



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
“ZARAGOZA”

¿LA PARTICIPACIÓN DEL NERVIIO OVÁRICO  
SUPERIOR EN LA REGULACIÓN DE LA  
OVULACIÓN Y LA ESTEROIDOGÉNESIS DEPENDE  
DEL CICLO CIRCÁDICO? LA RATA ADULTA  
COMO MODELO DE ESTUDIO.

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

DEYRA DE LOS ANGELES RAMÍREZ HERNÁNDEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA  
MIEMBROS DEL CÓMITE TUTOR: DRA. MARGARITA VIRGINIA  
GONZÁLES DEL PLIEGO OLIVARES  
DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ

MÉXICO, D.F.

ENERO DE 2011.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de octubre de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **RAMIREZ HERNANDEZ DEYRA DE LOS ANGELES** con número de cuenta **99262893** con la tesis titulada "**¿La participación del nervio ovárico superior en la regulación de la ovulación y la esteroidogénesis depende del ciclo circádico? La rata adulta como modelo de estudio**", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. LETICIA MORALES LEDESMA**:

Presidente: DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ  
Vocal: DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATZUMURA  
Secretario: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA  
Suplente: DR. BENJAMÍN FLORAN GARDUÑO  
Suplente: DRA. MARGARITA VIRGINIA GONZÁLEZ DEL PLIEGO OLIVARES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de enero de 2011.

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM** por darme la oportunidad de entrar en su programa en beneficio de mi formación académica y por conducirme a terminar mis estudios de posgrado.

Agradezco también al **CONACyT** por la beca 220291 otorgada para realizar mis estudios de maestría y al apoyo financiero de **DGAPA-PAPIIT** convenio IN-203307 y IN-213110.

Agradezco a cada uno de los miembros del jurado:

**Dr. Roberto Domínguez Casalá**

**Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura**

**Dra. Leticia Morales Ledesma**

**Dr. Benjamín Florán Garduño**

**Dra. Margarita Virginia González del Pliego Olivares**

Por el tiempo dedicado a la revisión de la tesis, por sus comentarios y sugerencias que la enriquecieron.

Al **Dr. Roberto** y a la **Dra. Margarita** por aceptar ser miembros de mi comité tutorial y seguir de cerca mi desarrollo académico dando la mejor crítica en cada uno de los tutorales. Por ayudarme a corregir mis errores, por compartir sus conocimientos y por su valiosa amistad.

En especial a la **Dra. Lety** por trabajar conmigo en la escritura, redacción y discusión del presente estudio, por encaminarme siempre en el campo del conocimiento y la autosuficiencia para terminar mis estudios de posgrado.  
¡¡¡Muchas Gracias!!!

A todos mis amigos del laboratorio que colaboraron en la realización de esta tesis: Azucena, Andrea, Clau, Denisse, Dan, Rosa, Gaby, Juan, Ricardo, Vero, Dra. Paty y muy en especial a **Ely**. Porque nuestra amistad crezca cada día más.

A la Dra. Adriana y al Dr. Román por su apoyo en el cuidado de las ratas del bioterio utilizadas en el estudio y por su amistad.

Al Biol. Roberto Chavira y al Biol. Mario Cardénas por su colaboración en la medición hormonal del presente estudio.





## DEDICATORIAS

### *A ti mi Dios*

*Gracias a tus bendiciones he logrado terminar esta tesis, tu infinita paciencia me ha mostrado el camino del triunfo. Te amo.*

### *A mis padres*

*(Mamá Chucha y Papá Beto)*

*En esta ocasión quiero dedicarles éste trabajo que realice con el esfuerzo de ustedes, porque el apoyo fue siempre incondicional y necesario para emprender y terminar esta etapa de mi vida. Gracias por enseñarme a levantarme de los fracasos, porque mi felicidad y orgullo es saber que los tengo junto a mí, disfrutando de nuestros éxitos. Los amo♥.*

### *A mis abuelitos*

*(Mamá Fanny y Papá Chucho)*

*También dedico a ustedes este estudio que con mucho entusiasmo logre terminar gracias a sus palabras de superación.*

*Porque todo momento me muestran que la vida puede seguir diferentes rumbos y que cualquiera que tomase siempre estarán para apoyarme. Los amo.*

### *(Abuelita Vice)*

*Por compartir una gran sonrisa de entusiasmo y palabras de aliento que me permitieron lograr este sueño. Te quiero.*





### *A mis tías*

*(Conchita e Inés)*

*Porque cada momento que compartimos, me demuestran su enorme cariño y apoyo, gracias por acompañarme en los instantes más importantes de mi vida. Las quiero.*

*(Tía Gela)*

*Mi querida tía, aunque lejos de casa se que me envías tus bendiciones y por tal razón he llegado a concluir un sueño que veía lejano, esperando que el sueño de vernos todos otra vez, muy pronto se cumpla. Gracias, te extraño.*

### *A mis hermanos*

*(Beto, Fanny, Beba, Jorge y Morín)*

*A mis queridos hermanos les dedico este estudio, porque todo momento han impulsado mi desarrollo personal y ayudado a tomar las decisiones correctas, por el tiempo que disfruto de su compañía, sueños y deseos. Porque siempre estemos juntos logrando éxitos. Los adoro pequeños!!!!*

### *A mis sobrinitos*

*(Phany y Cayitos)*

*Mis dos pequeños angelitos siempre dando ánimos con esas hermosas sonrisas en los momentos de soledad y tristeza, por aquellas sabias palabras mi pequeña Phany en mis momentos de enojo, por tus graciosidades mi Cayito. Gracias gordos, los amo.*

### *A Angeles y Carlos*

*Por ser parte de mi familia, gracias por desear lo mejor para mí, animándome a seguir cosechando éxitos, espero que en lo venidero estemos más unidos y disfrutemos más nuestra compañía y amistad. Los aprecio muchísimo.*





### *A la Dra. Lety*

*Por ser un gran ejemplo a seguir, inculcando en mí la responsabilidad que conlleva la realización de una maestría, siempre dando lo mejor para sacarme adelante, por escuchar y aconsejar ante las dificultades y sobre todo por su gran amistad, que es lo más importante que he obtenido después de tantos años de conocernos. Gracias.*

### *Al Dr. Roberto*

*Por permitirme ser parte de este gran grupo de trabajo que conforma la UIBR, por enseñarme a escribir y expresarme correctamente, gracias por todo su apoyo en mi desarrollo personal y por su grata amistad. Lo admiro.*

### *A Elizabeth*

*Porque nuestra amistad perdure y sigamos apoyándonos como hasta ahora, compartiendo alegrías, tristezas, fracasos y éxitos. Gracias por esas palabras de aliento que me hicieron sentir mejor y porque seamos aún más unidas. Gracias amiga.*



# ÍNDICE

	<i>Páginas</i>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<i>i</i>
<b>RESUMEN</b> .....	<i>ii</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>iv</i>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
El ovario de los mamíferos .....	<b>3</b>
La ovulación.....	<b>4</b>
Biosíntesis de hormonas esteroides y su regulación por gonadotropinas----	<b>5</b>
Secreción de GnRH y gonadotropinas.....	<b>15</b>
El ciclo estral en la rata hembra.....	<b>16</b>
Inervación ovárica.....	<b>20</b>
Participación de la inervación simpática en las funciones reproductivas----	<b>23</b>
Ritmos biológicos.....	<b>26</b>
El reloj biológico maestro: El núcleo supraquiasmático.....	<b>28</b>
Relojes biológicos en tejidos periféricos.....	<b>33</b>
Papel del NSQ en la regulación del ciclo estral y las funciones del ovario---	<b>34</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>38</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>39</b>

	<i>Páginas</i>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	<b>41</b>
<b>Procedimiento de autopsia</b> .....	<b>42</b>
<b>Cuantificación hormonal por radioinmunoanálisis (RIA)</b> .....	<b>44</b>
<b>Cálculo de la tasa de animales ovulantes</b> .....	<b>46</b>
<b>Análisis estadístico</b> .....	<b>46</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
<i><b>EXPERIMENTO I. Efectos agudos y sub-agudos de la operación simulada, realizada a las 11:00 ó 17:00 horas del diestro 1 o proestro, sobre la función ovárica</b></i> .....	<b>47</b>
<i><b>EXPERIMENTO II. Efectos agudos y sub-agudos de la sección del nervio ovárico superior, realizada a las 11:00 ó 17:00 horas del diestro 1 o proestro, sobre la función ovárica</b></i> .....	<b>49</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>65</b>
<b>MODELO</b> .....	<b>73</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>75</b>
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>77</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>78</b>

## RESUMEN

La secreción de hormonas esteroideas por el ovario y la ovulación son reguladas por señales endocrinas y nerviosas. El nervio ovárico superior (NOS) es la principal ruta de aporte simpático que recibe la gónada. En la rata adulta la información que llega a los ovarios a través del NOS participa en la regulación de la secreción de hormonas esteroideas y la ovulación, que dependen del día del ciclo estral analizado.

Con el fin de analizar si la participación del NOS sobre las funciones del ovario en la rata adulta dependen de la hora del día, en el presente estudio evalué los efectos agudos y sub-agudos de la sección uni o bilateral del NOS sobre la concentración de progesterona ( $P_4$ ), testosterona (T), estradiol ( $E_2$ ), la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) en suero. Para ésta propuesta, ratas adultas de la cepa CII-ZV a las 11:00 ó 17:00 horas del diestro 1 (D1) o proestro (P) fueron sometidas a la sección del NOS-izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO). Como grupos de comparación utilice animales con laparotomía izquierda, derecha o bilateral. Un grupo testigo intacto también se incluyó. Los diferentes grupos de animales testigo y tratados fueron sacrificados una o 24 horas después de la cirugía. La ovulación espontánea fue también analizada en éstos animales tratados en P, sacrificados 24 h después de la cirugía.

Una hora después de la laparotomía uni o bilateral realizadas a las 11:00 h del D1 o P resultó en mayores concentraciones de  $P_4$  que los animales control intactos. Veinticuatro horas después de la laparotomía practicada a las 11:00 h del D1, la cirugía izquierda y bilateral resultó en menores concentraciones de  $P_4$ , mientras que la bilateral resultó en mayor concentración de la hormona, cuando ésta fue realizada a las 17:00 h. Cuando la laparotomía fue realizada en el P, 24 horas después, la cirugía bilateral resultó en mayor concentración de  $P_4$ .

Una hora después de la laparotomía unilateral realizada a las 11:00 h del D1 o P resultó en mayor concentración de T. Efectos similares ocurrieron en las ratas tratadas a las 17:00 h del P. Veinticuatro horas después de la laparotomía uni o bilateral realizadas en D1, las concentraciones de T fueron menores que el control. Veinticuatro horas después de la cirugía izquierda o bilateral realizadas a las 11:00 h del D1, las concentraciones de  $E_2$  fueron mayores que el control, y menores en las ratas tratadas a las 17:00 h del P.

La laparotomía realizada en D1 resultó en menores concentraciones de LH y FSH. Una hora después de la laparotomía realizada a las 11:00 h del P, las concentraciones de LH fueron mayores que en el grupo control.

Veinticuatro horas después de la SNOI o SBNO a las 11:00 h del D1, las concentraciones de P4 fueron mayores que en los animales laparotomizados, mientras que éstas fueron menores cuando las cirugías se realizaron a las 17:00 h. Una hora después de la SBNO realizada a las 11:00 h del D1, la concentración de T fue mayor que en el grupo laparotomizado, mientras que ésta fue menor cuando la cirugía se realizó en el P.

La SNOD realizada a las 11:00 h del P resultó en mayor concentración de E<sub>2</sub>, una hora después de la cirugía. Un efecto similar fue observado en las ratas con SBNO realizada a las 17:00 h del P, sacrificadas 24 h después.

La SNOD realizada en el D1 resultó en mayor concentración de FSH. Una hora después de la sección uni o bilateral del NOS realizadas a las 11:00 ó 17:00 h del P, las concentraciones de LH fueron menores que en los grupos laparotomizados.

La laparotomía unilateral o bilateral, o la sección del NOS realizadas en el día del P, no modificaron la tasa de ovulación. El número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo fue menor en las ratas con SBNO realizada a las 11:00 h. Un resultado similar ocurrió en el ovario derecho de ratas con SNOD.

Los resultados del presente estudio apoyan la hipótesis de que la participación de las señales nerviosas que surgen de la pared abdominal y que llegan a los ovarios a través del NOS desempeñan un papel en la regulación de la secreción de hormonas esteroides en una vía asimétrica, la cuales dependen del día del ciclo estral y de la hora del día.

## **A B S T R A C T**

The secretion of steroid hormones by the ovary and ovulation are regulated by endocrine and nerve signals. The superior ovarian nerve (SON) is the main route of sympathetic input receiving the gonad. In the adult rat the information reaching the ovaries through the SON is involved in the regulation of steroid hormone secretion and ovulation depending on the day of the estrous cycle analyzed.

In order to analyze if the involvement of the SON on the regulation of ovarian functions in the adult rat depend on the hour of the day when the study was performed, in the present study I evaluated the acute and sub-acute effects of uni or bilateral SON section on progesterone ( $P_4$ ), testosterone (T), estradiol ( $E_2$ ), follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) serum levels. For this purpose, adults rats of the CII-ZV strain at 11:00 or 17:00 hours on diestrus 1 (D1) or proestrus (P) were subjected to section of the left-SON (LSON), right (RSON) or bilateral (BSON). For comparison I used groups of animals with left, right or bilateral laparotomy. An untouched control group was also included. Different groups of control and treated animals were sacrificed one or 24 hours after surgery. Spontaneous ovulation was also analyzed in those animals treated at P, sacrificed 24 h after surgery.

One hour after uni or bilateral laparotomy performed at 11:00 h on D1 or P resulted in higher  $P_4$  levels than untouched control. Twenty-four hours after laparotomy performed at 11:00 h on D1, left and bilateral surgery resulted in lower  $P_4$  levels, while bilateral surgery resulted in higher hormone levels when it was performed at 17:00 h. When the laparotomy was performed at P, bilateral surgery resulted in higher  $P_4$  levels 24 h after it.

One hour after unilateral laparotomy performed at 11:00 h on D1 or P resulted in higher T concentration. Similar effects occurred in rats treated at 17:00 h on P. Twenty-four hours after uni or bilateral laparotomy performed at D1, T levels were lower than control. Twenty-four hours after left or bilateral surgery performed at 11:00 h on D1,  $E_2$  levels were higher than control, and lower in rats treated at 17:00 h on P.

Laparotomy performed in D1 resulted in lower LH and FSH concentrations. One hour after laparotomy performed at 11:00 h on P, LH levels were higher than in control group.

Twenty-four hours after of the LSON or BSON at 11:00 h on D1, P<sub>4</sub> levels were higher than in laparotomized animals, while it was lower when the surgery was done at 17:00 h.

One hour after of the BSON performed at 11:00 h on D1, T level was higher than in laparotomized group, while it was lower when the surgery was done at P. The RSON performed at 11:00 h on P resulted in higher E<sub>2</sub> levels one hour after surgery. A similar effect was observed in rats with BSON performed at 17:00 h on P sacrificed 24 h later.

The RSON performed at D1 resulted in higher FSH levels. One hour after the uni or bilateral section of the SON performed at 11:00 or 17:00 h on P, LH levels were lower than laparotomized groups.

The unilateral or bilateral laparotomy or section of the SON performed on the day of P did not alter the ovulation rate. The number of ova shed by the left ovary was lower in rats with BSON performed at 11:00 h. A similar result occurred in the right ovary of rats with the RSON.

The results of present study support the hypothesis that the participation of neural signals arising from the abdominal wall and arriving to the ovaries via the SON play a role in the regulation of steroids hormone secretion in an asymmetric way, which depend on the day of the estrous cycle and the hour of the day.

# INTRODUCCIÓN

Las funciones de los ovarios son reguladas por hormonas del eje hipotálamo-hipófisis y por el sistema nervioso autónomo (Burden, 1985; Doganay y col., 2009). Las influencias nerviosas llegan por vías simpáticas, sensoriales y parasimpáticas (Dissen y Ojeda, 1999). El ovario de la rata recibe inervación simpática por dos rutas: el plexo ovárico (PO) que acompaña a la arteria ovárica e inerva principalmente la vasculatura, y el nervio ovárico superior (NOS) que corre junto con el ligamento suspensorio e inerva, vasos sanguíneos, células de la glándula intersticial y células de la teca interna (Lawrence y Burden, 1980).

La participación de la inervación en la regulación de las funciones del ovario ha sido analizada en función de los efectos de la sección de los nervios en modelos *in vivo* (Aguado y Ojeda, 1984a, 1984b; Selstam y col., 1985; Morales y col., 1993, Chavéz y col., 1991; Vieyra, 2007; Zhang y col., 2010) o de su estimulación en modelos *in vitro* (Sosa y col., 2004; Delgado y col., 2004, 2006, 2010).

En el animal pre-púber, la sección bilateral de los nervios ováricos no afecta la ovulación espontánea (Aguado y Ojeda 1984a; Selstam y col. 1985; Morales y col. 1993), mientras que el animal adulto, la sección bilateral disminuye el número de ovocitos liberados por el ovario derecho, 20 días después de la denervación (Chavéz y col., 1991). La sección unilateral del NOS resulta en una disminución de la cuota ovulatoria por el ovario denervado y un aumento por el ovario inervado (Morales y col., 1993).

En la rata adulta la sección bilateral del NOS realizada a las 11:00 ó 16:00 h del proestro, resulta en una menor concentración de  $P_4$  y  $E_2$ , 4 minutos después de la sección (Aguado y Ojeda, 1984b). Esta misma cirugía realizada entre las 11:30-12:30 del P, resultó en un decremento en la concentración de  $P_4$  a los

30' post-denervación, sin cambios en la de  $E_2$  (Erskine y Weaver, 1988). Cuando la sección bilateral del NOS se practicó a las 11:00 h del estro, no se registraron modificaciones en la concentración de las hormonas (Aguado y Ojeda, 1984b). Estas evidencias indicaron que la inervación simpática regula de manera estimulante la secreción de esteroides ováricos, efecto que depende de la etapa del ciclo estral en que se realiza la cirugía.

Los efectos de la sección del NOS parecen variar con la hora del día, lo que sugiere un mecanismo de control circádico que regula la síntesis y secreción de hormonas en el ovario y, que puede presentarse en los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-ovario.

Éste control circadiano que regula las funciones reproductivas, reside en el núcleo suparquiasmático del hipotálamo anterior, el cual es considerado el reloj biológico maestro, que sincroniza los cambios del medio externo (ciclo luz-oscuridad, la disponibilidad de alimento, la temperatura; Pittendrigh, 1981; Moore y col., 1982) con la de los ritmos endógenos del organismo a través de la expresión de genes reloj cada 24 horas (Balsalobre, 2002; Aguilar-Roblero y col., 2004; Kennaway, 2004; Kriegsfeld y Silver, 2006).

Debido a que existen pocas evidencias de la participación del NOS sobre las funciones ováricas en cada día del ciclo estral y a diferentes horas, en el presente estudio se analizó el efecto agudo o sub-agudo de la sección uni o bilateral del NOS, realizada en la rata adulta a las 11:00 ó 17:00 horas del diestro 1 o proestro, sobre la concentración sérica de hormonas esteroides, gonadotropinas y la ovulación espontánea.

