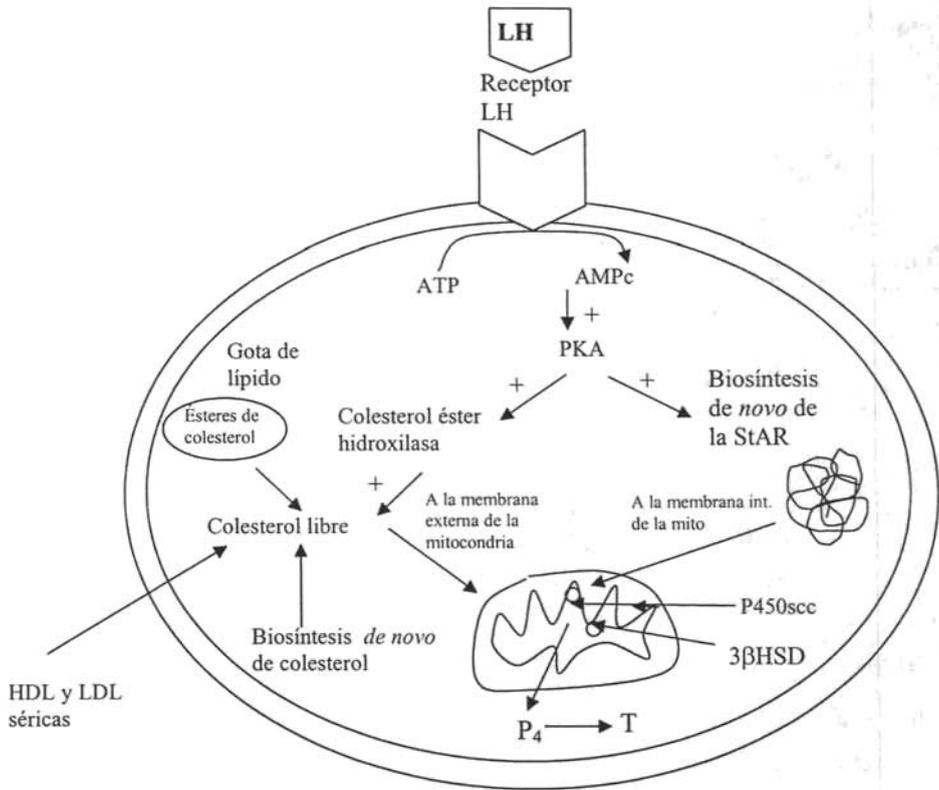


Figura 5. Factores que participan en la regulación de la síntesis de testosterona (T). Las fuentes de colesterol: las lipoproteínas de alta (HDL) y baja (LDL) densidad, biosíntesis de *novo* y ésteres de colesterol de las gotas de lípidos. La unión de la LH a su receptor incrementa el AMPc, el cual activa la enzima colesterol éster hidroxilasa y formar el colesterol libre. El AMPc también activa la sistesis de novo de la StAR la que a su vez regula la trasferencia de colesterol de la membrana externa a la interna de la mitocondria. La enzima P450scc convierte el colesterol a pregnenolona y a partir de esta se forma la progesterona P₄ y por último a testosterona (Tomado de Stocco, 1999).

Mecanismo de acción de StAR. El mecanismo de acción de StAR es incierto. En un principio se sugirió que la StAR entra a la mitocondria poniendo en contacto físico a la membrana mitocondrial externa con la interna, lo que permitiría el flujo de colesterol desde un gradiente de alta concentración a una de baja (Stocco, 1999). Sin embargo, la eliminación de 62 residuos de aminoácidos terminales resulta en una proteína que no puede

entrar a la mitocondria pero retiene toda la actividad biológica (Arakane y col., 1996). Mediante estudios biofísicos se ha mostrado que la StAR tiene una estructura terciaria, la cual sufre un desdoblamiento cuando interactúa con la membrana (Bose y col., 1999; Christensen y col., 2001). El análisis cristalográfico de proteínas relacionadas como la MLN64 (Tsujiyama y Hurley, 2000) y StAR D4 (Romanowski y col., 2002) ha mostrado que StAR tiene una hendidura hidrofóbica que puede acomodar a una sola molécula de colesterol. (Bose y col., 2002; Ronen-Fuhrmann y col., 1998).

Asimetrías funcionales del ovario

La primera evidencia que llevó a considerar la existencia de una asimetría funcional del cerebro fue dada por Paul Broca en 1861, al informar que las afasias cerebrales eran provocadas por malformaciones o lesiones en el cerebro izquierdo. Un siglo después se mostró (Geschwind y Levitsky, 1968) que la región temporal de la corteza del hemisferio izquierdo (área de Wernicke) es más grande que la del derecho. Estas observaciones llevaron a plantear el concepto de lateralización que señala que una respuesta es lateralizada cuando se produce por un estímulo que puede provenir de un centro localizado en el mismo lado del cuerpo (ipsilateral) o del lado opuesto (contralateral).

Es bien conocido que en las aves sólo el ovario izquierdo es funcional, ya que la gónada derecha se reduce a una capa de tejido localizado por debajo de la vena cava. La ovariectomía provoca que la gónada derecha se diferencie en una glándula semejante a un testículo (en el cual se pueden observar espermatozoides) (Benoit, 1932), en un ovario o en un “ovo-testis” (Benoit, 1923). En los murciélagos, la ovulación ocurre predominantemente en la gónada derecha, el ovario contralateral tiene la capacidad de funcionar sólo si se extirpa el ovario dominante (Blejer y Ehteshami 1981). En la mujer, la sangre venosa del ovario derecho llega a la vena inferior, mientras que la vena del ovario izquierdo entra en la vena renal izquierda (Gerendai y Halaz, 1997). Hay un

mayor número de fibras y troncos neurales alrededor del plexo de la arteria ovárica izquierda que del lado derecho (Malisheskaia y Brindak, 1980). El ovario derecho se desarrolla más temprano que el izquierdo (Harrison y Barbara, 1997; Humhrey y Janice, 1999; Mittwoch, y Mahadevarah, 1980).

En humanos hermafroditas es más frecuente encontrar el testículo en el lado derecho, el cual tiene más peso, contenido de proteínas y de DNA, que el ovario que se localiza en el lado izquierdo. En estos individuos la distribución del tejido testicular y del tejido ovárico genera la diferenciación asimétrica del tejido circundante. De tal forma que con mayor frecuencia se diferencia un ovario del lado izquierdo y un ovo-testis en el lado derecho. (Mittwoch y Mahadevarah, 1980; Mittwoch, 1975). Se ha observado que en ciertos días del ciclo menstrual las concentraciones de progesterona y estradiol de las venas ováricas presentan asimetría (Chikazawa y col., 1986). En los monos *Rhesus* y *Sinomolus* las concentraciones de estas hormonas también se comportan de manera asimétrica en la fase lútea del ciclo menstrual (Marut y Hodgen, 1982). La incidencia de endometriocis cística ovárica es mayor en un ovario izquierdo, mientras que el rbdomiosarcoma es más frecuente en el ovario derecho (Vercillini y cols., 1998).

En un paciente con el síndrome de insensibilidad incompleta a andrógenos se encontraron diferencias entre ambas gónadas respecto a la cantidad y liberación de esteroides hacia la vena pampiniforme. Esto se puede interpretar como que las diferencias entre las gónadas se deben a la producción autónoma de esteroides. También se describe que el testículo derecho produce más hormonas que el izquierdo (Bengt y cols., 1985). En los ratones hermafroditas también muestran asimetría de la diferenciación gonadal, pero en dirección opuesta a lo que ocurre en el humano: ovarios del lado derecho y testículos del lado izquierdo (Mittwoch, 2000).

En la rata, el ovario izquierdo libera más ovocitos que el derecho (Domínguez y cols., 1989). Cuando se extirpa el ovario izquierdo la proporción de los animales que ovalan en el día del estro es el doble que cuando queda el ovario izquierdo (Chávez y col.,

1987). Además, el ovario derecho es más independiente de la influencia vagal para la activación folicular que el ovario izquierdo (Burden y col., 1986). En ratas a las que se les ha extirpado el ovario derecho, la sección del nervio vago izquierdo incrementa la proporción de animales ovulantes, la OHC (Hipertrofia compensadora del ovario) y el número de ovocitos liberados; la sección del nervio vago en ratas con extirpación del ovario izquierdo disminuye los parámetros anteriores (Chávez y col., 1987). La sección unilateral del nervio ovárico superior disminuye el número de ovocitos liberados por el ovario que se localiza del mismo lado que se seccionó el nervio, sin modificar el porcentaje de ovulación del ovario opuesto (Morales y col., 1993).

JUSTIFICACIÓN

Con base a la información analizada previamente parece claro que en la rata hay diferencias funcionales entre los ovarios derecho e izquierdo. Sin embargo, no se tiene conocimiento de la existencia de disimilitudes en las secreciones de progesterona, testosterona y estradiol. Aún cuando se ha reconocido que el ovario de diversas especies recibe inervación colinérgica, lo que ha permitido sugerir que ésta inervación estaría involucrada en la modulación del proceso de la ovulación, no se tiene una idea clara de su participación en la regulación de la producción de hormonas esteroides ováricas.

Con el fin de conocer si existen diferencias en la secreción de progesterona, testosterona y estradiol por cada ovario, se estudiaron los efectos de la falta de uno de ellos una o 24 horas después de la ovariectomía unilateral. Además se analizó la participación del sistema colinérgico en la modulación de la secreción de estas hormonas, para lo cual se utilizaron ratas inyectadas con sulfato de atropina, por vía subcutánea, previa a la ovariectomía unilateral.

HIPÓTESIS

Dado que existe asimetría en el número de ovocitos liberados por cada ovario, entonces las secreciones de progesterona, testosterona y estradiol por los ovarios derecho e izquierdo será diferente. Dicha asimetría es el resultado de diferencias en la información colinérgica que recibe cada gónada.

OBJETIVOS

1. General

Estudiar los efectos inmediatos (una hora) o a corto plazo (24 horas) de la ovariectomía unilateral sobre las secreciones de progesterona, testosterona y estradiol, así como la participación del sistema colinérgico en la regulación de dicha función.

2. Particulares

2.1. Estudiar los efectos de la ovariectomía unilateral sobre las secreciones de progesterona, testosterona y estradiol en el día del estro

2.2. Analizar los efectos del bloqueo del sistema colinérgico sobre las secreciones de progesterona, testosterona y estradiol en el animal con ovariectomía unilateral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembra adultas vírgenes (200 a 280 g) de la cepa CIIZ-V, mantenidas en condiciones controladas de iluminación, 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad (luces encendidas de 5:00 a 19:00 hr.), con libre acceso al agua y al alimento (Purina rat chow). Para llevar el control del ciclo estral de las ratas se tomaron frotis vaginales diarios y solo fueron utilizadas aquellas que presentaron al menos, dos ciclos consecutivos de cuatro días. A las 13 horas del día del estro, los animales fueron destinados en alguno de los siguientes grupos experimentales:

Experimento 1.

Testigo. Un grupo de ratas cíclicas sin tratamiento fueron sacrificadas a las 14:00 horas en el día del estro y otro a las 13:00 horas del diestro-1

Anestesia. Un grupo de ratas fue anestesiado con éter a las 13:00 horas del día del estro durante 7 minutos (tiempo aproximado en el que se realiza la cirugía (operación simulada, u ovariectomía unilateral) y sacrificado a las 14:00 horas en el día del estro y otro a las 13:00 horas del diestro-1.

Perforación del peritoneo (PP). A las 13:00 horas del día del estro un grupo de ratas fueron colocadas en una tabla de disección, anestesiadas con éter y sometidas a una incisión en el dorso, unilateral o bilateral realizada aproximadamente 2 cm. por debajo de la última costilla. La incisión se hizo atravesando la piel, el músculo y peritoneo, pero sin tocar el ovario; una vez terminado este procedimiento se cerró la piel con una grapa. (Estos grupos fueron los de operación simulada, pero dado que se observaron cambios en la concentración hormonal se decidió llamar perforación del peritoneo)

Ovariectomía unilateral (OVX-U). Se siguió el mismo procedimiento utilizado para la perforación del peritoneo, con la diferencia de que se sacó el ovario derecho (OVX-D) o el izquierdo (OVX-I) se ligó el pedículo y se cortó la gónada. Una vez terminado el procedimiento se cerró la piel con una grapa.

Ovariectomía bilateral (OVX-B). En N ratas se siguió el mismo procedimiento utilizado para la ovariectomía, con la diferencia de que se extirparon ambos ovarios. Una vez terminado el procedimiento se cerró la piel con una grapa.

Experimento 2.

Inyección de vehículo (Vh). A las 12:00 horas del día del estro se pesaron las ratas y se inyectó agua destilada y esterilizada por vía subcutánea a la dosis de 0.3 ml/Kg de peso.

Inyección de Sulfato de Atropina. Se preparó una solución de 3.75g de sulfato de atropina (Sigma Chem. Co. St. Louis Mo. USA) y se aforo a 10 ml con agua destilada y esterilizada. A las 12:00 horas del día del estro se pesaron los animales y se inyectaron con 300 mg/kg de peso por vía subcutánea. Se utilizó esta dosis, dado que en experimentos previos se observó que la ovulación se bloqueaba en todos los animales tratados (Domínguez y col., 1982).

Inyección de sulfato de atropina + cirugía. (ATR+PP, ATR+OVX-U o ATR+OVX). Se pesaron los animales y a las 12:00 horas del día del estro se inyectaron 300 mg/Kg de peso y a las 13:00 horas se les realizó la perforación del peritoneo, ovariectomía unilateral o bilateral.

Con el fin de analizar los efectos inmediatos o a corto plazo los animales tratados fueron sacrificados una o 24 horas después del tratamiento experimental.

