



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES ZARAGOZA

**EFFECTO AGUDO DE LA SECCIÓN UNI O BILATERAL DEL NERVI
OVARICO SUPERIOR SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE HORMONAS
ESTEROIDES : LA RATA PREPUBER COMO MODELO DE ESTUDIO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

VIEYRA VALDEZ, ELIZABETH

ASESOR: MORALES LEDESMA, LETICIA

MÉXICO, D. F.

2007



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.

RESUMEN

La supervivencia de los seres vivos requiere de un mecanismo que permita la producción de nuevas generaciones de la misma especie. Este mecanismo es la reproducción, la cual está definida como la capacidad de producir nuevos individuos. En los vertebrados la reproducción es de tipo sexual. El órgano reproductor primario del macho es el testículo y el de la hembra es el ovario.

Los ovarios tienen dos funciones: la producción de hormonas esteroides (progesterona, andrógenos y estrógenos) y la gametogénesis (producción y liberación de ovocitos viables capaces de ser fecundados). Estas dos funciones se encuentran reguladas por un sistema neuroendocrino el eje-hipotálamo-hipófisis-ovario. Las acciones hormonales de este eje son moduladas por la inervación extrínseca que llega al ovario.

El ovario recibe fibras de naturaleza sensorial, aportadas en su gran mayoría por el nervio vago, y simpáticas provenientes del nervio ovárico superior (NOS) y el plexo ovárico (PO).

Dado que en la rata prepúber no se tiene información sobre los efectos *agudos* de la sección del NOS en la regulación de la esteroidogénesis, en el presente estudio se utilizaron ratas de 32 días de edad y se analizaron los efectos de la sección uni o bilateral del nervio ovárico superior, sobre la concentración sérica de progesterona, testosterona y 17- β estradiol a los 30 minutos, 1, 5, 48, 72 horas post-cirugía o al presentar el primer estro vaginal.

Los resultados mostraron lo siguiente, la laparotomía (utilizada como grupo de comparación) resultó en un retraso de la pubertad, que se acompañó de variaciones en las concentraciones de las hormonas esteroides que dependieron del tiempo transcurrido entre la laparotomía y la autopsia. La sección del NOS izquierdo o la sección de ambos nervios resultó en un retraso de la edad de apertura vaginal, mientras que con la sección NOS derecho se observó una menor cuota de ovocitos liberados por el ovario desnervado.

La concentración de progesterona en los animales con sección del NOS izquierdo varió en función del tiempo transcurrido entre el tratamiento y la autopsia. La sección del NOS derecho resultó en una menor concentración de la hormona en los animales autopsiados 5 horas después del tratamiento.

La concentración de testosterona en ratas con sección NOS izquierdo o sección de ambos nervios varió en función del tiempo transcurrido entre la sección y la autopsia. La sección del NOS derecho resultó en un aumento en la concentración de la hormona 48 horas después del tratamiento, mientras que 72 horas post-cirugía la concentración de la hormona fue menor.

La concentración de estradiol en los animales con sección del NOS izquierdo fue menor una, 5 ó 72 horas después de la denervación. La sección del NOS derecho resultó en una mayor concentración de la hormona 30', 48 horas después del tratamiento o al primer estro vaginal.

En conclusión a partir de nuestros resultados sugerimos que el nervio ovárico superior modula estimulando o inhibiendo la secreción de hormonas esteroides las cuales dependen del nervio seccionado y del tiempo de evolución entre la sección y la autopsia.

ABREVIATURAS

➤ CGRP	Péptido relacionado con el gen que codifica a la calcitonina
➤ DHEA	Dehidroepiandrosterona
➤ EAV	Edad de apertura vaginal
➤ FSH	Hormona folículo estimulante
➤ GC	Ganglio celiaco
➤ GH	Hormona de crecimiento
➤ GnRH	Factor liberador de gonadotropinas
➤ hCG	Hormona coriónica humana
➤ LH	Hormona Luteinizante
➤ NA	Noradrenalina
➤ NOS	Nervio ovárico superior
➤ NPY	Neuropéptido Y
➤ OSB	Operación simulada bilateral
➤ OSD	Operación simulada derecha
➤ OSI	Operación simulada izquierda
➤ PEV	Primer estro vaginal
➤ PO	Plexo ovárico
➤ SBNO	Sección bilateral del nervio ovárico superior
➤ SNOD	Sección del nervio ovárico superior derecho
➤ SNOI	Sección del nervio ovárico superior izquierdo
➤ SP	Sustancia P
➤ TA	Testigo Absoluto
➤ VIP	Péptido intestinal vasoactivo

INTRODUCCIÓN

Los sistemas nervioso y endocrino actúan de manera conjunta en la regulación de los procesos reproductivos. Estos dos sistemas forman el sistema neuroendócrino (Guyton, 2001).

En el eje hipotálamo-hipófisis-ovario participan hormonas hipotalámicas como el factor liberador de las gonadotropinas (GnRH), hormonas hipofisarias (Hormona luteinizante LH y Hormona folículo estimulante FSH) y hormonas ováricas (estrógenos, andrógenos, progestágenos, hormonas peptídicas y factores locales). La secreción de las gonadotropinas depende de la acción de la GnRH sobre la hipófisis. La regulación de la secreción hipofisaria está dada por una retroalimentación inhibitoria y exitatoria, que ejercen los estrógenos y la progesterona (Tresguerres, 2003).

Aunado al control endócrino de las funciones reproductivas, existe un control neural el cual actúa como un regulador puntual de la acción de las hormonas. Así, las gónadas reciben inervación simpática y sensorial que permiten el establecimiento de una comunicación de las gónadas con el sistema nervioso central (SNC) (Burden y Lawrence 1977; Kawakami y col., 1981; Morales y col., 1993, 1998).

La inervación extrínseca del ovario esta conformada por fibras de naturaleza sensorial, simpática y parasimpática. La fibras simpáticas contienen catecolaminas como la noradrenalina (NA) y péptidos como el neuropéptido Y (NPY), que llegan al ovario por dos vías diferentes, el nervio ovárico superior (NOS) y el plexo ovárico (PO) (Burden, 1978; Dissen y Ojeda, 1999). Las fibras sensoriales contienen como neurotransmisores predominantes la sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Ojeda y Lara, 1989; Dissen y Ojeda, 1999) y son transportados por el nervio vago y el plexo ovárico (Ojeda y col., 1983). Además del componente extrínseco se ha descrito un componente intrínseco en el ovario, formado por ganglios de naturaleza noradrenérgica (D'Albora y col., 2002).

En la rata adulta se ha postulado que la información neural que transcurre por el nervio ovárico superior (NOS) modula de manera estimuladora la esteroidogénesis ovárica y facilita el desarrollo folicular. Sin embargo, en la rata prepúber se desconoce el efecto agudo de realizar una sección del NOS sobre la esteroidogénesis ovárica. Por lo que en el presente estudio se utilizó a la rata de 32 días de edad sometida a la sección unilateral o bilateral del NOS y fueron sacrificadas 30', 1, 5, 48 ó 72 h post-sección y un grupo más fue sacrificado al presentar el primer estro vaginal.

MARCO TEÓRICO

EL OVARIO

En la hembra de los mamíferos, el ovario es el sitio de almacenamiento y desarrollo de los ovocitos formados durante la vida embrionaria, fetal ó perinatal. Los ovarios tienen dos funciones principales: la producción de hormonas esteroideas (progesterona, andrógenos y estrógenos) y la gametogénesis (producción y liberación de ovocitos viables capaces de ser fecundados) (Peters y McNatty, 1980). Estas funciones se encuentran reguladas por la influencia de mecanismos hormonales y neurales (Burden, 1978).

En la rata, los ovarios están situados cerca de los riñones a lo largo del borde del músculo lateral y se encuentran rodeados de grasa. Durante la etapa adulta la superficie del ovario es nodular y se encuentra cubierta por una capa monoestratificada de células cúbicas o poliédricas, llamada epitelio germinal (Burden, 1985).

La organización histológica del ovario de los mamíferos es la siguiente:

- **La corteza** es la zona más externa, revestida por el epitelio germinal que contiene todos los ovocitos incluidos cada uno en un folículo. Los cuales se encuentran en diversas fases de desarrollo y algunos de ellos presentan signos típicos de atresia. El estroma circundante se halla formado por elementos de tejido conjuntivo y células intersticiales.

- **La médula** es la parte más interna del ovario, está formada por tejido conjuntivo laxo con fibras elásticas, algunas fibras musculares lisas y numerosos vasos arteriales y venosos de los que se originan pequeñas ramas que se dirigen hacia la corteza. La corteza y la médula se continúan de forma imperceptible sin que exista entre ellas una separación visible (Fawcett, 1995).
- **El hilio** ovárico es la vía a través de la cual los vasos sanguíneos y linfáticos entran y salen del ovario, y se continúa con la médula. Las células hiliares son histológicamente idénticas a las células de Leyding del testículo, se trata de células redondas u ovaladas, con citoplasma granuloso y eosinófilo (Stevens, 1999).

El ovario esta constituido por tres compartimentos funcionales diferentes:

1) *Compartimiento folicular*; 2) *Compartimiento lúteal* y 3) *Compartimiento intersticial*.

1.- El compartimiento folicular: Donde se lleva a cabo el proceso de foliculogénesis (Figura 1) (Tresguerres, 2003).

2.- El compartimiento luteal: Formado por los cuerpos lúteos, tras la ovulación, las células de la granulosa y de la teca interna que quedan se convierten rápidamente en *células luteínicas*, aumentan su diámetro y se llenan de inclusiones lipídicas que les dan un aspecto amarillento. Este proceso se llama luteinización, y el conjunto de la masa de células luteinizadas se denomina cuerpo lúteo (Guyton, 2001). El cuerpo lúteo secreta grandes cantidades de progesterona.

3.- El compartimiento intersticial: Se forma de las células de la teca de aquellos folículos que van a la atresia. En el estroma ovárico se encuentran cuatro clases principales de células intersticiales, que se clasifican por sus características y posición en el ovario en: primarias, tecales, secundaria e hiliares. En respuesta a la acción de la LH, la glándula intersticial secreta andrógenos, principalmente androstenediona y testosterona (Tresguerres, 2003).

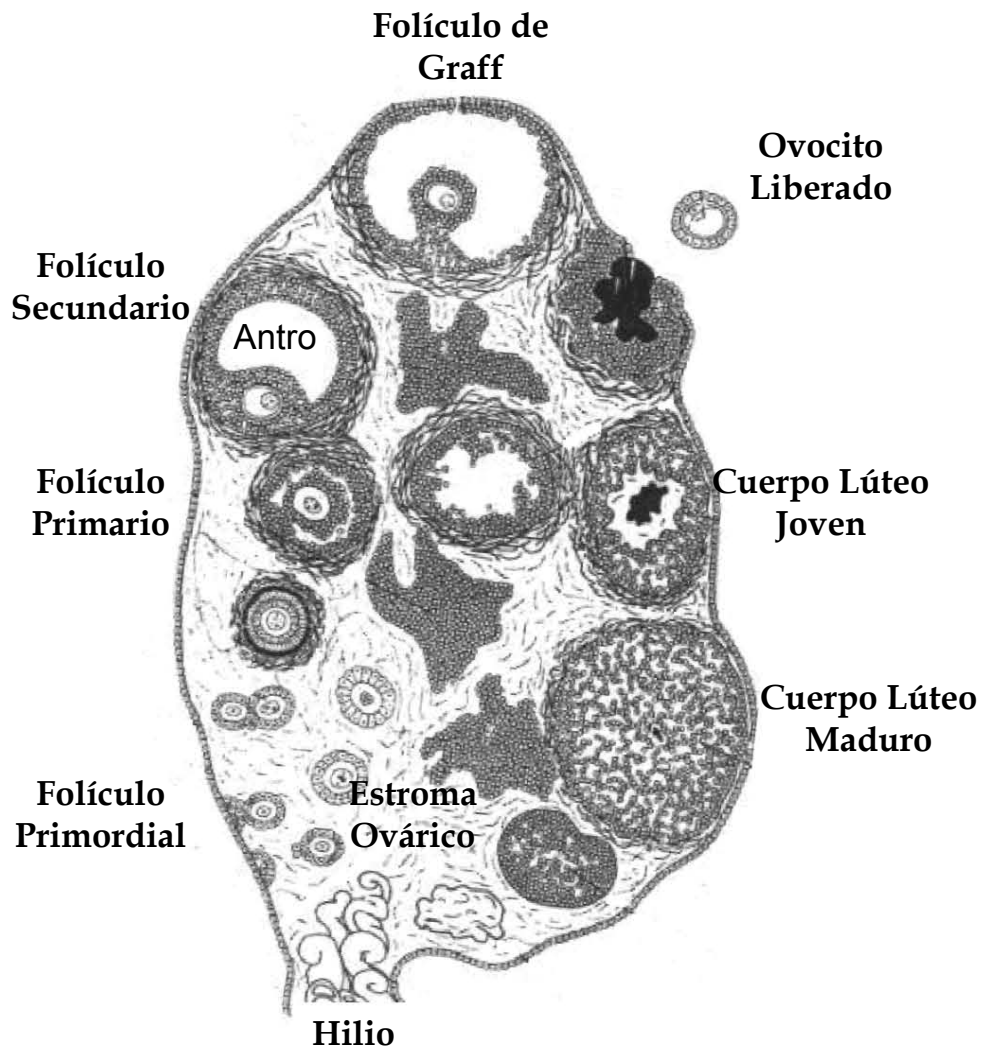


Figura 1. Esquema del ovario de mamíferos, que muestra las diferentes etapas de desarrollo por las que pasa un folículo (Tomado de Goldfien y Monroe, 1998).

DESARROLLO FOLICULAR

La foliculogénesis se define como el proceso que comprende el crecimiento y la maduración de los folículos, desde el momento en que emerge del conjunto o grupo de folículos formado durante la ovogénesis, hasta el momento en el cual es ovulado o entra en atresia. Los estadios por los cuales pasan los folículos permiten clasificarlos en: *folículos primordiales, primarios, secundarios y preovulatorios o de Graaf*. (Tresguerres, 2003).

Las gonadotropinas son las principales hormonas que regulan el proceso del desarrollo folicular. En el ovario, la LH y la FSH modulan la secreción de progesterona y estradiol; la cual estimula la proliferación celular a nivel local lo que favorece el crecimiento y la maduración folicular (Bergman, y col., 1998; Geneser, 2000).

El folículo es la unidad anátomo-funcional del ovario y está constituido por un ovocito, células de la granulosa que rodean al ovocito, la membrana basal que separa a las células de la granulosa de los otros componentes del folículo, las células de la teca que rodean a la membrana basal y se diferencian en una teca interna y otra externa. Conforme crece el folículo aumenta el número de células de la granulosa por mitosis, asimismo entre el ovocito y las células de la granulosa se forma una cavidad antral, por la unión de espacios llenos de líquido folicular incoloro y viscoso (Freeman, 1994; Gore-Langton y Armstrong, 1994) (Figura 2).

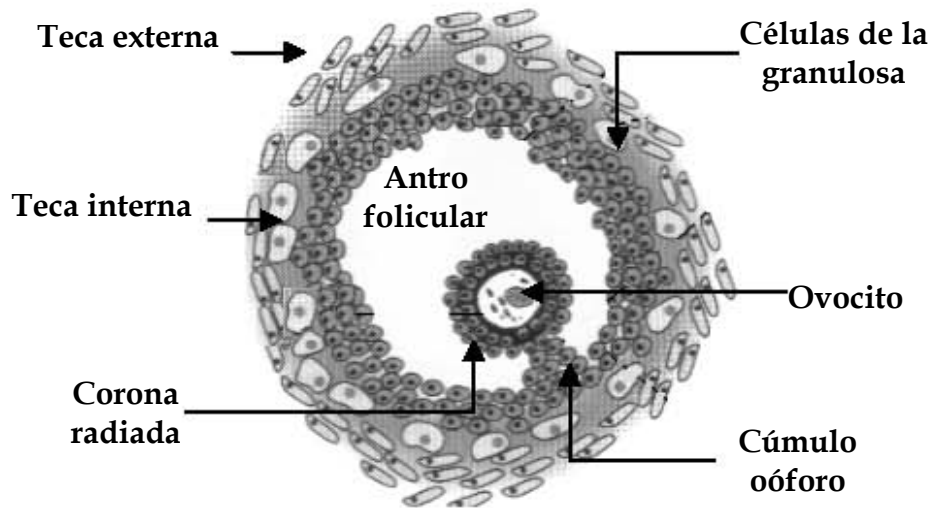


Figura 2. Esquema de las diferentes partes que conforman un folículo (Tomado de Arias, 2003).

Los folículos primordiales se forman durante el periodo embrionario-fetal y en algunas especies después del nacimiento. Este folículo es la unidad reproductiva fundamental del ovario y está formado por un ovocito de alrededor de 25 μm de diámetro rodeado de una membrana basal y por fuera de ella una única capa de células planas de la granulosa, que acompañan al folículo desde su formación. Estos folículos se encuentran principalmente en la periferia de la corteza por debajo de la túnica albugínea (Italo y Pineda, 1988) (Figura 1).

El proceso de transformación del folículo primordial en primario implica el aumento del volumen del ovocito, que casi triplica su tamaño inicial, debido a la síntesis de ADN y proteínas y a la multiplicación de las células de la granulosa que forman de 3 a 5 capas de células cúbicas apareciendo, claramente la zona pelúcida (Italo y Pineda, 1988).

Los folículos primarios o preantrales poseen un diámetro menor a 60 μm , el folículo se aproxima a la médula ovárica, el ovocito aumenta de tamaño y las células foliculares pierden su configuración epitelial aplanada, apareciendo inicialmente con morfología cilíndrica, y prolifera hasta formar dos o tres capas de células de la granulosa de contorno irregular y se forma la teca folicular. El ovocito y las células de la granulosa adyacentes quedan separados por una estrecha hendidura en la que se proyectan microvellosidades. En este espacio o hendidura se acumula un material amorfo que se condensa gradualmente formando la *zona pelúcida*, una capa glucoproteica (Fawcett, 1995; Geneser, 2000) (Figura 1).

Los folículos secundarios o antrales están conformados de varias capas de células de la granulosa. Durante esta etapa se forman espacios entre éstas células por acumulación del líquido folicular, a los cuales se les denomina cuerpos de Call-Exner, que al fusionarse entre sí, forman un espacio amplio dentro de la granulosa, llamando antro folicular. Al mismo tiempo, el compartimiento tecal se diferencia en una teca interna y una externa. La teca interna adquiere una rica vascularización y sus células tienen la capacidad de sintetizar hormonas esteroides, mientras que la teca externa mantiene su naturaleza de tejido conectivo con células musculares lisas (Fawcett, 1995) (Figura 1).

En los folículos de Graaf o preovulatorios el tamaño aumenta considerablemente debido a la acumulación rápida de líquido folicular y alcanza un diámetro mayor a 500 μm . Se caracterizan por una baja tasa mitótica de las células foliculares y una alta relación estrógenos/andrógenos y estrógenos/progesterona en el fluido folicular. Además presentan receptores de LH en células de la granulosa, alta producción de inhibina y mayor flujo sanguíneo que los folículos atresicos. En este estadio del desarrollo es cuando el folículo es capaz de ovular (Geneser, 2000) (Figura 1).

ATRESIA FOLICULAR

Las hembras de los vertebrados nacen con un número finito de ovocitos, la mayoría de los cuales degeneran por atresia (Devine y col., 2000). Se estima que en el humano, más del 99% de los folículos llegan a ser atrésicos, mientras que en el ratón, alrededor del 77% (Byskov, 1978).

La degeneración y pérdida folicular por el proceso de atresia, ocurre en cualquier estadio del desarrollo folicular, desde los primordiales hasta los antrales. Este proceso se da continuamente con cada ciclo reproductivo hasta que desaparecen y ocurre la senescencia reproductiva (Hsueh y col., 1994; Kaipia y Hsueh, 1997; Oliver y col., 1999).

Durante el proceso de atresia folicular se observan cambios morfológicos en el ovocito, las células de la granulosa y células tecaes. En el estadio inicial de atresia, algunas células de la granulosa muestran picnosis nuclear, especialmente las que están en contacto con el antro (Van Voorhis, 1999; Oliver y col., 1999).

En la etapa tardía de atresia, las células de la granulosa no proliferan y comienzan a morir y a descamar en el antro folicular. Las células de la teca se hipertrofian, la membrana basal se fragmenta y los leucocitos invaden el folículo. En éste momento, el ovocito puede presentar fragmentación de la vesícula germinal y mantenerlo en meiosis (Oliver y col., 1999).

Durante el estadio final de atresia, la contracción folicular progresa hasta la casi completa involución del folículo (Van Voorhis, 1999; Oliver y col., 1999), el ovocito degenera y se fragmenta. Los remanentes del folículo atrésico persisten dentro del ovario como estructuras semejantes a una cicatriz (Oliver y col., 1999).

La teca de aquellos folículos atrésicos que desarrollaron receptores a LH forma parte de la glándula intersticial (Greenwald y Roy, 1994).