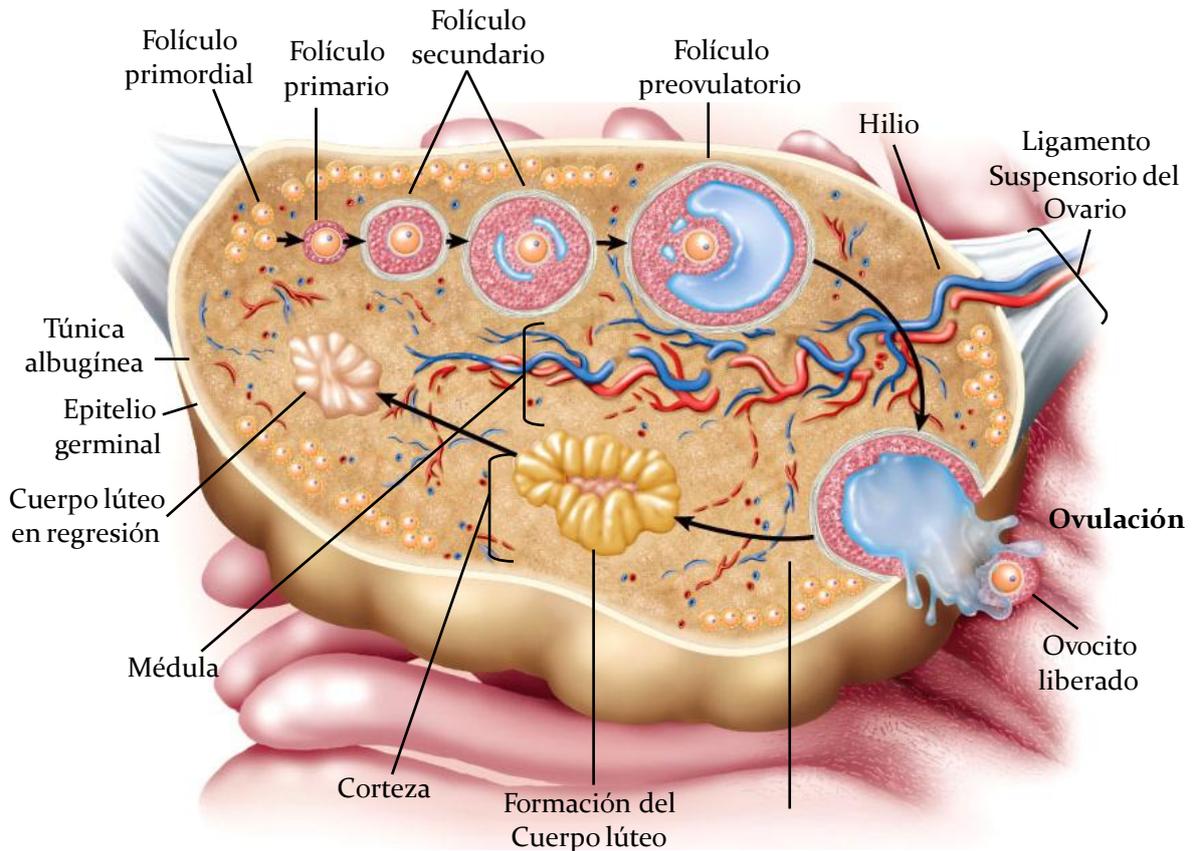
# MARCO TEÓRICO

## EL OVARIO DE LOS MAMÍFEROS

Los **ovarios** son las gónadas femeninas que junto con el útero y los cuernos uterinos, constituyen el aparato reproductor femenino (Constanzo, 2000).

Desde el punto de vista histológico (**Figura 1**), en el ovario se identifican cuatro tipos de folículos ováricos según el estado de desarrollo: los folículos primordiales, primarios, secundarios o antrales y terciarios o preovulatorios que sintetizan estradiol ( $E_2$ ) (Guyton y Hall, 2001; Netter, 2003). Aquellos que entran en atresia pierden la capacidad de aromatización y sintetizan andrógenos (Domínguez y col., 1991). Cuando el folículo preovulatorio libera su ovocito, las capas de células de la granulosa murales y de la teca interna del folículo post-ovulatorio forman pliegues, el folículo se colapsa y origina al cuerpo lúteo, el cual secreta progesterona ( $P_4$ ) (Guyton y Hall, 2001). En la rata ésta estructura vascularizada adquiere su máximo tamaño en el día del diestro y su fase de actividad es corta, con duración de 1 a 2 días (Freeman, 1994).

Los ovarios llevan a cabo algunas funciones como la maduración de los gametos, proceso conocido como foliculogénesis, donde la unidad morfofuncional es el folículo, la liberación del ovocito apto para ser fecundado (ovulación) y la secreción de hormonas peptídicas tales como la inhibina, activina y folistatina; y esteroides como la  $P_4$ , los andrógenos y estrógenos (Dissen y Ojeda, 1999; Prieto y Velásquez, 2002; Tresguerres, 2003).



**Figura 1.** Representación de la estructura de un ovario de mamífero donde se observan la secuencia de maduración de los folículos en el ovario, comenzando por el folículo primordial y terminando con la formación del cuerpo lúteo y subsecuente luteinización (Modificado de Netter, 2003).

## LA OVULACIÓN

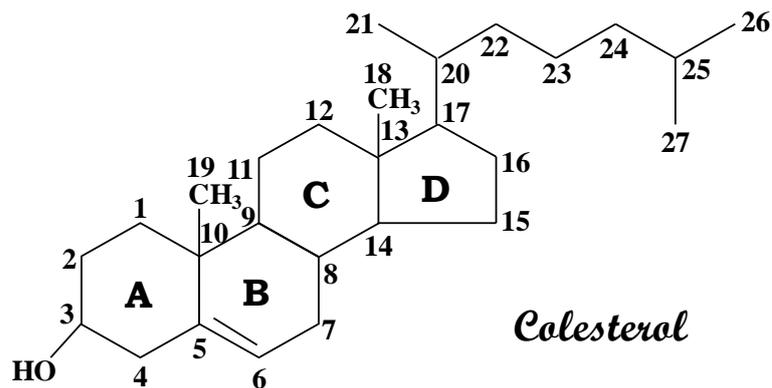
La rata y el ratón son especies que tienen poliovulación, es decir que liberan varios ovocitos al día del estro vaginal, ambos ovarios ovulan simultáneamente en respuesta a los aumentos bruscos en las concentraciones preovulatorias de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) secretadas por la adenohipófisis (Domínguez y col., 1991). En los roedores, la ovulación se produce en la madrugada del estro vaginal (Tresguerres, 2003) y los folículos “dominantes” que van a expulsar al ovocito han sido expuesto a por lo menos tres ciclos preovulatorios de gonadotropinas (Domínguez y col., 1991).

Pocas horas antes de que se produzca la ovulación, ocurre un aumento en la concentración de LH y de la  $20\alpha$ -hidroxiprogesterona (debido a la disminución en la secreción de estradiol). La LH y FSH actúan sinérgicamente en el folículo lo que resulta en un aumento de tamaño, los lisosomas de la teca externa comienza a liberar enzimas proteolíticas que causan el debilitamiento de la pared folicular y la formación del estigma. Simultáneamente en el folículo hay crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y secreción de prostaglandinas, las que producen vasodilatación y trasudación de plasma al interior del folículo, provocando la ruptura del folículo y la expulsión del ovocito acompañado de células del cúmulo oóforo y la corona radiada (Guyton y Hall, 2001).

## **BIOSÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES Y SU REGULACIÓN POR GONADOTROPINAS**

Las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos antrales maduros del ovario producen hormonas esteroideas, las cuales derivan del colesterol (Yoshinaga, 1999).

El colesterol posee una estructura formada por tres anillos derivados del fenantreno (A, B, C) y un anillo ciclopentano (D), que fusionados se denomina núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno. Tal estructura posee grupos metilo en el C-10 y C-13, un grupo hidroxilo en el C-3 del anillo A, una cadena alifática ramificada de 8 carbonos en la posición C-17 del anillo D y una insaturación entre el C-5 y C-6 (**Figura 2**) (Baynes y Dominiczak, 2006).



**Figura 2.** Estructura de la molécula del colesterol. A-D es la notación convencional que se utiliza para describir los cuatro anillos. Los números del 1-27 describen los átomos de carbono (Modificado de Baynes y Dominiczak, 2006).

Las células obtienen el colesterol a partir de dos fuentes: **a)** por su síntesis endógena, en la mitocondria, a partir de acetil coenzima A (acetil CoA) (Berne y col., 1999) y **b)** el que circula en la sangre unido a las lipoproteínas de baja (LDL) y alta densidad (HDL), el cual es captado por un receptor en la superficie celular (Yoshinaga, 1999) y es almacenado en gotas lipídicas, en forma de ésteres de colesterol (Tresguerres, 2008).

Con base en el número de átomos de carbono que forman la molécula de la hormona, se les clasifica en tres grupos (Berg y col., 2008):

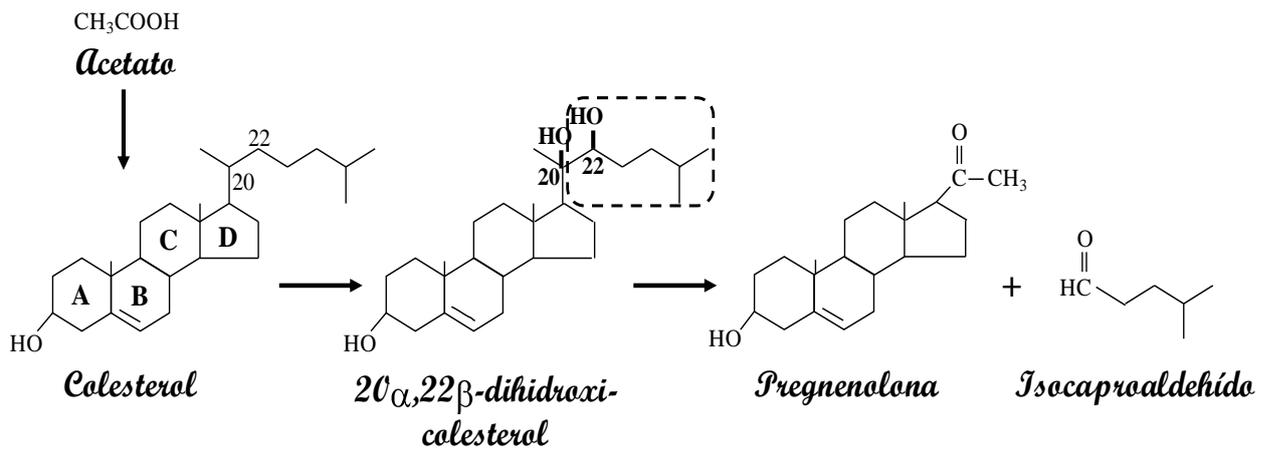
- Las que poseen 21 carbonos, que incluyen los corticoides y progestágenos y su núcleo es el pregnano.
- Las que poseen 19 carbonos, que incluyen los andrógenos y su núcleo es el androstano.
- Las que poseen 18 carbonos, que incluyen al E<sub>2</sub> y estrona y su núcleo es el estrano.

La primera etapa en la síntesis de hormonas esteroides es la eliminación de seis carbonos de la cadena lateral del colesterol, lo que tiene lugar en la capa interna de la mitocondria, por la acción de un complejo multienzimático, en el cual participan tres componentes (Gore-Langton y Armstrong, 1994):

- a) Un citocromo P450 que rompe la cadena lateral (P450<sub>scc</sub>) del colesterol, con función de oxidasa mixta (Yen y col., 2001)
- b) La coenzima FAD (dinucleótido de flavina y adenina; una flavoproteína) como aceptora de electrones
- c) Una proteína hemo, como intermediaria en la transferencia de electrones.

Las reacciones llevadas por la P450<sub>scc</sub> utilizan tres moles de fosfato de dinucleotido de nicotinamida y adenina en su forma reducida (NADPH) y O<sub>2</sub> por mol de colesterol en la ruptura de su cadena lateral (Gore-Langton y Armstrong, 1994).

La separación de la cadena lateral de la molécula de colesterol se realiza en varios pasos. El primero comprende dos hidroxilaciones, la primera en el C-20 y la segunda en el C-22, las cuales son el resultado de la acción de la P450<sub>scc</sub> (una monooxigenasa), que resulta en la formación de la 20 $\alpha$ ,22 $\beta$ -dihidroxicolesterol. Después la P450<sub>scc</sub> desmolasa (20-22 desmolasa) rompe los enlaces entre los C-20 y C-22, resultando en una molécula de pregnenolona y una de aldehído isocaproico (Berne y col., 1999; Yen y col., 2001) (**Figura 3**)



**Figura 3.** Esquema que muestra la biotransformación de colesterol a pregnenolona. Obsérvese las hidroxilaciones en el C-20 y C-22. El recuadro indica la pérdida de los seis carbonos de la cadena lateral (Modificado de Berg y col., 2008).

A partir de la pregnenolona sintetizada por las células de la teca interna del ovario, se producen diversas hormonas que se diferencian por seguir alguna de las siguientes vías metabólicas (**Figura 4**):

1. La **vía  $\Delta$ -4** o de las cetonas, es la ruta que toman aquellas moléculas esteroides que tienen el enlace de insaturación en el C-4 y un grupo ceto en el C-3. Es la vía que utiliza el cuerpo lúteo (Tresguerres, 2008) en la síntesis de pregnenolona a P<sub>4</sub> y 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (17 $\alpha$ -OHP) (Berg y col., 2008).

2. La **vía  $\Delta$ -5** es la vía que toman aquellas moléculas esteroides que tienen el doble enlace en la posición C-5 y un grupo hidroxilo en el C-3. Es la vía que utiliza el folículo ovárico (Tresguerres, 2008) y lleva a la producción de dehidroepiandrosterona (DHEA) (Berg y col., 2008).

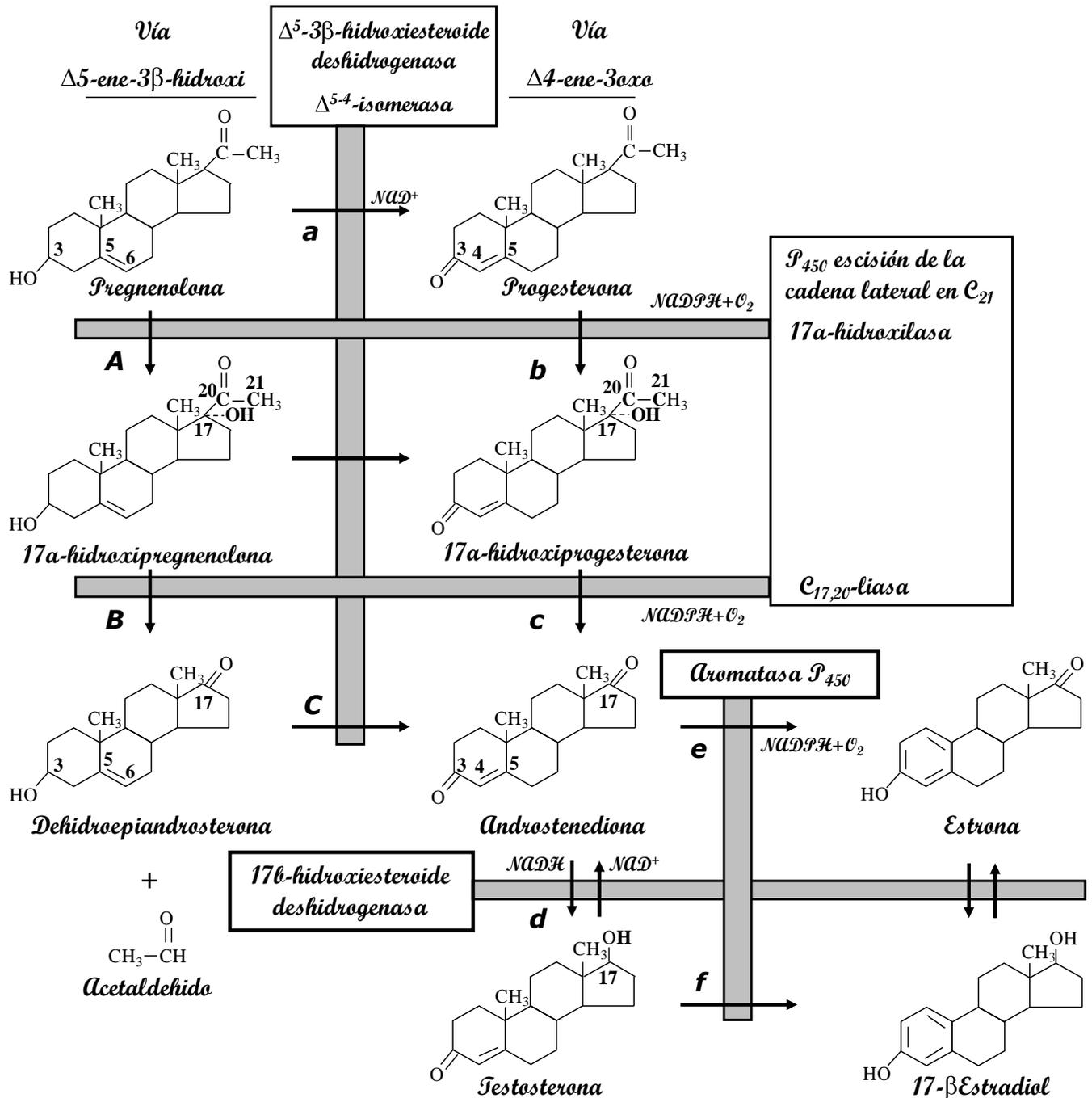


Figura 4. Vías esteroidogénicas  $\Delta^5$  y  $\Delta^4$  de pregnenolona a estrógenos. Las letras mayúsculas y minúsculas indican el orden de los pasos en la biosíntesis, que se redactan en el texto (Modificado de Yoshinaga, 1999).

En la conversión de pregnenolona a  $P_4$  por la vía  $\Delta$ -4, la molécula de pregnenolona localizada en el retículo endoplásmico de las células de la teca interna, pierde un átomo de hidrógeno del C-3 del anillo A, por la acción de la enzima  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $3\beta$ -HSD). Después la  $\Delta$ 5-4 isomerasa cambia el doble enlace del C-5 y C-6 al C-4 y C-5 del anillo A (**Figura 4a**) (Gore-Langton y Armstrong, 1994).