Procedimiento de autopsia. Los animales fueron sacrificados por decapitación, se colectó la sangre del tronco, se mantuvo a temperatura ambiente por 30 minutos para que coagulara y posteriormente fue centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos. Una vez terminada la centrifugación se separó el suero del botón celular. Los sueros fueron almacenados a -20° C, hasta que las concentraciones de progesterona, testosterona, 17β -estradiol fueran medidas.

Cuantificación de hormonas esteroides en suero

Las cuantificaciones de progesterona, testosterona y estradiol se realizaron por radio inmuno análisis de fase sólida, para lo cual se utilizó un estuche (Coat-A-Count, USA) que consiste de tubos de polipropileno impregnados con anticuerpos de coneja, viales de hormona marcada (^{125}I Progesterona, ^{125}I Testosterona y ^{125}I Estradiol) y siete calibradores para la realización de la curva patrón (Progesterona: 0.1, 0.5, 2, 10, 20 y 40 *ng/ml*; Testosterona: 0.2, 1.0, 200, 500, 1000, 2000, 4000, 8000, 16000 *pg/ml*; Estradiol: 5, 10, 20, 50, 75, 150, 250 *pg/ml*). A cada tubo se le adicionaron 100 μl de suero problema, más 1000 μl de la hormona marcada, todos los tubos se agitaron y se incubaron a temperatura ambiente durante tres horas. Posteriormente se decantó el sobrenadante de cada tubo, se secaron las paredes del mismo y se colocaron en un contador de centelleo gama para su análisis. La concentración de la progesterona se expresó en *ng/ml* y las de testosterona y estradiol en *pg/ml* de suero. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron 6.9% y 10.8 % para estradiol, 5.3% y 9.87 % para progesterona y 5.6% y 8.7 % para testosterona respectivamente.

Análisis estadístico

Los resultados de las concentraciones de progesterona, testosterona y estradiol en suero se analizaron por la prueba de análisis de varianza múltiple (ANDEVA), seguida de la prueba de Tukey. Para comparar los resultados de dos grupos se utilizó la prueba "t" de Student. En todos los casos se consideraron significativas aquellas diferencias en las cuales la probabilidad fue menor o igual al 5%.

RESULTADOS

Experimento 1. EFECTOS DE LA OVARIECTOMÍA UNILATERAL SOBRE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE PROGESTERONA, TESTOSTERONA Y ESTRADIOL

1.1. PROGESTERONA (P₄)

1.1.1. Efecto inmediato (1 hora) de la ovariectomía unilateral

Con respecto al grupo testigo, la anestesia no provocó cambios significativos en la concentración plasmática de P₄. En comparación con el grupo de animales anestesiados la perforación del peritoneo del lado izquierdo no modificó la concentración de P₄, pero la perforación del lado derecho resultó en aumento de la concentración de la hormona (Tabla 1).

Cuando se compararon los resultados de la OVX-U con el grupo de perforación peritoneal observamos que sólo la OVX-I resultó en la disminución la concentración de P₄ (Gráfica 1, panel A).

1.1.2. Efecto a corto plazo (24 horas) de la ovariectomía unilateral

Ni la anestesia con éter, ni la perforación unilateral del peritoneo provocaron cambios significativos en la concentración de P₄ respecto al grupo de animales testigo (Tabla 1).

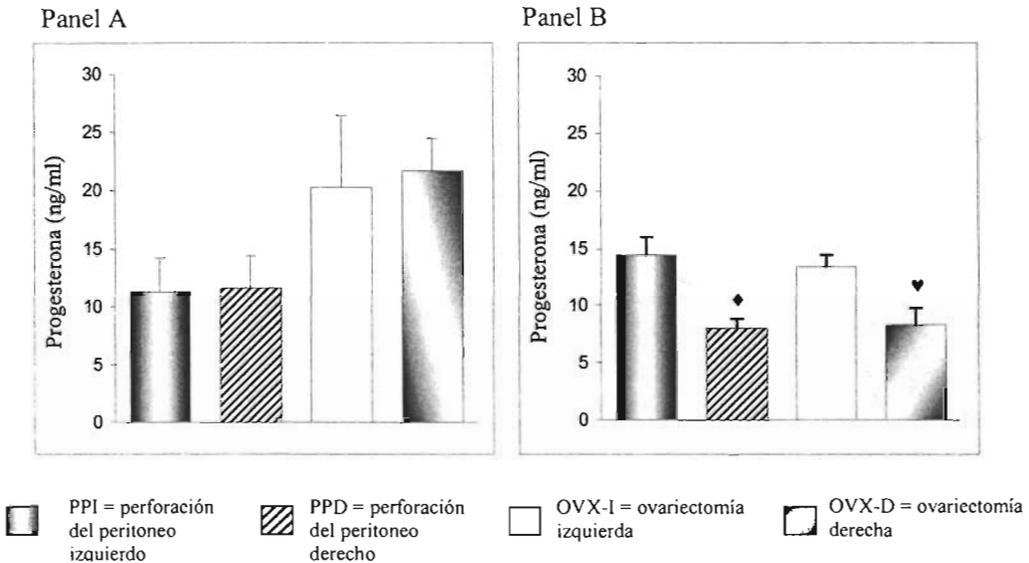
En comparación con el grupo de perforación unilateral del peritoneo, la extirpación de un ovario disminuyó la concentración de la hormona (Gráfica 1, panel B).

Tabla 1. Efectos inmediato (una hora) y a corto plazo (24 horas) sobre la concentración (media \pm e.e.m) de progesterona (ng/ml), de la anestesia y de la perforación del peritoneo del lado izquierdo (PPI) o derecho (PPD)

Grupo	N	Una hora	n	24 horas
Testigo	8	10.5 \pm 2.4	9	17.0 \pm 1.1
Anestesia	6	7.6 \pm 1.6	6	15.5 \pm 1.5
PPI	8	11.3 \pm 2.9	10	14.4 \pm 1.6
PPD	8	20.3 \pm 6.1 \heartsuit	8	13.4 \pm 1.0

\heartsuit p < 0.05 vs. Anestesia (ANDEVA, seguida de la prueba de Tukey)

Gráfica 1. Efectos inmediato (Panel A) y a corto plazo (Panel B) sobre la concentración (media \pm e.e.m) plasmática de progesterona (ng/ml), de la ovariectomía izquierda (OVX-I) o derecha (OVX-D)



\diamond p < 0.05 vs. PPI; \heartsuit p < 0.05 vs. PPD (ANDEVA, seguida de la prueba de Tukey)

1.1.3. Efectos inmediato y a corto plazo de la ovariectomía bilateral

La perforación del peritoneo de ambos lados no modificó la concentración de P₄ respecto a los animales anestesiados. Una hora después de la OVX-B la concentración de P₄ aumentó en comparación con el grupo de animales con perforación bilateral del peritoneo. Veinticuatro horas después de la OVX-B disminuyó la concentración de la hormona (Tabla 2).

Tabla 2. Efectos inmediato (una hora) y a corto plazo (24 horas) sobre la concentración (media \pm e.e.m) de progesterona (ng/ml), de la anestesia, perforación bilateral del peritoneo (PPB) o de la ovariectomía bilateral (OVX-B)

Grupo	n	Una hora	n	24 horas
Anestesia	6	7.6 \pm 1.6	6	15.5 \pm 1.5
PPB	8	14.7 \pm 1.9	9	13.4 \pm 0.5
OVX-B	9	29.6 \pm 3.4 \heartsuit \clubsuit	11	2.3 \pm 0.2 \heartsuit \clubsuit

\heartsuit p< 0.05 vs. Anestesia; \clubsuit p<0.05 vs. PPB (ANDEVA, seguida de la prueba de Tukey)

- Los resultados observados una hora después de los tratamientos quirúrgicos nos permiten sugerir que en el lado derecho del peritoneo transcurre una vía nerviosa que regula la secreción de la P₄ de manera estimulante.
- Este efecto nervioso es transitorio, dado que a las 24 horas estos resultados son diferentes.
- A las 24 horas de extirpar uno de los ovarios, el ovario *in situ* secreta aproximadamente la mitad de la concentración de P₄ circulante que en un animal normal.

1.2. TESTOSTERONA

1.2.1. Efecto inmediato (1 hora) de la ovariectomía unilateral

La anestesia no modificó la concentración de testosterona respecto al grupo testigo, efecto que tampoco fue modificado por perforación del peritoneo del lado izquierdo; pero la perforación del peritoneo del lado derecho provocó aumento en la concentración de la hormona (Tabla 3).

En comparación con el grupo de animales con perforación del peritoneo, la OVX-I aumentó la concentración de testosterona; mientras que la OVX-D no la modificó (Gráfica 2, panel A).

1.2.2. Efecto a corto plazo (24 horas) de la ovariectomía unilateral

Veinticuatro horas después de la anestesia, la concentración de testosterona aumentó respecto al grupo de animales testigo, efecto que no fue modificado por la perforación unilateral del peritoneo (Tabla 3).

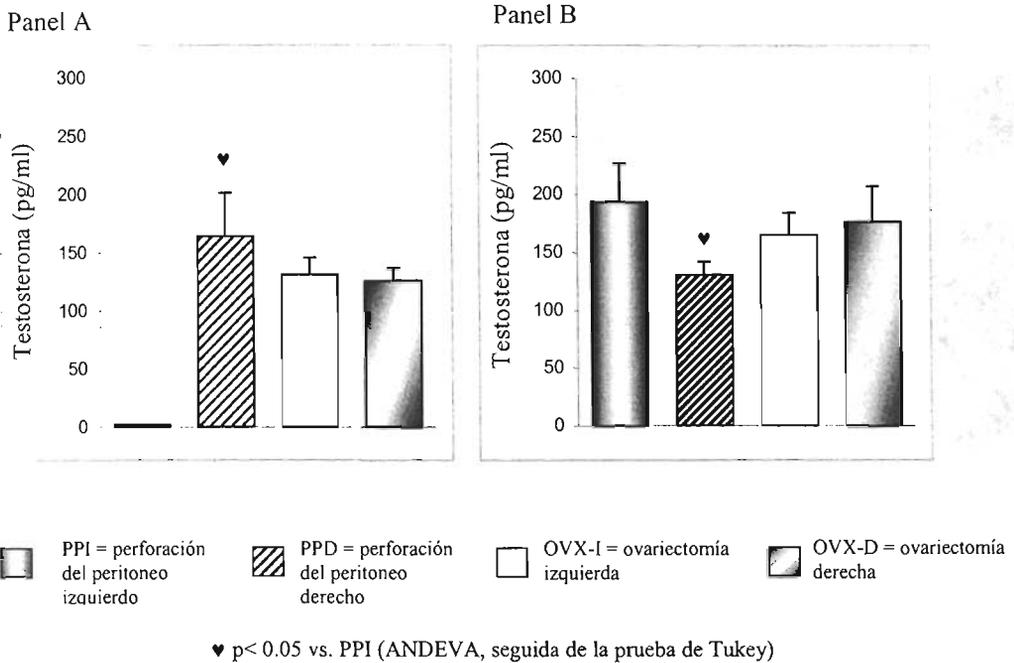
En comparación con el grupo de animales con perforación del peritoneo, la OVX-I disminuyó la concentración de testosterona; mientras que la OVX-D no provocó cambios (Gráfica 2, panel B).

Tabla 3. Efectos inmediato (una hora) y a corto plazo (24 horas) de la anestesia o de la perforación izquierda (PPI) o derecha (PPD) del peritoneo, sobre la concentración (media \pm e.e.m) de testosterona (pg/ml)

Grupo	n	Una hora	n	24 horas
Testigo	8	<2.0	9	20.9 \pm 5.0
Éter	6	<2.0	6	124.1 \pm 14.0♥
PPI	8	<2.0	10	193.3 \pm 32.8
PPD	8	131.6 \pm 14.6 ♥	8	164.8 \pm 19.3

♥ p< 0.05 vs. Testigo (ANDEVA, seguida de la prueba de Tukey)

Gráfica 2. Efectos inmediato (Panel A) y a corto plazo (Panel B) de la ovariectomía izquierda (OVX-I) o derecha (OVX-D), sobre la concentración (media \pm e.e.m.) plasmática de testosterona (pg/ml)



1.2.3. Efectos inmediato y a corto plazo de la ovariectomía bilateral

Una hora después de la perforación de ambos lados del peritoneo no se observaron cambios en la concentración de testosterona. En cambio, la OVX-B aumentó la concentración de la hormona respecto al grupo de ratas anestesiadas o con perforación del peritoneo. Veinticuatro horas después de la perforación del peritoneo la concentración de testosterona aumentó, efecto que no fue modificado por la extirpación de ambos ovarios (Tabla 4).

Tabla 4. Efectos inmediato (una hora) y a corto plazo (24 horas) de la anestesia, de la perforación bilateral del peritoneo (PPB) o de la ovariectomía bilateral (OVX-B), sobre la concentración (media \pm e.e.m) de testosterona (pg/ml)

Grupo	N	Una hora	n	24 horas
Anestesia	6	<2.0	6	124.1 \pm 14.0
PPB	8	<2.0	9	218.8 \pm 38.2♥
OVX-B	9	77.2 \pm 25.7♥♣	11	158.6 \pm 43.0

♥ p< 0.05 vs. Anestesia; ♣p<0.05 vs. PPB (ANDEVA, seguida de la prueba de Tukey)

- Estos resultados nos permiten sugerir que misma la vía nerviosa que transcurre por el lado derecho del peritoneo también regula la secreción de testosterona.
- El ovario izquierdo regula de manera inhibitoria la secreción de testosterona, dado que en los animales con OVX-I aumentó la concentración de la hormona.

1.3. ESTRADIOL

1.3.1. Efecto inmediato (1 hora) de la ovariectomía unilateral

La anestesia con éter no provocó cambios significativos en la concentración sérica de E₂. La perforación izquierda aumentó la concentración de la hormona, lo que no ocurrió en los animales con perforación del peritoneo del lado derecho (Tabla 5).