Los folículos atrésicos se caracterizan por un incremento en la síntesis de androstenediona, como resultado de la hipertrofia tecal. En células de la granulosa disminuye la actividad de las aromatasas y la síntesis de estradiol, como respuesta a la disminución en el número de receptores a las gonadotropinas (Hsueh y col., 1994; Van Voorhis, 1999).

El mecanismo que explica el proceso de atresia folicular es la apoptosis o muerte celular programada de las células de la granulosa (Hsueh y col., 1994; Tilly, 1998; Markstrom y col., 2002).

OVULACIÓN

La ovulación es el proceso por el cual el folículo de Graaf libera un ovocito (Ross y col., 1997) (Figura 1). Para que se lleve a cabo este proceso se necesita que se de el aumento brusco en la concentración de LH seguida de la disminución brusca de la hormona. El aumento en la liberación de LH es precedido por el aumento brusco de estradiol en plasma, lo cual es estimulado por las acciones de la FSH y LH a nivel folicular. En la mujer la liberación del ovocito se da en la mitad del ciclo menstrual, es decir, el día 14 de un ciclo de 28 días (Ross y col., 1997). En la rata, el ciclo estral es de cuatro o cinco días y la ovulación se produce en el día del estro vaginal (Ojeda y Urbanski, 1994).

Para que se produzca la ovulación, en el folículo se observan un conjunto de cambios que posibilitan la expulsión del ovocito:

1) Las células de la teca liberan enzimas proteolíticas, que causan la disolución de la matriz colágena de un punto de la pared folicular con el consiguiente debilitamiento, lo que forma una pequeña protuberancia que recibe el nombre de estigma (una pequeña zona en el centro de la cápsula folicular de la superficie del ovario).

2) Simultáneamente se produce el crecimiento rápido de nuevos vasos sanguíneos en el interior de la pared del folículo, y al mismo tiempo se secretan prostaglandinas (hormonas locales que provocan vasodilatación) en los tejidos foliculares. Estos dos factores producen trasudación de plasma al interior del folículo, que también contribuye a que éste aumente de tamaño. Finalmente, la combinación del aumento de tamaño del folículo con la degeneración simultánea del estigma hace que el folículo se rompa con la consecuente expulsión del óvulo (Guyton, 2001).

ESTEROIDOGÉNESIS

COLESTEROL: EL ORIGEN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES

Todas las hormonas esteroides derivan del colesterol. El colesterol utilizado para la producción de hormonas esteroides deriva principalmente de las lipoproteínas séricas circulantes (LDL y HDL) (Brown y Goldstein, 1976). Las lipoproteínas se unen a receptores específicos de membrana y los complejos lipoproteína-receptor ingresan a las células por endocitosis (Goldstein y col., 1979; Anderson y col., 1977). Las vesículas endocíticas se fusionan con los lisosomas, en los que se hidrolizan los ésteres de colesterol LDL y liberan el colesterol (Brown y col., 1975). El colesterol libre es reesterificado y almacenado en el citoplasma en gotas lipídicas. Cuando se necesita colesterol, los ésteres son hidrolizados y transportados a la mitocondria donde comienza la síntesis de esteroides (Yeh y Adashi, 2001). La proteína transportadora -StAR- traslada el colesterol a través del citoesqueleto a la mitocondria, donde comienza la síntesis hormonal (Yoshinaga, 1999).

Las señales para iniciar la síntesis de hormonas esteroides proceden de la presencia de la LH que al unirse a su receptor en la membrana, activa la síntesis intracelular de AMP-cíclico, que actúa como segundo mensajero en la síntesis hormonal esteroidea.

El primer paso de la síntesis de las hormonas esteroides comienza en la membrana interna de las mitocondrias, donde el número de carbonos disminuye de 27 a 21. La reducción del número de carbonos se produce por oxidaciones catalizadas por enzimas de la familia de los citocromos P450 (Van Voorhis, 1999).

La enzima que actúa en primer lugar es la P450scc (desmolasa), es decir la enzima que corta la cadena lateral de 6 carbonos del colesterol, produciendo ácido isocaproico y pregnenolona. El sistema enzimático que media la transformación es complejo, incluyendo tres enzimas, el citocromo P450scc propiamente dicho, una segunda proteína, la adenoxina, y una flavoproteína (NADPH: adenoxin reductasa), además de fosfolípidos que crean la interacción entre el colesterol y las enzimas. El proceso consume NADPH+H, y oxígeno molecular. El proceso ocurre sin liberación de productos intermediarios (Pedernera, 1993) (Figura 3).

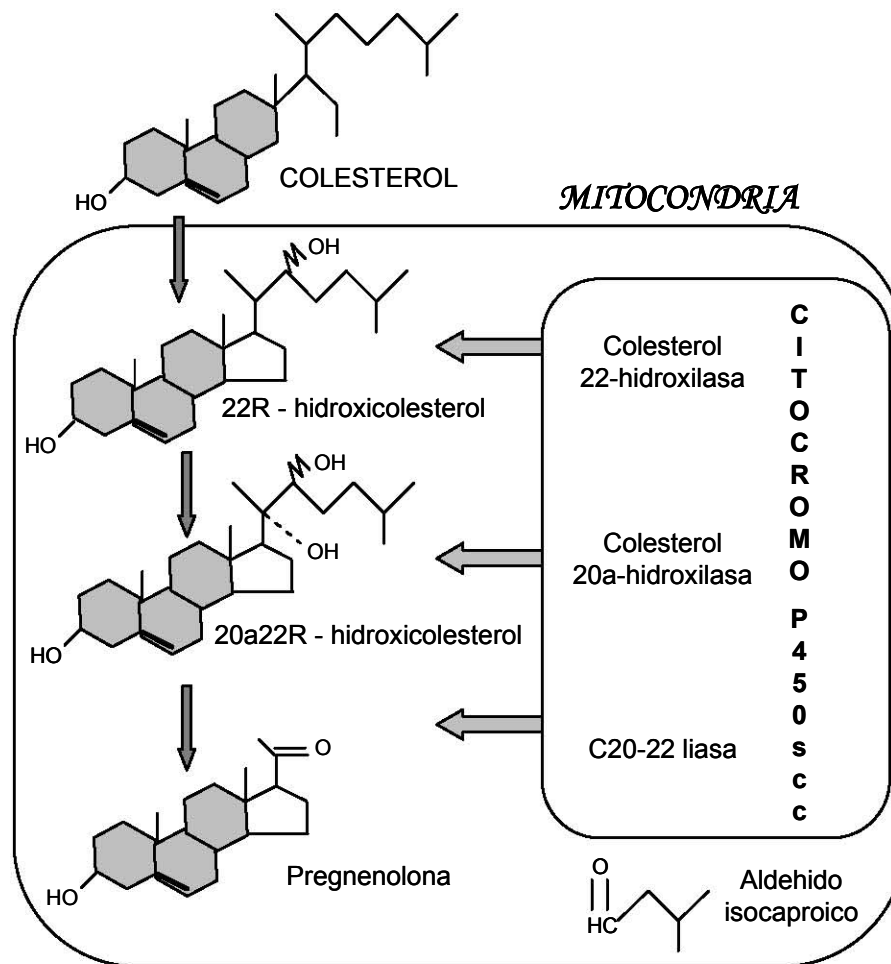


Figura 3. Esquema de la biosíntesis de colesterol y su biotransformación a pregnenolona. (Tomado y Modificado de Pedernera, 1993).

SÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES

Una vez sintetizada la pregnenolona esta puede tomar dos rutas diferentes:

1.- La primer ruta es la vía de la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, que se encarga de la conversión de pregnenolona a progesterona, esta enzima se localiza en el retículo endoplásmico (Van Voorhis, 1999) (Figura 4).

2.- El segundo camino metabólico de la pregnenolona es la vía de la enzima citocromo P450, 17 hidroxilasa, 17,20 liasa (P450c17). La P450c17 se localiza en el retículo endoplásmico de las células esteroideogénicas y es responsable de la conversión de pregnenolona a dehidroepiandrosterona (DHEA). Además la enzima P450c17 puede convertir progesterona a androstenediona. Las dos rutas metabólicas de la pregnenolona son llamadas ruta $\Delta 4$ ó $\Delta 5$ y hacen referencia al número del carbono de la molécula esteroide que presenta el doble enlace (Van Voorhis, 1999) (Figura 4).

La androstenediona es formada en las células de la teca del ovario y se convierte en testosterona por la enzima 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa o en estrógenos por la acción de las aromatasas. La aromatasa (P450arom) actúa en la conversión de androstenediona a estrona o de testosterona a 17β -estradiol (Van Voorhis, 1999) (Figura 4).

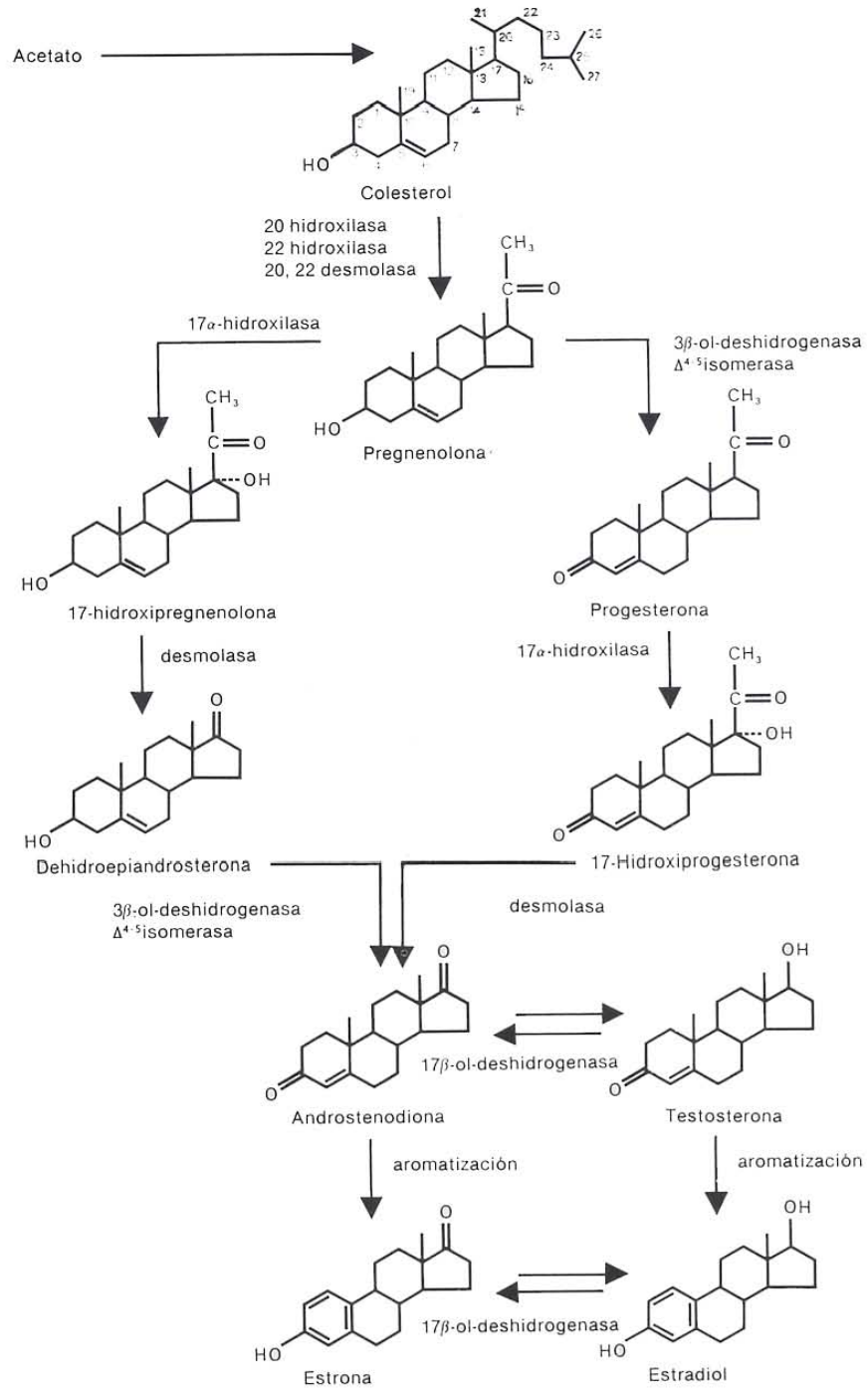


Figura 4. Esquema que muestra las rutas biosintéticas de la esteroidogénesis (Tomado de Van Voorhis, 1999).

Las células de la teca interna tienen las enzimas que les permiten sintetizar andrógenos a partir de la pregnenolona (Figura 5). El paso limitante en la biosíntesis de los andrógenos es la expresión del complejo P450c17, el cual es estimulado por la LH (Van Voorhis, 1999).

Los andrógenos, androstenediona y testosterona, atraviesan la membrana basal y son incorporados al citoplasma de las células de la granulosa. En las células de la granulosa la FSH estimula la síntesis del complejo enzimático aromatasa, lo que posibilita que los andrógenos sean aromatizados a estrógenos (Pedernera, 1993; Gore-Langton y Armstrong, 1994) (Figura 5).

Los andrógenos, principalmente la androstenediona, producidos por la células tecales dependientes de la LH, son el principal sustrato de la síntesis estrogénica en las células de la granulosa dependientes de la FSH. Aunque la estrona deriva de la androstenediona, rápidamente es convertida en estradiol en las células de la granulosa por la enzima 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (Bjersing, 1967).

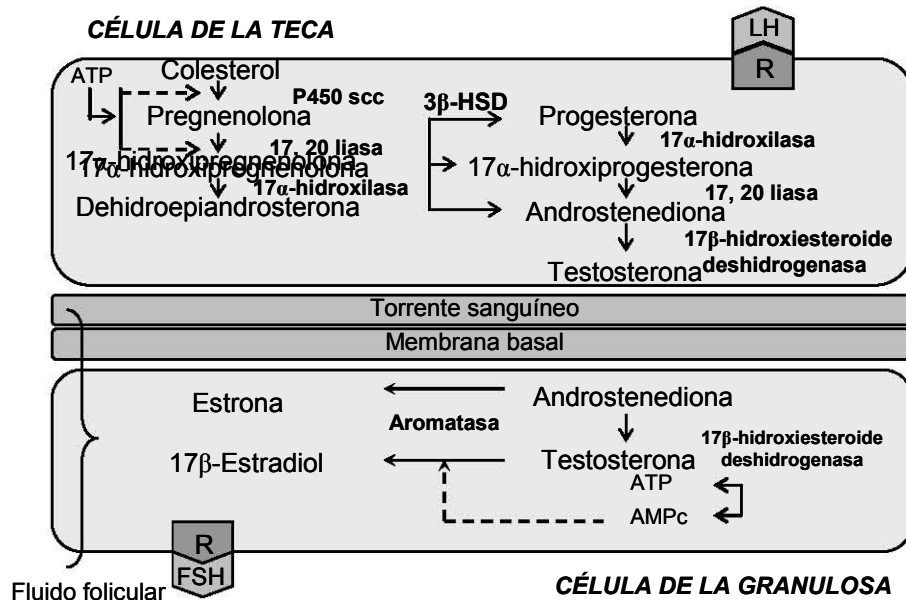


Figura 5. Esquema que muestra el efecto de las gonadotropinas sobre la biosíntesis de hormonas esteroides en las células del folículo (Tomado y modificado de Gore-Langton y Armstrong, 1994).

ETAPAS DEL DESARROLLO POSTNATAL DE LA RATA

La rata nace en un estado de inmadurez equivalente a los 150 días (5 meses) de gestación humana. El desarrollo de los mecanismos que participan en la regulación de la pubertad se producen en un lapso de cinco semanas y en ese tiempo el peso corporal aumenta 15 veces y la longitud del cuerpo tres veces (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

Tomando en consideración parámetros morfológicos y fisiológicos relacionados con los diferentes componentes del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, Ojeda y colaboradores (1980) han propuesto una clasificación de las etapas del desarrollo postnatal de la rata hembra, que abarca desde el nacimiento hasta la apertura vaginal.

Con base en su propuesta el desarrollo prepúberal de la rata hembra se divide en cuatro etapas:

Etapa Neonatal: Esta etapa abarca desde el nacimiento hasta el día 7 de vida y se caracteriza por la insensibilidad del ovario a las gonadotropinas (Peter, 1970). El crecimiento folicular se inicia de forma independiente a las gonadotropinas. La FSH estimula la síntesis de aromatasas y por ello la producción de estradiol a partir de la testosterona. La retroalimentación del estradiol no se establece claramente debido a la elevada concentración plasmática de la α -feto proteína, que se une fuertemente a los estrógenos tornándolos biológicamente inactivos (Raynaud, 1973).

La concentración de FSH empieza a aumentar y la de LH sérica se mantiene igual (Dohler y Wuttke, 1974). Al final de esta etapa se hace evidente la respuesta esteroideogénica del ovario a las gonadotropinas, debido a que entre el cuarto y quinto día comienzan a formarse los receptores de la FSH y dos días más tarde los de la LH (Lamprecht y col., 1976; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

La concentración de prolactina es baja desde el nacimiento. La prolactina es un factor luteotrófico importante, capaz de mantener altas concentraciones de receptores ováricos a LH previamente inducidos por la FSH, también se ha descrito que tiene acción a nivel hipotalámico aumentando la tasa de recambio de dopamina (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

Etapa Infantil: Esta etapa abarca del día 8 al 21 de vida. Esta caracterizada por el aumento en la concentración de FSH, que alcanza su máxima concentración a los 12 días de edad y declina gradualmente a partir del día 15, y por la presencia de elevaciones esporádicas de la concentración de la LH especialmente en las horas de la tarde. A medida que finaliza la etapa las elevaciones esporádicas dejan de producirse y la concentración tiende a disminuir (Dohler y Wuttke, 1974; Mackinnon y col., 1976; Wuttke y col., 1980). El aumento en la FSH estimula el crecimiento de los folículos que van a llegar a ovular en la pubertad (Ojeda y col., 1980; Hage y col., 1978).

Etapa juvenil: Esta etapa abarca de los 22 a los 32 días de vida. A partir de esta etapa la concentración de FSH ha disminuido sensiblemente y en su comienzo las concentraciones de LH son bajas y constantes. A nivel ovárico se observa un aumento en el número de receptores a LH (Smith-White y Ojeda, 1981) que junto con el patrón de secreción pulsátil de la LH se traduce en una mayor esteroidogénesis. Hacia el final del periodo la concentración basal de LH es mayor que en las etapas anteriores así como la amplitud de los pulsos que se producen durante la tarde, lo que establece un ritmo de secreción circadiano (Andrew y Ojeda, 1981; Meijs-Roelofs y col., 1983; Urbanski y Ojeda, 1983). Este hecho parece estar dirigido por el hipotálamo y no por los esteroides circulantes. El aumento gradual de la concentración de prolactina y la hormona de crecimiento (GH) facilita la acción estimuladora de las gonadotropinas (Ojeda y col., 1986).

Etapa Peripuberal: Esta etapa inicia en el día 33 de vida y culmina con la primera ovulación. En esta etapa se establece clara y regularmente el ritmo circadiano de LH, aumenta la frecuencia de sus pulsos de secreción lo que estimula el aumento en la producción de estradiol por parte de los ovarios. En el ovario se observa un número máximo de receptores para FSH y LH, lo que se traduce en una máxima respuesta esteroideogénica de la gónada (Ojeda y Urbanski, 1988).

En esta etapa las concentraciones de estradiol, progesterona y testosterona son mayores que en las etapas anteriores. Las concentraciones elevadas de los esteroides estimulan la liberación de GnRH por parte del hipotálamo la cual actúa sobre la adenohipófisis y estimula la liberación de FSH y LH, los que ejercen su función sobre el ovario que resulta en la primera ovulación (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

LA PUBERTAD EN LA RATA

La pubertad se define como la etapa biológica en la que el individuo pasa de la inmadurez a la madurez sexual (Ramírez, 1973; Ramaley, 1980). En esta etapa se produce la maduración anatómica y fisiológica del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. El inicio de la pubertad depende de la información genética particular de cada individuo y de factores externos como la nutrición, el estímulo social, el fotoperíodo la temperatura ambiental y las feromonas (Ramírez, 1973; Ojeda y Urbanski, 1994; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

Dependiendo de la especie, en la rata hembra desde el nacimiento hasta alcanzar la pubertad transcurren entre 35 y 40 días. El signo exterior que señala el comienzo de la función reproductora es la apertura vaginal, la cual ocurre el día posterior a las elevaciones bruscas en la concentración de gonadotropinas y el frotis vaginal muestra células cornificadas típicas del primer estro (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

Conforme el animal se acerca a la pubertad se producen una serie de cambios a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Por parte del hipotálamo se incrementa la secreción de la GnRH, que estimula la secreción de LH y FSH por la hipófisis lo que da como resultado final un aumento en la secreción de estrógenos por parte de los ovarios (Foster y Ebling, 1999).