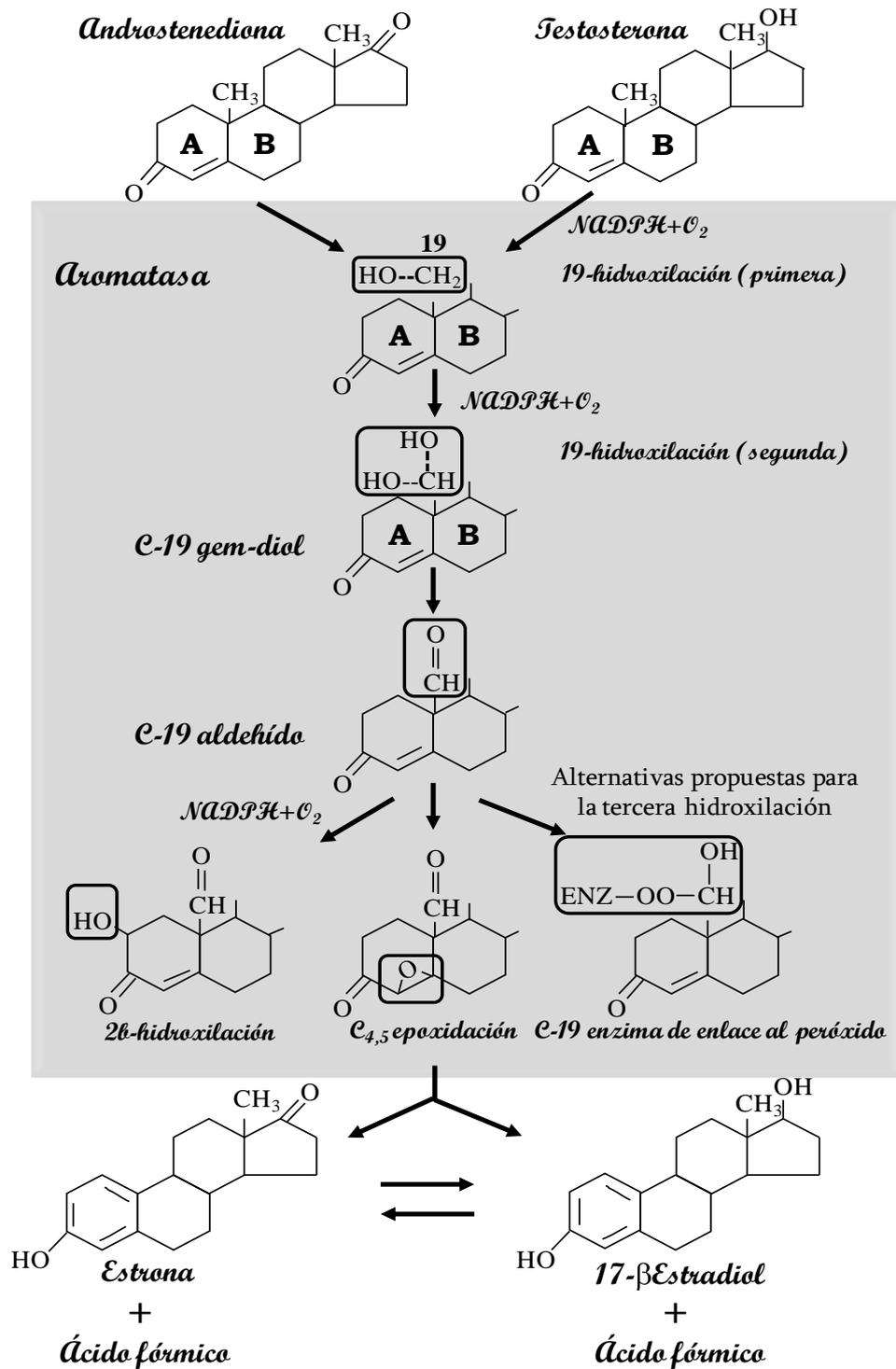
La molécula de  $P_4$  se transforma en la  $17\alpha$ -OHP por efectos de la enzima  $17\alpha$ -hidroxilasa, la cual cataliza la hidroxilación en el C-17 (**Figura 4b**). A partir de la  $17\alpha$ -OHP se sintetiza la androstenediona, por efecto de la  $C_{17, 20}$ -liasa, la cual escinde a los C-20 y C-21 de la molécula (**Figura 4c**) (Yoshinaga y col., 1999; Berg y col., 2008). La androstenediona actúa como un precursor de la testosterona (T), la cual se forma por la reducción del grupo ceto en el C-17 de la androstenediona, por la enzima  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa [ $17\beta$  HSD] (**Figura 4d**) (Berg y col., 2008).

A su vez, la androstenediona y la T son precursores de la estrona o el  $E_2$  (**Figura 4e, f**). En esta conversión participa un complejo enzimático denominado citocromo P450 aromatasa ( $P450_{arom}$ ), que se localiza en la membrana del retículo endoplásmico liso de las células de la granulosa, el cual cataliza la eliminación del grupo metilo del C-10 como ácido fórmico. Esto se logra por procesos secuenciales de ataque por oxígeno molecular al sustrato del C-19, lo que implica 2 hidroxilaciones al C-19, y la reacción total involucra una tercera hidroxilación, pero el sitio exacto de ésta no ha sido bien establecida (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Graham-Lorence y col., 1995). Por lo que se propusieron tres alternativas: la primera considera que la hidroxilación ocurre en el C-2, la segunda alternativa involucra una reacción de epoxidación entre el C-4 y C-5, seguido de la formación de un doble enlace entre los C-1 y C-2 y la ruptura del enlace entre el C-10 y C-19 y la descarboxilación en posición C-10 (Gore-Langton y Armstrong, 1994). En el último paso se produce un reordenamiento del anillo aromático A, el cual se transforma en un anillo

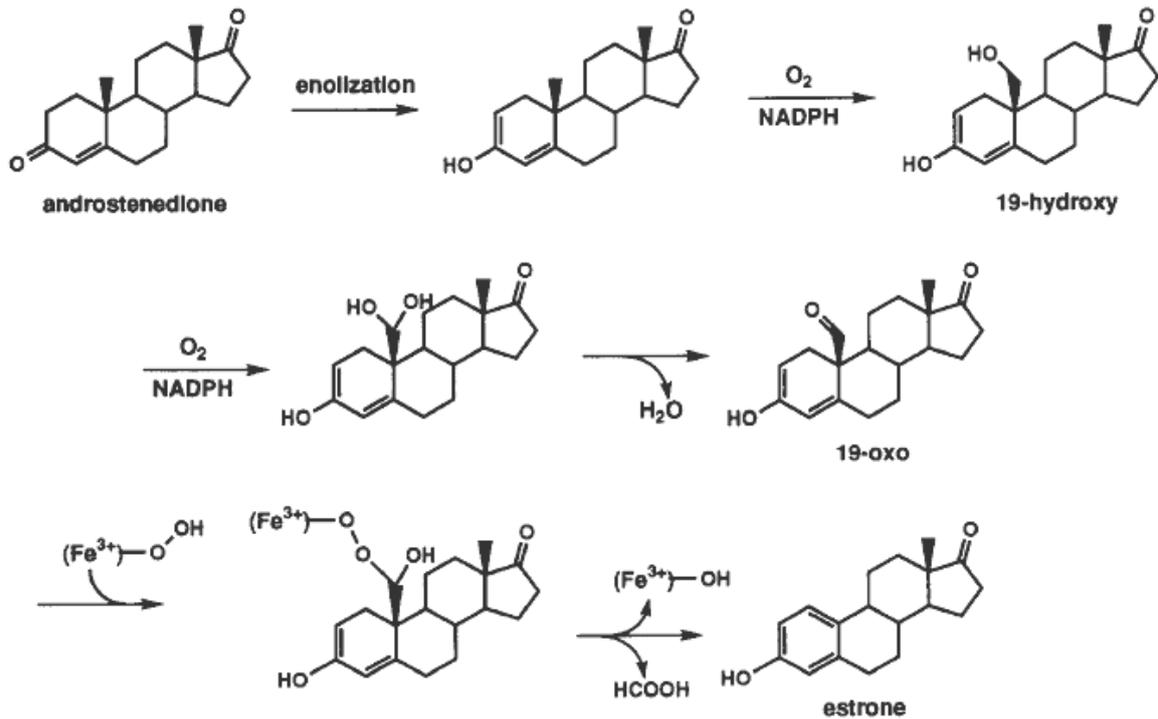
bencénico con tres dobles enlaces en posiciones C-1 y C-2; C-3 y C-4, C-5 y C-10; dando como producto final la síntesis de estrógenos más una molécula de ácido fórmico (**Figura 5**). La tercera alternativa sugiere un ataque peroxidativo en el C-19 (**Figura 5**) (Gore-Langton y Armstrong, 1994), después se elimina un ión hidrógeno para formar un doble enlace entre el C-1 y C-10.

Se ha propuesto que previo a la peroxidación se presenta una reacción de enolización (**Figura 6**) entre los hidrógenos contiguos al grupo carbonilo o ceto del C-3 del esteroide, que son relativamente ácidos y que pueden ser capturados por bases. Cuando tiene lugar esta reacción ácido-base, el grupo carbonilo recibe un ión hidrógeno, convirtiéndose en una unión enolato y formar el grupo hidroxilo en el C-3 y el doble enlace entre el C-2 y C-3 (Graham-Lorence y col., 1995).

En la **vía  $\Delta$ -5**, la pregnenolona es convertida directamente a DHEA (**Figura 4**). En la molécula de pregnenolona, la  $17\alpha$ -hidroxilasa cataliza la adición de un grupo hidroxilo en el C-17, dando como producto la  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona (**Figura 4A**), a esta hormona, la enzima  $17,20$ -liasa o desmolasa rompe los enlaces entre el C-17 y C-20 y escinde los C-20 y C-21 para formar DHEA más acetaldehído (**Figura 4B**) (Yoshinaga, 1999). Luego la DHEA es oxidada en el C-3 por la  $3\beta$ -HSD, y la  $\Delta$ 5-4 isomerasa cataliza el cambio del doble enlace de insaturación en la posición C-5 y C-6 a la posición C-4 y C-5, y sintetizar androstenediona (**Figura 4C**) (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Yoshinaga, 1999). Después se produce la aromatización de los andrógenos a estrógenos por la P450arom (**Figura 4e, f y Figura 5**), en el retículo endoplásmico de las células de la granulosa, como ya se explicó previamente (Berg y col., 2008).



**Figura 5.** Secuencia propuesta de reacciones de aromatización en la conversión de androstenediona y testosterona en estrona y estradiol, respectivamente, en las células de la granulosa (Modificado de Gore-Langton y Armstrong, 1994).

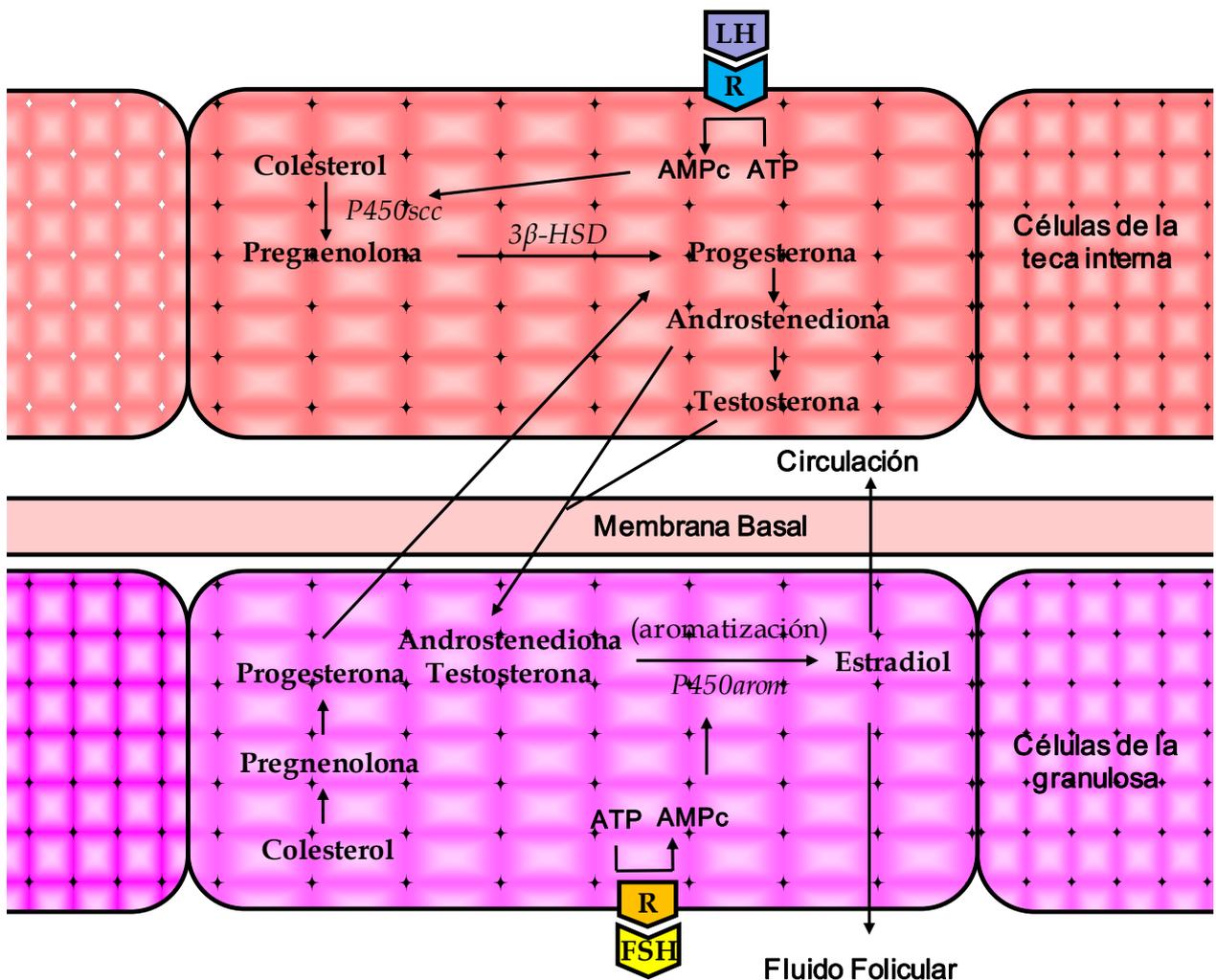


**Figura 6.** Propuesta de reacciones de aromatización (enolización y peroxidación) en la conversión de androstenediona a estrona (Tomado de Graham-Lorence y col., 1995).

En la esteroidogénesis es necesaria la participación de las células de la teca y de la granulosa, debido a que las células de la teca carecen del complejo aromatasa que convierte andrógenos a estrógenos, mientras que las células de la granulosa producen  $\text{P}_4$  pero carecen de la enzima  $17\alpha\text{-HSD}$ , que es esencial en la conversión a andrógenos. Por consiguiente las células de la teca producen los andrógenos que se mueven a través de la membrana basal a las células de la granulosa, donde éstos son convertidos a estrógenos por la aromatasa (Yoshinaga, 1999).

Las gonadotropinas, FSH y LH, estimulan en conjunto la síntesis de estrógenos. La teoría de la “*doble célula-doble hormona*” en la biosíntesis de estrógenos implica la unión de LH a su receptor en células de la teca interna, donde la acción de LH es mediada por el sistema adenilato ciclasa-AMPCíclico o

fosfolipasas, estimula la entrada del colesterol en las mitocondrias y su conversión en pregnenolona (Berne y col., 1999) y el metabolismo de la P<sub>4</sub> a androstenediona. Ésta última es transportada a células de la granulosa, en donde la FSH se une a su receptor y a través de la actividad mediada por el segundo mensajero AMPcíclico, aumenta la transcripción del gen de la aromatasa, la enzima específica en la síntesis de E<sub>2</sub>, de modo que la conversión de androstenediona a estrona y T a E<sub>2</sub> se acelera (Berne y col., 1999; Yoshinaga, 1999) (Figura 7).



**Figura 7.** Biosíntesis de hormonas esteroideas en el ovario explicado a través de la “teoría de la doble célula-doble hormona” (Modificado de Adashi, 1991).

## **SECRECIÓN DE GnRH Y GONADOTROPINAS**

El control hipotalámico de la secreción de las gonadotropinas se realiza mediante la producción de un decapeptido denominado hormona liberadora de gonadotropinas, GnRH. En la rata adulta, éste péptido es secretado a partir de neuronas hipotalámicas parvicelulares que se encuentran en el núcleo arcuato, el núcleo periventricular, el paraventricular y el área preóptica (Berne y col., 1999; Prieto y Velázquez, 2002). De estas zonas, la hormona es transportada por el axón y almacenada en la eminencia media. La GnRH es liberada en forma de pulsos cada 60 minutos, a través de un oscilador o pulso generador que reside en el núcleo supraquiasmático (Kilen y Schwartz, 1999), a las venas del sistema porta hipotálamo-hipofisiario hacia los gonadotropos de la adenohipófisis (Prieto y Velázquez, 2002).

La GnRH se une a su receptor en la membrana plasmática que se encuentra ligado a una proteína G, el cual activa la enzima fosfolipasa C, vía la generación de diversos segundos mensajeros como el diacilglicerol y el inositol, promueven la activación de la proteína cinasa C, lo que induce la salida de calcio intracelular en las células gonadotropas (Prieto y Velázquez, 2002; Clarkson y Herbison, 2006). El calcio tras formar un complejo con la calmodulina, actúa como principal segundo mensajero en la liberación simultánea de LH y FSH de los gránulos secretores, también estimula la transcripción de genes que dirigen la síntesis de ambas gonadotropinas y el procesamiento posterior de las prohormonas mediante glucosilación (Berne y col., 1999).

La naturaleza pulsátil de la secreción de la GnRH resulta en la liberación fásica de LH y FSH (Prieto y Velázquez, 2002), mientras que los pulsos de alta frecuencia de GnRH favorecen la liberación pulsátil de LH, los pulsos de baja frecuencia generan liberación pulsátil de FSH (Kilen y Schwartz, 1999).

La generación del pulso de GnRH es regulado por diversos estímulos como el ciclo luz-oscuridad, por moléculas olfatorias como las feromonas y las hormonas esteroides ováricas (Berne y col., 1999), por aferencias procedentes de diferentes áreas del sistema nervioso central, mediante la liberación de neurotransmisores, entre los que se encuentran la beta endorfina y el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) que inhiben la liberación de GnRH (Kilen y Schwartz, 1999; Prieto y Velázquez, 2002), en tanto que es estimulada por dopamina, noradrenalina (NA) y serotonina (Prieto y Velázquez, 2002).

Otras hormonas como la inhibina y la activina, factores no esteroides del ovario, regulan la liberación de LH y FSH. La inhibina previene la regulación a la alta de receptores a GnRH, por bloquear la estimulación de la síntesis del receptor producido por la misma hormona, mientras que la activina estimula la síntesis del receptor (Prieto y Velázquez, 2002).

En la rata, el hámster, la oveja y la vaca, hay cambios en el número de receptores hipofisarios a la GnRH a través del ciclo estral, siendo bajo en el estro y en el diestro 1 para aumentar gradualmente en el diestro 2 y permanecer alto hasta la tarde del proestro, en donde se alcanzan las concentraciones más altas, es decir durante el momento previo al pico preovulatorio de LH, lo que genera un factor regulador en la secreción de las gonadotropinas (Coon, 1994).