La extirpación de uno de los ovarios disminuyó la concentración de E₂, pero sólo fue estadísticamente significativa en los animales con OVX-I (Gráfica 3, panel A).

1.3.2. Efecto a corto plazo (24 horas) de la ovariectomía unilateral

En los animales anestesiados, la concentración sérica de E₂ fue semejante al grupo de ratas intactas (Tabla 5).

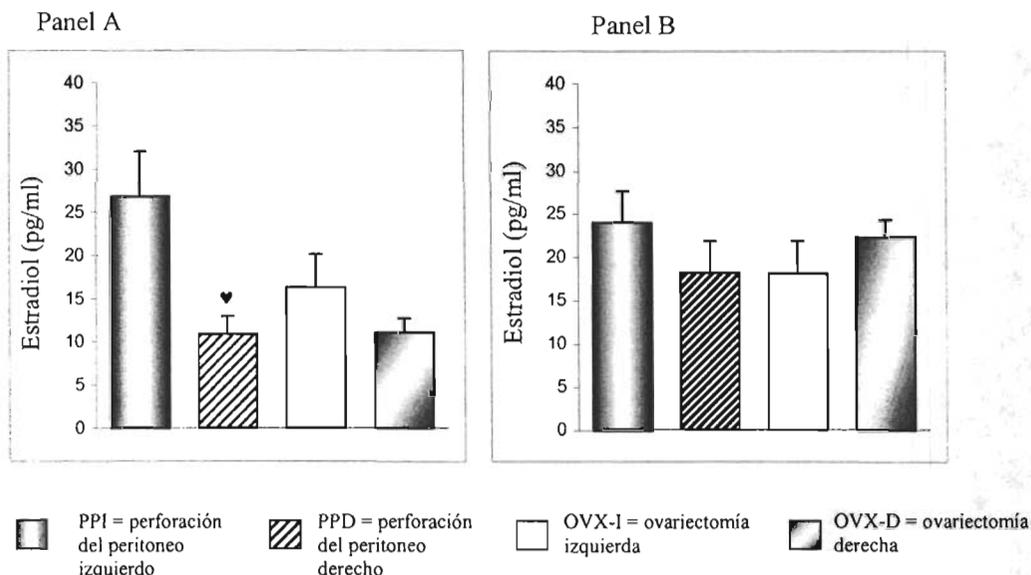
Ni la perforación del peritoneo del lado izquierdo o derecho (Tablas 5), ni sus respectivas OVX-U (Gráfica 3, panel B) provocaron diferencias significativas en la concentración de E₂.

Tabla 5. Efectos inmediato (una hora) y a corto plazo (24 horas) de la anestesia o de la perforación izquierda (PPI) o derecha (PPD) del peritoneo, sobre la concentración (media ± e.e.m) de estradiol (pg/ml)

Grupo	n	Una hora	n	24 horas
Testigo	8	16.0 ± 3.4	9	19.0 ± 1.3
Éter	6	10.9 ± 2.1	6	24.4 ± 2.6
PPI	8	26.8 ± 5.2 ♥	10	24.0 ± 3.6
PPD	8	16.3 ± 3.8	8	18.1 ± 3.7

♥ p<0.05 vs. Éter (ANDEVA, seguida de la prueba de Tukey)

Gráfica 3. Efectos inmediato (Panel A) y a corto plazo (Panel B) de la ovariectomía izquierda (OVX-I) o derecha (OVX-D), sobre la concentración (media ± e.e.m.) plasmática de estradiol (pg/ml)



♥ p<0.05 vs. PPI (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

1.3.3. Efectos inmediato y a corto plazo de la ovariectomía bilateral

Una hora después de la perforación bilateral del peritoneo aumentó la concentración de E₂ en el suero; este efecto fue bloqueado en los animales con ovariectomía bilateral. A las 24 horas ésta cirugía no provocó cambios significativos en la concentración de E₂ (Tabla 6)

Tabla 6. Efectos inmediato (una hora) y a corto plazo (24 horas) de la anestesia, de la perforación bilateral del peritoneo (PPB) o de la ovariectomía bilateral (OVX-B) sobre la concentración (media ± e.e.m) de estradiol (pg/ml)

Grupo	n	Una hora	n	24 horas
Anestesia	6	16.0±3.4	9	24.1 ± 2.6
PPB	8	28.8±4.0♥	9	18.4 ± 3.4♥
OVX-B	9	13.6 ± 1.5♣	11	23.7 ± 2.3

♥ p<0.05 vs. Anestesia; ♣p<0.05 vs. PPB (ANDEVA, seguida de la prueba de Tukey)

- Estos resultados nos llevan a sugerir que del lado izquierdo del peritoneo transcurre una vía nerviosa que regula la secreción de E₂.

Experimento 2.- ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO EN LA REGULACIÓN DE LAS SECRECIONES DE PROGESTERONA, TESTOSTERONA Y ESTRADIOL

2.1. PROGESTERONA (P₄)

2.1.1. Efecto inmediato (una hora) y a corto plazo (24 horas) de la inyección de sulfato de ATR

Una hora después de la inyección subcutánea del vehículo, no se observaron modificaciones significativas en la concentración de P₄ con respecto al grupo testigo. En cambio, 24 horas después aumentó la concentración de la hormona (Tabla 7).

La inyección subcutánea de sulfato de atropina aumentó la concentración de P₄ tanto a la hora como a las 24 horas (Tabla 7).

Tabla 7. Efectos inmediato (una hora) o a corto plazo (24 horas) de la inyección del vehículo (Vh) o del sulfato de atropina (ATR), sobre la concentración (media ± e.e.m) de progesterona (ng/ml)

Grupo	n	Una hora	n	24 horas
Testigo	8	10.5 ± 2.4	9	17.0 ± 1.3
Vh	8	6.6 ± 0.6	6	22.6 ± 1.7 ♥
ATR	8	29.1 ± 1.6 ♥ ♣	10	36.0 ± 1.8 ♥ ♣ ▲

♥ p<0.05 vs. Testigo, ♣ p<0.05 vs. Vh (ANDEVA, seguida de la prueba de Tukey)

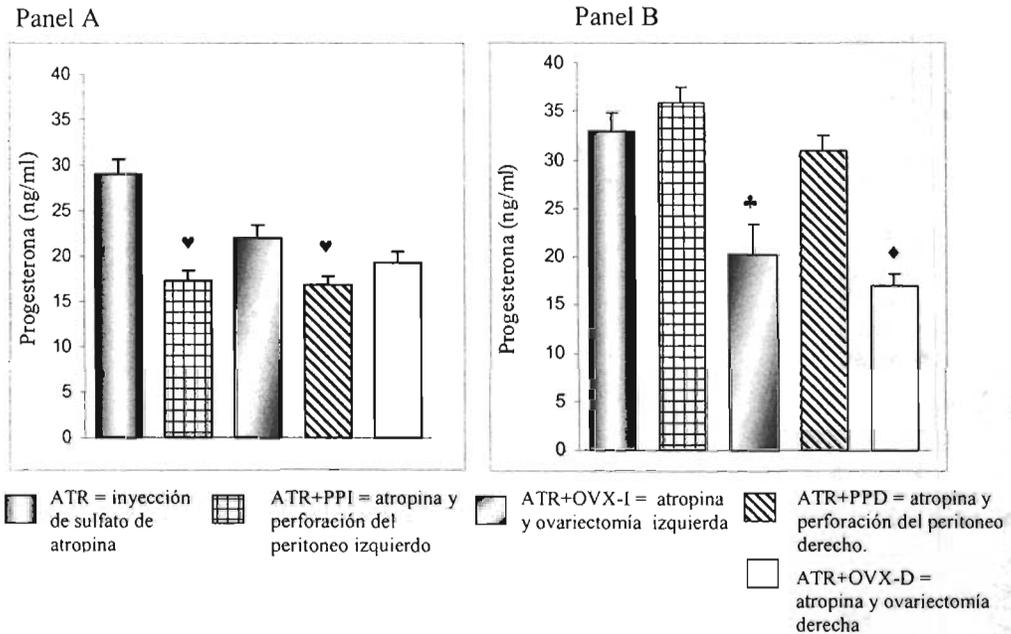
▲ p<0.05 vs. ATR a la hora (Prueba "t" de Student)

- Estos resultados muestran que la inyección de agua destilada es un factor estresante que estimula la secreción de P₄.
- El sistema colinérgico regula de manera inhibitoria la secreción de esta hormona, y su efecto aumenta conforme transcurre el tiempo desde su bloqueo.

2.1.2. Efectos inmediato y a corto plazo de la ovariectomía unilateral en ratas tratadas con ATR

En los animales con bloqueo del sistema colinérgico, la perforación unilateral del peritoneo disminuyó la concentración de P_4 una hora después de la cirugía (Gráfica 4, panel A), este efecto desaparece a las 24 horas (Gráfica 4, panel B). Veinticuatro horas después de la OVX-U disminuyó la concentración de la hormona (Gráfica 4, panel B).

Gráfica 4. Efectos inmediato (Panel A) y a corto plazo (Panel B) sobre la concentración (media \pm e.e.m.) plasmática de progesterona (ng/ml) de la perforación del peritoneo del lado izquierdo o derecho (ATR+PPI o ATR+PPD) o de la ovariectomía izquierda o derecha (ATR+OVX-I o ATR+OVX-D) en el animal con bloqueo del sistema colinérgico



♥ $p < 0.05$ vs. ATR, * $p < 0.05$ vs. ATR+PPI, ♦ $p < 0.05$ ATR+PPD (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

- Con base en los resultados sugerimos que el sistema colinérgico regula de manera inhibitoria la secreción de P_4 .

2.3.1. Efectos inmediato y a corto plazo de la ovariectomía bilateral en ratas tratadas con ATR

En animales inyectados con sulfato de atropina, el efecto inmediato de la perforación de ambos lados del peritoneo fue la disminución en la concentración de P₄, efecto que desaparece a las 24 horas.

Sólo a las 24 horas de la OVX-B se observó disminución en la concentración de la P₄ (Tabla 8).

Tabla 8. Efectos inmediato (una hora) y a corto plazo (24 horas) sobre la concentración (media ± e.e.m) de progesterona (ng/ml), de la perforación bilateral del peritoneo (ATR+PPB) o de la ovariectomía bilateral (ATR+OVX-B) en animales con bloqueo del sistema colinérgico

Grupo	n	Una hora	n	24 horas
ATR	8	29.1 ± 1.6	7	36.0 ± 1.6
ATR+PPB	6	13.0±1.2 ♣	6	21.7±3.7
ATR+OVX	7	13.9±1.7 ♦	5	6.2±1.2 ♦ ♣

♦p<0.05 vs. ATR, ♣p<0.05 vs. ATR + PPB (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

- Estos resultados nos permiten sugerir que la perforación bilateral del peritoneo bloquea el efecto estimulante del sulfato de atropina sobre la secreción de P₄; este efecto momentáneo disminuye a las 24 horas.

2.2. TESTOSTERONA

2.2.1. Efectos inmediato (a la hora) y a corto plazo (24 horas) de la inyección de sulfato de ATR

Una hora después de la inyección subcutánea del vehículo aumentó la concentración sérica de testosterona con respecto al grupo de animales testigo, efecto que desaparece a las 24 horas. Solamente a las 24 horas de inyectar el sulfato de atropina se observó aumento en la concentración de testosterona (Tabla 9).

Tabla 9. Efectos inmediato (una hora) y a corto plazo (24 horas) de la inyección del vehículo (Vh) o de sulfato de atropina (ATR) sobre la concentración (media \pm e.e.m) de testosterona (pg/ml)

Grupo	n	Una hora	n	24 horas
Testigo	8	<2.0	9	20.9 \pm 5.0
Vh	8	13.0 \pm 5.9♥	8	19.4 \pm 7.2
ATR	8	22.3 \pm 11.0	8	151.1 \pm 36.5 ♥♣

♥p<0.05 vs. Testigo, ♣<p0.05 vs. Vh (ANDEVA, seguida de la prueba de Tukey)

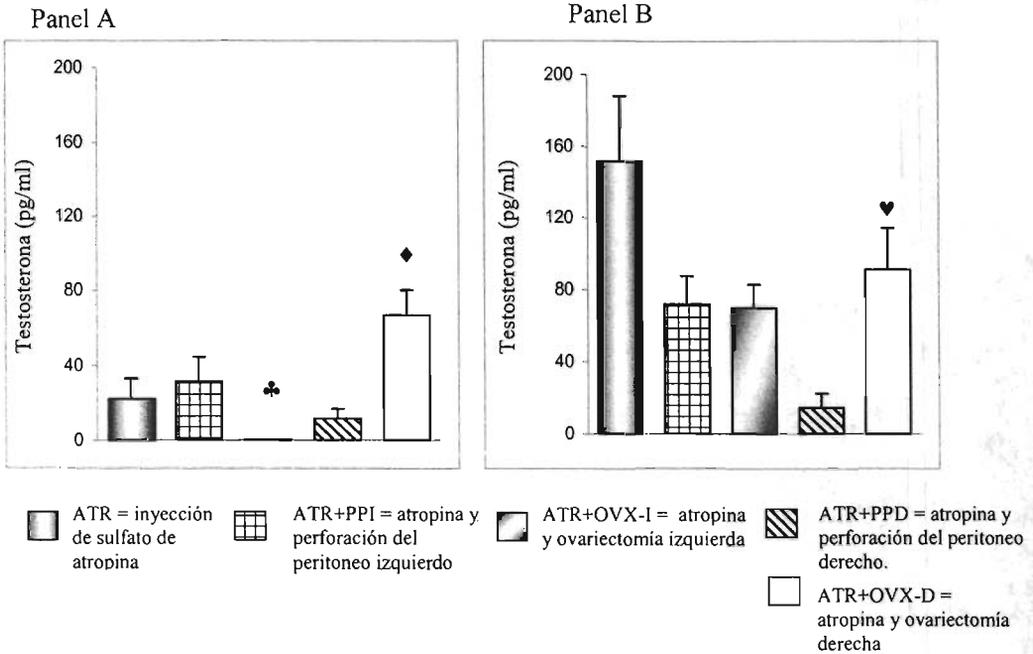
- Estos resultados nos permiten señalar que la inyección del vehículo tiene un efecto estimulante pero transitorio, sobre la secreción de testosterona.
- Los receptores muscarínicos regulan de manera inhibitoria la secreción de testosterona.