Según Ojeda y Urbansky (1994) la serie de eventos que culmina con la apertura vaginal y la primera ovulación se caracteriza por cambios morfológicos y fisiológicos en el útero, los ovarios y la vagina que son indicativos de que esta por iniciarse la *pubertad*. La etapa puberal se divide en las siguientes fases:

- **Anaestro:** Corresponde a la fase en la cual hay un incremento en el número de receptores a LH. En esta fase los animales tienen 30-32 días de edad, el útero es pequeño con un peso menor a 100 mg y no contiene fluido intrauterino. La vagina se mantiene cerrada.

- **Proestro temprano:** Los animales presentan un útero grande con un peso entre 120-190 mg lo cual se debe a la presencia de líquido intrauterino, la vagina aún se mantiene cerrada.

- **Proestro tardío:** Esta fase corresponde al día del primer proestro. Los animales presentan un útero balonado, es decir con bastante fluido intrauterino lo que hace que éste órgano alcance el peso máximo mayor a 200 mg. En los ovarios se observan folículos preovulatorios. En la tarde de ese día se observa la máxima concentración de estrógenos, lo que estimula la secreción de GnRH, y por ende el pico preovulatorio de las gonadotropinas las cuales estimulan la maduración final de los folículos y la ovulación. La vagina aún permanece cerrada.

- **Estro:** El útero es pequeño y no presenta fluido. Se presenta el día de la primera ovulación, por lo cual se encuentran cuerpos lúteos recién formados, la vagina se abre y en la citología vaginal se observan células cornificadas.

- **Primer diestro:** Esta fase de la pubertad se caracteriza por la presencia de cuerpos lúteos maduros en los ovarios, además en la citología vaginal predominan los leucocitos.

INERVACIÓN OVÁRICA

INERVACIÓN EXTRÍNSECA DEL OVARIO

El ovario posee tanto inervación intrínseca como extrínseca. La inervación intrínseca se conforma de ganglios, algunos de los cuales son catecolaminérgicos (Dees y col., 1995; D' Albora y col., 2002). La inervación extrínseca del ovario está conformada por fibras simpáticas, parasimpáticas y sensoriales derivadas de neuronas que se encuentran en el sistema nervioso periférico y hacen multisinapsis con el SNC (Burden y col., 1983; Gerendai y col., 1998; Klein y Burden, 1988). Las fibras nerviosas que llegan al ovario inervan los diferentes compartimentos ováricos incluyendo vasos sanguíneos, glándula intersticial y folículos en crecimiento (Owman y col., 1992; Dissen y Ojeda 1999). La inervación ovárica simpática proviene de los ganglios celiaco y mesentérico y de los nervios espláncnicos lumbares (Dissen y Ojeda, 1999). La inervación simpática llega al ovario por medio de el nervio ovárico superior (NOS) y del plexo ovárico (PO).

NERVIO OVÁRICO SUPERIOR

El nervio ovárico superior (NOS) se origina en el ganglio celiaco mesentérico superior y está asociado con el ligamento suspensorio. Sus fibras penetran al ovario por medio del hilio, inervan la glándula intersticial y células de la teca interna. El NOS posee una cubierta de peritoneo y aproximadamente 200 axones no mielinizados embebidos en una fina matriz de tejido conectivo. Los axones mielinizados son más frecuentes en el plexo ovárico que en los nervios del ligamento suspensorio (Burden, 1978; Lawrence y Burden 1980) (Figura 6).

En el NOS hay fibras de naturaleza noradrenérgica, vipérgicas y otras que liberan el neuropéptido Y (NPY). Estos neurotransmisores participan en la regulación de la síntesis de las hormonas esteroideas ováricas.

Las fibras que contienen VIP se distribuyen en el tejido intersticial del ovario de la rata y se encuentran asociadas con las células de la teca y con los folículos en desarrollo (Davoren y Hsueh, 1985; Dees y col., 1986). En células de la granulosa de ovarios de ratas fetales o neonatales, el VIP estimula la actividad de las aromatasas lo que resulta en una mayor síntesis de estradiol (Ahmed y col., 1986). Debido a que en los primeros cuatro días de vida, el ovario no presenta receptores a gonadotropinas, se ha propuesto que el VIP podría ser uno de los factores que inicia la diferenciación de los folículos (George y Ojeda, 1987). El NPY estimula la liberación de Noradrenalina (Ferruz y col., 1992)

La noradrenalina (NA) modula el efecto estimulador de las gonadotropinas sobre la secreción de esteroideas (Aguado y col., 1982; Hsueh y col., 1984; Ojeda y Lara, 1989). Las catecolaminas estimulan la esteroidogénesis ovárica vía la activación de los receptores β - adrenérgicos, lo que se traduce en una mayor síntesis de progesterona por parte de las células de la granulosa y luteales (Adashi y Hsueh, 1981; Weiss, y col., 1982; Aguado y Ojeda, 1984), y a su vez en una mayor secreción de andrógenos por parte de las células de la teca.

PLEXO OVÁRICO

El plexo ovárico viaja a lo largo de la arteria ovárica (Dissen y Ojeda, 1999) y está formado por una red de fibras nerviosas que revisten la arteria y la vena ovárica, inerva el oviducto, al ligamento ancho uterino y al ovario. Las fibras que inervan al ovario se originan a nivel de la médula a partir del segmento T10, mientras que las que inervan a los oviductos corresponden a T11-T12 y L1 (Lawrence y Burden,

1980). El plexo ovárico recibe fibras nerviosas proveniente de la parte pélvica del plexo hipogástrico y de las fibras preganglionares de los nervios sacros S3-S4 (Burden, 1978) (Figura 6).

Las fibras del PO tienen una distribución predominantemente perivascular y se encuentran más relacionadas con el flujo sanguíneo (Lawrence y Burden, 1980; Burden, 1985). En este nervio hay fibras con sustancia P (SP) que es un neurotransmisor clásico de las fibras sensitivas (Garraza y col., 2004).

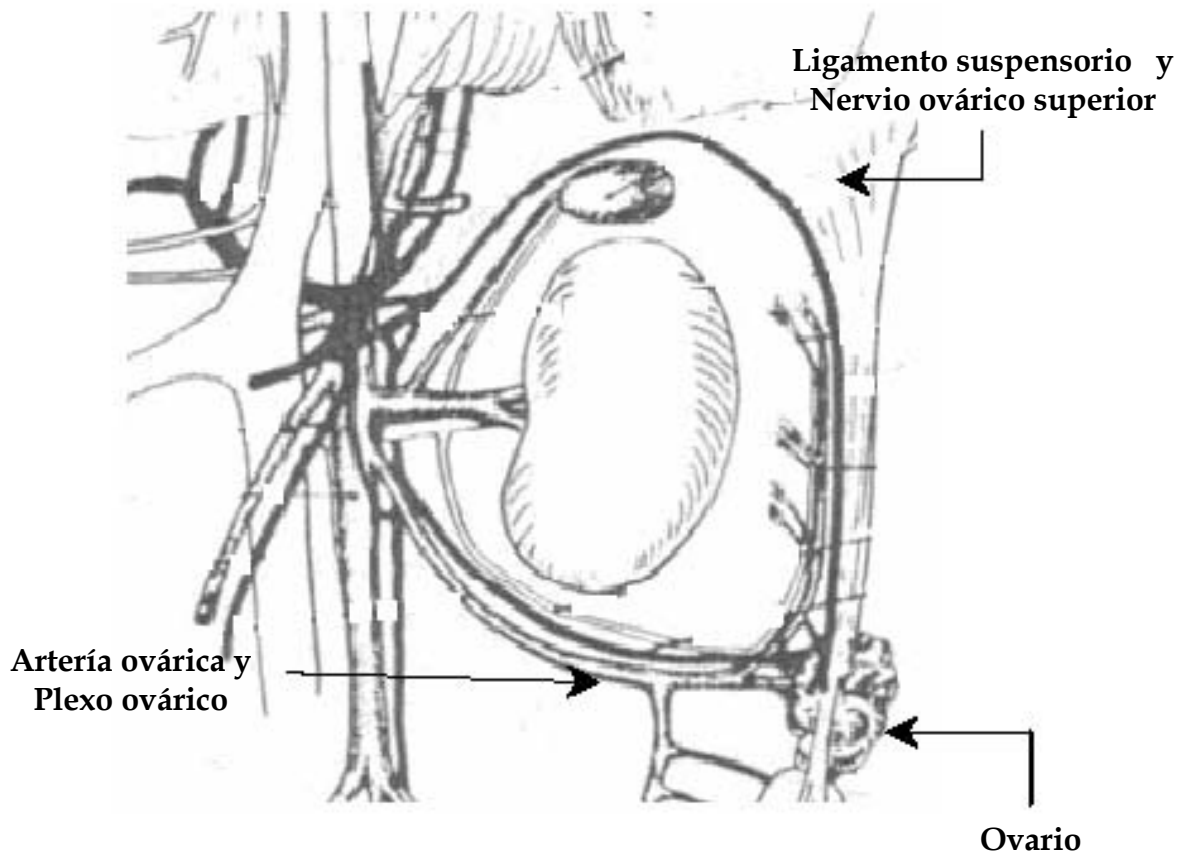


Figura 6. Esquema que muestra la inervación extrínseca del ovario conformada por nervio ovárico superior y el plexo ovárico.(Modificado de Lawrence y Burden 1980).

INERVACIÓN INTRÍNSECA

En varias especies de animales, incluido el humano, se ha mostrado la presencia de neuronas ováricas intrínsecas. La primera demostración fue en monos *reshus* y macaco japones (Dees y col., 1992,1995; Anesetti y col., 2001; D'Albora y col., 2000,2002;).

En el ovario de la rata se ha identificado un componente neural intrínseco en forma de ganglios bien desarrollados localizados en el mesoovario y en el hilio. También se han observado neuronas en la corteza y médula pero de una forma dispersa, aunque se pueden presentar algunos ganglios. En los ganglios mesoováricos los cuerpos neuronales son esféricos y multipolares, forman agregados pequeños y paquetes de fibras nerviosas. En el hilio y la médula, se pueden observar ganglios bien definidos parecidos a cadenas asociados a vasos sanguíneos que corren a lo largo del tejido conectivo. Los ganglios que se encuentran en la corteza presentan células redondas, pequeñas, con pocas dendritas, con arreglo polar y algunas veces, neuronas de forma irregular. También pueden observarse algunas neuronas en el tejido intersticial que rodea a los folículos (D'Albora y col., 2000).

En la rata, la presencia de neuronas intraováricas parece depender de la cepa y de la edad. El grupo de D'Albora identificó neuronas en el ovario de ratas de la cepa Wistar, pero no en la cepa Sprague-Dawley o Long-Evans. El número de neuronas disminuye conforme avanza la edad del animal. Estas neuronas son de naturaleza catecolaminérgica y por tanto podrían estimular la esteroidogénesis en conjunto con la inervación simpática extrínseca (D'Albora y col., 2000, 2002).

INERVACIÓN SENSORIAL

El ovario recibe inervación sensorial y en menor cantidad fibras de naturaleza parasimpática. Las fibras sensoriales que se localizan en el ovario, se originan en los segmentos T9-T11 y L2-L4 de la médula espinal y arriba al órgano por el plexo ovárico. La inervación parasimpática que recibe el ovario proviene del nervio vago y de los niveles S2-S4 de la médula espinal, vía plexo hipogástrico, aunque éste último no se ha descrito que exista en la rata (Burden 1978). Con el uso de técnicas de trazadores retrógrados se ha podido mostrar que el soma de las neuronas de los nervios que inervan al ovario y que provienen del nervio vago, se localizan en el ganglio nodoso y en las células ganglionares de la raíz dorsal de los segmentos T10 a L12, lo que permite sugerir que parte de los nervios ováricos, especialmente los parasimpáticos son de naturaleza sensorial (Burden, 1985).

PARTICIPACIÓN DE LA INERVACIÓN SIMPÁTICA EN LA REGULACIÓN DE LAS FUNCIONES OVÁRICAS

Se ha postulado que la NA y el VIP regulan la síntesis de los receptores a FSH y LH (Mayerhofer y col., 1997). Según Dissen y Ojeda (1999) la distribución inicial de las fibras nerviosas hace pensar en una relación estrecha entre la presencia de las mismas y el inicio de la foliculogénesis

Las fibras VIPérgicas se distribuyen en la glándula intersticial del ovario de rata y están asociadas con las células de la teca y el folículo en desarrollo (Dees y col., 1986). El VIP estimula el crecimiento de la población de células inmaduras debido a la presencia de receptores peptidérgicos en la célula (George y Ojeda, 1987).

En el ovario de la rata recién nacida los primeros folículos que se forman carecen de receptores a gonadotropinas, razón por la cual se ha propuesto que el inicio de la foliculogénesis es mediado por la inervación que llega al ovario, aseveración apoyada por la presencia de fibras inmunoreactivas a la tiroxina-hidroxilasa (TH) (por lo que se presume que son de naturaleza catecolaminérgica) que inervan al ovario a partir del día 19 de vida prenatal (Malamed y col., 1992). Además se ha encontrado que los mecanismos intracelulares que median las acciones de las gonadotropinas en sus células blanco, son funcionales antes de que la gónada adquiera la capacidad de responder a la LH o FSH (Mayerhofer y col., 1997).

EFFECTO DE LA DENERVACIÓN SIMPÁTICA SOBRE LAS FUNCIONES OVÁRICAS

A partir de los resultados de diversos estudios se sugiere que la inervación simpática participa en la regulación de la ovulación, el desarrollo folicular y la esteroidogénesis ovárica (Lawrence y Burden, 1980; Aguado y Ojeda, 1984a,b; Morales y col., 1993; De Bortoli y col., 1998, 2000; Morán y col., 2000; Sosa y col., 2000,2004; Delgado y col., 2004, 2006).

En la rata adulta la sección bilateral del NOS, provoca la disminución de 50% en el contenido de noradrenalina ovárica (Lawrence y Burden, 1980). Un resultado semejante se observa cuando la sección del nervio se realiza en la rata prepúber, donde la caída de la amina es del 60%, acompañada por un incremento en el número de receptores β -adrenérgicos y un descenso agudo de la concentración de progesterona, sin que se observen modificaciones en el inicio de la pubertad y la primera ovulación (Aguado y Ojeda 1984a).

Aguado y Ojeda (1984b) mostraron en ratas adultas que la sección bilateral del NOS realizada en la mañana del proestro, resulta en un descenso de la concentración de progesterona y estrógenos minutos después de la sección. Esta disminución se acompaña de una caída en la concentración de NA ovárica. Estos resultados han sido interpretados como que el NOS facilita la secreción de esteroides por el ovario.

La estimulación eléctrica del NOS resulta en el aumento del contenido de progesterona, lo cual se puede revertir por la administración de fentolamina un antagonista de los receptor alfa-adrenérgicos (Weiss y col.,1982).

En la rata prepúber la sección del NOS izquierdo resulta en una menor concentración de noradrenalina en ambos ovarios, la cual incluso llega a no ser detectable en el ovario denervado. Con la sección del NOS derecho, la concentración de noradrenalina disminuyó sólo en la gónada desnervada, mientras que con la sección bilateral disminuyó en ambos ovarios (Chávez y col., 1994; Morales, 1996).

En ratas adultas la sección derecha o bilateral del NOS reduce la tasa ovulatoria y el número de ovocitos liberados por el ovario denervado. A partir de estos resultados, los autores sugieren que la inervación que llega al ovario a través del NOS modula la ovulación espontánea y que además la actividad de éste nervio es lateralizada (Chávez y col., 1991).

Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que tanto en la rata adulta como en la prepúber la sección bilateral del NOS no modifica la cuota ovulatoria espontánea (Chávez y col., 1991; Morales y col., 1993). Cuando se realiza la sección unilateral del nervio, la gónada denervada libera un número menor de ovocitos. Este tipo de sección realizada en la rata prepúber provoca que en la gónada intacta se presente una respuesta compensadora semejante a lo que ocurre en el animal hemicastrado (Morales y col., 1993).

La sección bilateral del NOS a los cuatro días de edad (etapa neonatal), resulta en el retraso de la edad de apertura vaginal y del primer estro vaginal, lo que se puede explicar por la disminución en la concentración de estradiol. Cuando los animales son sacrificados a los 30, 35 ó 60 días de edad no hay cambios en las concentraciones séricas de LH, mientras que las de FSH disminuyen de manera significativa. Los autores postulan que durante la etapa neonatal la información que transcurre por el NOS es fundamental para que se de la regulación de la función ovárica en el animal adulto (Forneris y Aguado, 2002).

Estudios recientes muestran que existe una conexión neural entre el sistema nervioso central y el ovario que contribuye a la regulación de las funciones de la gónada. En estudios *in vitro*, De Bortoli y colaboradores (2000) mostraron que en el día del diestro 2 la estimulación adrenérgica central llega al ovario por el NOS, estimulando la secreción de progesterona y androstenediona de manera asimétrica y que la inyección intracerebroventricular de NA tiene un efecto inhibitorio en la liberación *in vitro* de progesterona y androstenediona.

Diversos estudios muestran la existencia de la comunicación neural entre el ovario y varios centros del SNC, a través de los ganglios simpáticos (Gerendai y col., 1998; Sosa y col., 2000, 2004; Delgado y col., 2004, 2006).

Estudios de Gerendai y colaboradores (1998) utilizando la técnica de trazadores virales, mostraron la primer evidencia morfológica de la existencia de una comunicación neural entre el ovario y ganglios simpáticos.

Estudios realizados por el grupo de Sosa y colaboradores (2000, 2004) mostraron que la estimulación *in vitro* del ganglio celiaco con agentes colinérgicos y adrenérgicos estimulan la liberación de progesterona por parte del ovario izquierdo y que los resultados varían dependiendo del día del ciclo estral en el que se obtienen los ovarios.

La estimulación *in vitro* del ganglio celiaco con agentes colinérgicos ó adrenérgicos modifican la liberación de esteroides ováricos en la rata prepúber por la acción del oxido nítrico (ON), el cual es un neurotransmisor que se localiza en el ovario y junto con la inervación simpática regulan la esteroidogénesis ovárica de la rata prepúber (Brann y col., 1997; Motta y col., 2001; Delgado y col., 2004, 2006).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A partir de las evidencias descritas se desprende que la información neural que transcurre por el nervio ovárico superior modula de manera estimuladora la esteroidogénesis ovárica.

En el modelo de la rata adulta se ha postulado que el nervio ovárico superior modula de manera diferencial la esteroidogénesis ovárica. Sin embargo se desconoce los efectos inmediatos que provoca la denervación en la rata prepúber, sobre la esteroidogénesis.

Por lo que en el presente trabajo se utilizó a la rata juvenil como modelo de estudio y se evaluaron los efectos agudos de la sección uni o bilateral del nervio ovárico superior sobre la secreción de progesterona, testosterona, 17 β -estradiol, el inicio de la pubertad y la ovulación espontánea.

HIPÓTESIS

La inervación simpática aportada por el nervio ovárico superior modula de manera estimulante la secreción de hormonas esteroides por parte del ovario, por lo que la eliminación unilateral o bilateral del nervio, producirá decremento agudo en las concentraciones séricas de las hormonas esteroides.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto agudo de la sección del nervio ovárico superior sobre la respuesta esteroidogénica del ovario.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar los efectos de la sección unilateral o bilateral del Nervio Ovárico Superior, realizada al final de la etapa juvenil, sobre el inicio de la pubertad y la ovulación espontánea.
2. Estudiar el efecto agudo de la sección unilateral o bilateral del Nervio Ovárico Superior, realizada al final de la etapa juvenil, sobre la concentración de progesterona, testosterona y 17- β estradiol.
3. Estudiar el efecto agudo de la sección unilateral o bilateral del Nervio Ovárico Superior, realizada al final de la etapa juvenil, sobre las variaciones del peso de los ovarios y el útero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras prepúberes de la cepa CIIZ-V mantenidas bajo condiciones controladas de iluminación, 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h.) y temperatura de 22 ± 2 °C. En todos los casos se siguió lo establecido por la Ley Mexicana de Protección Animal para el uso de Animales de Experimentación.

Al nacimiento los animales fueron distribuidos en grupos de cinco hembras y un macho por caja, con libre acceso a la madre hasta el momento del destete (21 días), y con agua y alimento *ad libitum*. A los 32 días de edad las hembras fueron asignadas al azar a uno de los siguientes grupos experimentales:

♣ Grupos con operación simulada (OS)

Hembras de 32 días de edad fueron anestesiadas con éter etílico, se les realizó una incisión lateral de 1 cm que abarcó piel y músculo (Laparotomía), sin tocar órganos internos. Terminada la laparotomía se suturó la herida.

♣ Grupos con sección unilateral del Nervio Ovárico Superior (SNO)

Como en el caso anterior y una vez realizada la incisión de piel y músculo se exteriorizó el ovario, se identificó el ligamento suspensorio y se seccionó el Nervio Ovárico Superior Izquierdo (SNOI) o Derecho (SNOD). El ovario se regresó de nuevo a la cavidad abdominal y se suturó la herida.