## **EL CICLO ESTRAL EN LA RATA HEMBRA**

En los mamíferos, el **ciclo estral (Figura 8)** se presenta como una secuencia de procesos reproductivos, que a diferencia del ciclo menstrual de los primates, está caracterizado por la conducta de apareamiento. En el ciclo estral se produce una cascada de eventos hormonales y conductuales que son progresivos, altamente sincronizados y repetitivos (Kilen y Schwartz, 1999). Es regulado por factores exteroceptivos como la luz, la temperatura y las sustancias percibidas por el olfato (Kilen y Schwartz, 1999; Tresguerres, 2003).

En la rata las variaciones en las concentraciones de las hormonas hipofisarias y ováricas se acompañan de cambios citológicos y conductuales característicos de las diferentes fases estrales, cada una de las cuales tiene una distinta duración: el *proestro* dura de 12 a 14 horas, el *estro* de 25 a 27 horas, el *metaestro o diestro 1* de 6 a 8 horas y el *diestro 2* de 55 a 57 horas (Freeman, 1994; Hernández y Ramos, 2002).

El **proestro (P)** se caracteriza por la presencia de células epiteliales nucleadas, las que se encuentran agrupadas mostrando un núcleo redondeado y fácilmente distinguible (Freeman, 1994). Empieza la conducta de celo, el acercamiento, la monta y la cópula por el macho son permitida en el proestro tardío durante la fase de oscuridad y termina cuando comienza el estro (Tresguerres, 2003; Feder, 1981). Los folículos preovulatorios liberan una cantidad elevada de  $E_2$ , la  $P_4$  mantiene estable su concentración basal durante la mayor parte del ciclo estral, aunque presenta un rápido incremento hacia la tarde del P. La secreción preovulatoria de esteroides sexuales estimula la conducta de estro, así como la cornificación de las células epiteliales vaginales y la ovulación (Hernández y Ramos, 2002).

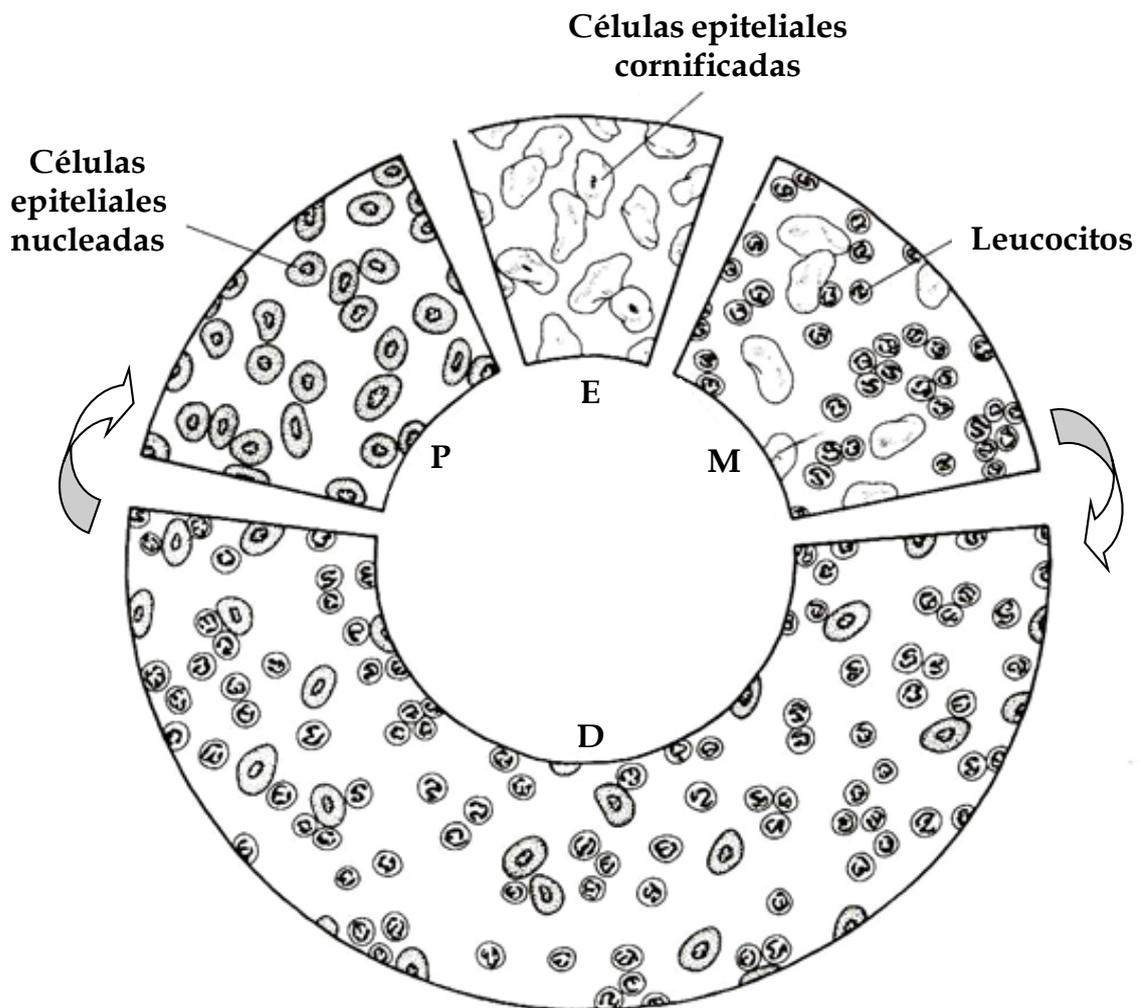
Aumenta la amplitud y la frecuencia de pulsos de GnRH y más tarde sucede lo mismo con la amplitud y frecuencia en los pulsos de liberación de FSH y LH, los cuales son debidos al efecto estimulante de retroalimentación positiva del  $E_2$ . El rápido incremento de LH a las 17:00 horas (Domínguez-González y col., 1998) produce la ruptura del folículo y la ovulación. Después las concentraciones de estrógenos descienden rápidamente hasta la línea basal, pero las concentraciones de  $P_4$  en sangre permanecen altas durante muchas horas si el apareamiento no tiene lugar, o durante muchos días en caso de producirse éste. Las concentraciones altas de  $P_4$  actúan poniendo fin a la conducta de estro (Hernández y Ramos, 2002). El útero por acción del  $E_2$ , se hace extremadamente contráctil (Tresguerres, 2003) y pesa en promedio 242 mg/100 g de peso corporal (Feder, 1981).

Al día siguiente, ya en la fase de **estro (E)**, las células dominantes son las epiteliales escamosas cornificadas, dichas células carecen de un núcleo, contienen un citoplasma altamente granuloso y de forma irregular (Freeman, 1994). Las concentraciones de  $E_2$  y  $P_4$  dentro del plasma venoso en los ovarios permanecen bajos. Los valores séricos de LH se mantienen bajos desde el inicio del estro, poco después de la ovulación y durante el resto del ciclo hasta la mitad del proestro. Un segundo pico en la concentración de FSH se presenta en la mañana del estro, que es debida a la disminución de la secreción ovárica de inhibina, y estimula el crecimiento folicular (Hernández y Ramos, 2002; Tresguerres, 2003). El útero pesa aproximadamente 172 mg/100 g de peso corporal (Feder, 1981).

Durante el **metaestro o diestro 1 (M o D1)**, las células más abundantes son los leucocitos pequeños con citoplasma granular y núcleos vesiculares, los cuales aparecen junto con un número significativo de células epiteliales cornificadas (Freeman, 1994; Hernández y Ramos, 2002; Tresguerres, 2003). Comienza el incremento en la secreción de  $E_2$  por los folículos y de  $P_4$  por los cuerpos lúteos, las que inhiben la secreción de gonadotropinas. La vascularización y motilidad del útero están disminuidas (Tresguerres, 2003) y pesa en promedio 166 mg/100 g de peso corporal (Feder, 1981).

En el día del **diestro 2 (D2)**, se presenta también gran cantidad de infiltración leucocitaria y algunas células epiteliales nucleadas (Freeman, 1994; Hernández y Ramos, 2002). Durante esta fase tiene lugar la regresión del cuerpo lúteo, los folículos son estimulados a producir hormonas esteroides sexuales en concentraciones crecientes, tales hormonas inhiben la secreción basal de gonadotropinas que a su vez mantienen el crecimiento folicular. El útero es pequeño y poco contráctil (Hernández y Ramos, 2002; Tresguerres, 2003), con un peso total promedio de 134 mg/100 g de peso corporal (Feder, 1981).

En las ratas con un periodo estral de cuatro días, las concentraciones de T y androstenediona en el plasma periférico presentan un patrón similar al del estradiol (Hernández y Ramos, 2002). El ciclo se reanuda cuando la liberación de GnRH estimula pulsos breves de gonadotropinas, lo que se traduce en el desarrollo de una nueva cohorte folicular. En la rata, se puede considerar que los dos días del diestro y el día del proestro constituyen la fase folicular del ciclo estral que preceden a la ovulación (Hernández y Ramos, 2002).



**Figura 8.** Representación de las fases del ciclo estral: Proestro (P), Estro (E), Metaestro o Diestro 1 (M) y Diestro 2 (D), y tipo de células que las caracterizan (Modificado de Hernández y Ramos, 2002).

## **INERVACIÓN OVÁRICA**

Las funciones de los ovarios son reguladas por señales hormonales y nerviosas. La inervación del ovario se clasifica en intrínseca y extrínseca. La **inervación intrínseca** está representada por microganglios de naturaleza catecolaminérgica y vipérgica, y fibras que se originan de ellos (Dees y col., 1995; D'Albora y col., 2002). Las neuronas positivas a tirosina hidroxilasa (enzima limitante en la biosíntesis de catecolaminas) se localizan en la corteza y médula del ovario. En la rata, la presencia de neuronas intraováricas depende de la cepa de rata estudiada, ya que las neuronas fueron identificadas en la cepa Wistar, pero no en la Long-Evans ni Sprague-Dawley (D'Albora y col., 2000), al momento desconocemos la existencia de éstas neuronas en la cepa de rata (CII-ZV) del presente estudio.

La **inervación extrínseca** está formada por fibras simpáticas, parasimpáticas y sensoriales derivadas de neuronas que se encuentran en el complejo del ganglio celiaco-mesentérico superior, las que reciben información nerviosas proveniente de diversas regiones del sistema nervioso central, entre las que se encuentra el hipotálamo, los núcleos del rafé, del vago y la amígdala (Burden y col., 1983; Klein y Burden, 1988; Gerendai y col., 1998, 2000).

La porción simpática de la inervación extrínseca del ovario se origina de la porción torácica T11 al segmento lumbar L4 y hace sinapsis en el ganglio celiaco- mesentérico superior. La porción sensorial deriva del ganglio nodoso y del ganglio de la raíz dorsal localizado entre el segmento torácico caudal T9-T11 y el segmento lumbar craneal del cordón espinal L2-L4, que arriban por el plexo ovárico (PO) (Burden, 1978; Dissen y Ojeda, 1999).

Estas neuronas contienen fibras que llegan a los componentes estructurales del ovario, incluyendo la vasculatura, el tejido intersticial y los folículos en desarrollo (Dissen y Ojeda, 1999).

La innervación parasimpática del ovario de la rata proviene del nervio vago (Burden y Lawrence, 1977), del cual aproximadamente el 85% de sus fibras son de naturaleza sensorial (Burden, 1978).

La innervación simpática llega al ovario por medio del PO y del nervio ovárico superior (NOS). Ambos se originan del ganglio celiaco-mesentérico superior. El NOS se localiza en el borde libre del ligamento suspensorio, inerva al ovario (**Figura 9**), al oviducto y al útero (Lawrence y Burden, 1980; Klein y Burden, 1988; Dissen y Ojeda, 1999 y Lara y col., 2000, 2002) y sus fibras penetran al ovario por el hilio, inervan células de la glándula intersticial, células de la teca interna y vasos sanguíneos (Lawrence y Burden, 1980), sin llegar a células de la granulosa de los folículos ni en las del cuerpo lúteo (Dissen y Ojeda, 1999; Baljet y Drukker, 1980; Lawrence y Burden, 1980).

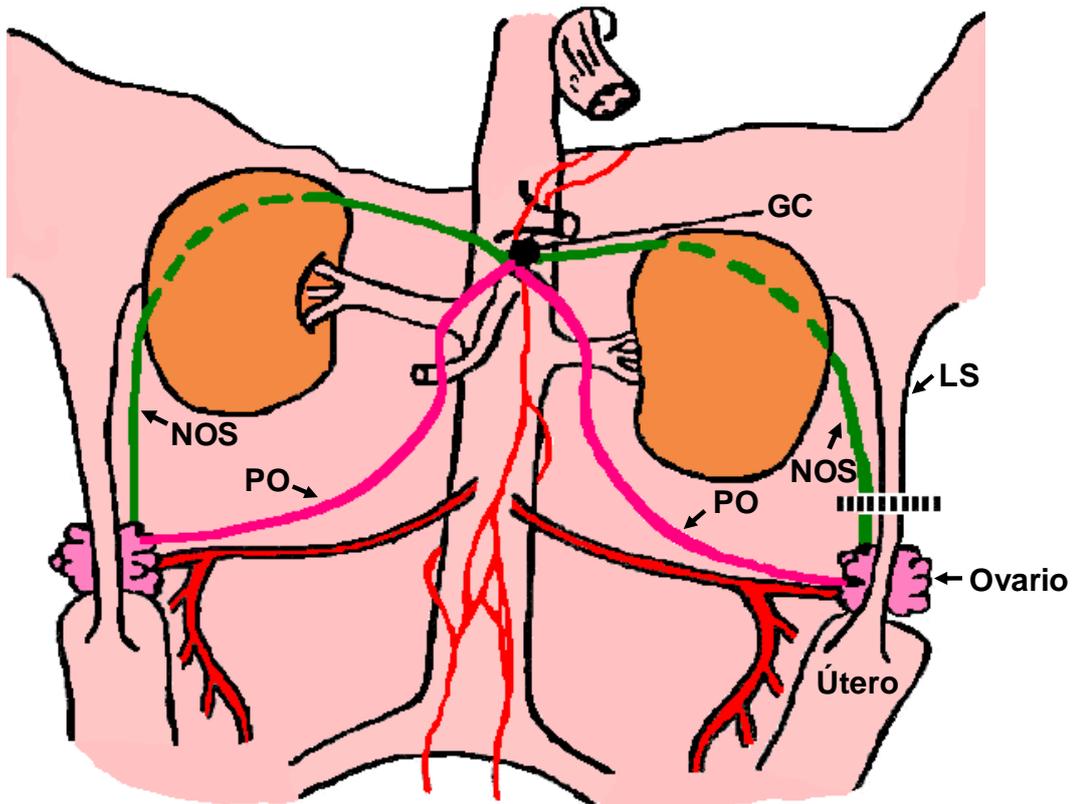
En el NOS hay paquetes de fibras de naturaleza noradrenérgica, vipérgica y otras que liberan el neuropéptido Y (NPY). Los neurotransmisores que viajan por estas fibras, participan en la regulación de la síntesis de las hormonas esteroides ováricas (Burden, 1978; Lawrence y Burden, 1980; Hsueh y col., 1984; Dees y col., 1986).

Se ha mostrado que la NA estimula la esteroidogénesis ovárica a través de la activación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Adashi y Hsueh, 1981; Aguado y col., 1982), induciendo la secreción de  $P_4$  por las células de la granulosa y luteales (Ratner y col., 1980; Adashi y Hsueh, 1981; Aguado y Ojeda, 1984b), así como andrógenos en las células tecales (Dyer y Erickson, 1985; Hernández y col., 1988). Lo que ha sugerido que los nervios simpáticos noradrenérgicos

amplifican la respuesta esteroideogénica de las células ováricas a las gonadotropinas (Leung y Adashi, 2004).

Mientras que el péptido intestinal vasoactivo (VIP), es un potente estimulador de la secreción de  $P_4$  (Garraza y col., 2004),  $E_2$  y andrógenos, ya que actúa sobre el complejo enzimático encargado de la ruptura de la cadena lateral del colesterol, la enzima limitante en la biosíntesis de esteroides y además estimula la actividad de la aromatasas (Davoren y Hsueh, 1985; Trzeciak y col., 1987).

En el PO está presente el neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), entre otros. Mientras que por parte del nervio vago los péptidos que predominan son la sustancia P (SP) y el péptido activador de la adenilato ciclasa (PACAP), la acetil colina, aunque también presenta fibras que contienen VIP (Dissen y Ojeda, 1999).



**Figura 9.** El esquema ilustra el curso del nervio ovárico superior (NOS) y plexo ovárico (PO), estos nervios se originan del ganglio celiaco (GC). El NOS viaja junto al ligamento suspensorio (LS) hasta el ovario. El GC se localiza a lo largo de la aorta en las proximidades de la arteria renal (Modificado de Klein y col., 1989). Se puede observar en líneas punteadas el sitio donde se realiza la sección en el presente estudio.

## **PARTICIPACIÓN DE LA INERVACIÓN SIMPÁTICA EN LAS FUNCIONES REPRODUCTIVAS**

La participación de la inervación en la regulación de las funciones del ovario ha sido analizada en función de los efectos de la sección en modelos *in vivo* (Burden, 1985; Morales y col., 1993; Chávez y Domínguez, 1994; Aguado, 2002; Forneris y Aguado, 2002; Doganay y col., 2009) o de la estimulación de los nervios que llegan a la glándula en modelos *in vitro* (De Bortoli y col., 1998, 2000; Sosa y col., 2004; Delgado y col., 2006; Vega y col., 2010).

En la rata prepúber con sección bilateral del NOS, se observó un decremento en el contenido de NA ovárica de hasta un 60%, que se acompañó de un mayor número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos y una disminución en la concentración de  $P_4$  (Aguado y Ojeda, 1984a). Cuando en la rata adulta la sección bilateral del NOS fue realizada a las 11:00 ó 16:00 h del P, una disminución de la concentración de  $P_4$  y  $E_2$ , fue observada 4 minutos después de la sección (Aguado y Ojeda, 1984b), semejante a lo que habían reportado previamente en la rata prepúber. Con estos resultados los autores proponen que el NOS estimula la secreción de esteroides por el ovario.

En la rata adulta la sección del NOS derecho o la sección de ambos nervios, disminuye la tasa ovulatoria y el número de ovocitos liberados por el ovario derecho. Sugiriendo que la inervación que llega al ovario a través del NOS modula de manera estimulante y lateralizada la ovulación espontánea (Chávez y col., 1991).

En el animal prepúber la sección unilateral del NOS resulta en una disminución en el número de ovocitos liberados por el ovario denervado, en tanto que el inervado presenta un incremento en la cuota ovulatoria, es decir una respuesta compensadora semejante a la que presenta un animal con ovariectomía unilateral (Morales y col., 1993); mientras que la secreción de hormonas esteroides ováricas es regulada de manera diferencial dependiendo del nervio seccionado y del tiempo transcurrido entre la cirugía y la autopsia (Morán y col., 2000, Vieyra, 2007).

En la rata adulta en E, la estimulación eléctrica del NOS derecho disminuye la secreción ovárica de  $E_2$  (Kagitani y col., 2008).

Se ha mostrado que en la rata adulta, la sección del NOS unilateral a las 13:00 h en los diferentes días del ciclo estral modifica de manera diferencial la secreción de  $P_4$  y  $E_2$  1 h después de la denervación, efecto que depende del

nervio seccionado y del día del ciclo estral en que se realiza el estudio (Flores y col., 2007).