2.2.2. Efectos inmediato (una hora) y a corto plazo (24 horas) de la ovariectomía unilateral en ratas tratadas con ATR

En animales con bloqueo del sistema colinérgico, la perforación unilateral del peritoneo no modificó la concentración de testosterona una hora después de la cirugía. Por el contrario, los efectos de la OVX unilateral dependieron del ovario extirpado. La OVX-I disminuyó la concentración de testosterona. El efecto opuesto se observó al extirpar el ovario derecho (Gráfica 5, panel A).

En los animales con bloqueo colinérgico, la concentración de testosterona disminuyó a las 24 horas de perforar el peritoneo del lado derecho. La extirpación de uno u otro ovario no alteró la concentración de la hormona a este tiempo (Gráfica 5, panel B).

Gráfica 5. Efectos inmediato (Panel A) y a corto plazo (Panel B) sobre la concentración (media ± e.e.m) de testosterona (pg/ml) de la perforación del peritoneo del lado izquierdo (ATR+PPI) o derecho (ATR+PPD) o de la ovariectomía izquierda (ATR+OVX-I) o derecha (ATR+OVX-D) en ratas con bloqueo del sistema colinérgico



♥p<0.05 vs ATR, ♣p<0.05 vs ATR+PPI, ♦p<0.05 ATR+PPD (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

- Con base en estos resultados sugerimos que el sistema colinérgico regula de manera asimétrica la secreción de testosterona por cada ovario *in situ*: sobre el ovario izquierdo sería inhibitoria, mientras que sobre el derecho sería estimulante. Dado que 24 horas después de la ovariectomía izquierda (animal con ovario derecho *in situ*), la concentración de testosterona es semejante a la observada en ratas con PPI, sugerimos que este ovario es capaz de compensar la ausencia del izquierdo como resultado de la activación de otros mecanismos de regulación y no exclusivamente por el colinérgico, como sucede con el ovario izquierdo *in situ*

2.2.3. Efectos inmediato y a corto plazo de la ovariectomía bilateral en ratas tratadas con ATR

En comparación con el grupo de ratas atropinizadas, la perforación de ambos lados del peritoneo no provocó cambios significativos en la concentración de testosterona en ninguna de las horas evaluadas. Este efecto no lo modificó la extirpación de ambos ovarios (Tabla 9)

Tabla 9. Efectos inmediato (una hora) y a corto plazo (24 horas) sobre la concentración (media \pm e.e.m) de testosterona (pg/ml), de la perforación bilateral del peritoneo (ATR+PPB) o de la ovariectomía bilateral (ATR+OVX-B) en animales con bloqueo del sistema colinérgico

Grupo	n	Una hora	n	24 horas
ATR	8	22.3 \pm 11.0	7	151.4 \pm 36.0
ATR+PPB	6	173.9 \pm 41.7	6	240.6 \pm 30.8
ATR+OVX	7	280.2 \pm 104.2♦	5	365.5 \pm 86.6♦

♦p<0.05 vs. ATR (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

- Con base es estos resultados sugerimos que la perforación del peritoneo estimula la secreción de testosterona por medio de mecanismos de regulación que no involucran al sistema colinérgico.

2.3. ESTRADIOL

2.3.1. Efectos inmediato (a la hora) y a corto plazo (24 horas) de la inyección de sulfato de ATR

La inyección del vehículo provocó un aumento en la concentración plasmática de E₂, una y 24 horas después de su administración. El bloqueo del sistema colinérgico no modificó estos resultados (Tabla 10).

Tabla 10. Efectos inmediato (una hora) y a corto plazo (24 horas) sobre la concentración (media \pm e.e.m) de estradiol (pg/ml), de la inyección del vehículo (Vh) o de sulfato de atropina (ATR)

Grupo	n	Una hora	n	24 horas
Testigo	8	16.0 \pm 3.4	9	19.0 \pm 1.3
Vh	8	41.4 \pm 2.3♥	8	47.1 \pm 3.3♥
ATR	8	45.3 \pm 6.7	8	34.7 \pm 3.4 ♥

♥ p<0.05 vs. Testigo (ANDEVA, seguida de la prueba de Tukey)

- Estos resultados nos permiten sugerir que el estrés provocado por la inyección del vehículo estimula la secreción de E₂. Esta respuesta al estrés no involucra un componente colinérgico.

2.3.2. Efectos inmediato (una hora) y a corto plazo (24 horas) de la ovariectomía unilateral en ratas tratadas con ATR

La perforación del peritoneo en animales con bloqueo del sistema colinérgico no provocó cambios en la concentración plasmática de E₂, efecto que no fue modificado por la OVX-U en ninguna de las horas estudiadas (Gráfica 6).

Tabla 11. Efectos inmediato (una hora) y a corto plazo (24 horas) sobre la concentración (media \pm e.e.m) de estradiol (pg/ml), de la perforación bilateral del peritoneo (ATR+PPB) o de la ovariectomía bilateral (ATR+OVX-B) en animales con bloqueo del sistema colinérgico

Grupo	n	Una hora	n	24 horas
ATR	8	45.3 \pm 6.7	7	34.7 \pm 3.4
ATR+PPB	6	35.2 \pm 4.6	6	45.9 \pm 5.7
ATR+OVX	7	40.7 \pm 6.3	5	28.5 \pm 4.0

- Estos resultados apoyan la idea de que el sistema colinérgico no regula la secreción de E₂.

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio nos permiten sugerir que en el día del estro, los ovarios secretan de diferente manera P_4 , testosterona y E_2 . El sistema colinérgico regula de manera diferente la secreción de estas hormonas: sobre la P_4 es inhibitoria, mientras que sobre la testosterona depende del ovario *in situ*, esto es, sobre el izquierdo es inhibitoria, mientras que sobre el derecho es estimuladora. En cambio, la secreción de E_2 no es regulada por este sistema de neurotransmisión.

Efectos inmediatos.

Los efectos diferentes sobre la concentración sérica de hormonas esteroides observadas una hora después de la OVX-U dependerían de la información nerviosa que recibe cada ovario. Esta regulación nerviosa parece derivar, en parte, de la inervación que se localiza en cada lado del peritoneo. En la rata, la integración de la información nociva (información sensorial que detecta daño o alteración) proveniente del peritoneo involucra al núcleo del tracto solitario por intermedio de receptores a neurokinina-B (Chen y col., 1997).

Con base en nuestros resultados proponemos que, por el lado derecho del peritoneo transcurriría una vía nerviosa que regularía la secreción de P_4 y testosterona, mientras que del lado izquierdo correría otra que modularía la secreción de E_2 ; de tal forma que el sistema sensorial que inerva el peritoneo participaría de manera asimétrica en la regulación de la secreción de dichas hormonas.

La vía peritoneal derecha también podría estar regulando la secreción de P_4 y testosterona en las glándulas adrenales, ya que la extirpación del ovario derecho no alteró el aumento en la concentración de estas hormonas observado en los animales con perforación del peritoneo del mismo lado. Los efectos inmediatos de la perforación del peritoneo del lado derecho podrían ser explicados como respuesta a la estimulación en la secreción de ACTH. En cuyos machos, la ACTH no modifica la concentración plasmática de LH pero aumenta la de P_4 ; en cultivos de células adrenales la ACTH estimula la liberación de P_4 , androstenediona y cortisol (Fenske, 1997).

El efecto de la perforación del peritoneo del lado izquierdo sobre la secreción de E_2 podría ser explicado por medio de la liberación de adrenalina y noradrenalina desde la médula de las suprarrenales. En el ovario de rata estas hormonas estimulan la secreción de P_4 y andrógenos, los cuales finalmente podrían ser aromatizados a E_2 (Aguado, 2002).

Otra explicación sería que la perforación izquierda del peritoneo ejerciera un efecto estimulante sobre la secreción del ácido gamma amino butírico (GABA) en el ovario y, de esta forma aumentar la secreción de E_2 . Erdö y col. (1895) y Laszlo y col. (1989) mostraron que la inyección de GABA en la bursa del ovario de ratas pseudopreñadas, aumenta la concentración de E_2 .

Los ovarios estarían ejerciendo un vínculo funcional de tipo inhibitorio en la secreción de P_4 y testosterona sobre las adrenales, ya que la OVX-B aumentó la concentración de estas hormonas en suero. Es posible que este vínculo funcional ocurra por medio del ganglio celiaco. La mayoría de las neuronas que constituyen el nervio ovárico superior se localizan en éste ganglio (Sarper y col., 1976). El plexo celiaco recibe fibras del nervio esplácnico y del vago. Se ha sugerido que las fibras VIPérgicas contenidas en el nervio ovárico superior derivan del nervio esplácnico, del vago y del ganglio suprarrenal (Baljet y Drukker, 1980). Por medio de estudios *in vitro*, de células adrenales se ha mostrado que el E_2 y la testosterona estimulan o inhiben, respectivamente la conversión de 25-OH-colesterol a pregnelona, al actuar sobre la actividad de la enzima P_{450sc} (Nowak y col. 1995; Kau y col., 1999). Malendowicz (1976) mostró en la rata macho, que la orquidectomía provoca aumento del peso de las adrenales y que tanto la testosterona como el E_2 inhiben la actividad 5α -reductasa en la adrenal. Recientemente se ha mostrado que las glándulas adrenales de oveja tienen receptores a estrógenos del tipo α , los que aumentan después de la castración (Van Lier y col, 2003).

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, en el día del estro, la fuente de secreción de E_2 son los ovarios, ya que la OVX-B disminuyó drásticamente su concentración en suero. Este hecho nos lleva a sugerir que en el día del estro las glándulas adrenales no secretan E_2 .

Con base en los resultados obtenidos sugerimos que los cambios en la concentración de las hormonas esteroides observados en la primera hora reflejan mecanismos neuroendocrinos de reorganización que compensarán la falta de uno de los ovarios. Además nuestros resultados apoyan la idea propuesta por Klein y Burden (1988) acerca de la existencia de un mecanismo reflejo viscerovisceral como componente generalizado del sistema nervioso autónomo que serviría como modulador de la actividad de las células del ganglio simpático y en consecuencia, de la actividad funcional de órganos viscerales específicos.

A partir de los resultados obtenidos en ratas OVX-U sugerimos que el ovario izquierdo regula de manera inhibitoria la secreción de testosterona, ya que en los animales con OVX-I aumentó la concentración de testosterona con respecto al animal con perforación del lado izquierdo del peritoneo. Esta función inhibitoria se estaría ejerciendo sobre el ovario derecho, sobre las adrenales o ambos. No contamos con una explicación anatómica ni fisiológica a este hecho. Posiblemente sea mediante el mecanismo reflejo entre las dos vísceras propuesto por Klein y Burden (1988). Previamente se ha planteado la existencia de una comunicación neural entre los dos ovarios por medio de las fibras que se originan en el ganglio celiaco del lado izquierdo y derecho y que da origen al nervio ovárico superior (Aguado, 2002, Domínguez y col, 2003)

Los efectos inmediatos (a la hora) de la inyección de agua destilada sobre la concentración de E_2 pueden ser explicados si consideramos que al inyectar al animal se activen receptores sensoriales que regulen la actividad de la enzima StAR en los ovarios. En cultivos de células de la teca y adrenales de bovinos, se ha observado que la transcripción del gen y la síntesis de la proteína StAR ocurre una y dos horas, respectivamente después de adicionar LH o ACTH al cultivo, su máxima concentración se observa a las cuatro horas y retorna a sus concentraciones basales en doce (para ACTH) o 24 horas (para la LH) (Ivell y cols., 2000).

Los resultados obtenidos por el tratamiento con sulfato de ATR nos permiten sugerir que en el día del estro, el sistema colinérgico regula de manera inhibitoria la secreción de P_4 y testosterona. Previamente se ha mostrado que la concentración

plasmática de P_4 aumenta a la hora de inyectar ATR en el día del diestro-1 (Cruz y col., 2001). Otros investigadores han mostrado que P_4 disminuye al tratar a los animales con agonistas nicotínicos (Asashi y Hsueh, 1981) y en ratas macho, Favaretto y col., (1993) mostraron un efecto inhibitorio del sistema colinérgico sobre la secreción de testosterona en cultivos de células de Leydig.

La regulación inhibitoria del sistema colinérgico en la secreción de P_4 se lleva a cabo solamente en el ovario izquierdo, ya que en un animal con bloqueo del sistema colinérgico, la extirpación del ovario izquierdo anula el aumento de la concentración de P_4 provocado por la inyección subcutánea del sulfato de atropina. Esta idea es apoyada por el hecho de que en el animal con bloqueo colinérgico, la extirpación del ovario derecho o de ambos incrementó aún más la concentración de P_4 en suero. Estos resultados pueden ser explicados con base en una diferencia en la inervación que recibe cada ovario (Klein y Burden, 1988). Se ha sugerido que la función del ovario derecho depende principalmente de la actividad vagal (Burden HW y col., 1986), sin embargo estos autores evaluaron la población folicular y la hipertrofia compensadora del ovario en ratas OVX-U y no la función esteroideogénica. En cultivos de células de la granulosa de humano y de rata, se ha mostrado la presencia de receptores M_1 y M_5 (receptores muscarínicos tipo 1 y 5) (Mayerhofer et al., 2003). La estimulación del sistema colinérgico en células de la granulosa de vaca estimula la síntesis de esteroides (D'Albora y cols., 2000). Sin embargo, en presencia de estradiol o de FSH, otros estudios ponen de manifiesto un efecto inhibitorio de drogas colinérgicas sobre la esteroideogénesis de células de la granulosa (Espey y cols., 2000; Felder, 1995; Fritz y cols., 1999).