♣ **Grupo con sección bilateral del Nervio Ovárico Superior (SBNO)**

En este caso se seccionaron el nervio ovárico superior izquierdo y derecho de la misma manera que en los grupos experimentales anteriores.

♣ **Grupo Testigo Absoluto (TA)**

Consistió de animales intactos que fueron sacrificados a los mismos tiempos que los grupos experimentales (30', 1, 5, 48 ó 72 h post-cirugía o al presentar el primer estro vaginal).

Procedimiento de la autopsia

Los animales fueron pesados y sacrificados por decapitación a los 30', 1, 5, 48 ó 72 h posteriores a la denervación y un grupo más se sacrificó en la mañana del día del primer estro vaginal

Se colectó la sangre del tronco, que se mantuvo a temperatura ambiente durante 30' y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min. Se separó el suero del botón celular, se depositó en tubos eppendorf y se almacenaron a -20 °C hasta el momento en que se realizó la cuantificación de progesterona, testosterona y 17 β-estradiol.

En los animales con sección uni o bilateral del nervio ovárico superior (NOS) se verificó que el ovario unido al útero se encontrara libre en la cavidad abdominal. Se disecaron los oviductos y se buscó la presencia de ovocitos, los cuales fueron contados con la ayuda de un microscopio estereoscópico, siguiendo la metodología habitual del laboratorio (Morales y col, 1993). Se disecaron y pesaron los ovarios y el útero.

Cuantificación de hormonas esteroides

Las concentraciones de progesterona, testosterona y 17 β -estradiol fueron cuantificadas por radioinmunoanálisis (RIA) de fase sólida, mediante reactivos comerciales (Coat-A-Count). En tubos de polipropileno (que ya contienen el anticuerpo específico: anti-progesterona- I^{125} o anti-estradiol- I^{125}), se adicionó la muestra problema (100 μ l de suero) y un ml de hormona radioactiva (I^{125}). Para facilitar la reacción, se agitó la mezcla en un vortex durante un minuto y se incubó tres horas a temperatura ambiente, se decantó la muestra, se removió el exceso de líquido y se determinó la concentración de hormona en la muestra problema con la ayuda de un contador de rayos gama modelo Cobra 5005, PckardTM, en función de las cuentas por minuto y de una curva de calibración.

La cuantificación de hormonas se realizó en el laboratorio de Hormonas Esteroides del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zuribán”.

Análisis Estadístico

Los resultados del número de ovocitos liberados, la edad de apertura vaginal y del primer estro se analizaron por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida por U de Mann-Whitney. El peso de los ovarios, el útero y las concentraciones de progesterona, testosterona y estradiol fueron sometidos a un Análisis de Varianza Multifactorial (ANDEVA) seguido de la prueba Tukey. Cuando se compararon dos grupos experimentales, se utilizó la prueba de ‘t’ de Student. La tasa ovulatoria, definida como el número de animales ovulantes/número total de animales, se analizó por las pruebas de probabilidad exacta de Fisher o de J_i^2 .

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

EXPERIMENTO 1

Efectos de la laparotomía unilateral o bilateral sobre el inicio de la pubertad y las funciones ováricas

Inicio de la Pubertad

En comparación con su grupo testigo, la operación simulada unilateral o bilateral no modificó el peso corporal de los animales sacrificados al primer estro vaginal, pero se observó un retraso significativo en la edad de apertura vaginal (inicio de la pubertad). Los animales con operación simulada tardaron el mismo tiempo para presentar el primer estro que los animales testigo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Media \pm e.e.m del **peso corporal**, **edad de la apertura vaginal (EAV)** y del **primer estro vaginal (PEV)** de los grupos testigo absoluto (TA), con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB), realizada a los 32 días de edad y sacrificados el día del primer estro vaginal.

<i>Grupo</i>	<i>n</i>	<i>Peso Corporal (gramos)</i>	<i>EAV (días)</i>	<i>PEV^a</i>
TA	18	105.4 \pm 2.5	33.6 \pm 0.3	1.42 \pm 0.4
OSI	10	101.0 \pm 3.5	37.2 \pm 0.6♣	0.8 \pm 0.5
OSD	10	110.9 \pm 3.2	38.0 \pm 0.8♣	2.2 \pm 0.8
OSB	9	105.2 \pm 3.8	35.6 \pm 0.6♣	1.3 \pm 0.58

^aRepresenta los días transcurridos entre la apertura vaginal y la aparición del primer estro

♣ p< 0.05 vs. TA (Prueba de Kruskal Wallis, seguida por la prueba de U de Mann-Whitney).

Respuesta Ovulatoria

La operación simulada unilateral o bilateral, no modificó la proporción de animales que ovularon espontáneamente en el día del primer estro vaginal, ni el número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo o derecho (Cuadro 2).

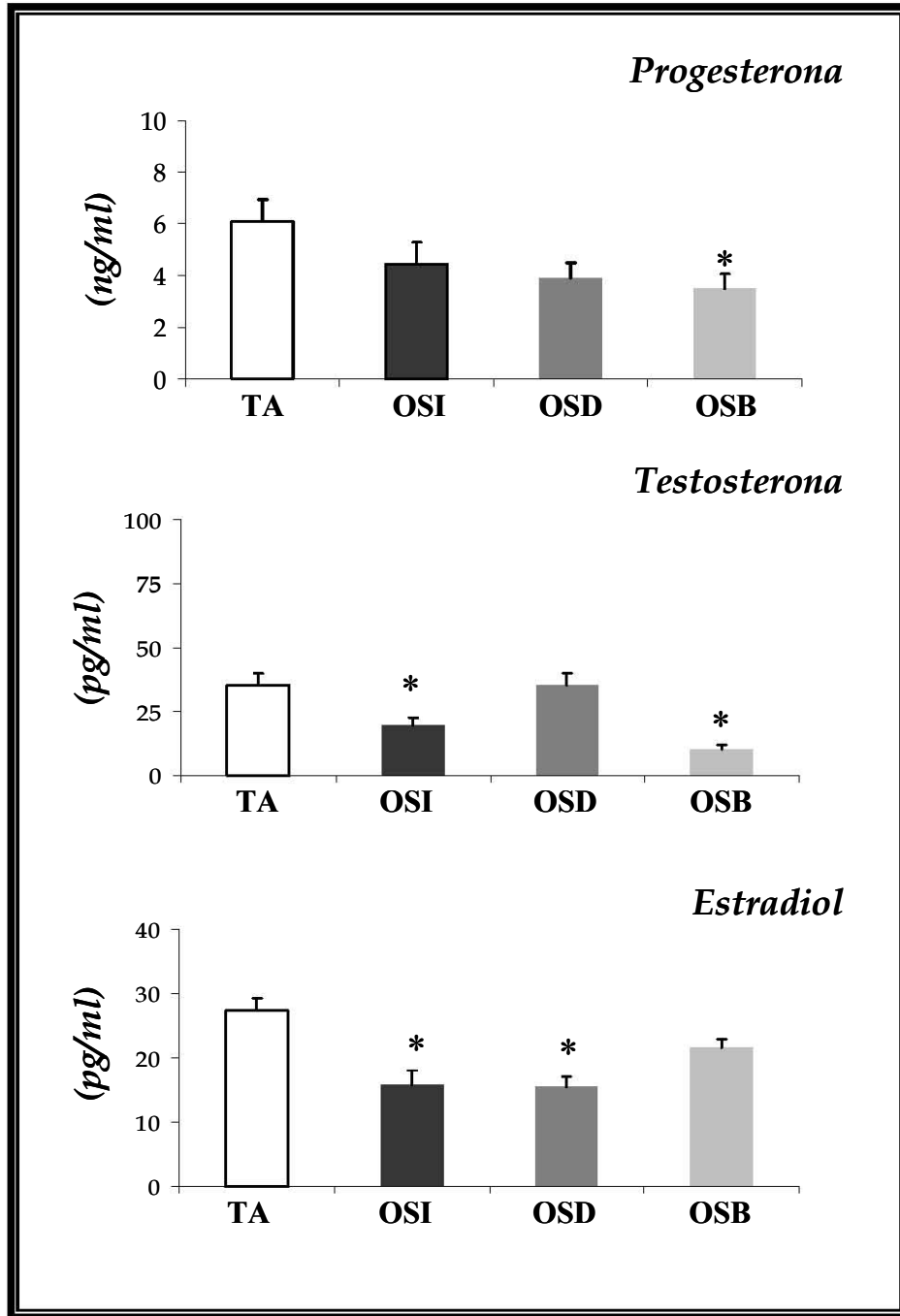
Cuadro 2. **Proporción de animales ovulantes** de los grupos testigo absoluto (TA), con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB), realizada a los 32 días de edad y sacrificados el día del primer estro vaginal

<i>Grupos</i>	<i>Proporción de animales ovulantes por ovario</i>		<i>Número de ovocitos liberados por ovario</i>	
	<i>Izquierdo</i>	<i>Derecho</i>	<i>Izquierdo</i>	<i>Derecho</i>
TA	14/18	12/18	4.3±0.5	5.0±0.6
OSI	8/10	7/10	5.1±1.0	4.7±0.5
OSD	8/10	8/10	4.1±0.7	4.8±0.4
OSB	7/9	7/9	4.1±0.6	4.5±0.5

Hormonas Esteroides

En comparación con el grupo testigo, en los animales con operación simulada bilateral la concentración de **progesterona** fue significativamente menor, mientras que la de **testosterona** fue menor en animales a los que se les realizó una operación simulada izquierda o bilateral. En los animales con laparotomía unilateral sacrificados en el día del primer estro vaginal, la concentración de **17-β estradiol** fue menor (Figura 7).

Figura 7. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de **progesterona**, **testosterona** y **estradiol** de los grupos testigo absoluto (TA), con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB), realizada a los 32 días de edad y autopsiados el día del primer estro vaginal.



* $p < 0.05$ vs. TA (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

EXPERIMENTO 2

Efectos agudos de la laparotomía unilateral o bilateral sobre la masa ovárica y el útero.

Masa ovárica

En comparación con el grupo testigo, la masa ovárica del grupo con operación simulada bilateral fue menor en los animales sacrificados 5 horas después de la operación, en tanto que 48 horas después de haber realizado la misma operación se presentó un aumento significativo de la masa ovárica. Al inicio de la pubertad este parámetro no se modificó (Cuadro 4).

Cuadro 4. Media \pm e.e.m. del peso relativo (mg/100g de peso corporal) de la **masa ovárica** de los grupos testigo absoluto (TA), con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB) realizada a los 32 días de edad y sacrificados a los 30', 1, 5, 48, 72 h post-cirugía o al primer estro vaginal (PEV).

<i>Grupos</i>	<i>30'</i>	<i>1 h</i>	<i>5 h</i>	<i>48 h</i>	<i>72h</i>	<i>PEV</i>
MASA OVARICA						
TA	23.8 \pm 2.0	23.8 \pm 2.0	22.3 \pm 2.0	22.4 \pm 1.1	22.9 \pm 2.0	28.2 \pm 1.2
OSI	19.9 \pm 0.4	21.3 \pm 0.6	22.02 \pm 1.0	25.0 \pm 1.3	18.9 \pm 1.0	27.6 \pm 1.3
OSD	22.6 \pm 1.0	20.9 \pm 1.2	22.2 \pm 1.1	21.5 \pm 1.4	19.0 \pm 0.7	26.5 \pm 1.2
OSB	24.2 \pm 1.2	20.4 \pm 0.8	16.8 \pm 0.6 ♣	26.4 \pm 1.6♣	20.0 \pm 0.6	28.2 \pm 1.2

♣ p<0.05 vs. TA (Prueba "t" Student).

Útero

La operación simulada derecha resultó en un menor peso del útero, cuando los animales fueron sacrificados 48 horas después de la operación, efecto contrario se observó con la operación simulada izquierda 72 horas post-operación en donde el peso del útero fue mayor (Cuadro 5).

Cuadro 4. Media \pm e.e.m. del peso relativo (mg/100g de peso corporal) del **útero** de los grupos testigo absoluto (TA), con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB) realizada a los 32 días de edad y sacrificados a los 30', 1, 5, 48, 72 h post-cirugía o al primer estro vaginal (PEV).

<i>Grupos</i>	<i>30'</i>	<i>1 h</i>	<i>5 h</i>	<i>48 h</i>	<i>72 h</i>	<i>PEV</i>
ÚTERO						
TA	67.1 \pm 4.7	67.1 \pm 4.7	71.9 \pm 4.1	79.8 \pm 7.9	76.7 \pm 1.4	136 \pm 6.3
OSI	63.9 \pm 7.7	66.4 \pm 7.1	67.9 \pm 6.3	81.4 \pm 5.1	135.1 \pm 8.3 ♣	133.4 \pm 5.0
OSD	64.2 \pm 2.8	74.6 \pm 8.7	77.3 \pm 7.2	50.4 \pm 3.7 ♣	67.1 \pm 11.3	118.7 \pm 6.7
OSB	63.9 \pm 4.8	61.1 \pm 6.0	66.6 \pm 5.4	87.3 \pm 8.0	85.9 \pm 5.9	144.4 \pm 5.6

♣ p<0.05 vs. TA (Prueba "t" Student).

EXPERIMENTO 3

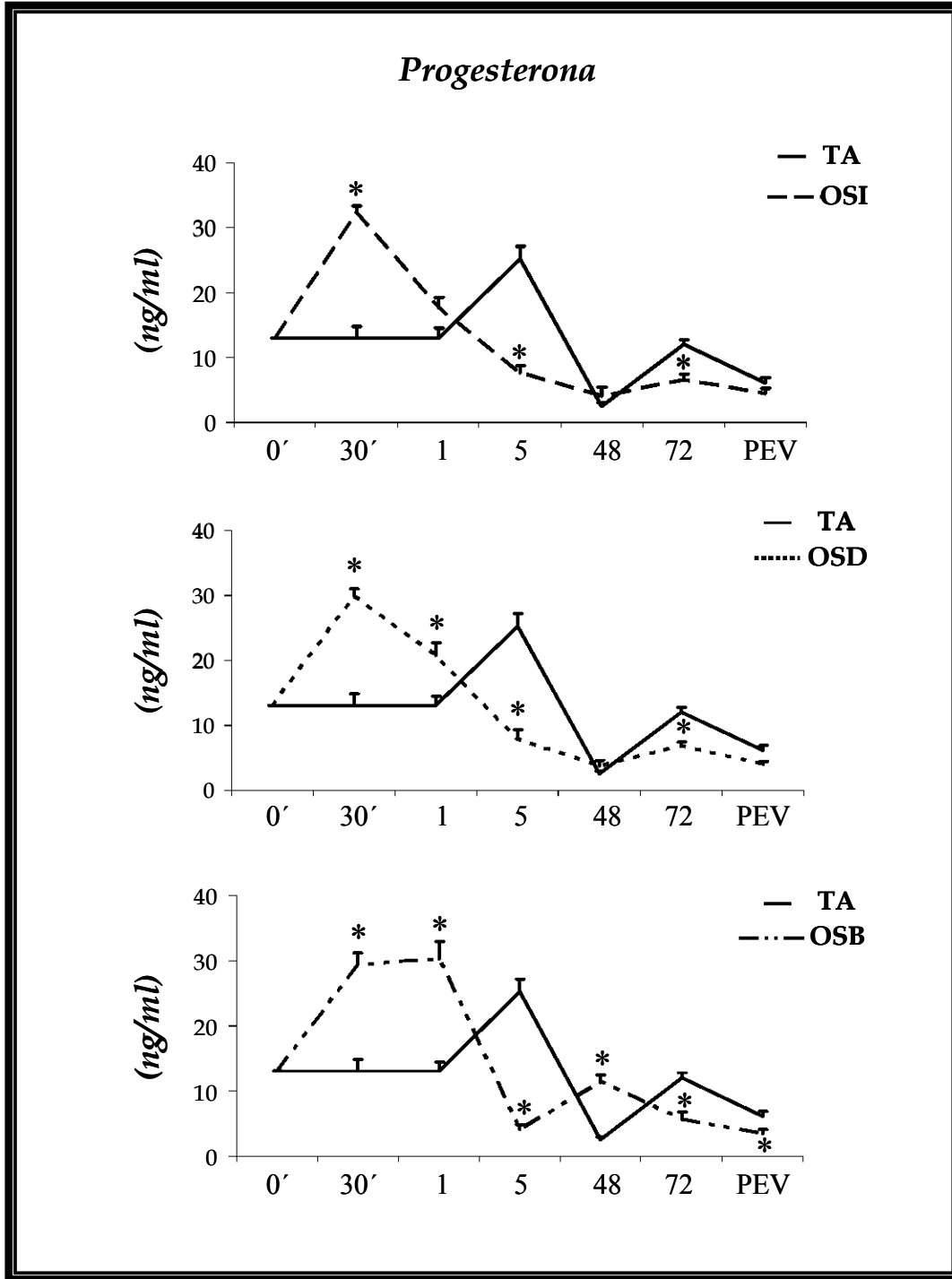
Efectos agudos de la laparotomía unilateral o bilateral sobre la concentración de hormonas esteroides

PROGESTERONA (Figura 8)

En comparación con el grupo testigo la **operación simulada izquierda**, resultó en una mayor concentración de la hormona en los animales sacrificados a los 30 minutos; a las 5 ó 72 horas post-cirugía la concentración de la hormona fue menor. En los animales con **operación simulada derecha**, la concentración de progesterona fue mayor en los animales sacrificados 30 minutos o una hora después de la operación, efecto inverso al que se observó cuando fueron sacrificados 5 ó 72 horas post-cirugía.

Comparado con los animales sin tratamiento, la **operación simulada bilateral** resultó en una mayor concentración de progesterona en los animales sacrificados 30 minutos, 1 ó 48 horas después de la cirugía, mientras que a las 5 ó 72 horas post-cirugía y al primer estro vaginal la concentración de la hormona fue menor.

Figura 8. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de **progesterona** de los grupos testigo absoluto (TA), con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB) realizada a los 32 días de edad y sacrificados a los 30', 1, 5, 48, 72 h post-cirugía o al primer estro vaginal (PEV).



* $p < 0.05$ vs. TA (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

TESTOSTERONA (Figura 9)

En comparación con el grupo testigo en los animales con **operación simulada izquierda** la concentración de la hormona fue mayor en las ratas sacrificadas 30 minutos, 1, 48 ó 72 horas después de la cirugía, mientras que a las 5 horas o en el día del primer estro vaginal la concentración de la hormona fue menor.

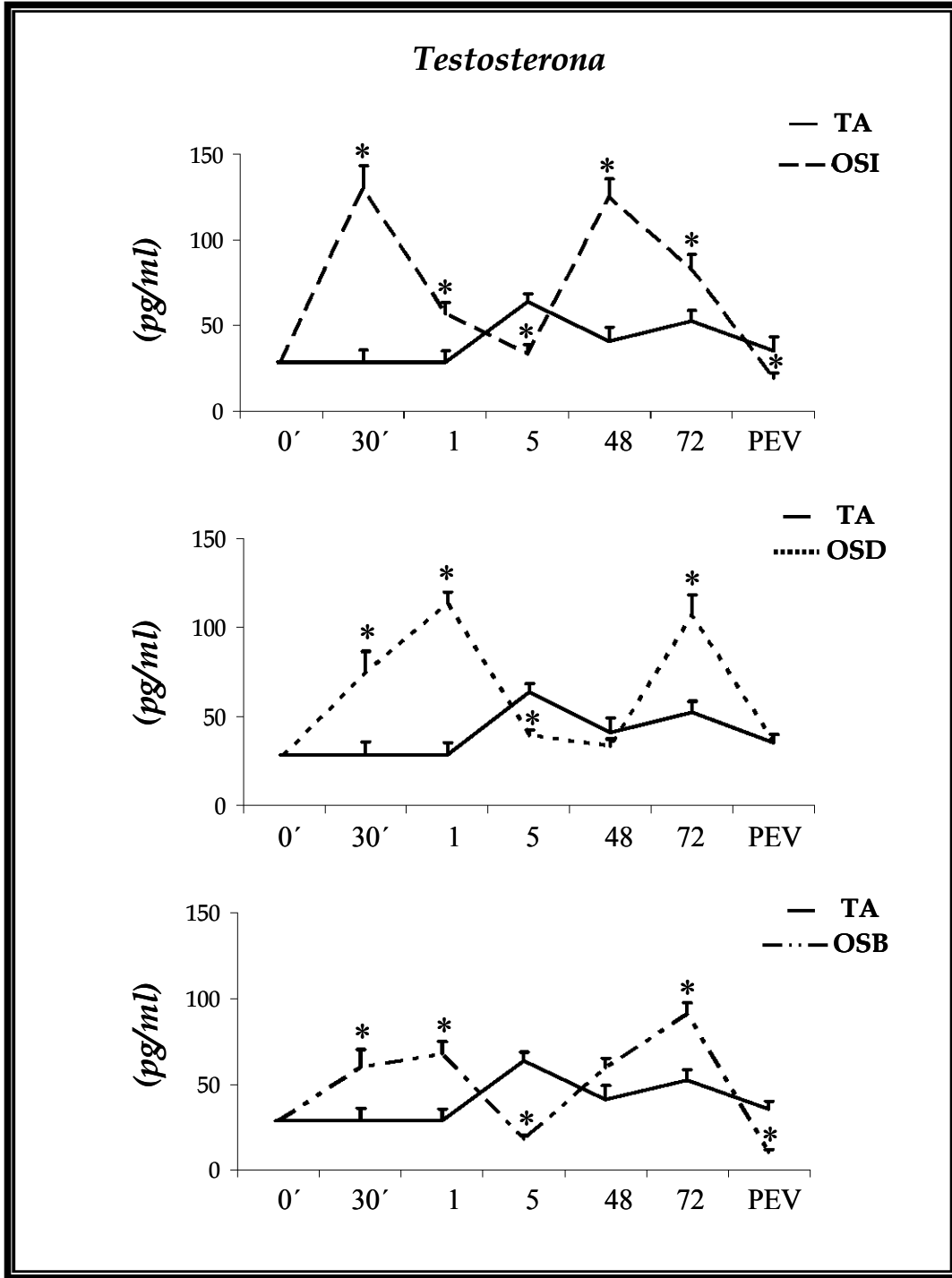
La **operación simulada derecha** resultó en una mayor concentración sérica en los animales sacrificados 30 minutos, 1 ó 72 horas después de la operación, mientras que a las 5 horas la concentración de la hormona fue menor.