En el animal de 24 días de edad, la sección bilateral del NOS, no modifica la concentración de FSH y de LH a los 7 días post-denervación (Aguado y Ojeda, 1984a). Otros estudios realizados en ratas de 4 días de edad sometidas a la sección bilateral del NOS, mostraron una menor concentración de FSH, pero no de LH cuando los animales son sacrificados a los 30, 35 ó 60 días de edad (Forneris y Aguado, 2002).

Mientras que en la rata de 32 días, la sección del NOS izquierdo o la de ambos nervios resultó en una mayor concentración de FSH en tiempos muy cortos después de la denervación, la sección del nervio derecho prácticamente no la modifica (Morales y col., 2008).

Más recientemente se ha mostrado que en la rata peripúberal, la sección bilateral del NOS retrasó la maduración folicular ya que se observó un adelgazamiento en la capa de células de la teca interna y de la pared folicular de los folículos preovulatorios (Dogany y col., 2009), así como de un decremento en el número y tamaño de los folículos totales, inhibición de la proliferación y apoptosis de las células de la granulosa en animales con sección bilateral a los 2 días de edad y sacrificados 30 ó 90 días después de la denervación (Zhang y col., 2010).

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 (Morales y col., 1993; Aguado y Ojeda 1994a, b; De Bortoli y col., 1998, 2000; Morán y col., 2000; Sosa y col., 2000, 2004; Delgado y col., 2004, 2006), la cual es diferente dependiendo de la edad y del día del ciclo estral de la rata (Aguado y Ojeda, 1984b; Flores y col., 2007; Kagitani y col., 2008).

Ya que los efectos de la sección del NOS parecen depender de la hora del día, esto hace pensar en la existencia de un ritmo biológico que participa como un factor regulador en las funciones del ovario.

## **RITMOS BIOLÓGICOS**

Las fluctuaciones periódicas en diversos parámetros fisiológicos son una propiedad general de los seres vivos; cuando estas fluctuaciones ocurren a intervalos regulares se consideran como ritmos biológicos (Salazar y col., 2006).

Los ritmos pueden definirse como la recurrencia o repetición de eventos o fenómenos biológicos en intervalos o períodos<sup>1</sup> de tiempo regulares (Aschoff, 1981).

Los ritmos biológicos son generados por un mecanismo endógeno del organismo. Se presentan en un amplio intervalo de frecuencias<sup>2</sup> de oscilación y van desde un ciclo por milisegundo hasta un ciclo por año (Pittendrigh, 1981).

En coordinación con la cronobiología, Enright (1981) clasificó a los ritmos biológicos en tres grupos, de acuerdo con la frecuencia de su oscilación.

- 1. Ritmos Ultradianos:** ciclos que ocurren varias veces en un día, tienen frecuencias inferiores a la diaria, inferior a 19 horas. Por ejemplo, el ritmo respiratorio, cardíaco, las ondas eléctricas cerebrales y el ciclo celular.
  
- 2. Ritmos Circadianos:** estos ocurren una vez al día o cercano a las 24 horas, en un intervalo de 19 a 29 horas. Por ejemplo, el ciclo sueño vigilia, la secreción hormonal del cortisol, de melatonina y de prolactina.

---

<sup>1</sup>**Periodo:** es la duración de un ciclo completo, es decir, el intervalo de tiempo entre dos puntos de referencia idénticos, se expresa en unidades de tiempo (segundos, minutos, horas, días, meses o años). <sup>2</sup>**Frecuencia:** número de ciclos que tiene lugar por unidad de tiempo (Gruart y col., 2002; Campos y col., 2008).

- 3. Ritmos Infradianos:** ciclos cuyo frecuencia es superior a la diaria, mayor a 29 horas. Por ejemplo, el ciclo menstrual en mamíferos, el ciclo estral en los roedores, los ciclos reproductivos.

Cuando la frecuencia de un ritmo biológico se aproxima a la de un ciclo ambiental se le denomina con el prefijo “circa”; por esta razón, a los ritmos biológicos cercanos a las 24 horas se les llama ritmos circadianos (Salazar y col., 2006) y persisten bajo condiciones ambientales controladas (luz, oscuridad, temperatura) (Kennaway, 2004).

En los mamíferos, los ritmos circadianos representan un proceso importante mediante el cual los eventos del medio interno se organizan en una secuencia temporal, que permite una máxima adaptación al medio externo. Esta característica permite al organismo predecir cambios en el ambiente geofísico asociado con el día y la noche y prepararse a ellos (Aguilar-Roblero y col., 2004).

Para llevar a cabo esta función adaptativa, los ritmos circadianos requieren que el sistema tenga la capacidad de medir el tiempo biológico, es decir, que el ritmo circadiano sea generado endógenamente y que se pueda ajustar al tiempo geofísico, esto es, que en condiciones ambientales usuales, el periodo del oscilador se ajuste al periodo del ciclo ambiental, a lo que se le denomina **sincronización** (Aschoff, 1981).

Las señales o variables ambientales que modifican a los osciladores circadianos se conocen como **sincronizadores** o *zeitgebers* (del alemán “dador de tiempo”) (Aschoff, 1981), y se clasifican en: **fóticos**, que se refieren al ciclo luz-oscuridad, la cual es una de las señales mas comúnmente estudiadas; y **no fóticos**, como la temperatura, la humedad, el ruido, las interacciones sociales, la disponibilidad de alimento, la actividad motora, los campos eléctricos, la presión atmosférica, entre otras (Pittendrigh, 1981; Salazar y col., 2006).

El proceso de sincronización requiere la presencia de un reloj biológico que genere oscilaciones autosostenidas y que responda en forma discriminada a los estímulos externos que puedan generar específicamente respuestas de fase<sup>3</sup> por parte del mismo (Roenneberg y col., 2003).

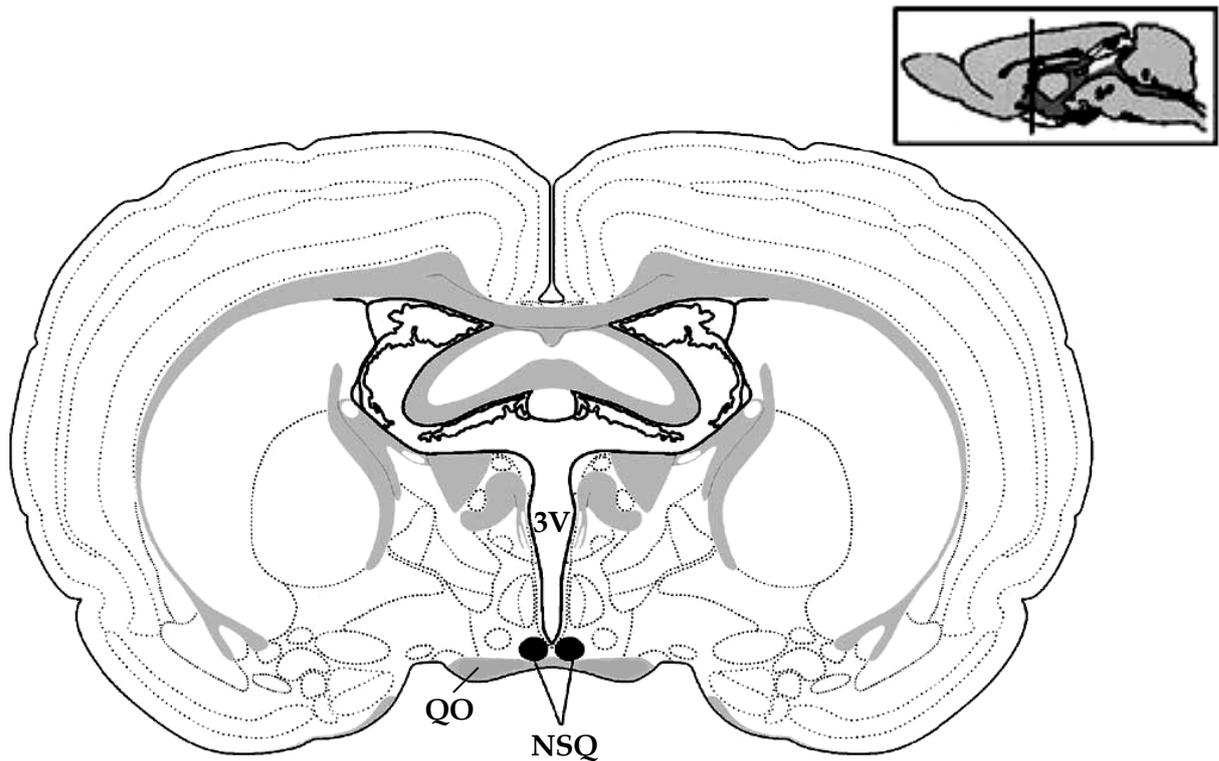
## **EL RELOJ BIOLÓGICO MAESTRO: EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO**

Un reloj biológico puede definirse como un sistema orgánico capaz de generar un orden temporal en las actividades del organismo e implica la capacidad del sistema a oscilar con un periodo regular y la capacidad de usar dichas oscilaciones como una referencia temporal interna (Aschoff, 1981; Granados y col., 1995.).

En los mamíferos, el sistema circadiano está localizado en el Núcleo Supraquiasmático (NSQ; Rusak, 1982) que se ubica en la porción ventral del hipotálamo anterior, ventrolateral al tercer ventrículo y dorsal al quiasma óptico (Balsalobre, 2002; Aguilar-Roblero y col., 2004; Kennaway, 2004; Kriegsfeld y Silver, 2006) (**Figura 10**). El NSQ es una estructura pareada (Kennaway, 2004), que en la rata adulta se compone de 16,000-20,000 neuronas pequeñas, asociadas con células gliales y terminales nerviosas (Van den Pol, 1991).

---

<sup>3</sup>**Fase:** se refiere al momento (hora, día o mes) en que ocurre un hecho característico dentro del ciclo en estudio (Gruart y col., 2002; Campos y col., 2008).

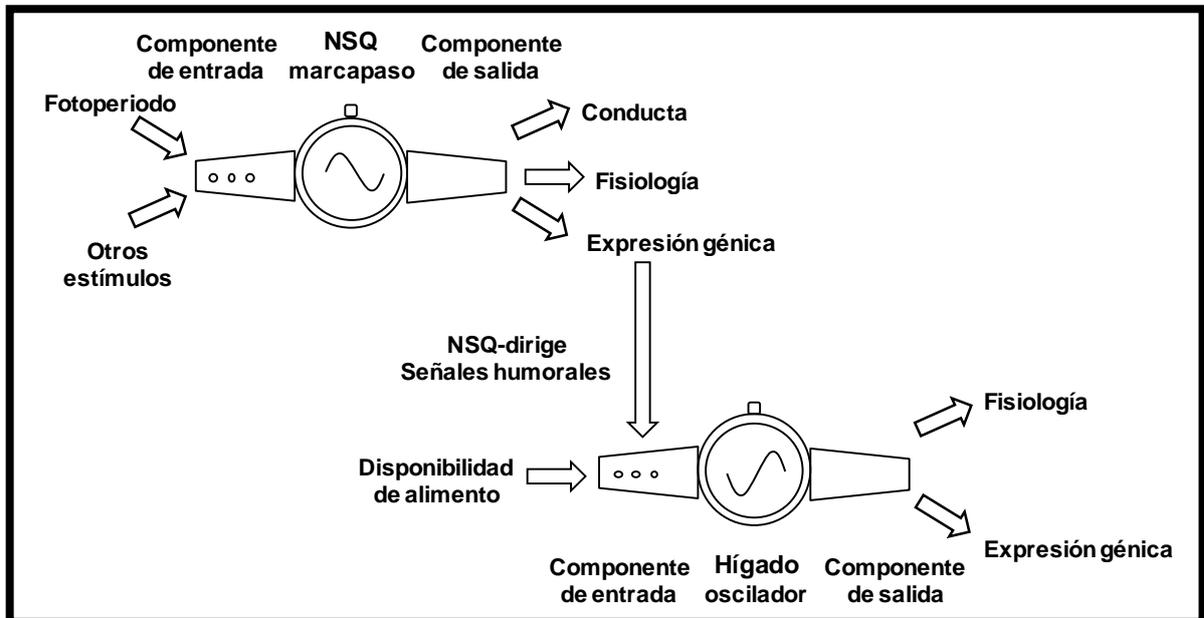


**Figura 10.** El reloj circadiano en los mamíferos está localizado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo anterior. En el borde superior derecho se representa la ubicación rostro-caudal del cerebro de roedor con sección coronal y el esquema ilustra la ubicación del NSQ en el cerebro. Quiasma óptico, QO; tercer ventrículo, 3V (Modificado de Kriegsfeld y Silver, 2006).

En la **figura 11** se puede observar como está conformado el sistema circadiano, el cual consta básicamente de tres componentes:

- 1.- El *componente de entrada (input component)*, son todas aquellas vías nerviosas que captan las señales externas y que permiten al reloj biológico sincronizar el tiempo circadiano con el medio ambiente.
- 2.- El *núcleo oscilador u oscilador molecular (pacemaker)*, es el reloj biológico que se encarga de convertir las señales externas en una respuesta a través de la expresión rítmica de genes con una periodicidad cercana a 24 horas (Balsalobre, 2002; Antle y Silver, 2005; Buchanan y Gillette, 2005).

3.- El *componente de salida (output component)*, son aquellas vías nerviosas por donde el oscilador transmite su información temporal al resto del organismo y que permiten la expresión de los ritmos fisiológicos y conductuales (Balsalobre, 2002).



**Figura 11.** Modelo hipotético en la sincronización de los relojes periféricos por el NSQ y señales locales. El componente de salida del reloj en el NSQ controla directamente varios aspectos de la ritmicidad circadiana a través de señales humorales y neurales. El componente de entrada al reloj del NSQ es requerido para sincronizar el tiempo circadiano a las señales externas, principalmente al fotoperiodo. Además las neuronas del NSQ producen o gatillan la producción de señales humorales que reinician o sostienen a los relojes periféricos. El componente de entrada de los relojes periféricos puede ser directamente sensitivo a algunas señales tales como la disponibilidad de alimento. Cuando el alimento esta disponible *ad libitum*, los relojes periféricos están sincronizados principalmente por el fotoperiodo a través del reloj en el NSQ. Sin embargo, cuando la alimentación esta restringida en la fase de iluminación, los relojes periféricos pueden escapar de la influencia de las señales dirigidas por el NSQ y reiniciarse por señales locales dominantes como la disponibilidad de alimento (Modificado de Balsalobre, 2002).

Los estudios han llevado a plantear que el reloj circadiano en los roedores es un complejo marcapasos que consta de dos osciladores mutuamente acoplados en antifase (con actividad antiparalela) uno con relación al otro (Pittendrigh, 1976), la evidencia de esta idea surge inicialmente en un fenómeno conocido como “splitting” o actividad locomotora (rueda giratoria) disociada o dividida en dos componentes estables que se presentan cada 12 h, la cual ha sido más estudiada en el hámster expuesto a luz constante. En el hámster el análisis experimental de la expresión génica en el NSQ sobre el fenómeno de splitting llevó a interpretar que los dos osciladores acoplados en este fenómeno corresponden al lado derecho e izquierdo del NSQ (De la Iglesia y col., 2000).

Se ha identificado que las neuronas del NSQ contienen una amplia variedad de neurotransmisores, principalmente péptidos, que se distribuyen en dos poblaciones neuronales: una **dorsomedial** caracterizada por la presencia de vasopresina (ADH), somatostatina, el factor liberador de corticotropinas (CRH), neuroficina y encefalinas entre otras, y una **ventrolateral** caracterizada por la presencia de VIP, péptido histidina-leucina (PHL), péptido liberador de gastrina y la bombesina; la mayoría de las neuronas de las dos poblaciones sintetizan GABA (Klein y col., 1991; Moore y Leak, 2002). Otros neuropéptidos también sintetizados son el PACAP, la serotonina, el glutamato, el NPY, SP, estrógenos, melatonina y citocinas como el factor de crecimiento semejante a la insulina-I, leptina e interferón y también se han localizado los receptores a sus respectivos ligandos (van den Pool, 1980; Kennaway, 2004; Kriegsfeld y Silver, 2006).

El ritmo circadiano de la actividad de las neuronas del NSQ es el resultado de la oscilación de un conjunto de “genes reloj” que forman asas de retroalimentación sobre la transcripción y traducción, en el cual la expresión de estos genes es suprimida periódicamente por sus proteínas producto (Reppert y Weaver, 2001). Hasta la fecha hay  $\geq 10$  genes que forman las bases de la ritmicidad celular como los que se muestran en el **Cuadro 1** (Kennaway, 2004).

**Cuadro 1.** Lista de genes reloj que desempeñan un papel en la generación de ritmicidad celular en los vertebrados (Modificado de Kennaway, 2004).

<i>Nombre del gen</i>	<i>Abreviación</i>	<i>Nombre alternativo</i>
Period 1	<i>per1</i>	
Period 2	<i>per2</i>	
Period 3	<i>per3</i>	
Circadian locomotor	<i>Clock</i>	
Output cycle kaput		
Brain muscle	<i>Bmal1</i>	<i>MOP3</i>
ARNT-like protein 1		
Cryptochrome 1	<i>cry1</i>	
Cryptochrome 2	<i>cry2</i>	
Differentiated embryo chondrocytes 1	<i>dec1</i>	<i>Stral3, Sharp2, BHLHB2, Clast5</i>
Differentiated embryo chondrocytes 2	<i>dec2</i>	<i>Sharp1, BHLHB3</i>
Rev erb alpha	<i>Rev erb<math>\alpha</math></i>	
Casein kinase I epsilon		
Casein kinase I delta		

La lesión bilateral del NSQ produce la desorganización del patrón circadiano que caracteriza diversas conductas, actividad locomotora, ingesta de alimento, ciclo sueño-vigilia y parámetros fisiológicos (secreción de diversas hormonas como la hormona adenocorticotropa, melatonina, LH) (Aguilar-Roblero y col., 2004; Kennaway, 2004). Esto se produce por la disrupción tanto de comunicaciones nerviosas como de vías parácrinas o endócrinas. En los animales con lesión del NSQ, el trasplante del núcleo proveniente de fetos o de animales neonatos restablece los ritmos; sin embargo, los mecanismos por los cuales el trasplante restaura la ritmicidad se desconocen (Moore y Leak, 2002). Con estas evidencias se ha considerado al NSQ como un marcapasos circadiano autónomo.

## **RELOJES BIOLÓGICOS EN TEJIDOS PERIFÉRICOS**

En mamíferos se observó que las proteínas traducidas a partir del RNAm se sintetizan de manera circadiana, no solo en el NSQ, sino también en tejidos periféricos incluyendo al bulbo olfatorio (Granados y col., 2004), hígado, músculo, riñón, bazo, pulmón, páncreas y adrenales (Balsalobre y col., 1998; Reppert y Weaver, 2001; Buijs y col., 2003). Estos resultados fueron interpretados como que en los mamíferos muchos tipos celulares parecen tener todos los elementos moleculares necesarios, para lograr la expresión de un gen circádico y por lo tanto cada célula en tejidos periféricos pueda tener su propio reloj. Sin embargo, la extirpación de alguno de los tejidos no altera la expresión de la ritmicidad circadiana en el órgano (Gruart y col., 2002). Así, se ha demostrado, al menos funcionalmente (aunque no anatómicamente), la existencia de otros osciladores que determinan ritmos que no desaparecen con la destrucción del NSQ.