Con base en los resultados obtenidos en los animales inyectados con ATR antes de la OVX-U, podemos sugerir que el sistema colinérgico regula de manera asimétrica la secreción de testosterona: sobre el ovario izquierdo ejercería un efecto estimulante sobre la secreción de testosterona; mientras que sobre el ovario derecho tendría una influencia inhibitoria. Si consideramos los resultados obtenidos en el animal con OVX-B, podemos sugerir que el sistema colinérgico también estaría regulando de manera inhibitoria la secreción de testosterona en las adrenales. Walland y Pieper (1998) mostraron en el cuyo y

el perro, que la activación de receptores M_1 activan partes centreales del sistema nervioso simpático, incluyendo proyecciones de las adrenales (ganglio paraganglionar) por una acción mediada por receptores muscarínicos de las glándulas adrenales.

Efectos a Corto Plazo.

Veinticuatro horas después de las manipulaciones “simuladas”, el sistema secretor de hormonas como la P_4 y el E_2 parece estar más estable, ya que a este tiempo los efectos iniciales del éter o las perforaciones unilaterales o bilaterales del peritoneo ya no son significativamente diferentes con respecto a un animal intacto.

Los efectos inmediatos de la perforación uni o bilateral del peritoneo sobre la concentración de P_4 y E_2 desaparecen a las 24 horas, lo que nos lleva a pensar en respuestas inmediatas al estrés. La regulación de la secreción de testosterona parece ser un mecanismo más complejo, ya que hasta las 24 horas posteriores a la anestesia o la perforación bilateral observamos un incremento en la concentración de esta hormona. Una explicación al respecto implicaría la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal al éter mediado por catecolaminas (Murakami y col., 1997); las cuales regulan la secreción de P_4 y andrógenos en cultivo de ovarios completos (Adashi y Hsueh, 1981; Aguado y col., 1984; Dyer, Erickson, 1985).

En humanos y roedores la respuesta al estrés agudo (como la anestesia con éter) se evalúa por medio del incremento en la concentración plasmática de testosterona y de LH (Rabin y col, 1988; Riever y Rivest, 1991). En los roedores, el incremento en la concentración de LH se ha explicado mediante el efecto estimulante de la ACTH sobre las neuronas secretoras de la GnRH. No debemos descartar la posibilidad de que el aumento en la concentración de testosterona pueda ser también de origen adrenal. Diversos autores han señalado que el estrés produce alteraciones en la estructura interna de la suprarrenal, las cuales varían dependiendo de la naturaleza del estrés, de su gravedad y de su duración (Luse, 1970).

Otra explicación al aumento en la concentración de testosterona observado 24 horas después de la anestesia, sería que la hormona se acumule en la sangre, como resultado del retardo en su degradación, depuración o de ambas funciones a la vez, ya que uno de los efectos del éter es disminuir la filtración glomerular y las funciones hepáticas (Price, 1978).

Un posible mecanismo involucrado en los efectos de la perforación del peritoneo sobre la secreción de testosterona es que la estimulación de los receptores sensoriales del peritoneo, aferentes al sistema nervioso central por intermedio de la neuroquinina-B, activen a su vez neuronas colinérgicas del núcleo del tracto solitario y desde aquí parta una señal estimulante (posiblemente por medio del nervio vago) de las glándulas productoras de testosterona (Fig. 6). Las neuronas colinérgicas del sistema nervioso central son reguladas por tacikinas (Arenas y col, 1991; Lehericy y col, 1993; Preston y col, 1999). El uso de agonistas o antagonistas a tacikinas afectan la actividad de las neuronas colinérgicas y modulan la liberación de acetilcolina (Anderson y col., 1993; Arenas y col., 1991; Lehericy y col., 1993; Preston y col., 1999). Hay evidencias de que las neuronas colinérgicas del cerebro anterior y los ganglios basales hacen sinapsis con terminales que liberan sustancia P (Arai y col., 1986). Luego entonces, modificaciones en los receptores a neurokinina-B del peritoneo podría regular la función colinérgica central y periférica.

Con base en los resultados obtenidos 24 horas después de la OVX uni o bilateral podemos sugerir que el ovario *in situ* ya es capaz de compensar la concentración sérica de E₂ pero no de P₄, lo que convierte a este animal en una entidad diferente al que cuenta con ambas gónadas.

La idea planteada previamente acerca de la función inhibidora del ovario izquierdo en la secreción de testosterona, es apoyada por el hecho que aún 24 horas después de la OVX-I la concentración de testosterona permanece elevada en comparación con el animal con perforación del lado izquierdo del peritoneo.

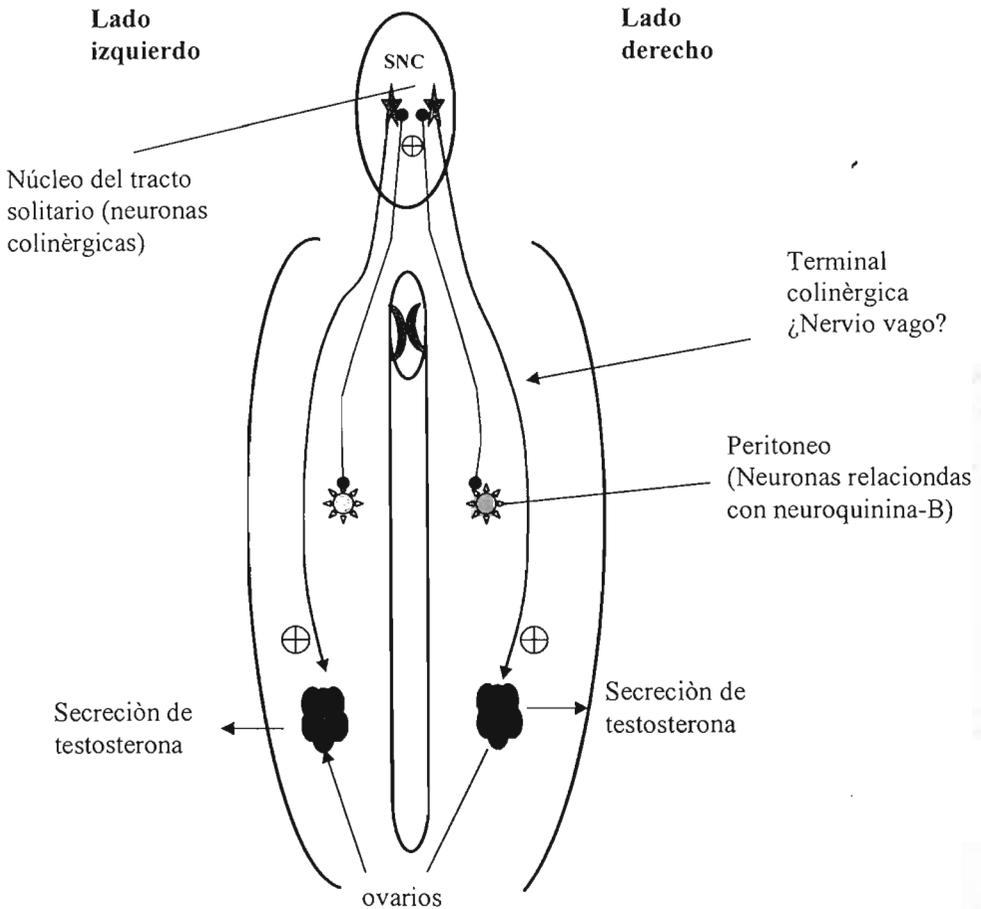


Figura 6. Posible explicación de la secreción de testosterona en la que posiblemente se estimulen los receptores sensoriales del peritoneo mediante la participación de la neuroquinina-B, quienes a su vez activan neuronas colinérgicas del núcleo del tracto solitario y a su vez estimule (quizá a través del nervio vago) las glándulas productoras de testosterona.

Dado que 24 horas después de la OVX-B, la concentración de E₂ fue semejante a la de un animal intacto, nos lleva a sugerir que:

1. El tiempo de depuración y degradación del E₂ se altere; de tal forma que 24 horas después de la OVX-B la concentración de la hormona siga siendo semejante a la del grupo testigo. En la mujer, el tiempo de vida media de esta hormona es de una hora (Remington, 1975).
2. Otros órganos secreten el E₂ a falta de las gónadas, durante las 24 horas posteriores a la OVX-B. Órganos como el corazón, páncreas y timo (Martel y cols., 1992), bazo (Fornieris y col, 1999), las adrenales (Wajechenberg y col, 1980; Tinnikov y col, 1992) y el tejido adiposo (Simpson, 2003) producen estradiol bajo ciertas condiciones experimentales o patológicas.

La anestesia con éter y la inyección del vehículo son factores estresantes que se manifiestan hasta las 24 horas, dando como resultado cambios significativos en la concentración de P₄, testosterona y E₂. Sin embargo, estas alteraciones no ponen en riesgo la ovulación del animal (Cruz y col., 2001).

El efecto de la inyección del vehículo a las 24 horas sobre la secreción de P₄, testosterona y E₂ puede ser explicado como una respuesta al estrés, es decir, a la estimulación del eje adrenal. En ratas inyectadas con cocaína (droga que incrementa la liberación de ACTH), aumenta la concentración de P₄, la que en su mayoría es de origen adrenal (Walter, 2001). La inyección de capsaicina (agente neurotóxico específico para fibras sensoriales A y C) a ratas estimula la secreción de catecolaminas de origen adrenal (Watanabe y col., 1988). En cubetas de incubación donde se mantienen unidos el ganglio celiaco, el ovario y el nervio ovárico superior, la adición de noradrenalina en diestro-2 disminuye la liberación de P₄. La adición de propanolol en la cubeta de incubación aumenta la liberación de esta hormona (Sosa y col., 2000)

Los resultados obtenidos en los animales inyectados con ATR a los que se les perforó el peritoneo, ponen de manifiesto que alteraciones en la información sensorial localizada en el pliegue del cuello, desencadenan mecanismos de regulación complejos que

involucran no sólo al sistema colinérgico, sino a otros más, para lo cual no tenemos una explicación.

En el humano, la atropina tiene una vida media de dos horas, sin embargo sus efectos se prolongan, ya que el fármaco se elimina por completo hasta las 48 horas siguientes, cuando se aplican dosis altas. Además, la ATR tiene un efecto antidiurético (Innes y Nickerson, 1978). Esta observación explicaría el hecho que a 24 horas de la inyección de ATR, la concentración de P_4 y testosterona siguieron estando altas, así que, ambas hormonas pudieron acumularse en la sangre como resultado de una inhibición de la diuresis.

Como se señaló en párrafos anteriores, en el día del estro los ovarios son la fuente principal de E_2 , ya que la OVX-B disminuyó drásticamente la concentración en suero. La secreción de E_2 no es regulada por el sistema colinérgico, dado que la inyección de ATR no modificó la concentración de la hormona. Burden (1978) mostraron que terminales simpáticas poseían actividad acetil-colinesterasa (enzima responsable de la degradación de la acetilcolina en el espacio sináptico), por lo que sugirieron que algunas fibras de origen vagal viajaban junto con fibras simpáticas hacia el ovario, así que se asumió que una inervación colinérgica similar a la simpática terminaba en el ovario. En la actualidad sabemos que las fibras nerviosas viajan junto con los vasos sanguíneos hasta la glándula intersticial, la teca y los cuerpos lúteos. Sin embargo, las células de la granulosa, que serían las células blanco de la acetilcolina, ya que cuentan con receptores muscarínicos (Mayerhofer y col., 2003), no entran en contacto con las posibles terminales nerviosas, debido a que se encuentran por dentro de la membrana basal del folículo, lo que explicaría en parte porque la inyección de ATR no produjo modificaciones significativas sobre la secreción de E_2 .

CONCLUSIONES

1. En el día del estro, los ovarios no secretan de manera asimétrica P_4 , testosterona y E_2 . Los cambios en la concentración de las hormonas esteroides observados en la primera hora de estudio reflejan mecanismos neuroendocrinos de reorganización que compensarán la falta de uno de los ovarios.
2. El sistema sensorial que inerva el peritoneo regula de manera asimétrica la secreción de hormonas esteroides sexuales. La inervación del peritoneo del lado izquierdo regula la secreción de E_2 , mientras que la del lado derecho modula la de P_4 y testosterona.
3. Un vínculo funcional de tipo inhibitorio en la secreción de P_4 y testosterona estarían ejerciendo los ovarios sobre las adrenales.
4. El ovario izquierdo regula de manera inhibitoria la secreción de testosterona.
5. El sistema colinérgico regula de manera inhibitoria la secreción de P_4 del ovario izquierdo
6. El sistema colinérgico regula de manera asimétrica la secreción de testosterona: sobre el ovario izquierdo ejercería un efecto estimulante, mientras que sobre el ovario derecho tendría una influencia inhibitoria.
7. El sistema colinérgico no participa en la regulación de la secreción E_2 , cuya fuente principal son los ovarios.
8. Hasta las 24 horas de la ovariectomía unilateral, el ovario *in situ* es capaz de compensar la concentración de testosterona pero no la de P_4 .