Comparado con los animales sin tratamiento, la concentración de testosterona fue mayor en los animales con **operación simulada bilateral** sacrificados a los 30 minutos, 1 ó 72 horas después de la cirugía, mientras que a las 5 horas y al inicio de la pubertad la concentración de la hormona fue menor.

A los 30 minutos la concentración de la hormona fue mayor en los animales con operación simulada izquierda que en los tratados del lado derecho o de ambos lados (OSI 130.16 ± 13.3 vs. OSD 74.94 ± 11.7 ; OSB 59.39 ± 11.13 $p < 0.05$). Sin embargo, 1 hora después de la operación simulada derecha la concentración de la hormona fue mayor que en los tratados del lado izquierdo o de ambos lados (OSD 113.6 ± 9.33 vs. OSI 56.88 ± 6.8 ; OSB 67.67 ± 7.4 $p < 0.05$).

En los animales con operación simulada izquierda el aumento en la concentración de testosterona se observó a las 48 horas, mientras que en los animales con operación simulada bilateral o derecha el aumento se presentó a las 72 horas.

Figura 9. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de **testosterona** de los grupos testigo absoluto (TA), con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB) realizada a los 32 días de edad y sacrificados a los 30', 1, 5, 48, 72 h post-cirugía o al primer estro vaginal (PEV).



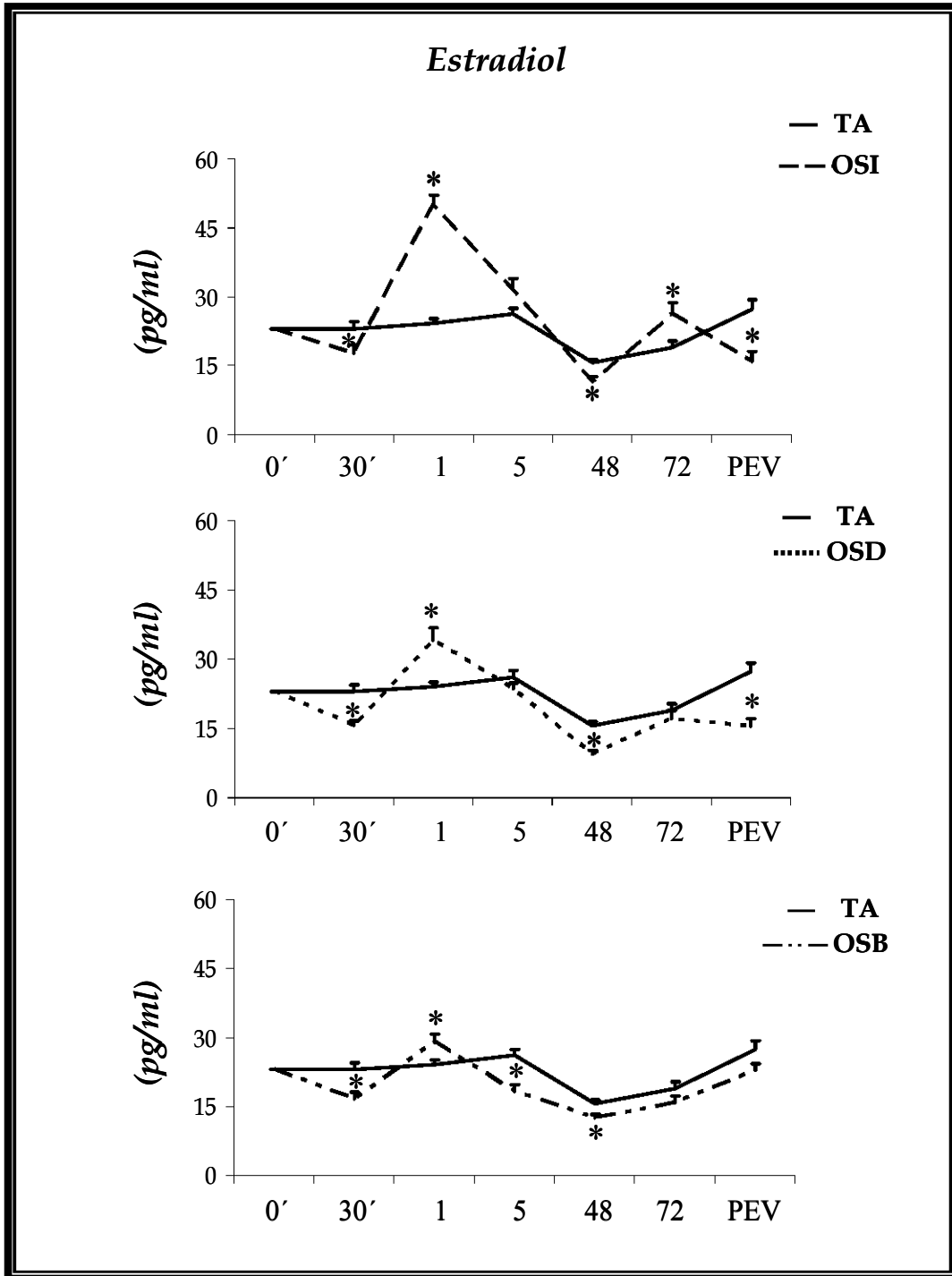
* $p < 0.05$ vs. TA (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

ESTRADIOL (Figura 10)

En comparación con el grupo testigo la concentración de estradiol fue menor en los animales con **operación simulada unilateral o bilateral** sacrificados 30 minutos, 48 horas y en el día del primer estro vaginal. En los animales sacrificados una o 72 horas después de la cirugía, la concentración de la hormona fue mayor.

En los animales con operación simulada izquierda sacrificados una hora después del tratamiento la concentración de estradiol fue mayor que en el grupo con operación simulada derecha o bilateral (OSI 50.1 ± 2.1 vs. OSD 34.2 ± 2.6 ; OSB 29.1 ± 1.6 $p < 0.05$).

Figura 10. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de **estradiol** de los grupos testigo absoluto (TA), con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB) realizada a los 32 días de edad y sacrificados a los 30', 1, 5, 48, 72 h post-cirugía o al primer estro vaginal (PEV).



* $p < 0.05$ vs. TA (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

EXPERIMENTO 4

Efectos de la sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior sobre el inicio de la pubertad y las funciones ováricas

Dado que la operación simulada modificó el inicio de la pubertad y las concentraciones de hormonas esteroideas, las comparaciones de los grupos con sección del nervio ovárico superior se realizaron con sus respectivos grupos de operación simulada.

Inicio de la Pubertad

En comparación con sus respectivas operaciones simuladas la sección del NOS izquierdo resultó en un mayor peso corporal de los animales y retraso de la edad de apertura vaginal (inicio de la pubertad). La sección del NOS derecho no modificó estos parámetros, mientras que la sección bilateral retrasó el inicio de la pubertad, más no la del primer estro vaginal (Cuadro 6).

Cuadro 6. Media \pm e.e.m del **peso corporal**, **edad de apertura vaginal** (EAV) y **primer estro vaginal** (PEV) de los grupos con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD), bilateral (OSB) o con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO), realizada a los 32 días de edad y sacrificados el día del primer estro vaginal.

<i>Grupos</i>	<i>n</i>	<i>Peso Corporal (gramos)</i>	<i>EAV (días)</i>	<i>PEV^a</i>
OSI	10	101.0 \pm 3.5	37.2 \pm 0.6	0.8 \pm 0.5
SNOI	10	113.0 \pm 3.7♣	39.8 \pm 1.0 ♣	1.5 \pm 0.4
OSD	10	110.0 \pm 3.2	38 \pm 0.8	2.2 \pm 0.8
SNOD	10	107.3 \pm 3.5	38.5 \pm 0.6	1.7 \pm 0.5
OSB	9	105.2 \pm 3.8	35.6 \pm 0.6	1.3 \pm 0.5
SBNO	10	98.3 \pm 1.9	38.3 \pm 0.5 ♣	0.8 \pm 0.4

^aRepresenta los días transcurridos entre la apertura vaginal y la aparición del primer estro

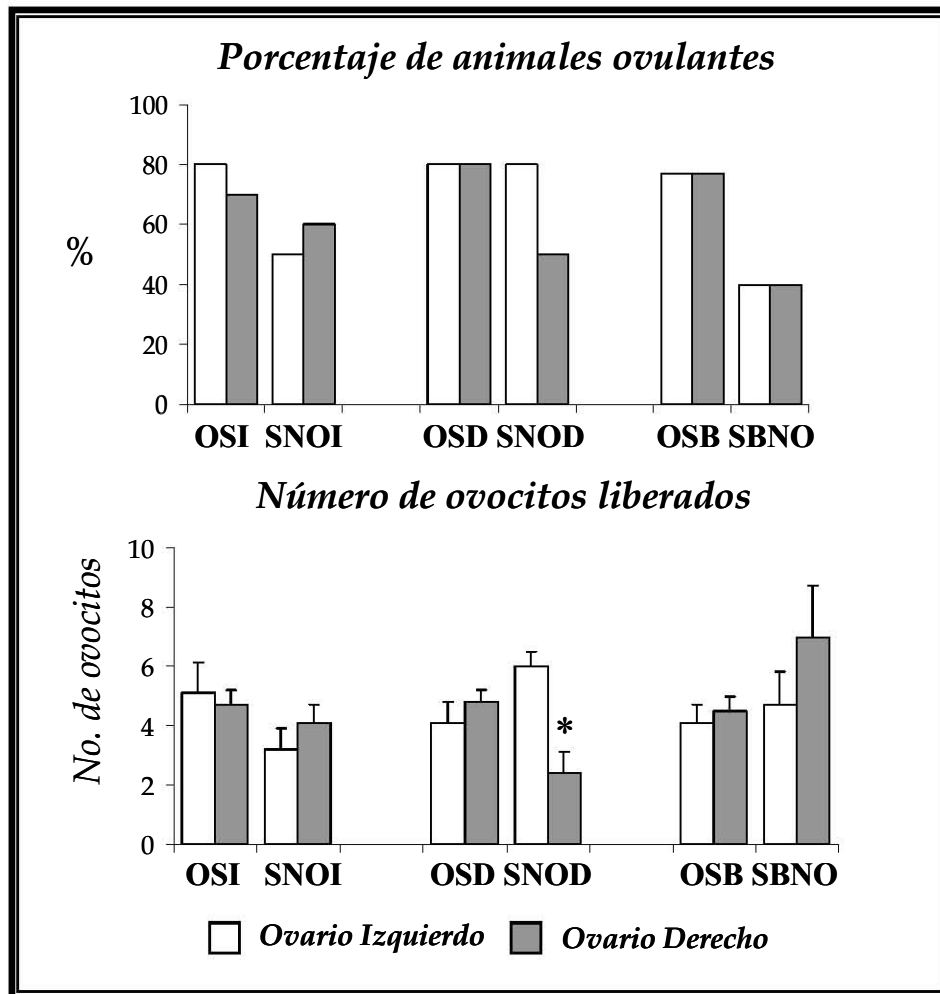
♣ p<0.05 vs. su respectiva operación simulada (Prueba “t” Student).

Respuesta Ovulatoria

La sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior no modificó la proporción de animales que ovularon espontáneamente en el día del primer estro vaginal.

Cuando se realizó la sección del nervio ovárico superior derecho, el número de ovocitos liberados al primer estro vaginal por el ovario denervado, fue significativamente menor en comparación con su ovario izquierdo y con el ovario derecho de la operación simulada derecha (Figura 11).

Figura 11. **Porcentaje de animales ovulantes y número de ovocitos liberados**, de los grupos con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD), bilateral (OSB), con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO), realizada a los 32 días de edad y sacrificados el día del primer estro vaginal.



- $p < 0.05$ vs. **Ovario derecho de la OSD y su Ovario Izquierdo** (Prueba de U de Mann Whitney).

Pesos de los ovarios y el útero

En comparación con su ovario izquierdo, los animales con sección unilateral del nervio ovárico superior el peso del ovario derecho fue menor. En comparación con su operación simulada, el peso del útero fue mayor en los animales con sección del nervio ovárico superior derecho (Cuadro 7).

Cuadro 7. Media \pm e.e.m del peso relativo (mg/100mg de peso corporal) de los **ovarios y útero**, de los grupos con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD), bilateral (OSB), con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO), realizada a los 32 días de edad y sacrificados el día del primer estro vaginal.

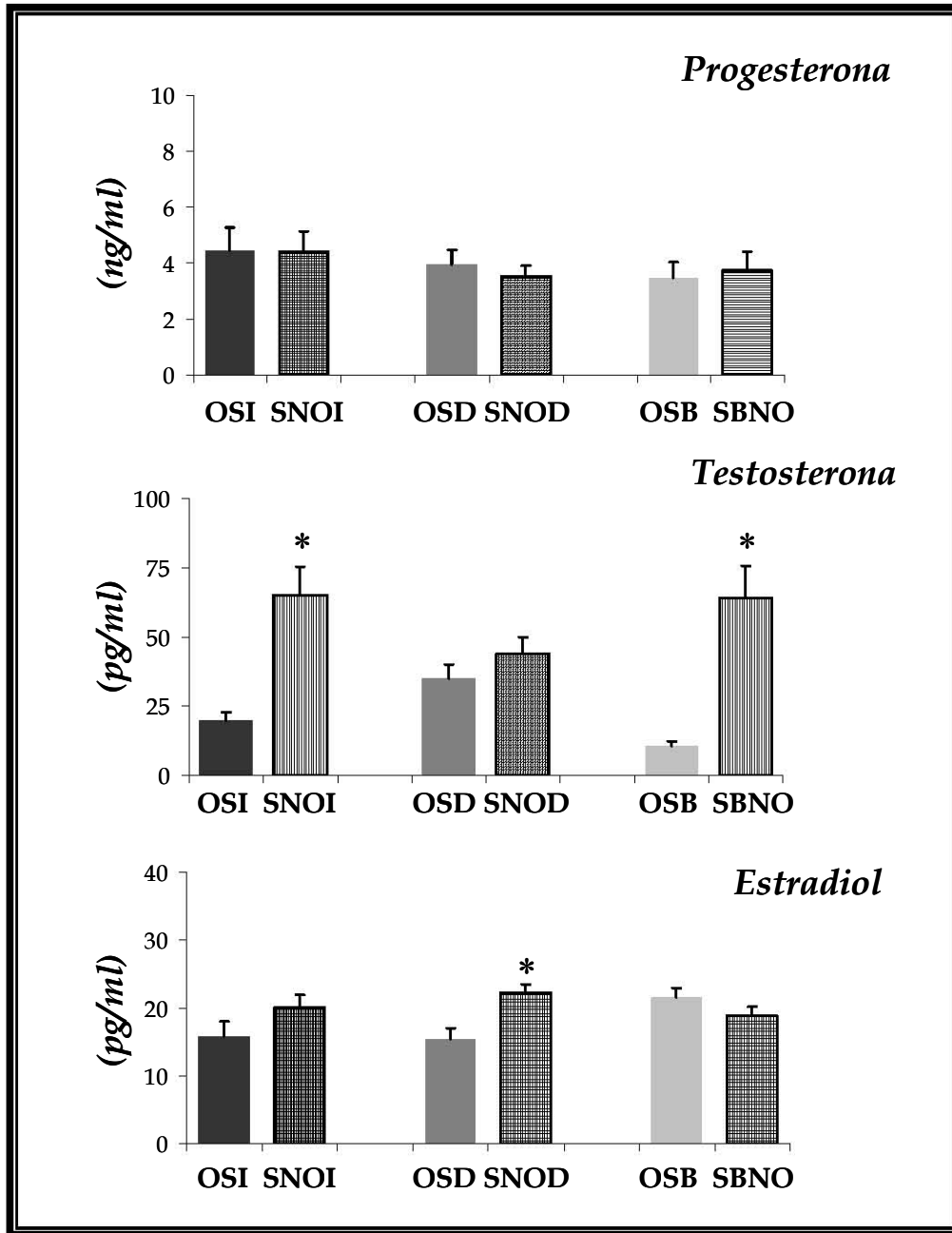
Grupos	n	Ovarios		Útero
		Izquierdo	Derecho	
OSI	10	13.68 \pm 0.4	13.58 \pm 0.9	133.4 \pm 5.0
SNOI	10	16.63 \pm 0.6 \diamond	13.35 \pm 0.6 \clubsuit	136.8 \pm 7.3
OSD	10	13.43 \pm 0.8	12.93 \pm 0.6	118.7 \pm 6.7
SNOD	10	15.54 \pm 0.8	12.49 \pm 0.6 \clubsuit	145.0 \pm 5.7 \blacksquare
OSB	9	15.03 \pm 0.9	13.51 \pm 0.6	144.4 \pm 5.6
SBNO	10	15.96 \pm 0.8	14.11 \pm 0.9	153.2 \pm 5.6

\diamond p<0.05 vs. el ovario izquierdo de su OS; \clubsuit p<0.05 vs. su ovario izquierdo; \blacksquare p<0.05 vs. su OS (Prueba "t" Student).

Hormonas esteroides

La concentración de **progesterona** en los animales con sección unilateral o bilateral fue similar a la de los animales con operación simulada. La sección del nervio ovárico superior izquierdo o la de ambos nervios resultó en una mayor concentración de **testosterona**, mientras que la concentración de **estradiol** fue mayor en los animales con sección del nervio ovárico superior derecho (Figura 12).

Figura 12. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de **progesterona**, **testosterona** y **estradiol** de los grupos con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD), bilateral (OSB) o con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO), realizada a los 32 días de edad sacrificados el día del primer estro vaginal.



* $p < 0.05$ vs. su respectiva OS (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

EXPERIMENTO 5

Efectos agudos de la sección uni o bilateral del nervio ovárico superior sobre la masa ovárica y útero

Masa ovárica

La masa ovárica de las ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo o derecho sacrificadas 48 o 72 horas post-sección fue mayor. El aumento observado a las 72 horas se debió al incremento de peso del ovario inervado (SNOI 17.52 ± 1.7 vs 9.11 ± 0.5 ; SNOD 14.94 ± 1.1 vs 10.48 ± 0.7 $p < 0.05$). La sección de ambos nervios ováricos resultó en el aumento de la masa ovárica en animales sacrificados 5 o 72 horas después de la sección (Cuadro 9).

Cuadro 9. Media \pm e.e.m. del peso relativo (mg/100mg de peso corporal) de la *masa ovárica* de los grupos con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD), bilateral (OSB), con sección del nervio ovárico izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO), realizada a los 32 días de edad y sacrificados a los 30', 1, 5, 48, 72 h o al primer estro vaginal (PEV).

Grupos	30'	1 h	5 h	48 h	72 h	PEV
MASA OVARICA						
OSI	19.9 \pm 0.4	21.3 \pm 0.6	22.0 \pm 1.0	25.0 \pm 1.3	18.9 \pm 1.0	27.6 \pm 1.3
SNOI	17.6 \pm 0.8	19.2 \pm 0.7	20.6 \pm 0.9	30.7 \pm 1.8 ♣	31.5 \pm 3.6 ♣	29.5 \pm 0.6
OSD	22.6 \pm 1.0	20.9 \pm 1.2	22.2 \pm 1.1	21.5 \pm 1.4	19.0 \pm 0.7	26.5 \pm 1.2
SNOD	20.1 \pm 0.2	22.4 \pm 1.3	20.3 \pm 0.8	23.4 \pm 1.2	25.8 \pm 2.1 ♣	27.6 \pm 0.2
OSB	24.2 \pm 1.2	20.4 \pm 0.8	16.7 \pm 0.6	26.4 \pm 1.6	20.0 \pm 0.6	28.2 \pm 2.2
SBNO	23.1 \pm 1.7	22.7 \pm 0.9	21.7 \pm 0.8 ♣	26.3 \pm 1.6	27.2 \pm 1.2 ♣	29.7 \pm 2.0

♣ $p < 0.05$ vs. su respectiva OS (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

Útero

La sección del nervio ovárico superior izquierdo o derecho resultó en el aumento del peso del útero cuando los animales fueron sacrificados 48 ó 72 horas después de la sección o al presentar el primer estro vaginal. Cuando fueron sometidos a la sección bilateral del nervio ovárico superior, el peso del útero aumentó a las 5 horas, efecto inverso se observó 48 horas post-sección (Cuadro 10).