Dado que las neuronas del NSQ y las células de los tejidos periféricos generan oscilaciones por mecanismos similares, se ha postulado que el reloj del NSQ y los periféricos son similares pero no idénticos. Por lo que, el reloj del NSQ se define como marcapasos capaz de generar y mantener sus oscilaciones independientes, mientras que los relojes periféricos son osciladores que requieren de señales externas para sostener y sincronizar sus ritmos circadianos (Balsalobre, 2002).

En los vertebrados, dependiendo de la especie, se han propuesto al NSQ, a la retina y la glándula pineal como posibles marcapasos circadianos. En anfibios, reptiles y aves se ha documentado ampliamente el papel del marcapaso de la retina y la pineal, mientras que en los mamíferos, principalmente en los roedores, se señala al NSQ (Klein y col., 1991).

Recientemente, diversos genes reloj (*arntl*, *per1*, *per2*, *clock*, *cry1*) han sido reportados que operan en el ovario de la rata adulta e inmadura (Fahrenkrug y col., 2006; Karman y Tischkau, 2006; He y col., 2007; Yoshikawa y col., 2009; Nakamura y col., 2010). Por estudios de inmunohistoquímica se ha mostrado que los genes *per1* y *per2*, presentan una expresión rítmica en células esteroideogénicas de la granulosa y de la teca de folículos preantrales, antrales y preovulatorios, en el cuerpo lúteo y células de la glándula intersticial, pero no en el ovocito (Fahrenkrug y col., 2006; Karman y Tischkau, 2006).

Los grupos de investigación de Fahrenkrug (2006), Karman (2006), He (2007) y Yoshikawa (2009) han demostrado que el ovario de los mamíferos tiene un reloj circadiano endógeno (Dolatshad y col., 2009).

Varios resultados han permitido sugerir que la expresión de los genes reloj en el tejido ovárico está regulada por las gonadotropinas (Karman y Tischkau, 2006; He y col., 2007; Yoshikawa y col., 2009) y por el ciclo estral (Nakamura y col., 2010).

## **PAPEL DEL NSQ EN LA REGULACIÓN DEL CICLO ESTRAL Y LAS FUNCIONES DEL OVARIO.**

Muchos procesos fisiológicos como el comportamiento, la ovulación y la secreción de diversas hormonas presentan ritmicidad circadiana, la cual es controlada por relojes endógenos presentes en las neuronas del NSQ y en células de los tejidos periféricos, como en el ovario (Antle y Silver, 2005; Buchanan y Gillette, 2005).

La secreción de ciertas hormonas presentan variaciones durante el ciclo circádico como es el caso de la corticosterona para la rata y del cortisol para el humano (Johnson y Levine, 1973), las gonadotropinas y los esteroides gonadales

en el hámster, la rata y el humano que varían dependiendo de la etapa de luz-oscuridad a la que son sometidos (Andrews y Ojeda, 1981; de la Iglesia y col., 1999).

En estudios previos hemos mostrado que la administración de pentobarbital sódico en el día del P, E, D1 o D2 en varias horas del día, puede inhibir la elevación de LH y la ovulación, debido a una disrupción o retraso en la secreción de estrógenos, ambos eventos (liberación preovularia de LH y la ovulación) ocurren 24 h después del E (Domínguez y Smith, 1974). Actualmente se acepta que el tiempo requerido para que culmine el crecimiento del folículo y libere el ovocito está determinado por el NSQ (Kennaway, 2004).

La secreción de gonadotropinas es regulada por varios sistemas, entre ellos el colinérgico. La administración de una dosis de 100 mg/kg de p.c. de sulfato de atropina resulta en el bloqueo de la ovulación, el cual depende de la hora y del día del ciclo estral en el que se administre el fármaco. Así se obtiene 70% del bloqueo cuando se administra a las 17:00 del E, y hay un bloqueo total si la atropina se inyecta a las 09:00 o 13:00 h del D1, sugiriendo que el sistema colinérgico ejerce una regulación circádica sobre la secreción de gonadotropinas (Domínguez y col., 1982). De igual manera, la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en el hipotálamo muestra un patrón circádico (Cruz y col., 1990).

Se ha mostrado que el NSQ establece la duración de la fase de luz del día, cuando el NSQ es dañado, se interrumpe el ciclo estral, esto hace evidente que la luz es uno de los factores que controla el ciclo estral, vía el NSQ. En la interacción entre los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, para regular el ciclo estral, se requiere de la integridad del NSQ (Balsalobre, 2002; Barbacka-Surowiak y col., 2003).

En los roedores hembra, el NSQ envía proyecciones neurales (que expresan VIP) directamente a neuronas GnRH-érgicas (Van der Beek, 1997a). La conexión entre las células del NSQ-GnRH determinan las bases anatómicas de la influencia circádica en la regulación de los ciclos reproductivos de la hembra (Van der Beek y col., 1993). Los estudios de Smith y colaboradores (2000) sugieren que las neuronas VIP-érgicas originadas en el NSQ, reciben señales fóticas que entran directamente por la retina (tracto retino-hipotalámico) y transmiten la información del fotoperíodo a las neuronas GnRH-érgicas. De esta forma, las neuronas VIP-érgicas regulan directamente a neuronas de GnRH.

Estudios realizados por De la Iglesia y colaboradores (2003) propusieron que en la hembra del hámster la elevación de LH que se produce aproximadamente cada 12 h en el split, se debía al reflejo de la activación alternada de las neuronas de GnRH, en el lado izquierdo y derecho del área preóptica, ipsilateral a los núcleos supraquiasmáticos.

Hay evidencias de que los estrógenos ejercen sus efectos en los ritmos con actividad circádica actuando directa o indirectamente en el NSQ (Barbacka-Surowiak y col., 2003; Kriegsfeld y Silver, 2006). La expresión de receptores a  $E_2$  (RE)  $\alpha$  y  $\beta$  en el NSQ ha permitido sugerir que los estrógenos actúan directamente en los ritmos circádicos en el hámster, (Tavakoli-Nezhad y Schwartz, 2005), el ratón (Shughrue y col., 1997) y el humano (Kruijver y Swaab, 2002), mientras que en la rata (Barbacka-Surowiak y col., 2003) actúan de manera indirecta a través de vías multisinápticas, sensitivas a esteroides, con las neuronas de otras áreas cerebrales que contienen RE como el área preóptica [donde las neuronas GnRH-érgicas poseen RE- $\beta$  (Pettersen y col., 2003)], la amígdala, núcleo arcuato y el núcleo paraventricular anteroventral (AVPV) (De la Iglesia y col., 1999).

El AVPV (región sexualmente dimórfica) localizada entre el NSQ y el área preóptica medial, ha sido propuesta como un candidato donde convergen las señales circadianas y la de los estrógenos (Pettersen y col., 2003). La gran cantidad de RE- $\alpha$  en el AVPV parece necesario para que se produzca el efecto de retroalimentación positiva de los estrógenos sobre la liberación preovulatoria de LH. Las neuronas del AVPV están conectadas (Watson y col., 1995) y se proyectan a las neuronas del NSQ (De la Iglesia y col., 1999).

Se ha mostrado que en machos castrados, la duración de la actividad locomotora incrementa, mientras que las revoluciones de la rueda giratoria por ciclo disminuye, indicando que la T afecta la consolidación de los ritmos de actividad locomotora (Kriegsfeld y Silver, 2006). La T puede actuar a través de sus receptores en el NSQ, los cuales se han identificado en varias especies (Clancy y col., 1994; Kashon y col., 1996; Fernández-Guasti y col., 2000), o indirectamente por su conversión a E<sub>2</sub> (Kriegsfeld y Silver, 2006).

Por estudios con trazadores se ha mostrado que en los adipositos, corazón e hígado las conexiones multisinápticas con el sistema nervioso simpático y parasimpático, son moduladas por el NSQ (Buijs y Kalsbeek, 2001; Scheer y col., 2001). Estas evidencias permiten sugerir que la información neural que transcurre por la inervación simpática del ovario y del útero puede también ser regulada por el NSQ (Kennaway, 2004), aunque al momento no existen evidencias que lo avalen.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La regulación endocrina del eje hipotálamo-hipófisis-ovario se realiza por señales hormonales originadas en el hipotálamo (principalmente por GnRH), que pasan a la hipófisis (FSH, LH, prolactina, entre otros) y finalmente llegan al ovario (estrógenos, progesterona, andrógenos, activina, inhibina, folistatina), además de señales nerviosas que se originan en diversas regiones del SNC y que llegan al ovario por el NOS (sistema simpático), después de hacer relevo en el ganglio celiaco-mesentérico superior.

La innervación del ovario regula la respuesta de los folículos y de la glándula intersticial a las gonadotropinas, mientras que otras fibras llevan información sobre las respuestas del ovario hacia diversas regiones del SNC. Existe poca información si la modulación nerviosa que ejerce el NOS en la secreción hormonal y la ovulación espontánea varía en las diferentes horas del día (fase de iluminación) y si esta respuesta depende de la etapa del ciclo estral. Por lo que en el presente estudio se analizó el efecto de la sección uni o bilateral del NOS a las 11:00 ó 17:00 horas del diestro 1 o del proestro sobre las funciones ováricas.

## **HIPÓTESIS**

Si el nervio ovárico superior es una vía nerviosa de conexión entre el sistema nervioso central y los ovarios que participa en la modulación de las funciones reproductivas, entonces la eliminación de la información nerviosa que transcurre por este nervio a través de su sección, en diferentes momentos del día en el diestro 1 o proestro, resultará en modificaciones tanto de la secreción hormonal como de la ovulación espontánea.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar los efectos agudos y sub-agudos de la sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior, realizada a las 11:00 y a las 17:00 horas del diestro 1 o proestro sobre la función ovárica.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- ❖ Analizar los efectos agudos y sub-agudos de la sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior, realizada a las 11:00 y a las 17:00 horas del diestro 1 o proestro sobre el peso húmedo de los ovarios, las adrenales y el útero.
  
- ❖ Analizar los efectos agudos y sub-agudos de la sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior, realizada a las 11:00 y a las 17:00 horas del diestro 1 o proestro sobre ovulación espontánea.
  
- ❖ Analizar los efectos agudos y sub-agudos de la sección del nervio ovárico superior, realizada a las 11:00 y a las 17:00 horas del diestro 1 o proestro sobre la concentración de FSH y LH.
  
- ❖ Analizar los efectos agudos y sub-agudos de la sección unilateral del nervio ovárico superior o de ambos nervios, realizadas a las 11:00 y a las 17:00 horas del diestro 1 o proestro sobre la concentración de progesterona, testosterona y estradiol.

## MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron ratas hembras, adultas vírgenes, de la cepa CII-ZV, con libre acceso al agua y alimento, mantenidas en condiciones de iluminación controlada de 14 h de luz y 10 h de oscuridad (luces encendidas de 5:00 a 19:00 h) y temperatura de  $22\pm 2$  °C. En todos los casos se siguió lo establecido por la Ley Mexicana de Protección Animal para el Uso de Animales de Experimentación. El Subcomité del Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM aprobó el protocolo experimental. El ciclo estral de los animales fue monitoreado por la toma diaria de frotis vaginales. Sólo se utilizaron aquellos animales que presentaron al menos 2 ciclos consecutivos de 4 días de duración.

A diferentes grupos de animales (n=10/grupo) se les realizó la sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior, a las 11:00 o a las 17:00 horas del diestro 1 o del proestro, siguiendo la metodología habitual del laboratorio. Los animales se anestesiaron con éter etílico, se realizó una incisión lateral de aproximadamente 1 cm que abarcó piel, músculo y peritoneo, se exteriorizó el ovario unido al útero, se identificó el ligamento suspensorio y se seccionó el nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o ambos nervios (SBNO) [**Figura 9**, la línea punteada indica el lugar donde se realizó el corte]. El ovario fue regresado a la cavidad abdominal y se suturó la herida.

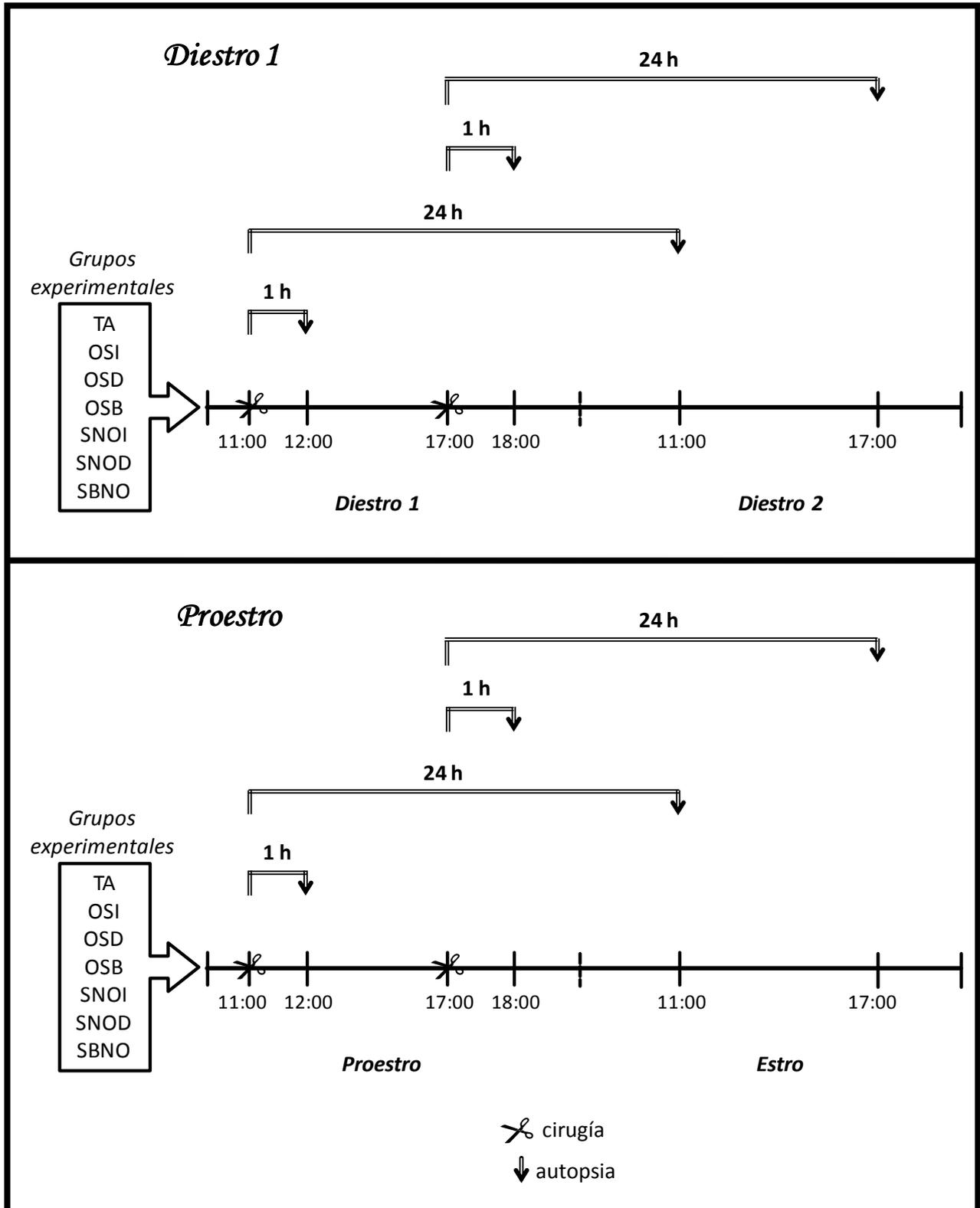
Como grupos de comparación utilizamos animales que no recibieron tratamiento (testigo absoluto, TA) y animales a los que se les realizó una operación simulada o laparotomía izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB), la cual consistió en la incisión de piel, músculo y peritoneo, y que sin tocar ningún órgano se suturó la herida.

## ***PROCEDIMIENTO DE AUTOPSIA***

Grupos de animales tratados y no tratados fueron sacrificados por decapitación, 1 ó 24 horas después de la intervención.

Se colectó la sangre del tronco y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos, el suero se congeló a -20 °C hasta el momento en que se determinaron las concentraciones de P<sub>4</sub>, T, E<sub>2</sub>, FSH y LH por RIA. A la autopsia se disecaron las adrenales, los ovarios y el útero e inmediatamente después se pesaron (peso húmedo) en una balanza de precisión, en los oviductos se buscó la presencia de ovocitos los cuales fueron contados con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

ESQUEMA QUE MUESTRA LOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTALES REALIZADOS EN EL PROTOCOLO





➤ **Hormonas Proteicas**

La cuantificación de hormonas proteicas (FSH y LH) se realizó por RIA de doble anticuerpo, en tubos de vidrio se colocaron 100 µl de suero problema más 100 µl de hormona marcada con FSH-I<sup>125</sup> o LH-I<sup>125</sup>, después se adicionó el anticuerpo obtenido de suero de borrego anti-FSH o anti-LH y la mezcla se dejó incubar por 24 h.

Posteriormente, se agregaron 100 µl del segundo anticuerpo suplementado con suero normal de conejo y la mezcla se incubo durante 2 horas. Pasado este tiempo, los tubos se centrifugaron a 3000 rpm a -4 °C por 30 minutos, se decantó el sobrenadante y se secaron las paredes de los tubos y enseguida se colocaron en un contador de rayos gamma, modelo Cobra 5005, Packard<sup>TM</sup>. Para determinar la concentración de la hormona en la muestra problema, se realizó una curva de calibración utilizando estándares para FSH (rFSH-RP2) o LH (rLH-RP2) y de las cuentas por minuto. Las concentraciones de FSH y LH se expresaron en ng/ml de suero. Los coeficientes intra e interespecíficos fueron los siguientes: 5.1% y 6.5% para LH, y 4% y 7.9% para FSH. La sensibilidad del análisis fue de 0.02 ng/ml para LH y de 0.1 ng/ml para FSH.

La cuantificación de las hormonas esteroides y proteicas se realizó en el Laboratorio de Hormonas Esteroides y Proteicas del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

## ***CÁLCULO DE LA TASA DE ANIMALES OVULANTES***

El cálculo de la tasa de animales ovulantes (TAO) de los animales operados en el proestro a las 11:00 ó 17:00 h y sacrificados en 24 horas (estro), se realizó con la siguiente fórmula:

$$\text{TAO} = \frac{\text{Número de animales ovulantes}}{\text{Número total de animales por grupo}} \times 100$$

## ***ANÁLISIS ESTADÍSTICO***

Los resultados de pesos de órganos, las concentraciones séricas de P<sub>4</sub>, T, E<sub>2</sub>, FSH, LH se analizaron por la prueba de Análisis de Varianza Multifactorial (ANDEVA) seguida de la prueba de Tukey. El número de ovocitos liberados fue analizado por la prueba de Kruskal Wallis seguida de la prueba de Dunn. La tasa de animales ovulantes se analizó por la prueba de Fisher. Cuando se realizó la comparación entre dos grupos, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney o “t” de Student dependiendo del parámetro analizado. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fuera igual o menor a 0.05.