PERSPECTIVAS:

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, surgen los siguientes objetivos:

1. Estudiar el papel de las glándulas adrenales en la secreción de P_4 , testosterona y E_2 en el día del estro.
2. Analizar la contribución del ovario izquierdo o derecho en la concentración de P_4 , testosterona y E_2 , como única fuente *in situ* de secreción.
3. Estudiar el papel del sistema colinérgico en la regulación de la secreción de estas hormonas por parte de las adrenales o de uno de los ovarios, utilizando el modelo del animal adrenalectomizado o adrenalectomizado y ovariectomizado unilateralmente.

REFERENCIAS

- Adashi EY, Hsueh AJ. 1981. Stimulation of β_2 -adrenergic responsiveness by follicle stimulating hormone in rat granulosa cells in vitro and in vivo. *Endocrinology* **108**: 2170-2178.
- Aguado LI. 2002. Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microsc Res Tech* **59**: 462-473.
- Aguado LI, Ojeda SR. 1984. Ovarian adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion. *Endocrinology* **115**: 1944-1946.
- Ahmed CE, Dees WL yOjeda SR. 1986. The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide VIP-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology* **118**: 1682-1689.
- Alonso R, López-Coviella I. 1998. Gonadal steroids and neural function. *Neurochem Res* **23**: 675-688.
- Anderson JJ, Chase TN, Engber TM. 1993. Substance P increases release of acetylcholine in the dorsal striatum of freely moving rats. *Brain Res* **623**: 189-194.
- Anesetti G, Lombide P, Dálbora H, Ojeda SR. 2001. Intrinsic neurons in the human ovary. *Cell Tissue Res*. **306**: 231-237.
- Arai H, Emson PC. 1986. Regional distribution of neuropeptide K and other tachykinins (neurokinin A, Neurokinin B and substance P) in rat central nervous system. *Brain Res* **399**: 240-249.
- Arakane F, Sugawara T, Nishino H, Liu Zhiming Holt JA, Pain D, Stocco MD, Miller WL, Strauss JF. 1996. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) retains activity in the absence of its mitochondrial import sequence: implications for the mechanism of StAR action. *Proc Natl Acad Sci*. **93**: 13731-13736.
- Arellano RO, Garay E, Miledi R. 1999. Muscarinic receptor heterogeneity in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *J Physiol*. **521**:409-419.

- Arenas E, Alberch J, Pérez-Navarro E, Solsona C, Marsal J. 1991. Neurokinin receptors differentially mediate endogenous acetylcholine release evoked by tachykinins in the neostriatum. *J Neurosci* **11**: 2332-2338.
- Arnold AP, Gorski RA. 1984. Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **7**: 413-442.
- Baljet B, Drukker J. 1980. The extrinsic innervation of pelvic organ in the female rats. *Acta Anat* **107**: 241-267
- Batra S, Popper LD, Iosif CS. 1993. Characterisation of muscarinic cholinergic receptors in human ovaries, ovarian tumours and tumour cell lines. *Europ J Cancer* **29**: 1302-1306.
- Benoit J. 1923. Transformation experimentale du sexe por ovariectomie précoce chez la poule domestique. *CR Acad Sci Paris* **177**: 1074-1077.
- Benoit J. 1932. L'inversion sexuelle de la poule determine par l'ablation de l'ovarie gauche. *Arch Zool Exp Gen* **73**: 1-112.
- Blejer WJ, Ehteshami M. 1981. Ovulation following unilateral ovariectomy in the California Leaf-nosed bat (*Macrotus californicus*). *J Reprod Fertil* **63**: 181-183.
- Bose H, Lingappa VR, Millar WL. 2002. Rapid regulation of steroidogenesis by mitochondrial protein import. *Nature* **417**: 87-91
- Burden HW. 1978. Ovarian innervation. En: *The mammalian Ovary. Comparative Biology*. Ed. RE Jones. Raven Press, Nueva York . pp:615-638.
- Burden HW, Lawrence IE Jr, Smith CP Jr, Hoffman J, Leonard M, Fletcher DJ, Hodson CA. 1986. The effects of vagotomy on compensatory ovarian hypertrophy and follicular activation after unilateral ovariectomy. *Anat Rec* **214**: 61-66.
- Burris TP. 1999. Progestinas. En: *Encyclopedia of Reproduction* Editrors. Ernst Knobil y Jimmy D Nelly. Academic Press, San Diego Cal. USA. pp:23-30.
- Casper RF, Cotterell MA. 1984 The effects of adrenergic and cholinergic agents on progesterone production by human corpus luteum in vitro. *Ame J Obs Gynecol* **148**: 663-669.

- Chavez R, Cruz ME, Domínguez R. 1987. Differences in the ovulation rats: effects of ipsi and contralateral vagus nerve on the remaining ovary. *J Endocrinol* **113**: 397-401.
- Chen LW, Guan ZL, Ding YQ. 1997. Neurokinin B receptor (NK3)-positive neurons expressing c-fos after chemical noxious stimulation on the peritoneum: a double staining study in the nucleus tractus solitarius of the rat. *J Hirnforsch* **38**: 363-367.
- Chikazawa K, Araki S, Tamada T. 1986. Morphological and endocrinological studies on follicular development during the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* **62**: 305-313.
- Christenson LK, Strauss JF 3rd. 2001. Steroidogenic acute regulatory protein : an update on its regulation and mechanism of action. *Arch Med Res.* **32**:576-586.
- Cooke RG, Payne JH. 1988. Effects of arteril infusions of adrenaline and acetylcholine on luteal secretion of progesterone and oxytocin in goats. *Theriogenology* **50**: 249-255.
- Conley AJ, Bird IM 1997. The Role of Cytochrome p450 17 α -hydroxylase and 3 β -hydroxysteroid deshydrogenase in the Integration of gonadal and Adrenal Steroidogenesis via the Δ 5 and Δ 4 Pathway of steroidogenesis in Mammals. *Biol Reprod* **56**: 789-799.
- Cruz ME, Villegas G, Domínguez-González, Chavira R, Domínguez R. 2001. Oculation delay induced by blockade of the cholinergic system of dioestrus-1, is related to changes in dopaminergic activity of preoptic antero-hypothalamic área of the rat. *Brain Res Bull* **54**: 339-344.
- D'Albora H, Lombide P, Ojeda SR. 2000. Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study. *Cell Tissue Res* **300**: 47-56.
- Davoren BJ, Hsueh AJW. 1985. Vasoactive intestinal peptide: a novel stimulator of steoidogenesis by cultura rat granulosa cell. *Biol Reprod* **33**: 37-52.
- Disen GA, Ojeda SR 1999. Ovarian Inervation En: Encyclopedia of Reproduction. Edited by E Knobil. 2a Edition Raven Press, San Diego California pp: 583-589

- Domínguez R, Riboni L, Zipitria D, Revilla R. (1982). Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the estrous cycle related to ovulation in the rat?. *J Endocrinol* **95**:175-180.
- Domínguez R, Cruz ME, Chavez R. 1989. Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation. En: Growth Factors and the ovary. Anne M. Hirshfiel Ed Plenum Press, Nueva York pp: 321-325.
- Domínguez R, Chavez R, Cruz ME. 1991. La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: Tópicos Selectos en Biología de la Reproducción. Editor R. Domínguez. UNAM-PORRÚA, México. pp: 161-192.
- Domínguez R, Morales L, Cruz ME. 2003. Ovarian Asymetry. *Annu rev Biomed Sci.* **5**: 95-104.
- Douglas MS. 1999. Testosterone biosynthesis. En: Encyclopidia of Reproduction. Edited by E Knobil. 2a Edition Raven Press, San Diego California pp: 784-789.
- Dyer CA, Erickson GF. 1985. Norepinephrine amplifies human cholinergic gonadotropin stimulated androgen biosynthesis by ovarian theca interstitial cells. *Endocrinology* **116**:1645-1652.
- Erdö SL, Varga B, Horvath E. 1985. Effects of local GABA administration on rats ovarian blood flow, and on progesterone and estradiol secretion. *Eur J Pharmacol* **111**: 397-404.
- Espey LL, Ujioka T, Russell DL, Skelsey M, Vladu B, Robker RL, Okamura H, Richards JS. 2000. Induction of early growth response protein-1 gene expresión in the rat ovary in response to a n ovulatory dose of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* **141**: 2385-2391.
- Favaretto AL, Valencia MM, Picanco-Diniz DL, Antunes-Rodríguez JA. 1993. Inhibitory role of cholinergic agonista o testosterone secretion by purified rat Leydig cells. *Arch. Int Ohysiol Biochem Biophys* **101**: 333-335.

- Felder CC. 1995. Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J* **9**: 619-625.
- Fenske M. 1997. Role of cortisol in the ACTH-induced suppression of testicular steroidogenesis in guinea pigs. *J. Endocrinol* **154**: 407-414.
- Forneris M, Oliveros L, Aguado LI. 1999. Effect of secretion of splenocytes after superior ovarian nerve section on the ovarian steroidogenesis. *Neuroimmunomodulation* **6**:1293-1299.
- Fredricsson B, Carlström K, Kjessler B, Lindsterdt J, Pöen L, Ritzén M y de la Torre B. 1985. Incomplete androgen insensitivity: asymmetry in morphology and steroid profile and metabolism of the gonads. An analysis of case. *Acta Endocrinologica* **110**: 564-571
- Fritz S, Föhr KJ, Boddien S, Berg U, Brucker C, Mayerhorfer A. 1999. Functional and molecular characterization of a muscarinic receptor type and evidence for expression of choline-acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in human granulosa-luteal cell. *J Clin Endocrinol Metab* **84**: 1744-1750.
- Fritz S, Wessler I, Breitling R, Rossmanith W, Ojeda SR, Dissen GA, Amsterdam A, Mayerhorfer A. 2001. Expression of muscarinic receptor types in the primate ovary and evidence nonneural acetylcholine synthesis. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 349-354.
- Genazzani AR, Lucchesi A, Stomati M, Catarsi S, Genazzani AD, Crisculo M, Petraglia F. 1997. Effects of sex steroid hormones on the neuroendocrine system. *Eur J Contracep Reprod Health Care* **2**: 63-69.
- George FW, Ojeda SR. 1987. Vasoactive intestinal peptide enhances aromatase activity in the neonatal rat ovary before development of primary follicles or responsiveness to follicle-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 5803-5807.
- Gerendai I, Halasz B. 1997. Neuroendocrine asymmetry. *Front Neuroendocrinol* **18**: 354-381.

- Gerendai I, Toht IE, Boldogkoi Z, Medveczky I, Halasz B. 2000. CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function. *J Auton Nerv Syst.* **80**: 40-45.
- Geschwind N, Levitsky W. 1968. Left-right asymmetry in temporal speech region. *Science* **161**: 186-187.
- Gordon DN, Ferry MNH. 1994. Luteum and Its Control In Infraprimates Species. Cap: 14 En: The physiology of reproduction Edited by E Knobil and J.D. Nelly. 2a Edition Raven Press, NY pp: 781-816.
- Gore-Langton RE, Armstrong DT. 1994. Follicular steroidogenesis and its Control. Cap: 10 En: The physiology of Reproduction. Edited by E Knobil and J.D. Nelly, 2a Edition Raven Press, NY pp: 572-609.
- Graham JD, Clarke CL. 1997. Physiological actions of progesterone in target tissue. *Endocr Rev* **18**: 502-519.
- Gutkind JS, Novotny EA, Brann MR, Robbins KC. 1991. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes as agonist-dependent oncogenes. *Proc Nat Acad Scie USA* **88**: 4703-4707.
- Harrison RJ, Barbara JW. 1977. Structure of the mammalian ovary. En: The ovary general aspects. Editors Lord Zuckerman and Barbara J. Weir Academic Press. NY.
- Hinshelwood MM. 1999. Steroidogenesis, overview. En: Encyclopedia of Reproduction Vol. 3 Editors Ernst Knobil and J.D. Nelly. 2a Edition. Academic Press, San Diego USA. pp: 644-653.
- Hsueh JS, Adashi EY, Jones PB, Welsh TH Jr. 1984. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev* **5**: 76-127.
- Humhrey HCY y Janice MB. 1999. Ovary Overview. En: Encyclopedia of Reproduction Vol. 3 Editors Ernst Knobil De. Academic Press, San Diego California USA. pp: 590-597.
- Hutchinson JS, Nelson PB, Zeleznik AJ. 1986. Effects of different gonadotropin pulse frequencies of corpus luteum function during the menstrual cycle of rhesus monkeys. *Endocrinology* **119**: 1964-1971.

- Ines IR, Nickerson M. 1978. Atropina, escopolamina y fármacos atimuscarínicos relacionados. En: Bases farmacológicas de la terapéutica. Editores: Louis S. Goodman y Alfred Gilman. 5ª Ed. pp: 431-446.
- Ivell R, Tillmann G, Wang H, Nicol M, Stewart PM, Bartlick B, Walter N, Mason JJ, Morley SD. 2000. Acute regulation of the bovine gene for the steroidogenic acute regulatory protein in ovarian theca and adrenocortical cell. *J Mol Endocrinol* 24: 109-118.
- Juengel JL, McIntush EW y Niswender GD. 1999. Corpus Luteum. En: Encyclopedia of Reproduction. Ed. Academic Press. USA pp: 703-709.
- Kasson BG, Hsueh AJ. 1985. Cholinergic inhibition of follicle-stimulating hormone-induced progesterin production by cultured rat granulosa cells. *Biol Reprod* 33:1158-1167.
- Kau MM, Lo MJ, Wang SW, Tsai SC, Chen JJ, Chiao YC, Yeh JY, Lin H, Shum AY, Fang VS, Ho LT, Wang PS. 1999. Inhibition of aldosterone production by testosterone in male rats. *Metabolism* 48: 1108-1114.
- Kawashima K, Fujii T. 2000. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacology and Therapeutics* 86: 29-48.
- Keefe DL. 2002. Sex hormones and neural mechanisms. *Arch Sex Beb* 31: 401-403.
- Klein CM, Burden HW. 1988. Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the ovary. *Neurosci Lett* 85: 217-222.
- Kornya L, Bodis J, Copan M, Tinneberg HR, Torok A. 2001. Modulatory effect of acetylcholine on gonadotropin-stimulated human granulosa cell steroid secretion. *Gynecol Obstet Invest* 52:104-107.
- Laszlo A, Villanyi P, Zolnai B, Erdo SL. 1989. Gamma-aminobutyric acid, its related enzymes and receptor-binding sites in the human ovary and fallopian tube. *Gynecol Obstet Invest* 28:94-97.