Cuadro 10. Media \pm e.e.m. del peso relativo (mg/100mg de peso corporal) del **útero** de los grupos con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD), bilateral (OSB) o con sección del nervio ovárico izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO), realizada a los 32 días de edad y sacrificados a los 30', 1, 5, 48, 72 h post-cirugía o el día del primer estro vaginal (PEV).

<i>Grupos</i>	<i>30'</i>	<i>1 h</i>	<i>5 h</i>	<i>48 h</i>	<i>72 h</i>	<i>PEV</i>
ÚTERO						
OSI	63.9 \pm 7.7	66.4 \pm 7.1	67.9 \pm 6.3	81.4 \pm 5.1	135.1 \pm 8.3	133.4 \pm 5.0
SNOI	62.6 \pm 9.2	69.9 \pm 3.9	79.8 \pm 5.3	150 \pm 10.3♣	131 \pm 8.7	136.8 \pm 7.3
OSD	64.2 \pm 2.8	74.6 \pm 8.7	77.3 \pm 7.2	50.4 \pm 3.7	67.0 \pm 11.3	118.7 \pm 6.7
SNOD	62.8 \pm 4.9	76.8 \pm 5.7	66.7 \pm 4.0	73.7 \pm 5.6♣	115.9 \pm 8.6♣	145.0 \pm 5.7♣
OSB	63.9 \pm 4.8	61.1 \pm 6.0	66.6 \pm 5.4	87.3 \pm 8.0	85.9 \pm 5.9	144.4 \pm 5.6
SBNO	61.0 \pm 4.7	65.5 \pm 4.1	81.5 \pm 3.6♣	66.3 \pm 2.9♣	80.3 \pm 5.1	153.2 \pm 5.6

♣ p<0.05 vs. su respectiva operación simulada (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

EXPERIMENTO 6

Efectos agudos de la sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior sobre la concentración de hormonas esteroides

PROGESTERONA (Figura 13)

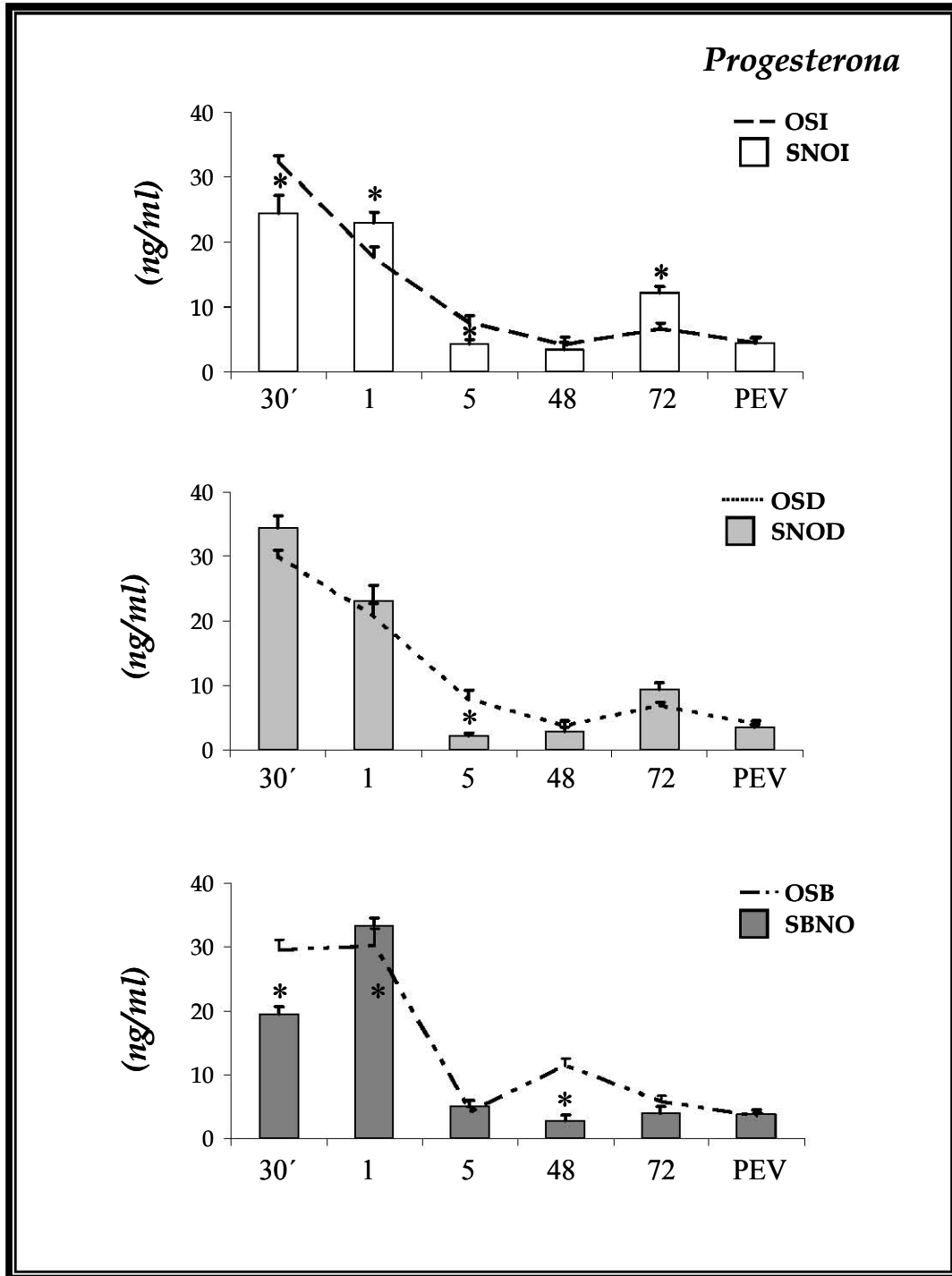
La **sección del nervio ovárico superior izquierdo** resultó en una menor concentración de la hormona en los animales sacrificados 30 minutos o 5 horas después de la sección. Cuando fueron sacrificados 1 ó 72 horas después de la cirugía la concentración de la hormona fue mayor. En los animales con **sección del nervio ovárico superior derecho** la concentración de progesterona fue menor sólo en el grupo de animales sacrificados 5 horas después del tratamiento.

La **sección bilateral del nervio ovárico superior** resultó en menor concentración de progesterona en los grupos sacrificados 30 minutos ó 48 horas después de la denervación.

Cuando se comparan los efectos de la denervación unilateral con la bilateral se observó que una hora después de la cirugía, la concentración de progesterona fue mayor en animales con sección bilateral del nervio ovárico que en los grupos con sección del lado izquierdo o derecho (SBNO 33.3 ± 1.4 vs. SNOI 23 ± 1.7 ; SNOD 24.9 ± 1.6 $p < 0.05$).

Los animales con sección del nervio ovárico izquierdo presentaron una segunda elevación en la concentración de progesterona, 72 horas después de la cirugía, que llegó a ser mayor respecto a los grupos con sección del nervio ovárico derecho o bilateral (SNOI 12.2 ± 1.1 vs. SNOD 9.4 ± 1.0 ; SBNO 3.9 ± 1.0 $p < 0.05$).

Figura 13. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de **progesterona** de los grupos con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD), bilateral (OSB), con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) realizada a los 32 días de edad y sacrificados a los 30', 1, 5, 48, 72 h post-cirugía o el día del primer estro vaginal (PEV).



* $P < 0.05$ vs. OSI (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

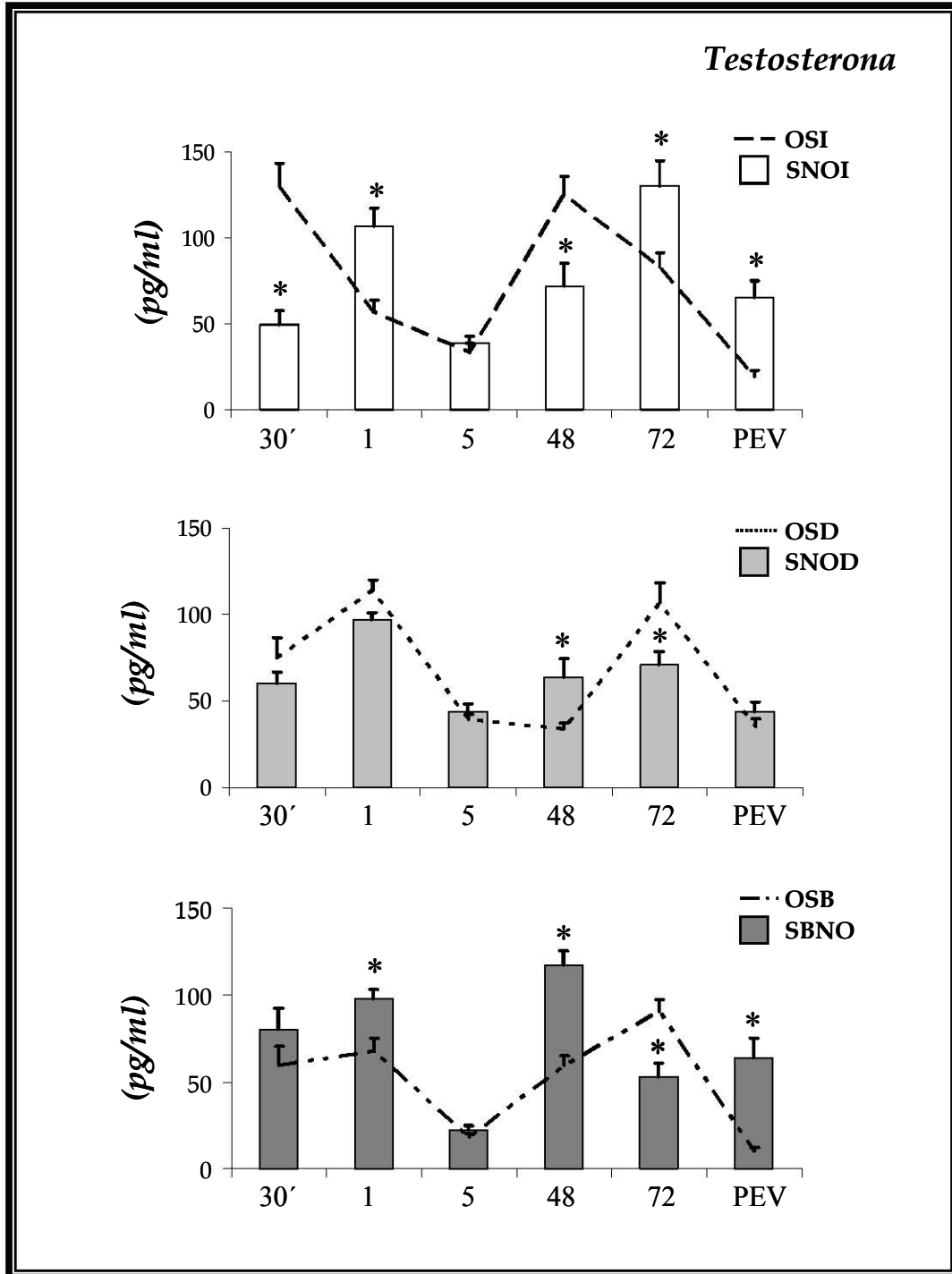
TESTOSTERONA (Figura 14)

La concentración de testosterona fue mayor en los animales con **sección del nervio ovárico superior izquierdo** sacrificados una ó 72 horas después de la sección o en el día del primer estro vaginal. Cuando fueron sacrificados 30 minutos o 48 horas después de la denervación, la concentración de la hormona fue menor. En los animales con **sección del nervio ovárico superior derecho** sacrificados a las 48 horas, la concentración de testosterona fue mayor, mientras que en el grupo sacrificado a las 72 horas la concentración fue menor.

En respuesta a la **sección bilateral del nervio ovárico superior** la concentración de testosterona fue mayor en animales sacrificados una ó 48 horas post-denervación y en el día del primer estro vaginal, mientras que a las 72 horas la concentración fue menor.

El aumento en la concentración de testosterona en los animales con sección izquierda se observó a las 72 horas después del tratamiento, mientras que en los animales con sección bilateral del nervio ovárico superior dicho aumento se observó a las 48 horas.

Figura 14. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de **testosterona** de los animales con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD), bilateral (OSB), con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) realizada a los 32 días de edad y sacrificados a los 30', 1, 5, 48, 72 h post-cirugía o el día del primer estro vaginal (PEV).



* $P < 0.05$ vs. OSD (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

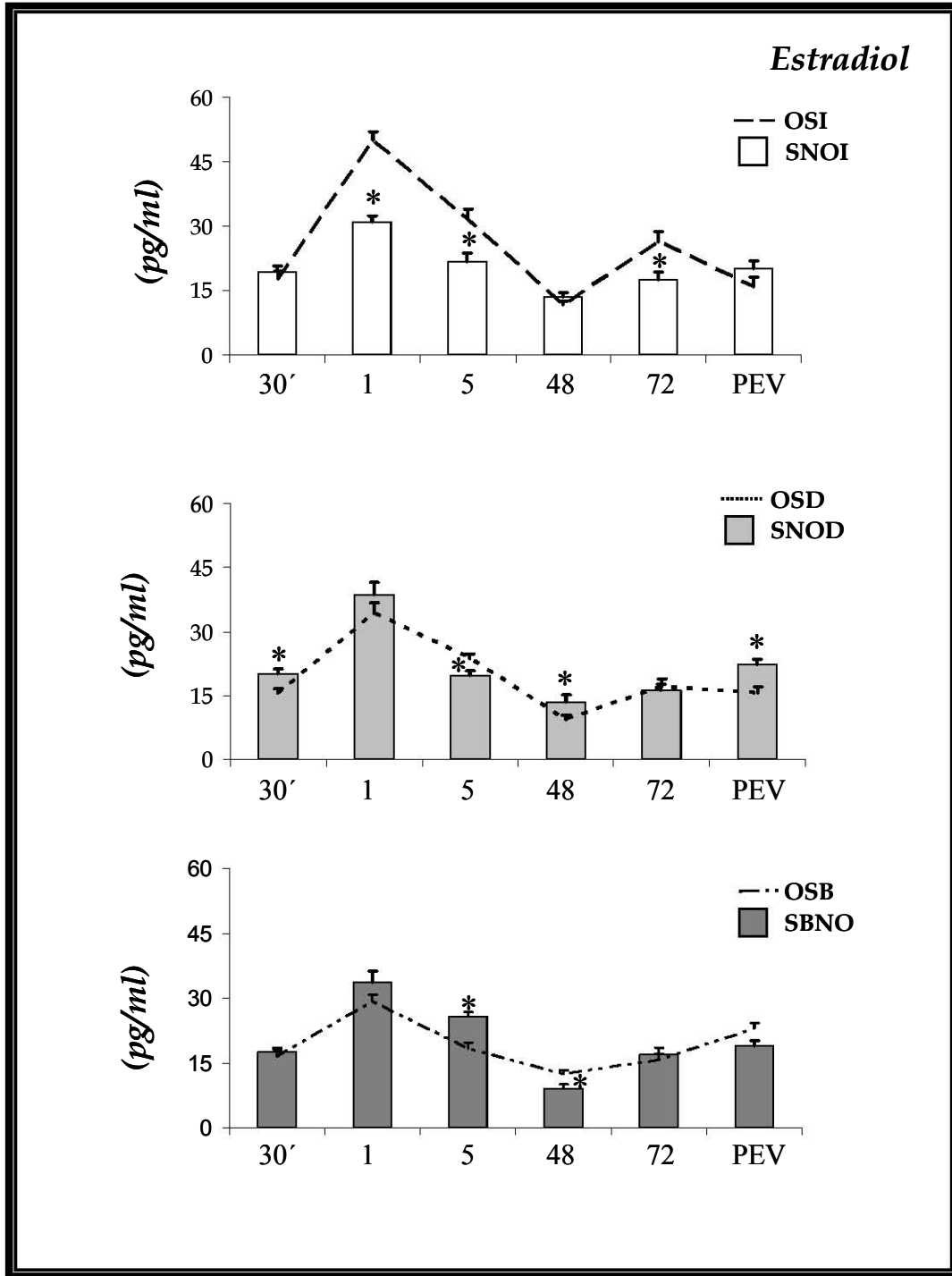
ESTRADIOL (Figura 15)

La sección del **nervio ovárico superior izquierdo** resultó en una menor concentración de la hormona en animales sacrificados una, 5 ó 72 horas post-denervación.

En las ratas con **sección del nervio ovárico derecho** sacrificadas 30 minutos, 48 horas después de la sección o al presentar el primer estro vaginal, la concentración de estradiol fue mayor, efecto contrario se observó cuando fueron sacrificadas 5 horas post-cirugía.

Cinco horas después de la **sección bilateral del nervio ovárico superior** la concentración de estradiol fue mayor, y fue menor en los animales sacrificados 48 horas después.

Figura 15. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de **estradiol** de los grupos con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD), bilateral (OSB), con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) realizada a los 32 días de edad y autopsiados a los 30', 1, 5, 48, 72 h post-cirugía o el día del primer estro vaginal (PEV).



* $P < 0.05$ vs. **OSB** (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

Efectos comparativos de la sección uni o bilateral sobre la concentración hormonal.

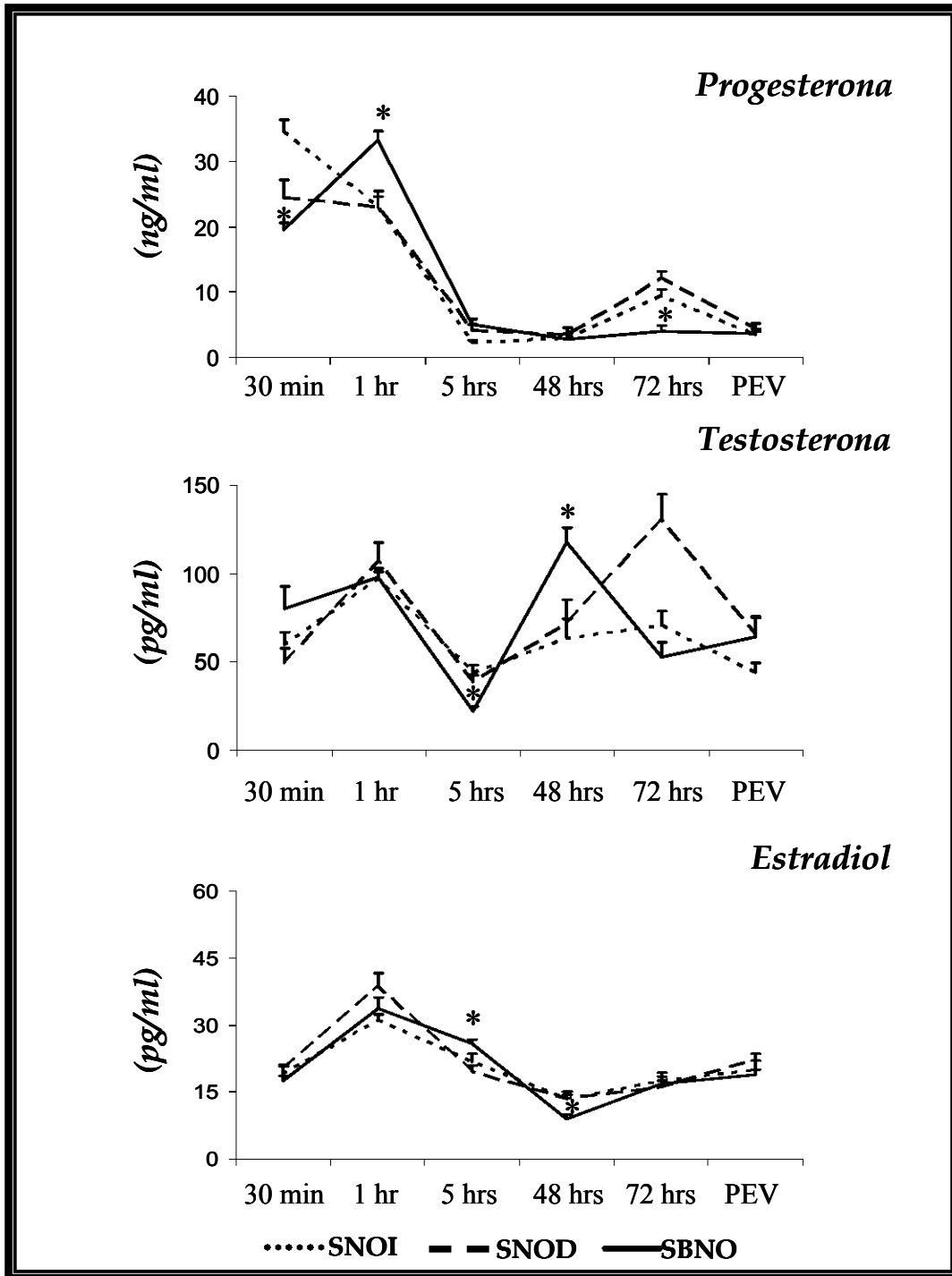
En la figura 16 se muestra que los efectos de la sección uni o bilateral del nervio ovárico superior sobre la concentración de progesterona, testosterona y estradiol son diferentes y dependen del lapso transcurrido entre la operación y la autopsia.