# R E S U L T A D O S

## EXPERIMENTO I.

*Efectos agudos y sub-agudos de la operación simulada realizada a las 11:00 ó 17:00 horas del diestro<sup>1</sup> o proestro sobre la función ovárica*

### ▪ **Peso Corporal y Masa Ovárica**

El **peso corporal** y la **masa ovárica** de los animales sometidos a la operación simulada fue similar al del grupo testigo (datos no mostrados).

### ▪ **Peso del Útero y Masa Adrenal**

Una hora post-cirugía, el **peso del útero** de los animales con OSI a las 17:00 h del P fue mayor que en el grupo control ( $425.8 \pm 9.8$  vs.  $381.0 \pm 9.5$  mg,  $p < 0.05$ ). El peso del útero fue menor en los animales con OSB realizada a las 17:00 del D1, sacrificados a las 24 horas post-laparotomía ( $303.1 \pm 13.7$  vs.  $370.2 \pm 14.6$  mg,  $p < 0.05$ ).

En los animales con OSD tratados a las 17:00 h del D1 y sacrificadas a las 24 h, la **masa adrenal** fue mayor que en las hembras testigo ( $59.5 \pm 2.3$  vs.  $48.7 \pm 1.8$  mg,  $p < 0.05$ ).

### ▪ Ovulación

En las hembras TA sacrificadas a las 17:00 h del E, el **número de ovocitos liberados** por el ovario derecho fue mayor que el izquierdo ( $6.7 \pm 0.6$  vs.  $4.8 \pm 0.4$ ,  $p < 0.05$ ).

El **número de ovocitos liberados** y la **tasa de animales ovulantes (TAO)** de los animales con operación simulada fue similar al del grupo control (datos no mostrados).

### ▪ Concentración de $P_4$ , T y $E_2$ en suero

En la **figura 12** se presentan los cambios inducidos por las operaciones simuladas sobre las concentraciones de  $P_4$ , T y  $E_2$  en animales sacrificados una o 24 horas después de la cirugía.

En los animales tratados a las 11:00 ó 17:00 h del D1 sacrificados una hora después de la cirugía, la concentración de  $P_4$  fue mayor que en el grupo control. En los animales con OSI u OSB a las 11:00 h del D1 sacrificados 24 horas después de la cirugía, la concentración de  $P_4$  fue menor que en el grupo control. La OSB a las 17:00 h del D1 y evaluado 24 horas después, resultó en una mayor concentración de la hormona.

En los animales sometidos a operación simulada uni o bilateral a las 11:00 h del P, una hora después del tratamiento la concentración de  $P_4$  fue mayor que en los animales control. En comparación con los animales TA, la OSB practicada a las 11:00 ó 17:00 h del P, 24 horas post-laparotomía, la concentración de la hormona fue mayor.

La concentración de **T** en los animales con OSI u OSD a las 11:00 h de D1 una hora después de la laparotomía, fue mayor que en los animales TA. Veinticuatro horas después de la laparotomía uni o bilateral en la mañana o tarde del D1, la concentración de **T** fue menor que en el grupo control.

La concentración de **T** en las hembras con operación simulada uni o bilateral a las 11:00 ó 17:00 h del P, una hora después del tratamiento, fue mayor que en los animales TA. Veinticuatro horas después de la OSD u OSB realizadas a las 11:00 h del P, la concentración de la hormona fue menor, mientras que con la OSI a las 17:00 del P, la concentración de **T** fue mayor que el grupo control.

La concentración de **E<sub>2</sub>** en los animales con OSB en la mañana o tarde del D1 o en la mañana del P, sacrificados una hora después de la cirugía, fue menor que en el grupo testigo.

Las ratas sometidas a OSI u OSB a las 11:00 h del D1, 24 horas después del tratamiento, la concentración de **E<sub>2</sub>** fue mayor que en los animales TA. Veinticuatro horas después de la OSB a las 17:00 h del D1 o laparotomía uni o bilateral practicadas a las 17:00 h del P, la concentración de la hormona fue menor que en el grupo control.

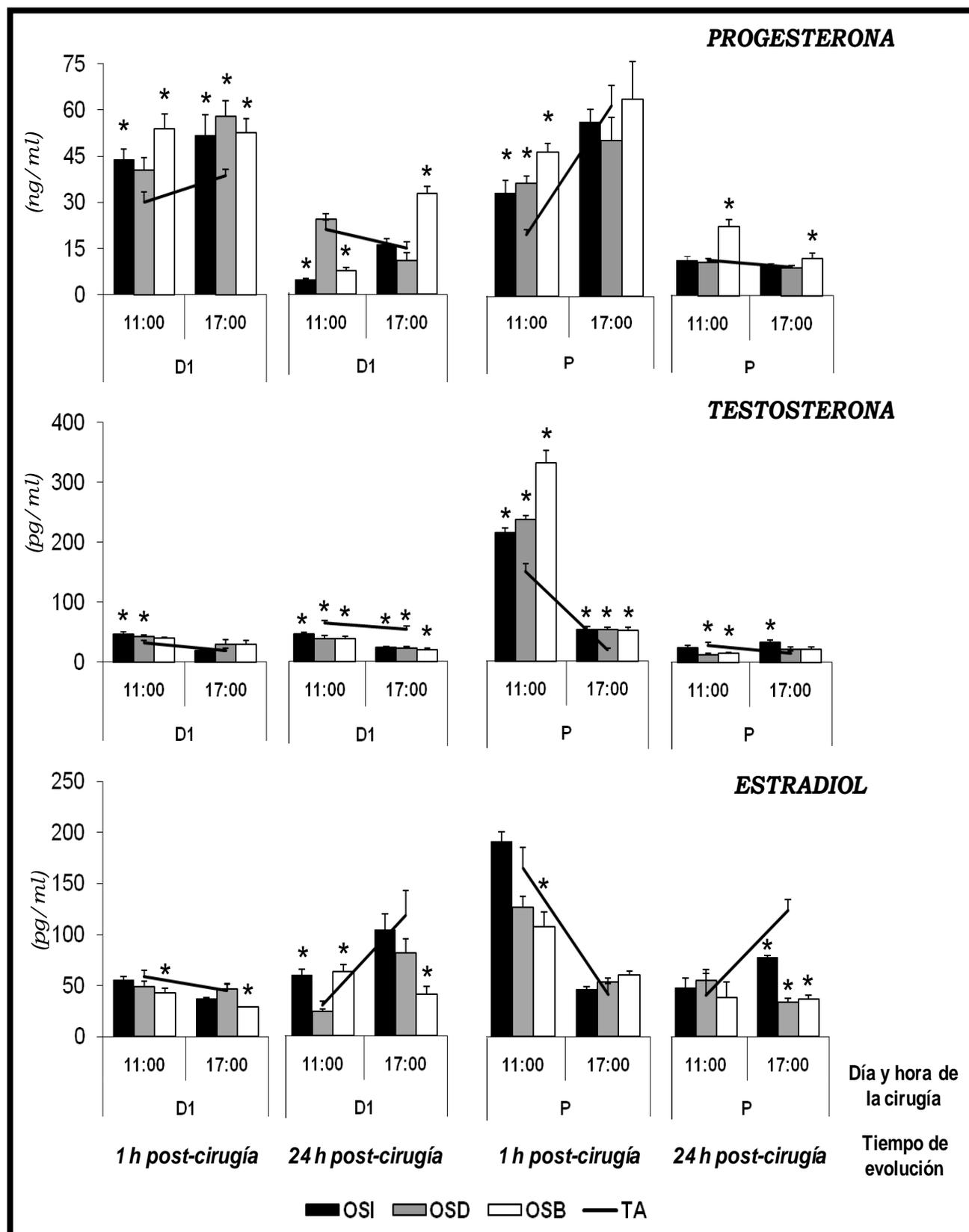


Figura 12. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración sérica de progesterona, testosterona y estradiol de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB) realizada a las 11:00 ó 17:00 h del diestro 1 o proestro y sacrificadas 1 ó 24 h post-cirugía. \* $p < 0.05$  vs. TA (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

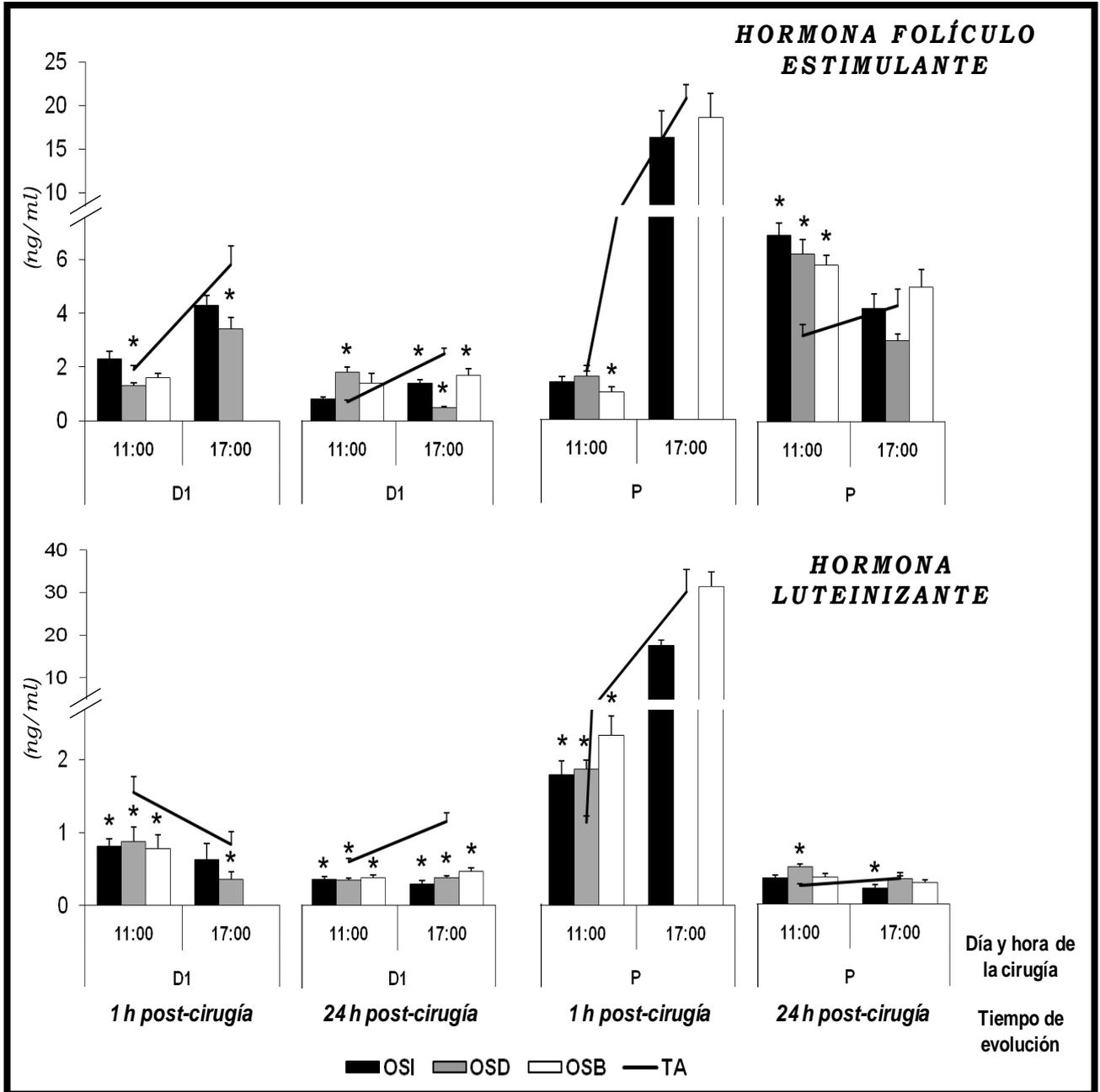
▪ **Concentración de la FSH y LH en suero**

En la **figura 13** se presentan los cambios inducidos por las operaciones simuladas sobre las concentraciones de FSH y LH en animales sacrificados una o 24 horas después de la cirugía.

Una hora después de realizada la OSD a las 11:00 ó 17:00 h del D1, la concentración de **FSH** fue menor que el grupo control. Un resultado similar se observó en los animales sometidos a OSB en la mañana del P, autopsiados una hora post-tratamiento

La OSD practicada a las 11:00 h del D1, 24 horas post-cirugía, la concentración de **FSH** fue mayor que en el grupo TA. Con la laparotomía uni o bilateral realizada a las 17:00 h del D1 y evaluada 24 horas post-cirugía, la concentración de la hormona fue menor que en los animales TA. Las mismas cirugías a las 11:00 h del P, 24 horas después del tratamiento, resultaron en una mayor concentración de **FSH** que el grupo testigo.

La concentración de **LH** en los animales con operación simulada uni o bilateral practicadas en la mañana o tarde del D1 y evaluada una ó 24 horas después de la cirugía, fue menor que en los animales control. En comparación con los animales testigo, la operación simulada uni o bilateral en la mañana del P, evaluada una hora después del tratamiento, resultó en mayor concentración de **LH**, al igual que con la OSD realizada en la mañana del P y evaluada 24 horas post-cirugía. Con la OSI practicada en la tarde del P, la concentración de la hormona fue menor que el grupo testigo.



**Figura 13.** Media  $\pm$  e.e.m. de la **concentración sérica de FSH y LH** de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB) realizada a las **11:00 ó 17:00 h del diestro 1 o proestro y sacrificadas 1 ó 24 h post-cirugía**. \* $p < 0.05$  vs. TA (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

## RESUMEN DE RESULTADOS

### DIESTRO 1

Tiempo evolución	1 hora			24 horas			1 hora			24 horas		
Hora cirugía	11:00						17:00					
Grupo	OSI	OSD	OSB	OSI	OSD	OSB	OSI	OSD	OSB	OSI	OSD	OSB
<b>P<sub>4</sub></b>	↑	=	↑	↓	=	↓	↑	↑	↑	=	=	↑
<b>T</b>	↑	↑	=	↓	↓	↓	=	=	=	↓	↓	↓
<b>E<sub>2</sub></b>	=	=	↓	↑	=	↑	=	=	↓	=	=	↓
<b>FSH</b>	=	↓	=	=	↑	=	=	↓	-	↓	↓	↓
<b>LH</b>	↓	↓	↓	↓	↓	↓	=	↓	-	↓	↓	↓

### PROESTRO

Tiempo evolución	1 hora			24 horas			1 hora			24 horas		
Hora cirugía	11:00						17:00					
Grupo	OSI	OSD	OSB	OSI	OSD	OSB	OSI	OSD	OSB	OSI	OSD	OSB
<b>P<sub>4</sub></b>	↑	↑	↑	=	=	↑	=	=	=	=	=	↑
<b>T</b>	↑	↑	↑	=	↓	↓	↑	↑	↑	↑	=	=
<b>E<sub>2</sub></b>	=	=	↓	=	=	=	=	=	=	↓	↓	↓
<b>FSH</b>	=	=	↓	↑	↑	↑	=	-	=	=	=	=
<b>LH</b>	↑	↑	↑	=	↑	=	=	-	=	↓	=	=

Resumen de los efectos agudos y sub-agudos de la operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB) comparados con el grupo testigo absoluto (TA), realizada en ratas adultas a las 11:00 ó 17:00 horas del diestro 1 o proestro y autopsiadas 1 ó 24 horas post-cirugía sobre la concentración sérica de progesterona (P<sub>4</sub>), testosterona (T), estradiol (E<sub>2</sub>), de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH). Donde los signos de igual (=) indican no diferencias, las flechas hacia abajo señalan disminuciones (↓) y las flechas hacia arriba señalan incrementos (↑) en los parámetros evaluados.

Debido a que la operación simulada modificó varios de los parámetros estudiados, los efectos de la sección uni o bilateral del NOS se compararon con los de su respectiva operación simulada.

## **EXPERIMENTO II.**

### *Efectos agudos y sub-agudos de la sección del nervio ovárico superior realizada a las 11:00 ó 17:00 horas del día 1 o proestro sobre la función ovárica*

#### ▪ **Peso Corporal y Masa Ovárica**

El **peso corporal** de los animales sometidos a la sección uni o bilateral del NOS fue similar a la de sus respectivos grupos con laparotomía (Datos no mostrados).

Una o 24 horas post-denervación, la **masa ovárica** de los animales sometidos a SBNO a las 11:00 ó 17:00 h del D1 o P, fue mayor que el grupo con laparotomía (**Cuadro 2**).

Veinticuatro horas después de la SNOI practicada a las 11:00 ó 17:00 h del D1, la **masa ovárica** fue mayor que el grupo de OSI. En los animales con SNOD a las 11:00 h del P, sacrificados a las 24 horas, la **masa ovárica** fue mayor que en el grupo de OSD (**Cuadro 2**).

**Cuadro 2.** Media  $\pm$  e.e.m. de la **masa ovárica (mg)** de ratas con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB), sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada a las **11:00 ó 17:00 h del diestro 1 o proestro** y **sacrificadas 1 ó 24 horas post-cirugía.**

Día de la cirugía	DIESTRO 1		PROESTRO	
Tiempo de evolución	1 HORA POST-CIRUGÍA			
Hora de la cirugía	11:00	17:00	11:00	17:00
OSI	57.3 $\pm$ 1.5	54.5 $\pm$ 1.2	53.8 $\pm$ 1.1	60.2 $\pm$ 2.0
SNOI	58.9 $\pm$ 2.1	58.0 $\pm$ 2.1	55.9 $\pm$ 1.8	60.2 $\pm$ 2.9
OSD	59.2 $\pm$ 2.0	54.5 $\pm$ 3.1	56.0 $\pm$ 1.8	59.7 $\pm$ 2.9
SNOD	55.6 $\pm$ 4.6	52.7 $\pm$ 2.2	57.7 $\pm$ 0.7	61.6 $\pm$ 2.3
OSB	55.9 $\pm$ 1.8	54.7 $\pm$ 1.6	55.1 $\pm$ 1.3	57.3 $\pm$ 2.2
SBNO	60.8 $\pm$ 1.0♣	55.0 $\pm$ 1.5	61.9 $\pm$ 2.2♣	58.4 $\pm$ 2.9
Tiempo de evolución	24 HORAS POST-CIRUGÍA			
OSI	58.0 $\pm$ 1.5	59.9 $\pm$ 2.1	60.0 $\pm$ 2.8	67.8 $\pm$ 3.2
SNOI	64.6 $\pm$ 2.1♣	75.7 $\pm$ 2.5♣	62.3 $\pm$ 1.5	65.0 $\pm$ 2.3
OSD	63.3 $\pm$ 1.8	62.6 $\pm$ 2.3	59.4 $\pm$ 2.0	65.2 $\pm$ 2.2
SNOD	62.3 $\pm$ 2.3	64.4 $\pm$ 3.7	67.0 $\pm$ 2.3♣	67.3 $\pm$ 4.3
OSB	57.7 $\pm$ 2.2	63.0 $\pm$ 2.3	54.4 $\pm$ 3.2	70.4 $\pm$ 5.8
SBNO	65.2 $\pm$ 2.4♣	66.5 $\pm$ 3.5	66.9 $\pm$ 2.4♣	69.9 $\pm$ 2.5

♣p<0.05 vs. su respectivo grupo con OS (Prueba “t” de Student).