- Lauder JM, Schambra UB. 1999. Morphogenetic roles of acetylcholine. *Envir Health Perspec* 107: 65-69.
- Lawrence IE Jr, Burden HW. 1980. The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *Anat Rec* 196:51-59.
- Lehericy S, Hirsch EC, Cervera-Pierot P, Hersh LB, Bakchine S, Piette F, Duyckaerts C, Hauw JJ, Javoy-Agid F, Agid Y. 1993. Heterogeneity and selectivity of the degeneration of cholinergic neurons in the basal forebrain of patients with Alzheimer's disease. *J Comp neurol* 330: 15-31.
- Luck MR. 1990. Cholinergic stimulation, through muscarinic receptors, of oxytocin and progesterone secretion from bovine granulosa cell undergoing spontaneous luteinization in serum-free culture. *Endocrinology* 126:1256-1263.
- Luse S. 1970. Estructura íntima de la corteza suprarrenal. En: La corteza suprarrenal Editor Albert B. Eisenstein. Ed Toray, Barcelona, España pp: 1-35.
- Malendowicz LK. 1976. Sex differences in adrenocortical structure and function. III. The effects of postpubertal gonadectomy and gonadal hormone replacement on adrenal cholesterol sidechain cleavage activity and steroids biosynthesis by rat adrenal. *Endokrinology* 67: 26-35.
- Malisheskaia VA, Brindak OI. 1980. [Formation of extraorganic ovarian nerves during the intrauterine period of human ontogeny]. *Anat Gistol Embriol* 79: 95-99.
- Manna PR, Roy P, Clark BJ, Stocco DM, Huhtaniemi IT. 2001. Interaction of thyroid hormone and steroidogenic acute regulatory (StAR) protein in the regulation of murine Leydig Cell steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76: 167-177.
- Martel C, Rheaume E, Takahashi M, Trudel C, Couet J, Luu-The V, Simard J, Labrie F. 1992. Distribution of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression and activity in rat and human tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 41: 597-603.
- Marut EL, Hodgen GD. 1982. Asymmetric secretion of principal ovarian venous steroids in the primate luteal phase. *Steroids* 39: 461-469.

- Mayerhofer A, Dimitrijevic N, Kunz L. 2003. The expresión and biological role of the non-neural cholinergic system in the ovary. *Life Sci* 72: 2039-2045.
- Mayerhofer A, Fohr KJ, Sterzik K, Gratzl M. 1992. Carbacol increases intracellular free calcium concentrations in human granulosa-lutein cell. *J Endocrinol* 35: 153-159.
- Mayerhofer A, Fritz S. 2002. Ovarian acetylcholine and muscarinic receptors: hints of a novel intrinsic ovarian regulatory system. *Microsc Res Tech* 15: 503-508.
- Mayerhofer A, Frungieri MB, Billing A, Fritz S. 1999. Sources and function of neural signalling molecules in the gonads. *Medicina (B Aires)* 59: 542-545.
- McEwen BS. 1983. Gonadal steroid influences on brain development and sexual differentiation. *Int Rev Physiol* 27: 99-145.
- Mittwoch U. 2000. Genetics of sex determination: exceptions that prove the rule. *Mol Genet Metab* 71: 405-410.
- Mittwoch U, Mahadevarah S. 1980. Additional growth- α link between mammalian testes, avian ovaries, gonadal asymmetry in hermaphrodites and the expresión of H-Y antigen. *Growth* 44: 287-300.
- Mittwoch U. 1975. Lateral asymmetry and gonadal defferentation. *Lancet* 1: 401-402.
- Morales L, Chávez R, Domínguez R. 1993. Participation of the superior ovarian nerve in the prepuberal rat: Differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve. *Med Sci Res* 21: 15-17.
- Morán C, Morales L, Quiroz U, Domínguez R. 2000. Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in infantile rats on follicular growth. *J Endocrinol* 166: 205-211.
- Morley P, Tasang BK, Whitfield JF, Scwartz JL. 1992. the effect of muscarinic chlinergic agonists on intracellular calcium and progesterone production by chicken granulosa cells. *Endocrinology* 130: 663-670.

- Mount HT, Dreyfus CF, Black IB. 1994. Muscarinic stimulation promotes cultured Purkinje cell survival: a role for acetylcholine in cerebellar development?. *J Neurochem* **63**: 2065-2073.
- Murakami K, Akana SF, Dellman MF. 1997. Dopamine-beta-hydroxylase activity is necessary for hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) response to ether, and stress-induced facilitation of subsequent HPA response to acute ether emerges as HPA responses are inhibited by increasing corticosterone (B). *J Neuroendocrinol* **9**: 601-608.
- Nance DM, Burns J, Klein CM, Burden HW. 1988. Afferent fibers in the reproductive system and pelvic viscera of female rats: anterograde tracing and immunocytochemical studies. *Brain Res Bull* **21**: 701-709.
- Nowak KW, Neri G, Nussdorfer GG, Melendowicz LK. 1995. Effects of sex hormones on the steroidogenic activity of dispersed adrenocortical cells of the rat adrenal cortex. *Life Sci* **57**: 833-837
- Payer AF. 1978. ultrastructural study of nerve plexus accompanying the ovarian artery and vein in the rat. *Anat Rec* **190**: 47-64.
- Pomata PE, Colman-Larner AA, Baranao LJ y Fiszman ML. 2000. In vivo evidences of early neurosteroid síntesis in the developing rat central nervous system and placenta. *Dev Brain Rev* **120**: 83-86.
- Preston Z, lee K, Widdowson L, Richardson PJ, Pinnock RD. 1999. Tachykinin increases [³H] acetylcholine release in Morse striatum through multiple receptor subtypes. *Neuroscience* **95**: 367-376.
- Price HL. 1978. Anestésicos volátiles: éter, halotano, metoxifluorano, enflurano y otros anestésicos volátiles halogenados. En: Bases farmacológicas de la terapeutica. Editor: Louis S. Goodman y Alfred Gilman. 5ª Ed. pp: 76-82.
- Rabin D, Gold PW, Margioris AN, Chrousos GP. 1988. Stress and reproduction: Physiology and Pathophysiologic interactions between the stress and reproductive axes. pp377-387.

- Remington's. 1975. *Pharmaceutical Sciences RPS-15*. 5a edición. Editor John E Hoover. Pennsylvania USA pp: 912-934.
- Riever C, Rivest S. 1991. Effect of stress on the activity of the Hypothalamic-Pituitary-gonadal axis: Peripheral and Central Mechanisms. *Biol Reprod* **45**: 523-532.
- Romanowski MJ, Soccio RE, Breslow JL, Burley SK. 2002. Crystal structure of the Mus musculus cholesterol regulated START protein 4 (Star D4) containing a StAR-related lipid transfer domain. *Proc Nat Acad Sci*. **1499**: 6949-6954.
- Ronen-Fuhrmann T, Timberg R, King SR, Hales KH, Hales DB, Stocco DM, Orly J. 1998. Spatio-temporal expression patterns of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology* **139**: 303-315.
- Saito H, Kaba H, Sato T, Kondo M, Takeshima Y, Edashige N, Seto K, Kawakami M. 1990. Influence of electrical stimulation of the hypothalamus on ovarian steroidogenesis in hypophysectomized and adrenalectomized rats. *Exp Clin Endocrinol* **95**: 259-261.
- Sarper CB, Loewy AD, Swanson LW, Cowan WM. 1976. Direct hypothalamo-autonomic connections. *Brain Res* **117**: 305-316.
- Serrano JS, Serrano MI. 2003. Hormonas sexuales. En: *Farmacología fundamental*. Capítulo 50. Editor A Velasco, L San Román, Serrano J Martínez- Sierra. España pp: 659-676.
- Shao-Yao Ying, Zhong Zhang. 1998. Ovary Overview. En: *Encyclopedia of Reproduction Vol. 3* Editors Ernst Knobil De. Academic Press, California USA pp: 578-582.
- Shoham Z, Schachter M. 1996. Estrogen biosynthesis regulation, actino, remote effects and value of monitoring in ovarian stimulation cycles. *Fertil Steril* **65**: 687-701.
- Simpson ER 2002. Aromatization of androgens in women: current concepts and findings. *Fertil Steril* **77**: 6-10.

- Simpson ER. 2003. Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86: 225-230.
- Smith CL. 1999. Estrogens, Overview. En: Encyclopedia of Reproduction Editors Ernst Knobil De. Academic Press California USA pp: 119-126.
- Sorger T, Pittman R, Soderwall AL. 1983. Principal features of the nerves supli to the ovary, oviduct and tubal tirad of the uterus in the golden hamster. *Biol Reprod* 28: 461-482.
- Sporrong B, Kannisto P, Owman C, Sjoberg NO, Walles B. 1985. Histochemistry and ultrastructure of adrenergic and acetylcholinesterase-containing nerves supplying follicles and endocrine cells in the guinea-pig ovary. *Cell Tissue Res* 240: 505-511.
- Springer SP, Deutsh G. 1985. Cerebro izquierdo, cerebro derecho. Gedisa Barcelona, pp:1-235.
- Stoco DM, 1999. Testosterone Biosynthesis. En: Encyclopedia of Reproduction. Vol 4. Editors Ernst Knobil De. Academic Press, California pp: 784-789.
- Tinnikov AA, Bazhan NM, Yakovleva TV. 1992. The study of properties of immunoreactive estradiol secreted by adrenalds and ovaries of immature female rats. *Steroids* 57: 174-177.
- Trkulja V, Lackovic Z. 2001. Vagal influence on compensatory ovarian growth is important only briefly after hemicastration. *Exp Biol. Med* 226: 776-781.
- Uphouse L, Maswood S. 1999. Estrogen Action, Behavior. En; Encyclopedia of Reproduction Vol. 2 Editors Ernst Knobil De. Academic Press California USA pp: 59-63.
- Van Lier E, Meikle A, Bielli A, Akerberg S, Forsberg M, Sahlin L. 2003. Sex differences in oestrogen receptor levels in adrenal gland of sheep during the breeding. *Domest Anim Endocrinol* 25: 373-383.
- Vercillini P, Aimi G, De Giorgi O, Maddalena S, Carinelli S, Crosignani PG. 1998. Is cystic ovarian endometriosis an asymmetric disease. *Brit J Obstet Gynaecol* 105: 1018-1021.

- Voet D, Voet J. 1995. Lipid metabolism. En: Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc. Second Edition. pp: 663-726.
- Wajechenberg BL, Goldman J, Kyan TS, Achando SS, Thomsen YL, Lima SS. 1980. Oestrogen dynamics in adrenal venous effluents in congenital virilizing adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol* **13**: 401-404.
- Walland A, Pieper MP. 1998. Central activation of the sympathetic nervous system including the adrenals in anaesthetized guinea pigs by the muscarinic agonist talsaclidine. *Arch Pharmacol*. **357**: 426-430.
- Walter LM. 2002. Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. *Mol Cel Endocrinol* **98**: 7-14.
- Walter QD, Francis R, Cabassa J, Kuhn CM. 2001. Effect of ovarian hormones and estrous cycle on stimulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* **297**: 291-298.
- Watanabe T, Kawada T, Kurosawa M, Sato A, Iwai K. 1988. Adrenal sympathetic efferent nerve and catecholamine secretion excitation caused by capsaicin in rats. *Am J Physiol* **255**: 23-27.
- Weis GK, Dail EG, Rather A. 1982. Evidence for direct neural control of ovaria syteroidogenesis in rats. *J Reprod Fertil* **65**: 507-511.
- Weisz J, Ward I. 1980. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetusses and neonatal offspring. *Endocrinology* **117**: 155-160.
- Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K. 1999. The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**: 198-205.
- Zeleznik AJ. 1999. Luteinization. En: Encyclopidia of Reproduction. Editors Ernst Knobil. De. Academic Press, San Diego California pp: 1076-1082.

**PROGRAM
for the
THIRTY-SECOND ANNUAL
MEETING**

of the

**SOCIETY FOR THE STUDY
OF REPRODUCTION**

**Center for Reproductive Biology
Washington State University/University of Idaho
July 31 – August 3, 1999
Pullman, Washington**

Biology of Reproduction

Volume 60, Supplement 1

identified as equine inhibin pro- α -C and α N- α C peptide, respectively. In conclusion, partial purification of equine inhibin has been accomplished. It appears that equine inhibin exists in different MW forms as has been demonstrated in other species.