En comparación con la sección unilateral, la sección bilateral del nervio ovárico superior resultó en una mayor concentración de **progesterona** en los animales sacrificados una hora después de la sección. Cuando fueron sacrificados 30 minutos ó 72 horas después, la concentración de la hormona fue menor.

Con la sección bilateral del nervio ovárico superior, la concentración de **testosterona** fue mayor a las 48 horas en comparación con la sección unilateral, efecto contrario se observó 5 horas después cuando la concentración de la hormona fue menor.

Con la sección bilateral del nervio ovárico superior la concentración de **estradiol** fue mayor 5 horas después del tratamiento, en comparación con la sección del nervio ovárico superior derecho (25.85 ± 0.85 vs. 19.65 ± 1.29 $p < 0.05$). En los animales sacrificados a las 48 horas post-denervación la concentración de estradiol fue menor en los animales con sección bilateral del nervio ovárico superior, en comparación con la sección unilateral (SBNO 8.98 ± 1.0 vs. SNOI 13.43 ± 1.0 ; SNOD 13.57 ± 1.5).

Figura 16. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de **progesterona**, **testosterona** y **estradiol** de los grupos con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o (SBNO), realizada a los 32 días de edad sacrificados a los 30', 1, 5, 48, 72 h o el día del primer estro vaginal (PEV).



* $P < 0.05$ vs. Sección Unilateral del NOS (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que en la rata hembra juvenil, la regulación que ejerce el nervio ovárico superior sobre la secreción de progesterona, testosterona y estradiol es diferente para cada hormona y presenta asimetría.

El retraso en el inicio de la pubertad y presencia del primer estro en los animales sometidos a la laparotomía, puede ser explicado por el estrés al que fueron sometidos. El estrés estimula la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y de glucocorticoides. La CRH inhibe la liberación de la GnRH (Chrousos y col., 1998) y los glucocorticoides bloquean la liberación de la LH lo que se traduce en la menor secreción de estradiol (Rabin y col., 1990).

El estrés induce cambios a nivel del SNC y periférico los cuales pueden afectar las funciones reproductivas, alimenticias y de crecimiento (Chrousos y col., 1998). En la mujer, el estrés crónico inhibe la menstruación debido a una alteración hipotalámica como resultado de una alteración en la regulación de la secreción pulsátil de GnRH, padecimiento conocido como amenorrea hipotalámica funcional (Drew, 1961; Berga, 1996). En la rata hembra el estrés resulta en un retraso en la pubertad, ausencia de la conducta receptiva y alteraciones en la ovulación (Loucks y Yens, 1989).

Algunos autores han postulado que en la rata, el inicio de la pubertad depende de la concentración plasmática de estradiol (Ojeda y Urbanski, 1994; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990). Sin embargo, algunos resultados muestran que la canalización de la vagina no depende exclusivamente de las concentraciones plasmáticas de 17β -estradiol (Bolaños 2005, Morales y col., 2004, 2007). Más aún, en el presente estudio mostramos que en los animales sometidos a una laparotomía bilateral, en donde se retrasó el inicio de la pubertad, no se modificó la concentración de estradiol al primer estro, ni tres días antes de que se produjera la apertura vaginal.

En el presente estudio observamos que la operación simulada uni o bilateral no modificó la tasa de animales ovulantes ni el número de ovocitos liberados, resultado similar al de Ricardo (2005). Al parecer la perforación del peritoneo no tiene efectos sobre los mecanismos que regulan la ovulación, tanto en la rata prepúber (Ricardo, 2005), como en la adulta (Flores y col., 1990).

En la rata adulta, la anestesia con éter en el día del diestro 1, diestro 2 o proestro estimula al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y como resultado se produce un incremento significativo en la concentración de progesterona, cuando los animales son sacrificados una hora después de la estimulación. Cuando además del éter, se utiliza otro tipo de estresor, como son la perforación unilateral o bilateral del peritoneo, no se modifica la concentración de la hormona, por lo que los autores concluyen que el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal responde de manera diferente dependiendo del tipo de estrés (Flores y col., 2005).

A diferencia de lo que ocurre en la rata adulta, en el animal juvenil los efectos de la laparotomía unilateral sobre la secreción de progesterona son diferentes a los de la bilateral. En la rata adulta en los días del diestro 2, proestro y estro, las adrenales son la principal fuente de progesterona (Flores y col., 2005). Es posible, entonces que los aumentos en la concentración de la hormona observados en el presente estudio sean debidos a que las adrenales secretaron la hormona.

La menor concentración de progesterona, acompañada de mayor concentración de testosterona en los animales sometidos a una laparotomía uni o bilateral podrían ser explicados por un aumento en la actividad de las enzimas 17α -HSDH y 17β -HSDH en respuesta al estrés (Van Voorhis, 1999).

En la rata juvenil la regulación de la secreción de testosterona no presenta asimetría, a diferencia de lo que ocurre en el animal adulto (Flores y col., 2006).

Según Barco y colaboradores (2003) en la rata adulta en el día del estro, la secreción de las hormonas esteroideas es regulada por dos vías neurales, una por parte de la adrenal derecha que se encargaría de la regulación de la secreción de progesterona y la otra, por parte del ovario izquierdo, la cual participaría en la modulación de la secreción de estradiol. Además se ha mostrado que en la rata adulta cíclica, la laparotomía izquierda resulta en una disminución significativa de la concentración de estradiol, mientras que la derecha depende del día del ciclo estral en que se realiza la cirugía. Para explicar esta diferencia se ha sugerido que la información que se origina del lado izquierdo del peritoneo inhibe los mecanismos que regulan la actividad de las aromatasas en la transformación de testosterona a estradiol (Cruz y col., 2006). Este comportamiento fue inverso en la rata juvenil, donde una hora después se presentó incremento de la concentración de la hormona, efecto que reaparece conforme el animal se aproxima a la pubertad. Esta diferencia en los mecanismos

de regulación de la secreción de estradiol entre el animal juvenil y el adulto, indican que dicho mecanismo no ha alcanzado la madurez en el animal juvenil.

Con los resultados del presente estudio resulta evidente que al realizar una laparotomía, se estimula o inhibe una(s) vía neural originada en el peritoneo que tiene efectos sobre el sistema nervioso central, lo cual a su vez provoca cambios en la esteroidogénesis lo que dependerá del lado en el que se realice la cirugía y de la edad del animal.

Previamente se ha mostrado que en ratas de 24 días de edad, la sección bilateral del nervio ovárico no modifica la edad de apertura vaginal espontánea (Aguado y Ojeda, 1984a; Morales y col., 1993) ni la inducida por la administración de la gonadotropina del suero de yegua preñada (Selstam y col., 1985). Por lo que en un principio se postuló que el inicio de la pubertad era un evento independiente de la información que llega al ovario a través del nervio ovárico superior.

Forneris y Aguado (2002) mostraron que en la rata neonata la sección bilateral resultó en un incremento de la concentración de testosterona que se acompañó por un retraso en la edad de apertura vaginal. Según Becu-Villalobos y Lacau-Mengido (1990) el inicio de la pubertad depende más de la concentración de testosterona que de estradiol. Linares (2006) mostró que la sección del nervio ovárico superior izquierdo realizada a los 24 días de edad, provocó retraso en la edad de apertura vaginal, con un aumento en la concentración de testosterona y sin cambios en la concentración de estradiol. Nuestros resultados muestran que la sección del nervio ovárico superior izquierdo o de ambos nervios, resultan en retraso del inicio de la pubertad y aumento en la concentración de testosterona, lo cual apoya lo propuesto por Forneris y Aguado (2002). Con base en nuestros resultados, sugerimos que la información que transcurre por el nervio ovárico superior izquierdo modula de manera inhibitoria la secreción de testosterona.

En la rata juvenil, la sección bilateral del nervio ovárico superior no modificó el número de ovocitos liberados por ambos ovarios. Este efecto ya había sido descrito tanto para la rata púber como adulta (Aguado y Ojeda 1984; Chávez y col., 1991; Morales y col., 1993). Esto permite sugerir que al eliminar la inervación simpática que llega al ovario vía nervio ovárico superior, otro tipo de información neural, como puede ser la sensorial aportada por el nervio vago, es la encargada de regular de manera normal la ovulación.

La sección unilateral del nervio ovárico superior resulta en la disminución en la cuota ovulatoria por parte del ovario denervado tanto en la rata prepúber (Morales y col., 1993) como en la adulta (Chávez y col., 1991). Los resultados obtenidos en el presente estudio son semejantes a los descritos por Morales y col. (1993) y Chávez y col. (1991), excepto que en este estudio el ovario derecho no es capaz de compensar la disminución de la cuota ovulatoria del ovario izquierdo. Esto nos permite postular que la ovulación por parte del ovario derecho depende más de la integridad del nervio ovárico superior que el ovario izquierdo, y que el ovario inervado compensa la disminución del número de ovocitos por el ovario denervado. Estos resultados y las de otros autores, dan soporte a la idea de que existe una comunicación neural entre ambos ovarios, en donde un ovario podría enviar señales al otro por medio de la inervación la cual pasa a través de la columna intermediolateral, vía nervios simpáticos y llega al ovario a través del nervio ovárico superior (Morán y col., 2005).

En el animal con sección unilateral del nervio ovárico superior, la concentración de noradrenalina en el ovario desnervado es menor que la del testigo, mientras que es mayor en el ovario intacto (Chávez y col., 1994), resultado que apoya la hipótesis de una comunicación entre las gónadas. Por estudios electrofisiológicos se ha postulado que existe una comunicación entre los ovarios que pudiera ser mediada por el nervio ovárico superior o por el plexo ovárico, ya que cuando se estimula eléctricamente el nervio ovárico superior se registra un incremento de la actividad del plexo ovárico (Klein y col., 1989).

Morales y colaboradores (1993) mostraron que en la rata prepúber la sección del nervio ovárico superior derecho resulta en un incremento en la proporción de animales ovulantes al primer estro vaginal, mientras que en el presente estudio no se modificó la tasa ovulatoria. A pesar de que en ambos estudios se utilizó la rata prepúber, los resultados difieren debido a que en el experimento antes mencionado se consideró de manera conjunta a ratas sometidas a la denervación durante la etapa infantil y juvenil. Por lo tanto, estos resultados son una prueba más de que los mecanismos neuroendócrinos involucrados en la regulación de la ovulación, funcionan de forma diferente en cada una de las etapas del desarrollo de la rata.

El útero presenta receptores a estrógenos (Ennis y Stumpf, 1989) y progesterona (Ohta y col., 1993) cuyo número varía a lo largo de la vida del animal. La inervación simpática del útero modula la acción de los esteroides ováricos sobre el tejido (Zoubina y col., 1998). En la fase peripuberal de la rata el útero es muy sensible a los estrógenos (Ojeda y Urbanski, 1994), mientras que en la rata adulta la densidad de las fibras simpáticas y sensoriales que inervan al útero varía durante el ciclo estral, lo cual se explica por los cambios en las concentraciones de hormonas esteroides durante el ciclo estral (Zoubina y col., 1998). El mayor de peso del útero en la rata juvenil con sección del nervio ovárico superior derecho desde cuatro días anteriores a la apertura vaginal se explica por el aumento en la concentración de estradiol en esos animales. La sección unilateral del nervio ovárico superior en la etapa infantil (16 días de edad) resulta en el aumento del peso del útero cuando el animal llega a la etapa juvenil (Morán y col., 2000). Tomados en conjunto, estos resultados indican que en la etapa juvenil, la información nerviosa que transcurre por el nervio ovárico superior derecho regula de manera inhibitoria la secreción de estradiol.

En la rata adulta la información neural que transcurre por el nervio ovárico superior participa en la regulación de la secreción de progesterona de modo diferente según el día del ciclo estral estudiado (Aguado y Ojeda (1984b), mientras que en la rata infantil, el nervio ovárico superior regula de manera estimulante la secreción de progesterona (Morán y col., 2000). Los resultados del presente estudio indican que en el animal juvenil la información que transcurre por dicho nervio también regula de manera estimulante la secreción de progesterona,

Nuestros resultados indican que en la rata juvenil y púber la secreción de testosterona es regulada de manera asimétrica por el nervio ovárico superior, siendo el nervio izquierdo el que tiene mayor participación en la regulación, lo cual concuerda con lo observado por Linares (2006) en el animal de 24 días.

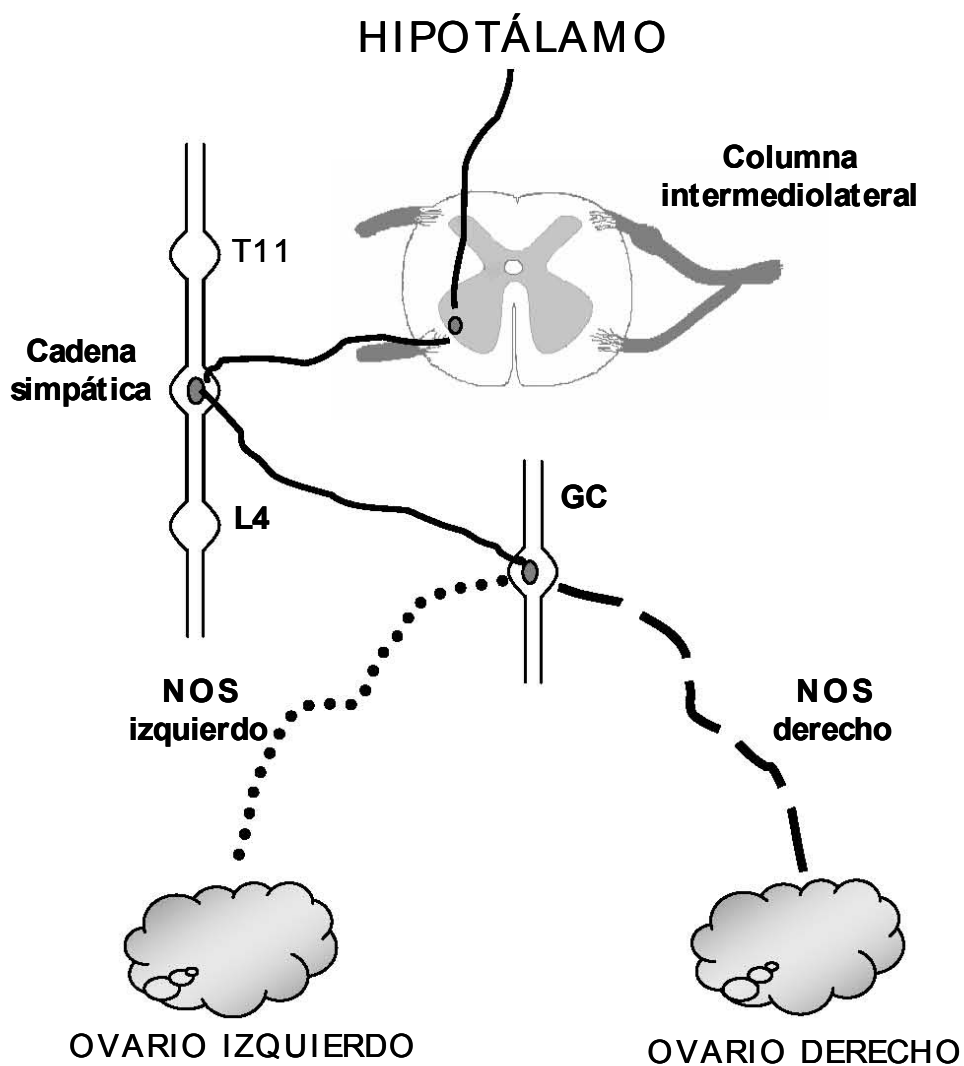
En ratas de 4 días de edad, la sección bilateral del nervio ovárico superior resultó en una disminución de la concentración de androstenediona a los 30 días (etapa prepuberal) y 41 días (etapa puberal) (Forneris y Aguado 2002). En el presente estudio observamos que en la rata juvenil de 32 días de edad, con sección de ambos nervios las concentraciones de testosterona fluctuaron en función del tiempo transcurrido entre la sección y la autopsia, por lo que postulamos que la secreción de andrógenos varía con la edad del animal en estudio.

Las diferencias observadas en los efectos de la sección unilateral del nervio ovárico superior en la rata juvenil sobre la concentración de estradiol, menor en los animales con sección del nervio ovárico superior izquierdo y mayor en aquellos con sección del nervio derecho, indican que en esta etapa la participación del nervio ovárico superior es asimétrica y varía con la edad del animal.

En resumen, a partir de los resultados obtenidos en el presente estudio sugerimos que el nervio ovárico superior participa de manera diferencial en la esteroidogénesis ovárica y dicha participación varía con el tiempo transcurrido y el nervio seccionado.

MODELO

En la figura 17 se presentan los efectos agudos de seccionar el nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) ó bilateral (SBNO) sobre la concentración sérica de progesterona (P4), testosterona (T), estradiol (E2), masa ovárica (MO), útero (U) y edad de apertura vaginal (EAV) realizada en la rata de 32 días de edad y sacrificadas 30 min., 1,5,48 ó 72 horas post-sección y un grupo más al presentar el primer estro vaginal (PEV). Donde el signo (\neq) nos indica que hubo variaciones a los largo de los tiempos de sacrificio, la flecha (\uparrow) indica un incremento ó descenso (\downarrow) en la mayoría de los tiempos en los cuales fueron sacrificados los animales y el signo ($=$) que no hubo cambios significativos.



SNOI	
[P ₄]	≠
[T]	↑
[E ₂]	↓
MO	=
U	=
EAV	Retraso

SNOD	
[P ₄]	=
[T]	=
[E ₂]	↑
MO	=
U	↑
EAV	=

SBNO	
[P ₄]	=
[T]	↑
[E ₂]	=
MO	=
U	=
EAV	Retraso

Figura 17. Representación esquemática de la porción simpática de la innervación del ovario, la cual se origina en la cadena ganglionar simpática del segmento T11 a L4 y hacen sinapsis en el ganglio celiaco (GC) donde nace el nervio ovárico superior (NOS).

CONCLUSIONES

- En la rata de 32 días de edad la laparotomía unilateral o bilateral retrasa la edad de apertura vaginal.
- Las concentraciones de progesterona, testosterona y 17- β estradiol se modifican con el hecho de realizar una laparotomía uni o bilateral y dependen del período de evolución.
- La sección del nervio ovárico superior izquierdo o bilateral retrasa la edad de apertura vaginal.
- La ovulación depende más de la integridad del nervio ovárico superior derecho.
- El nervio ovárico superior derecho inhibe el crecimiento del útero cuando la rata esta cercana a la pubertad.
- En la rata juvenil y púber el nervio ovárico superior izquierdo se encuentra más comprometido con la secreción de testosterona.
- El nervio ovárico superior izquierdo modula de manera estimulante la secreción de estradiol, mientras que el derecho actúa inhibiendo la secreción de dicha hormona
- El nervio ovárico superior participa de manera diferencial en la esteroidogénesis ovárica y dicha participación varia con el tiempo transcurrido y el nervio seccionado.

REFERENCIAS

- Aguado L. I. y Ojeda S. R. (1984a). Prepuberal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. Role of noradrenergic innervation. **Endocrinology**. 114 (5):1845-1853.
- Aguado L. I. y Ojeda S. R. (1984b). Ovarian adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion. **Endocrinology**. 114 (5):1944-1946.
- Ahmed C. E., Dess W. L., y Ojeda S. R. (1986). The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP) containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. **Endocrinology**. 118: 1682-1689.
- Anderson R. G., Brown M. S. y Goldstein J. L. (1977). Role of the coated endocytotic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. **Cell Tissue Res**. 10:351.
- Andrew W. W. y Ojeda S. R. (1981). A detailed analysis of the serum luteinizing hormone secretory profile in conscious, free-moving female rats during the time of puberty. **Endocrinology**. 109:2032-2039.
- Anesetti G., Lombide P. D., D'Albora H. y Ojeda S. R. (2001). Intrinsic neurons in the human ovary. **Cell Tissue Res**. 306: 231-237.
- Arias (2003). Endocrinología de la Reproducción. En: Dvorkin MA, Cardinali DP. (Eds.) **Bases Fisiológicas de la Práctica Médica**. 13°. Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires. Cap. 38. pp: 659-681.