466. EVIDENCE ON THE ASYMMETRIC ABILITY IN THE ESTROGEN SECRETION BY THE RAT OVARIES. R Dominguez¹, Al Barco¹, R Chavira¹, ME Cruz.¹ Biology of Reproduction Research Unit, FES Zaragoza UNAM, Mexico DF, Mexico.¹

The possible existence of asymmetrical ovarian involvement in the estrogen secretion was examined. On the day of estrus of 4-day cyclic rats, after two consecutive estrous cycles, sham operation or hemiovariectomy (left or right ovary extirpated) was performed at 1200 h of the day of estrous and the animals were killed 1 or 2 hours after surgery. Untouched control groups were sacrificed at 1300 or 1400 h. One hour after sham operation, progesterone (22.2 ± 4.3 vs. 23.8 ± 4.6 ng/ml) and 17β -estradiol (19.3 ± 2.8 vs. 16.3 ± 3.0 pg/ml) serum levels, were similar to untouched group. Rats with left ovary in situ showed a diminution in 17β -estradiol serum level (19.3 ± 2.8 vs. 9.5 ± 1.8 , $p < 0.05$) without changes in progesterone level (22.2 ± 4.3 vs. 25.1 ± 4.6). When the right ovary was in situ, 17β -estradiol (17.9 ± 2.6 vs. 8.5 ± 1.3 , $p < 0.05$) and progesterone (21.0 ± 3.0 vs. 11.7 ± 3.0 , $p < 0.05$) serum levels decreased, in comparison with sham operated animals. Two hours after sham operation, progesterone (16.0 ± 4.0 vs. 17.8 ± 3.5) and 17β -estradiol (11.3 ± 1.4 vs. 10.1 ± 2.0) serum levels were similar to untouched control group. 17β -estradiol (11.3 ± 1.4 vs. 12.9 ± 2.6) and progesterone (16.0 ± 4.0 vs. 22.2 ± 3.5) serum level were similar to sham operated animals when the rats kept the left ovary in situ. When the right ovary was in situ, the 17β -estradiol serum levels was lower than in sham operated ones (6.3 ± 0.4 vs. 14.9 ± 2.3 , $p < 0.05$), while progesterone (37.4 ± 11.2 vs. 12.4 ± 2.3 , $p < 0.05$) serum levels increased. These results suggest that ovarian steroidogenesis ability by the left and right ovaries is different when one ovary is extirpated. Supported by DGAPA:IN 208996, CONACYT and PUIS.

467. EFFECT OF ETHANE 1,2-DIMETHYL SULFONATE (EDS) ON ACUTE STEROIDOGENIC REGULATORY PROTEIN (STAR) GENE EXPRESSION AND PROGESTERONE SYNTHESIS IN ACTIVATED MOUSE TUMOR LEYDIG CELLS. Thorsten Diemer^{1,3}, Karen Heid-Hales¹, John Choi¹, Focko Rommerts², Dale Buchanan Hales.¹ Depts of Physiology & Biophysics, Univ of Illinois at Chicago, Chicago, IL¹; Dept of Endocrinology and Reproduction, Erasmus Univ, Rotterdam, Netherlands²; Dept of Urology, Justus Liebig Univ, Giessen, Germany.³

The objective of our study was to evaluate the molecular mechanism responsible for acute inhibition of steroidogenesis in mouse tumor Leydig cells (MA 10) by EDS. EDS has been established as agent inducing specific apoptosis in Leydig cells in rats and mice as well as in cultured MA 10 cells. MA 10 cells were grown in Waymouth's medium with 15% horse serum. Incubation was performed under cAMP stimulation and different concentrations of EDS for 3 and 6 hours. MA 10 cells were lysed after incubation followed by total RNA extraction. StAR expression was detected by hybridization of Northern blots with ³²P-labeled StAR cDNA probes. StAR protein measurements were conducted by Western blotting of total cellular protein by use of a polyclonal anti-StAR antibody. Progesterone production of MA 10 cells was determined by radioimmunoassays. Additional experiments excluded de novo protein synthesis and bypassed the StAR dependant mitochondrial pathway of cholesterol by 22-R-OH-cholesterol. The acute inhibition of steroidogenesis in MA 10 cells by EDS is attributable to immediate suppression of the StAR gene subsequently resulting in the lack of StAR. The inhibitory effect of EDS is independent from de novo protein synthesis and is also evident in pre-stimulated cells. Steroidogenesis can be rescued by R-22. EDS-specific effects on StAR expression and protein are evident before the cells enter into apoptosis excluding apoptotic events as cause of the observed phenomenon. Our results underscore the significance of StAR as a potential target for various pathophysiological events impairing steroidogenesis. StAR function has to be evaluated in the future in the background of testicular disorders present in infertile or hypogonadic patients. (Source of funding: DFG project Di 723/1-1 to T. Diemer (Germany)NIH project HD 35544 to D.B. Hales (USA))

468. STEROIDOGENIC ACTIVITY OF HUMAN GRANULOSA CELLS IMMORTALIZED WITH SV40 LARGE T ANTIGEN. Katsuyasu Ishikawa¹, Makoto Nitta¹, Hidetaka Katabuchi¹, Takashi Ohba¹, Nobuyuki Tanaka¹, Kohei Matsuura¹, Hitoshi Okamura.¹ Dept of Obstetrics and Gynecology, Kumamoto Univ School of Medicine, Kumamoto City, Japan.¹

We immortalized human granulosa cells freshly obtained from the follicular aspirates of ovaries in women with a natural ovulatory cycle, using SV40 large T antigen. Of 28 independently isolated clones, two clones established from one patient grew progressively into lines; GC1a and GC1b. Progesterone and estradiol were secreted by the GC1a line at the early passages (GC1a E), but not by the GC1a line at the late passages (GC1a L) or the GC1b line. The mRNAs of steroidogenic acute regulatory protein and sterol carrier protein 2 were observed in the GC1a E line but decreased in the GC1a L line, as determined by RT-PCR. Incubation of GC1a L cells with 20α -hydroxycholesterol, a soluble intermediate of the cholesterol side-chain cleavage reaction, stimulated progesterone secretion. The addition of 50 ng/ml androstenedione increased progesterone and estradiol production in all three lines. These results show that individual human granulosa cell lines transformed with SV40 progressively lose the steroidogenic activity by multistep transformation. These cell lines provide a new experimental model to study the biological events that govern the steroidogenesis in human granulosa cells.

Abstract View

DIFFERENTIAL EFFECTS OF THE ACUTE CHOLINERGIC BLOCKADE BY ATROPINE SULPHATE (ATR) INJECTION TO HEMIOVARIETOMIZED (HVOX) ADULT RATS, ON PROGESTERONE (P), TESTOSTERONE (T) AND ESTRADIOL (E) SERUM LEVELS

M.E. Cruz^{1,2}; A.I. Barco¹; R. Chavira²; nguez¹." >R. DomÍnguez¹

1. *Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, FES Zaragoza, Mexico, Mexico*

2. *Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirón", México, Mexico*

Acute cholinergic blockade results in an increase in P and E serum levels (Brain Res. Bull, in press). Because there is evidence that the effects of hemiovariectomy (Hov) depends on the ovary in situ, we analyzed the effects of ATR injection immediately after left or right Hov on P, T and E serum levels, one hour after surgery. When the right ovary (RO) was in situ, P serum level was significantly higher than control (21.7 ± 2.8 ng/ml vs. 10.6 ± 2.4 , $p < 0.05$), and ATR injection did not modify it (21.9 ± 1.4). On the other hand, when the left ovary (LO) was in situ, P serum levels were similar to control (11.3 ± 2.4 vs. 10.6 ± 2.4), and cholinergic blockade resulted in a significant increase (19.34 ± 1.2 vs. 11.3 ± 2.4 , $p < 0.05$). Hov resulted in a significant increase in T serum levels (126 ± 10 pg/ml and 165 ± 29 vs. < 2.0 , $p < 0.05$). ATR treatment significantly diminished such increase (< 2.0 and 44.6 , $p < 0.05$). Hov did not modify E serum levels. Cholinergic blockade in turn resulted in a significantly increase, higher when the LO was in situ (35.0 ± 1.6 and 23.3 ± 1.9 pg/ml vs. 10.0 ± 3.4 , $p < 0.05$). Present results suggest that cholinergic innervation plays a different role in the regulation of hormonal secretion by the left and right ovaries.

Supported by: CONACYT 27851-N



Site Design and Programming © ScholarOne, Inc., 2001. All Rights Reserved. Patent Pending.

**PROGRAM
for the
THIRTY-FIFTH ANNUAL
MEETING**

of the

**SOCIETY FOR THE STUDY
OF REPRODUCTION**

**Marriott Waterfront Hotel
July 28–31, 2002
Baltimore, Maryland**

**Biology of Reproduction
Volume 66, Supplement 1**

in monkey ovaries in a coordinated manner, suggesting that the interaction and coordinated regulation of tPA and PAI-1 may also play an essential role in the induction of ovulation in primate.

76. EFFECTS OF CHOLINERGIC BLOCKADE AT ESTRUS ON OVARIAN HORMONES SECRETION. Roberto Dominguez¹, Ana I Barco¹, Roberto Chavira² and Maria E Cruz¹. ¹Biology of Reproduction Research Unit, FES Zaragoza, Mexico City, Mexico; ²Dept of Biology of Reproduction, Instituto Nacional de la Nutrición S.Z., Mexico City, Mexico.

Atropine sulfate (ATR) injection at 1300 h of estrous day blocks ovulation on the next expected estrous day. Such blockade of ovulation is the result of the blockade of LH secretion, but not FSH. Because there is evidence that cholinergic ovarian innervation plays a role in the regulation of ovarian secretion at the beginning of the estrous cycle we analyzed the effects of ATR (300 mg/kg b.w.) injection at 1300 h of the day of estrus on progesterone (P), testosterone (T) and estradiol (E) serum levels, in rats sacrificed 24, 48, 68, or 75 hours after ATR administration. Cyclic untouched rats were used as control. 24 h after treatment P and T concentrations were similar to control animals, while E level was significantly lower (3.6 ± 0.2 pg/ml vs. 12.3 ± 2.5 , $p < 0.01$). 48 h after ATR injection, P level increased (18.2 ± 4.3 (pg/ml) vs. 9.6 ± 1.0 , n.s.), while T level decreased (6.0 ± 3.6 (ng/ml) vs. 36.7 ± 1.3 , $p < 0.01$) and E level was similar to control. 68 h after treatment (day of proestrus at 0900 h) P level was significantly higher than control (26.2 ± 4.2 vs. 4.3 ± 0.7 , $p < 0.01$), T level was lower than control (32.5 ± 1.2 vs. 150 ± 0.7 , $p < 0.01$), as well as E level (6.8 ± 1.8 vs. 28.9 ± 2.6 , $p < 0.01$). At 1700 h of proestrus day (75 h after treatment); P levels were similar to control, while T levels were far below control levels ($T 24.3 \pm 1.3$ vs. 92.5 ± 0.8) and nonsignificant differences were observed in E levels. Present results suggest that the lack of LH preovulatory increase during P afternoon is partially a consequence of ovarian hormone secretion during the estrous cycle. They also support the cholinergic participation in the regulation of ovarian secretion. Supported by CONACYT grant 2785-1.

77. TWO ISOFORMS OF THE ACTIVIN β_A SUBUNIT IN ZEBRA FISH OVARY: mRNA EXPRESSION AND REGULATION BY GONADOTROPIN. Tamara DiMuccio¹, Spencer Mukai¹, Nikki Kohli¹, Eric Clelland¹, Tingting Wu¹ and Chun Peng¹. ¹Department of Biology, York University, Toronto, Canada.

Activins are dimeric proteins consisting of two inhibin β subunits. Homo- and hetero-dimerizations of two β subunits, β_A and β_B , produce three forms of activins, activin-A, -B, and -AB. Our recent studies have suggested that activin-A mediates gonadotropin-induced final oocyte maturation in the zebrafish. To further examine the structure and function of activin-A in the zebrafish ovary, we used primers for conserved regions of the mammalian activin β_A mRNA to amplify zebrafish ovarian cDNA. An expected size of PCR product was ligated into TOPO PCR2.1 vector and several clones were sequenced. Two distinct sets of sequences were obtained, both of which show highest homologies to activin β_A subunits of other species. They were therefore designated as activin β_A isoform 1 and 2. The identities of the two isoforms in the mature peptide region are: 84% at the nucleotide level and 93% at the amino acid level. Isoform 1 shows lower homology with β_A subunits from other species than isoform 2. To determine if mRNA levels of activin β_A isoforms vary in different stages of follicles and if they are regulated by gonadotropin, real-time PCR was performed using the ABI PRISM Sequence Detection System, with SYBR Green I as the reporter fluorescent dye. Analyses of total RNA extracted from different stages of follicles reveal that both isoform mRNAs are expressed in previtellogenic, vitellogenic, and mature follicles, with vitellogenic follicles showing highest mRNA levels. Treatment of follicles with human chorionic gonadotropin (hCG) significantly increased both isoform mRNAs levels. This study demonstrates that there are two activin β_A subunit isoforms expressed in the zebrafish ovary. The finding that activin β_A mRNA levels are up-regulated by hCG further supports the notion that activin-A mediates the action of gonadotropin in the ovary. (Supported by a grant from Natural Science and Engineering Research Council of Canada to CP)

78. REGULATED EXPRESSION AND POTENTIAL ROLE OF PROHIBITIN GENE PRODUCT DURING FOLLICULAR DEVELOPMENT AND ATRESIA IN THE RAT OVARY. Alicia Branch¹, Eric Asselin², Jonathan K Stiles², Benjamin K Tsang³ and Winston E Thompson¹. ¹Department of Obstetrics & Gynecology and Cooperative Reproductive Science Research Center, Morehouse School of Medicine, Atlanta, GA; ²Department of Microbiology Biochemistry and Immunology, Morehouse School of Medicine, Atlanta, GA; ³Department of Obstetrics & Gynecology and Cellular & Molecular Medicine, University of Ottawa and Ottawa Health Research Institute, Ottawa, Canada.

We have previously demonstrated that prohibitin is associated with granulosa cell development and that its expression may, in part, be regulated by gonadotropin. Recently, we have shown that prohibitin content is inversely associated with cell proliferation, but increases during granulosa cell differentiation, and in earlier events of apoptosis in a temperature-sensitive granulosa cell line. In an attempt to extend these observations to examine the role and regulation of prohibitin in follicular cell fate determination in immature rat ovaries, we have used established in vivo models for the induction of follicular development and atresia to provide a comprehensive characterization of the temporal and spatial patterns for prohibitin. Western blot analyses of total