- Barco A. I., Flores A., Chavira R., Damián-Matsumura P., Domínguez R. y Cruz M. E. (2003). Asymmetric effects of acute hemiovariectomy on steroid hormone secretion by the in situ ovary. **Endocrine**. 21: 209-215.
- Becú-Villalobos D. B. y Lacau-Mengido M. I. (1990). Control hormonal del desarrollo puberal en la rata hembra. **Acta Physiol.Pharmacol.Latinoam**. 40: 1-17.
- Berga S. (1996). Functional hypothalamic chronic anovulation. En: Adashi EY., Rock JA., Rosenwaks Z., eds. **Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology**. V.1. Philadelphia: Lippincott-Raven. Pp: 1061-1075.
- Bergman R. A., Afifi A. K y Heidger P, M. (1998). “Sistema reproductor femenino”. En: **Histología**. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. Cap 16. pp. 307-320.
- Bjersing L. (1967). Histochemical demonstration of 5-3 β - and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities in porcine ovary. **Histochemic**. 10:295.
- Bolaños G. A. (2005). Participación de la innervación parasimpática en el inicio de la pubertad y en la esterodogénesis ovárica. La rata hemicastrada como modelo de estudio. **Tesis de licenciatura**. México, D. F.
- Brann D. W., Bhat G. K., Lamar C. A. Y Mahesh V.D. (1997). Gaseous transmitters and neuroendocrine regulation. **Neuroendocrinology**. 65: 385-395.

- Brown M. S. y Goldstein J. L. (1976). Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. **Science**. 191:150.
- Brown M. S., Dana S. E. y Goldstein J. L. (1975). Receptor-dependent hydrolysis of cholesterol esters contained in plasma low density lipoprotein. **Proc Natl Acad Sci USA**. 72:2925.
- Burden H. W. (1978). Ovarian innervation. **En: The vertebrate ovary: Comparative Biology**. R.E. Jones. Ed. Plenum Press. Chapter. 18: 615-638.
- Burden H. W. (1985). The adrenergic innervation of mammalian ovaries. **En: Catecholamines as Hormone Regulator**. N. Ben-Jonathan, J. M. Barh y R.I. Weiner eds. Reven Press, New York.
- Burden H. W. y Lawrence Jr. (1977). The effect of denervation compensatory ovarian hypertrophy. **Neuroendocrinology**. 23: 36-37.
- Burden H. W., Leonard M., Smith C. P. y Lawrence I. (1983). The sensory innervation of the ovary: A horse-radish peroxidase study in the rat. **Anat. Rec.** 207:623-627.
- Byskov A. G. (1978). "Follicular Atresia". En: Jones RE (Ed.). **The Vertebrate Ovary: Comparative Biology and Evolution**. New York: Plenum. 533-562.
- Chávez R., Carrizosa L. y Domínguez R. (1991). Effects of superior ovarian nerve section on spontaneous and induced ovulation in adult rats. **Medical Science Research**. 19: 41-42.

- Chávez R., Morales L., González Ma. E. y Domínguez R. (1994). Ovarian norepinephrine content in prepubertal rats with superior ovarian nerve section: Temporal studies. **Medical Science Research**. 22: 789-790.
- Chrousos G.P., Torpy D. J. y Gold P. W. (1998). Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: **Clinical Implications. An. Intern. Med.** 129: 229-240.
- Cruz M. E., Flores A., Palafox M. T., Méendez G., Rodríguez O. J., Chavira R. y Domínguez R. (2006). The role of the muscarinic system in regulating estradiol secretion varies during the estrous cycle: the hemiovariectomized rat model. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 4(43): 1-8.
- D'Albora H., Anesetti G., Lombide P., Dess W. y Ojeda S. R. (2002). Intrinsic neurons in the mammalian ovary. **Microscopy Research and Technique**. 59:484-489.
- D'Albora H., Lombide P. y Ojeda S. R. (2000). Intrinsic neurons in the rat: an immunohistochemical study. **Cell Tissue Res**. 300: 47-56.
- Davoren J. y Hsueh A. (1985). Vasoactive intestinal peptide: Anovel stimulator of steroidogenesis by cultured rat granulosa cells. **Biol. Reprod**. 33: 37-52.
- De Bortoli M. A., Garraza M. H. y Aguado L. I. (1998). Adrenergic intracerebroventricular stimulation affects progesterone concentration in the ovarian vein of the rat: participation of the superior ovarian nerve. **Journal of Endocrinology** 159: 61-68.

- De Bortoli M. A., Garraza M. H. y Aguado L. I. (2000). Epinephrine intracerebroventricular stimulation modifies the LH effect on ovarian progesterone and androstenedione release. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology** 74: 19-24.

- Dees W. L., Ahmed C. y Ojeda S. R. (1986). Substance P and vasoactive intestinal peptide containing fibers reach the ovary by independent routes. **Endocrinology**. 119: 638-641.

- Dees W. L., Hiney J. K., Schultea T. D., Mayherhofer A., Danilchik M., Dissen G. A., y Ojeda S. R. (1995). The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuronlike cells expressing nerve growth factor receptors. **Endocrinology**. 136: 5760-5768.

- Delgado M., Casais M., Sosa Z. y Rastrilla A. (2006). Ganglionic adrenergic action modulates ovarian steroids and nitric oxide in prepubertal rat. **Journal of Endocrinology**. 53:547-554.

- Delgado M., Sosa Z., Dominguez N., Casais M., Aguado L. y Rastrilla A. M. (2004). Effect of the relation between neural cholinergic action and nitric oxide on ovarian steroidogenesis in prepubertal rats. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. 91: 139-145.

- Dees W. L., Schultea T. D., Hiney J. K., Dissen G. y Ojeda S. R. (1992). The rhesus monkey ovary contains a developmentally regulated network of nerve growth factor receptor immunoreactive neurons in addition to its extrinsic innervation. **Prog. 74th. Ann. Mtg. Endocrine Soc.**

- Devine P. J., Payne C. M., McCuskey M. K. y Hoyer P. B. (2000). Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. **Biology of Reproduction**. 63: 1245-1252.
- Dissen A. G. y Ojeda, S. R. (1999). Innervation in ovarian. **En Encyclopedia of Reproduction** (Edits) E. Knobil y J. D. Neill. Academic Press. (3): 583-589.
- Dohler K. D. y Wuttke W. (1974). Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. **Endocrinology**. 94:1003-1008.
- Domínguez R. (1997). Endocrinología de las gónadas. **En: XL Congreso nacional de ciencias fisiológicas sociedad mexicana de ciencias fisiológicas, A. C.**
- Drew F. L. (1961). The epidemiology of secondary amenorrea. **J. Chronic Dis**. 14: 396-407.
- Ennis B. W. y Stumpf (1989). Autoradiographic localization of [³H] hydroxitamoxifen to uterine oestrogen and antioestrogen-binding sites. **Histochem**. 21: 52-60.
- Fawcett D. W. (1995). **Tratado de Histología**. Ed. McGraw-Hill Interamericana. 12º edición. Pp: 886-904.

- Ferruz J., Ahmed C. E., Ojeda S. R. y Lara H. E. (1992). Norepinephrine release in the immature ovary is regulated by autoreceptors and neuropeptide Y. **Endocrinology**. 130: 1345-1351.
- Flores A., Mélenlez G., Palafox M. T., Rodríguez O. J., Barco A. I., Chavira R., Domínguez R. y Cruz M. E. (2005). The participation of the cholinergic system in regulation progesterone secretion through the ovarian-adrenal crosstalk varies along the estrous cycle. **Endocrine**. 28: 1-7.
- Flores A., Morales L., Ulloa-Aguirre A. y Domínguez R. (1990). Acute changes in serum levels of luteinising hormone and follicle stimulating hormone, ovulation and follicular growth induced by stress, unilateral ovariectomy or mechanical stimulation of the ovarian pedicle at different stages of the oestrous cycle of the rat. **Medical Science Research**. 18: 819-921.
- Flores A., Rodríguez O. J., Palafox M. T., Mélenlez G., Barco A. I., Chavira R., Cruz M. E. y Domínguez R. (2006). The acute asymmetric effects of hemiovariectomy on testosterone secretion vary along the estrous cycle. The participation of the cholinergic system. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 4(11): 1-10.
- Forneris L. M. y Aguado L. (2002). Neonatal superior ovarian nerve transection disturbs the cyclic activity of the female rats. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. 82: 75-82.

- Foster L. D. y Ebling F. J. (1999). Puberty, in nonprimate mammals. **En: The Physiology of Reproduction**. Vol. 5. Pp: 142-151. Second. Edition. Knobil, E., Neill, J. (Eds). New York: Raven Press.
- Freeman M. (1994). The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. **En: The Physiology of Reproduction**. Segunda edición, Raven Prees, New York, USA: 620-634.
- Garraza M. H., Aguado I. L. y De Bortoli, M. A. (2004). In vitro effect of neuropeptides on ovary or celiac ganglion affects the release of progesterone from ovaries in the rat. **Med. Sci. Monit.** 10(12): BR440-446.
- Geneser F. (2000). Órganos de la Reproducción. **En: Histología sobre Bases Biomoleculares**. 3ra. Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Cap. 22. pp: 613-638.
- George F. W. y Ojeda S. R. (1987). Vasoactive intestinal peptide enhances aromatasa activity in the neonatal rat ovary before development of primary follicles or responsiveness to follicle-stimulating hormone. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 84: 5803-5807.
- Gerendai I., Toth I. E., Boldogkoi Z., Medveczky I. y Halasz B. (1998). Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral tracing technique. **Neuroendocrinology**. 68: 244-256.
- Goldfien A. y Monroe S. E. (1998). Ovarios. En: Greenspan FS, Strewler GJ. (Eds.) **Endocrinología Básica y Clínica**. 4ta. Edición. Editorial el Manual Moderno. México, D. F. Cap. 13 pp: 497-554.

- Goldstein J. L., Anderson R. G. y Braw M. S. (1979). Coated pits, coated vesicles, and receptor mediated endocytosis. **Nature**. 279:679.
- Gore-Langton R. y Armstrong D. T. (1994). Follicular steroidogenesis and its control **En: The Physiology of Reproduction**, Vol 1 pp:571-627. Second Edition. Knobil E. Neill JD (Eds) New Cork: Raven Press Ltd.
- Greenwald G. S. y Roy S. K. (1994). Follicular development and its control. En: Knobil E, Neill JD (Eds.) **The Physiology of Reproduction**. 2nd Editorial Raven Press. New York, Vol 2. Cap. 12 pp. 629-724.
- Guyton A. C. (2001). Fisiología femenina antes de la gestación y hormonas femeninas. **En: Tratado de Fisiología Médica**. 10^a. Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México. Cap. 81. pp: 1117-1133.
- Hage A.J., Groen-Klevant A. C. y Welschen R. (1978). Follicle growth in the immature rat ovary. **Acta endocr. (Copenh)**. 88:375-382.
- Hsueh A. J. W., Adashi E. Y., Jones P. B. C. y Welsh T. H. J. (1984). Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. **Endocr. Rev.** 5: 76-127.
- Hsueh A. J. W., Billig H. y Tsafiriri A. (1994). "Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process". **Endocr. Rev.** 15: 707-724.

- Italo T. R. y Pineda R. L. (1988). Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal en la edad reproductiva de la mujer. **Avances de Reproducción Humana**. Sociedad argentina de esterilidad y fertilidad. Ed Panamericana. Pp: 21-49.
- Kaipia A. y Hsueh A. J. W. (1997). Regulation of ovarian follicle atresia. **Annu. Rev. Physiol.** 59: 349-363.
- Kawakami M., Kubo K., Uemura T., Nagase M. y Hayashi R. (1981). Involvement of ovarian innervation in steroid secretion. **Endocrinology**. 109: 136-145.
- Klein C. M. y Burden H. W. (1988). Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. **Neuroscience Letters**. 85: 217-222.
- Lamprecht S. A., Kohen F., Ausher J., Zor U. y Lindner H. R. (1976). Hormonal stimulation of estradiol-17 β release from the rat ovary during early postnatal development. **Journal of Endocrinology**. 68: 343-344.
- Lawrence I. E. Jr. y Burden H. W. (1980). The origin of the Extrinsic Adrenergic innervation to the rat ovary. **The Anatomical Record** 196: 51-59.
- Linares C. R. (2006). Participación del nervio ovárico superior en el desarrollo del síndrome del ovario poliquístico. La rata como modelo de estudio. **Tesis de Licenciatura**. México, D. F.

- Loucks A. B. y Yens S.C. (1989). Alterations in the hypothalamic-pituitary-ovarian and the hipotalamic-pituitary-adrenal axes in athletic women. **J. Clin. Endocr. Metab.** 68: 402-411.
- Mackinnon P.C.B., Mattock J.M. y Ter Haar, M. B. (1976). Serum gonadotrophin levels during development in male, female and androgenized female rats and the effect of general disturbance on high luteinizing hormone levels. **Journal of Endocrinology.** 70:361-371.
- Malamed S., Gibney JA. y Ojeda S. R. (1992). Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat. **Cell Tissue Res.** 270: 87-93.
- Markstrom E., Svensson E. C., Shao R., Svanberg B. y Billig H. (2002). Survival factors regulating ovarian apoptosis dependence on follicle differentiations. **Reproduction.** 123: 23-30.
- Mayerhofer A., Dissen G. A., Costa M. E. y Ojeda S. R. (1997). A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. **Endocrinology.** 138: 3320-3329.
- Meijs-Roelofs H. M. A., Kramer P. y Sander H.J. (1983). Changes in serum concentrations of luteinizing hormone in the female rat approaching puberty. **Journal of Endocrinology.** 98:241-249.

- Morales L. (1996). Participación del nervio ovárico superior en la regulación de la función del ovario de la rata prepúber. El modelo del animal estimulado con gonadotropinas y sus efectos sobre la ovulación y el crecimiento folicular. **Tesis de Doctorado**. México, D. F.
- Morales L., Betanzos R. y Domínguez R. (2004). Unilateral or bilateral vagotomy performed on prepubertal rats at puberty onset of female rat deregulates ovarian function. **Arch. Med. Res.** 35:279-283.
- Morales L., Chávez R. y Domínguez R. (1993). Participation of the superior nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve. **Medical Science Research.** 21:15-17.
- Morales L., Chávez R. y Domínguez R. (1998). Effect of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in prepubertal rats on the ovulatory response to gonadotrophin administration. **Journal of Endocrinology.** 158: 213-219.
- Morales L., Ricardo B., Bolaños A., Chavira R y Domínguez R. (2007). Ipsilateral vagotomy to unilaterally ovariectomized pre-pubertal rats modifies compensatory ovarian responses. **Reproductive Biology and Endocrinology.** 5:24.
- Morán C., Franco A., Morán J. L., Handal A., Morales L. y Domínguez R. (2005). Neural activity between ovaries and the prevertebral celiac-superior-mesenteric ganglio varies during the estrous cycle of the rat. 26 (2):147-152.

- Morán C., Morales L., Quiróz U. y Domínguez R. (2000). Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section infantile rats on follicular growth. **Journal of Endocrinology**. 166: 205-211.
- Motta A. B., Estevez A., Tognetti T., Gimeno M. A. F. M. y Franchi A. M. (2001). Dual effects of nitric oxide in functional and regressing rat corpus luteum. **Molecular Human Reproduction**. 7: 43-47.
- Ohta Y., Sato T. y Iguchi T. (1993). Immunocytochemical localization of progesterone receptor in the reproductive tract of adult female rats. **Biol. Reproduction**. 48: 205-213.
- Ojeda S. R., Andrews W. W., Advis J. P. y Smith-White S. (1980). Recent advances in the endocrinology of puberty. **Endocrine Rev.** 1: 228-257.
- Ojeda S. R. y Lara H. E. (1989). Role of the sympathetic nervous system in the regulation of ovarian function. **In the Menstrual Cycle and Its Disorders**, ed. K.M. Pirke, W. Wuttke, and U. Schweiger, 26-32. Berlin: Springer-Verlag.
- Ojeda S. R. y Urbanski H. F. (1988). Puberty in the rat. **En: The Physiology of Reproduction**. Knobil, E., Neill, J., ET AL. Eds Raven Press Ltd, Nueva York. 1699-1737.
- Ojeda S. R. y Urbanski H. F. (1994). Puberty in the Rat. **En: The physiology of Reproduction**. (Edits) E. Knabil y J. D. Neill. Raven Press. New York, USA: 363-409.

- Ojeda S. R., Urbanski H. F. y Ahmed (1986). The onset puberty: Studies in the rat. **Recent Prog Horm. Res.** 42: 385-395.
- Ojeda S. R., White S. S., Aguado L. I., Advis J. P. y Andersen J. M. (1983). Abdominal vagotomy delays the onset of puberty and inhibits ovarian function in the female rat. **Neuroendocrinology.** 36: 261-267.
- Oliver R. H., Chen G. D., Yeh J. (1999). Follicular atresia. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) **Encyclopedia of Reproduction.** Academia Press. Vol. 2 pp:373-375.
- Owman C., Kannisto P., Liedberg F., Schmidt G., Sjoberg N, O., Stjernquist M y Walles B. (1992). Innervation of the ovary. **In Local Regulation of Ovarian Function.** 149-170.
- Pedernera E. (1993). Cooperación celular en la biosíntesis de hormonas esteroides. Comunicación neuroendocrina bases celulares y moleculares. **Sociedad Mexicana de Ciencia Fisiológicas, México.** 33-46.
- Peter H. (1970). Some aspects of early follicular development. **En Ovarian Follicular Development and Function.** Eds. Raven Press, Nueva York: 1-3.
- Peters H. y McNatty K. (1980). The ovary. **Granada Publishing, London.**
- Ramaley J. D. (1980). Biological clocks and puberty onset. **Federation Proceedings,** 39:2355-2359.

- Ramírez V. D. (1973). Endocrinology of puberty. **En: Handbook of Physiology**. Greep RO, Astwood EB (Eds). Washington: American Physiological Society. 2(7):1-28.
- Raynaud J.P. (1973). Influence of rat estradiol binding plasma protein (EBP) on uterotrophic activity. **Steroids**. 21:249-258.
- Ricardo G. B. (2005). Participación de la inervación vagal en la respuesta compensadora del ovario. La rata hemicastrada como modelo de estudio. **Tesis de Licenciatura**. México, D. F.
- Ross M., Romrell L. y Kaye G. (1997). **Histología**. 3ª ed. Panamericana. México. 674-688.
- Selstam G., Norjavaara E., Tegenfelt T., Lundberg S., Sandstrom C. y Persson S. (1985). Partial denervation of the ovaries by transection of the suspensory ligament does not inhibit ovulation in rats treated with pregnant mare serum gonadotropin. **The Anatomical Record**. 213: 392-395.
- Short T. J., Pickett J., Wood G. y Paczynski M. (1999). Acute stress persistently enhances estrogen levels in the female rat. **Stress**. 3: 162-171.
- Smith-White S. y Ojeda S.R. (1981). Changes in ovarian luteinizing (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) receptor content and in gonadotropin-induced ornithine decarboxylase activity during prepubertal and pubertal development of the rat. **Endocrinology**. 109:152-161.

- Sosa Z, Casais M, Rastrilla A.M y Aguado L. (2000). Adrenergic influences on celiac ganglion affect the release of progesterone from cycling ovaries: characterization of an in vitro system. **Journal of Endocrinology**. 166. 307-318.
- Sosa Z., Delgado M., Casais M., Aguado L. y Rastrilla A. M. (2004). Release of ovarian progesterone during the rat oestrous cycle by ganglionic cholinergic influence. The role of norepinephrine. **Journal of Steroid Biochemistry y Molecular Biology**. 91: 179-184.
- Stevens A. (1999). **Histología Humana**. Ed Harcourt. 2da edición, España. Pp: 320-330.
- Tilly J. L. (1998). Molecular and genetic basis of normal and toxicant-induced apoptosis in female germs cells. **Toxicol Lett**. 102-3: 497-501.
- Tresguerres J. A. (2003). **Fisiología Humana**. Ed. McGraw-Hill Interamericana. 2º edición. Pp: 1036-1048.
- Urbanski H. F y Ojeda S. R. (1983). The juvenile-peripuberal transition period in the female rat: establishment of a diurnal pattern of pulsatile luteinizing hormone secretion. **Endocrinology**. 117:644-649.
- Van Voorhis B.J. (1999). Follicular steroidogenesis. En: Encyclopedia of Reproduction, Vol 2. **Academic Press**. Pp: 389-395.

- Weiss W. G., Dail W. G. y Ratner A. (1982). Evidence for direct neural control of ovarian steroidogenesis in rats. **Journal Reproduction and Fertility**. 65: 507-511.
- Wuttke W., Honma K., Lamberts J. y Hohn K. G. (1980). The role of monoamines in female puberty. **Fed. Proc.** 39:2378-2383.
- Yeh J. y Adashi E. Y. (2001). El ciclo ovárico. **En: Endocrinología de la Reproducción, fisiología, fisiopatología y manejo clínico**. 4ta. Edición. Editorial. Medica Panamericana. Pp: 164-202.
- Yoshinaga K. (1999). Estrogen secretion, regulation of. **En: Encyclopedia of Reproduction, Vol 2. Academic Press.** 108-118.
- Zoubina E. V., Fan Q. y Smith P. (1998). Variations in uterine innervation during the estrous cycle in rat. **The Journal of Comparative Neurology.** 397: 561-571.