▪ **Peso del Útero y Masa Adrenal**

En los animales con SNOI a las 11:00 h del D1, sacrificados una hora después de la denervación, el **peso del útero** fue mayor que en el grupo de operación simulada. La misma cirugía practicada a las 17:00 h del P, resultó en menor peso

del órgano. Una hora después de la SBNO a las 11:00 h del P, el **peso del útero** fue mayor que en el grupo con OSB (**Cuadro 3**).

La SNOI a las 11:00 h del D1, 24 horas post-denervación, resultó en menor **peso del útero** que el grupo con OSI. En los animales con SBNO a las 17:00 h del D1, 24 horas después de la denervación, el peso del órgano fue mayor que la OSB (**Cuadro 3**).

**Cuadro 3.** Media  $\pm$  e.e.m. del **peso del útero (mg)** de ratas con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB), sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada a las **11:00 ó 17:00 h del diestro 1 o proestro** y **sacrificadas 1 ó 24 horas post-cirugía**.

Día de la cirugía	DIESTRO 1		PROESTRO	
Tiempo de evolución	<b>1 HORA POST-CIRUGÍA</b>			
Hora de la cirugía	<b>11:00</b>	<b>17:00</b>	<b>11:00</b>	<b>17:00</b>
<b>OSI</b>	264.3 $\pm$ 6.8	262.4 $\pm$ 8.5	397.7 $\pm$ 22.4	425.8 $\pm$ 9.8
<b>SNOI</b>	303.7 $\pm$ 12.0♣	291.4 $\pm$ 11.0	410.2 $\pm$ 25.3	389.0 $\pm$ 8.4♣
<b>OSD</b>	288.5 $\pm$ 17.0	271.2 $\pm$ 5.2	430.2 $\pm$ 9.9	393.8 $\pm$ 12.3
<b>SNOD</b>	287.2 $\pm$ 13.4	271.9 $\pm$ 4.7	464.0 $\pm$ 13.5	420.8 $\pm$ 8.7
<b>OSB</b>	299.2 $\pm$ 7.6	264.6 $\pm$ 11.7	389.8 $\pm$ 11.0	371.7 $\pm$ 7.2
<b>SBNO</b>	297.0 $\pm$ 6.8	292.2 $\pm$ 12.8	441.5 $\pm$ 13.5♣	350.9 $\pm$ 7.4
Tiempo de evolución	<b>24 HORAS POST-CIRUGÍA</b>			
<b>OSI</b>	322.8 $\pm$ 14.1	326.9 $\pm$ 10.0	339.7 $\pm$ 11.5	324.6 $\pm$ 16.8
<b>SNOI</b>	281.4 $\pm$ 10.3♣	320.9 $\pm$ 13.9	349.1 $\pm$ 11.7	335.4 $\pm$ 12.8
<b>OSD</b>	338.9 $\pm$ 18.3	334.3 $\pm$ 11.1	366.5 $\pm$ 13.0	320.7 $\pm$ 18.6
<b>SNOD</b>	316.6 $\pm$ 15.5	316.3 $\pm$ 11.5	404.0 $\pm$ 21.1	346.8 $\pm$ 11.7
<b>OSB</b>	310.0 $\pm$ 9.4	303.1 $\pm$ 13.7	390.8 $\pm$ 13.8	325.7 $\pm$ 11.8
<b>SBNO</b>	315.1 $\pm$ 15.0	350.4 $\pm$ 14.3♣	372.6 $\pm$ 23.1	316.9 $\pm$ 15.2

♣p<0.05 vs. su respectivo grupo con OS (Prueba "t" de Student).

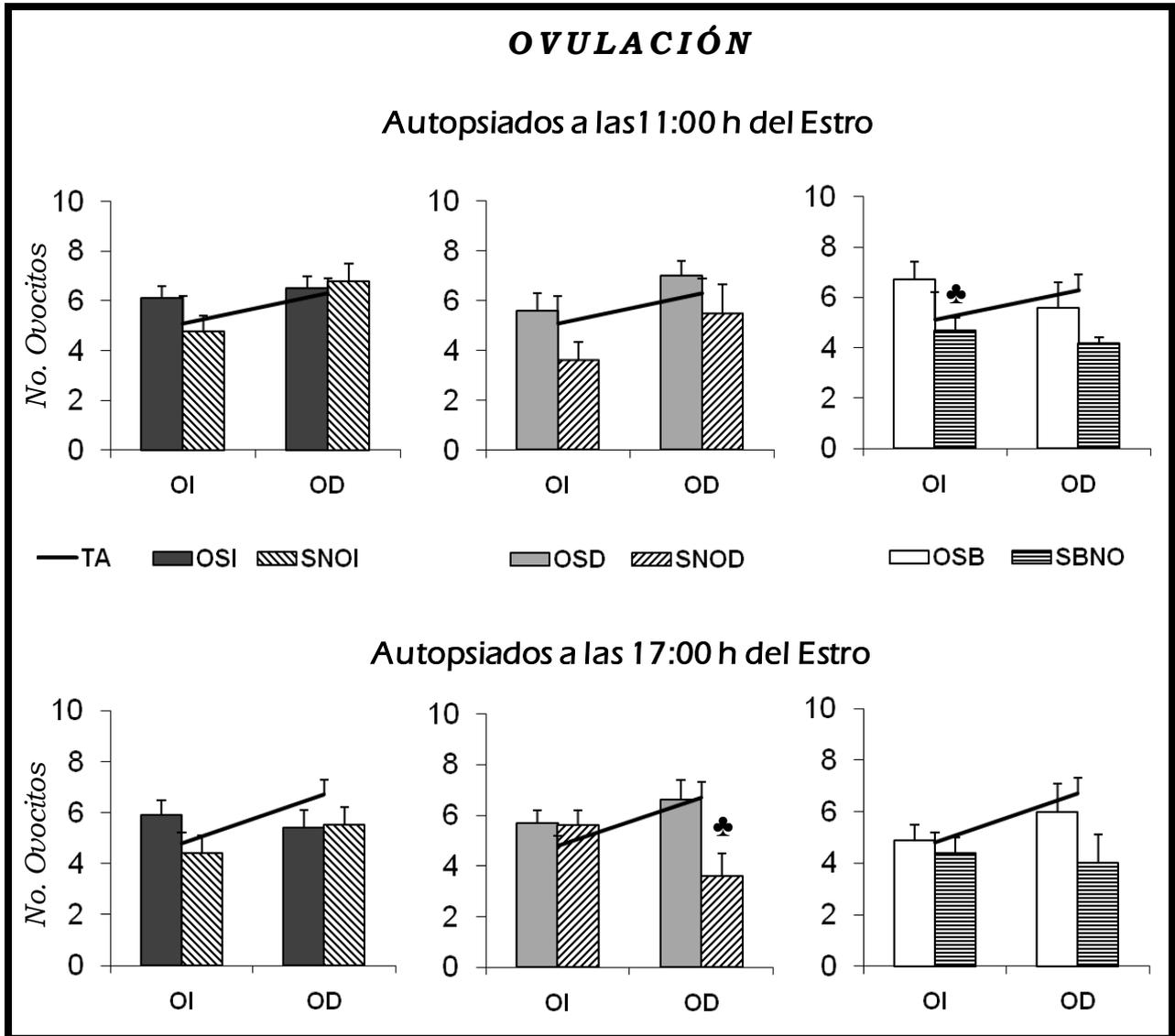
Una hora después de la SNOI a las 17:00 h del D1, la **masa adrenal** fue mayor que en las ratas con laparotomía ( $50.2 \pm 2.5$  vs.  $42.5 \pm 1.4$  mg,  $p < 0.05$ ). La SBNO a las 17:00 h del D1, 24 horas después del tratamiento, resultó en un mayor peso de la **masa adrenal** que su grupo con operación simulada ( $60.6 \pm 2.4$  vs.  $47.8 \pm 1.9$  mg,  $p < 0.05$ ).

#### ▪ **Ovulación**

La SNOI practicada a las 11:00 h del P, evaluada 24 h después, resultó en una disminución del **número de ovocitos liberados** por el ovario denervado que el ovario inervado ( $4.8 \pm 0.6$  vs.  $6.8 \pm 0.7$ ,  $p < 0.05$ ). La SBNO a las 11:00 del P, resultó en una menor cuota ovulatoria por el ovario izquierdo que en el grupo con OSB (**Figura 14**).

En las ratas con SNOD a las 17:00 h del P, autopsiadas a las 24 horas, el **número de ovocitos liberados** fue menor por el ovario denervado que en los animales con operación simulada (**Figura 14**).

La **tasa de animales ovulantes** (TAO) de los animales con sección uni o bilaeral del NOS fue similar a la de los grupos con operación simulada (datos no mostrados).

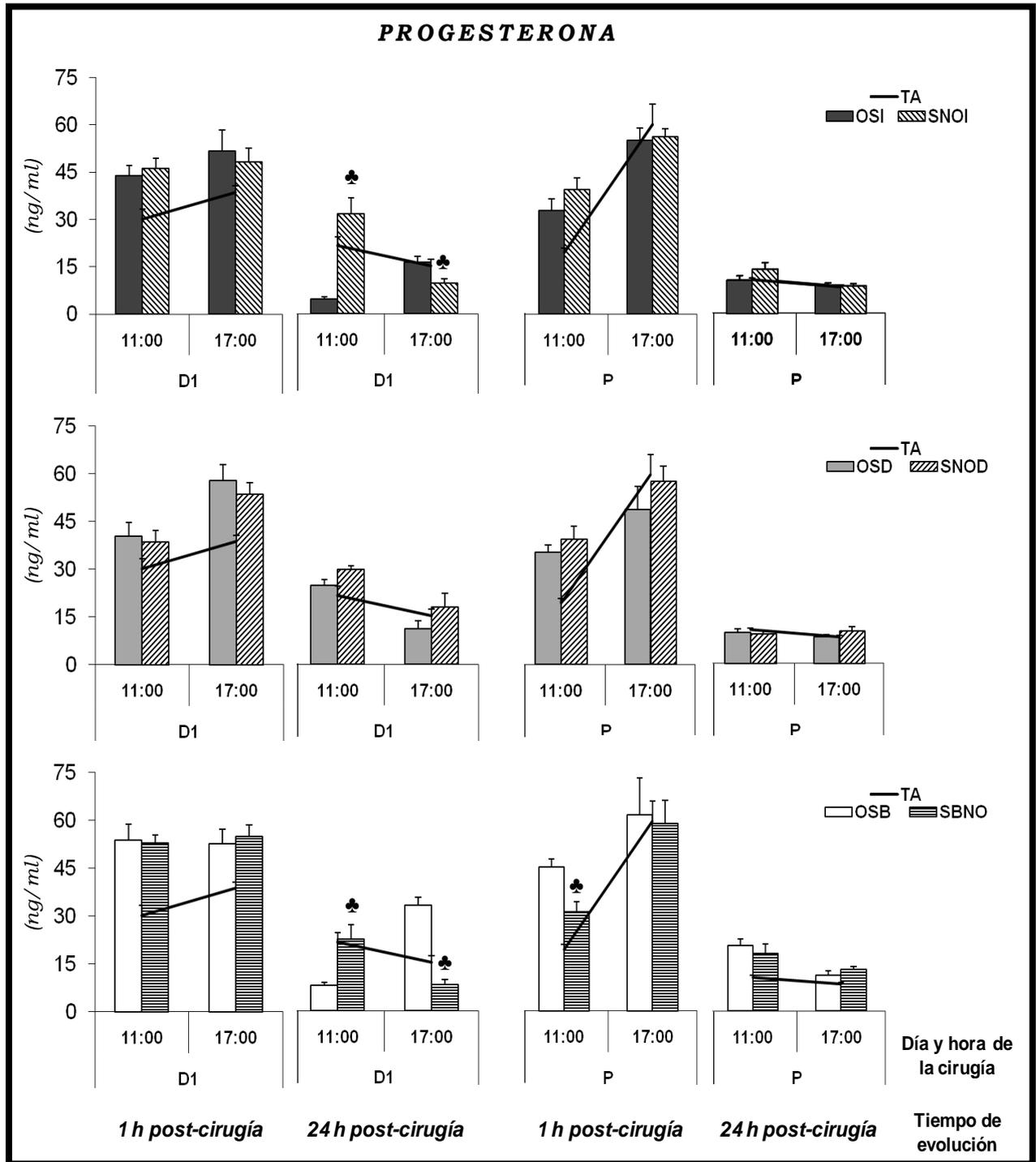


**Figura 14.** Media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados por los ovarios izquierdo (OI) y derecho (OD) de hembras testigo absoluto (TA), con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB), sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada a las 11:00 ó 17:00 h del proestro y sacrificadas 24 horas post-cirugía. ♣ $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo con OS (Prueba U de Mann-Whitney).

▪ **Concentración de P<sub>4</sub> en suero**

En los animales con SNOI o SBNO a las 11:00 h del D1, 24 h post-cirugía, la concentración de P<sub>4</sub> fue mayor que en las ratas con laparotomía, mientras que los mismos tratamientos realizados a las 17:00 h del D1, resultaron en menor concentración. La concentración de P<sub>4</sub> en las hembras con SNOD en el D1 o P fue similar al del grupo con OSD (**Figura 15**).

Con la SBNO a las 11:00 h del P, una hora después de la denervación, la concentración de P<sub>4</sub> fue menor que en los animales con operación simulada (**Figura 15**).

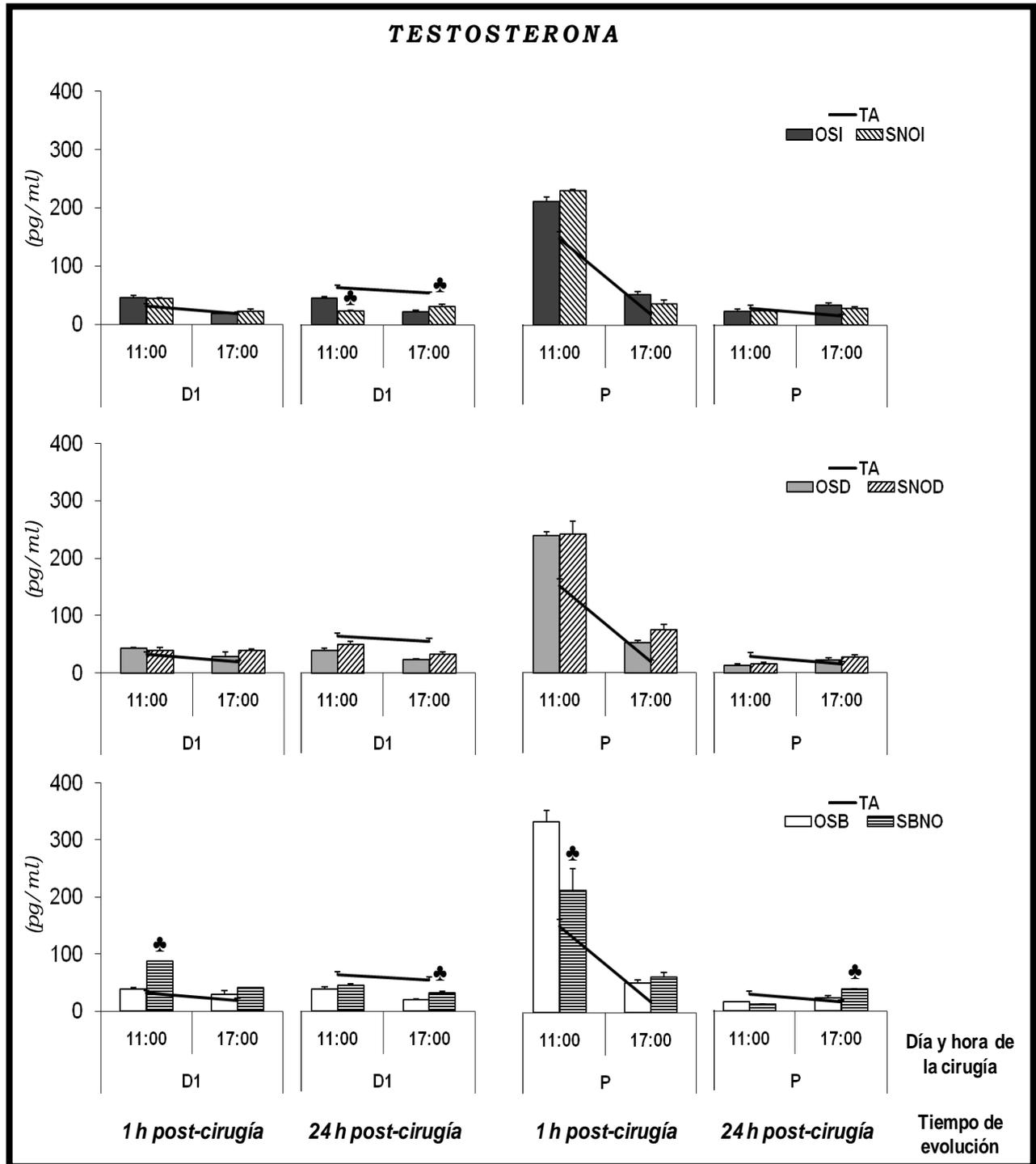


**Figura 15.** Media  $\pm$  e.e.m. de la **concentración sérica de progesterona** de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB), sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) realizada a las 11:00 ó 17:00 h del diestro 1 o proestro y sacrificadas 1 ó 24 horas post-cirugía. ♣ $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo con OS (Prueba “t” de Student).

▪ **Concentración de T en suero**

Veinticuatro horas después de la SNOI realizada a las 11:00 h del D1, la concentración de **T** fue menor que en el grupo con OSI ( $22.8 \pm 1.7$  vs.  $45.3 \pm 2.6$  pg/ml,  $p < 0.05$ ), mientras que cuando la sección se realizó a las 17:00 h, la concentración de la hormona fue mayor ( $31.4 \pm 3.6$  vs.  $22.9 \pm 1.8$  pg/ml,  $p < 0.05$ ). La concentración de T en los animales con SNOD en el D1 o P fue similar al del grupo con OSD (**Figura 16**).

Una hora después de la SBNO a las 11:00 h de D1, la concentración de **T** fue mayor que la OSB, hecho similar se observó en los animales con SBNO a las 17:00 h del D1 o P, sacrificados 24 horas post-tratamiento (D1:  $30.6 \pm 3.6$  vs.  $19.8 \pm 1.8$ ; P:  $37.1 \pm 1.6$  vs.  $22.1 \pm 4.1$  pg/ml,  $p < 0.05$ ). En los animales con SBNO a las 11:00 h del P, sacrificados una hora después de la denervación, la concentración de **T** fue menor que en las ratas con OSB (**Figura 16**).

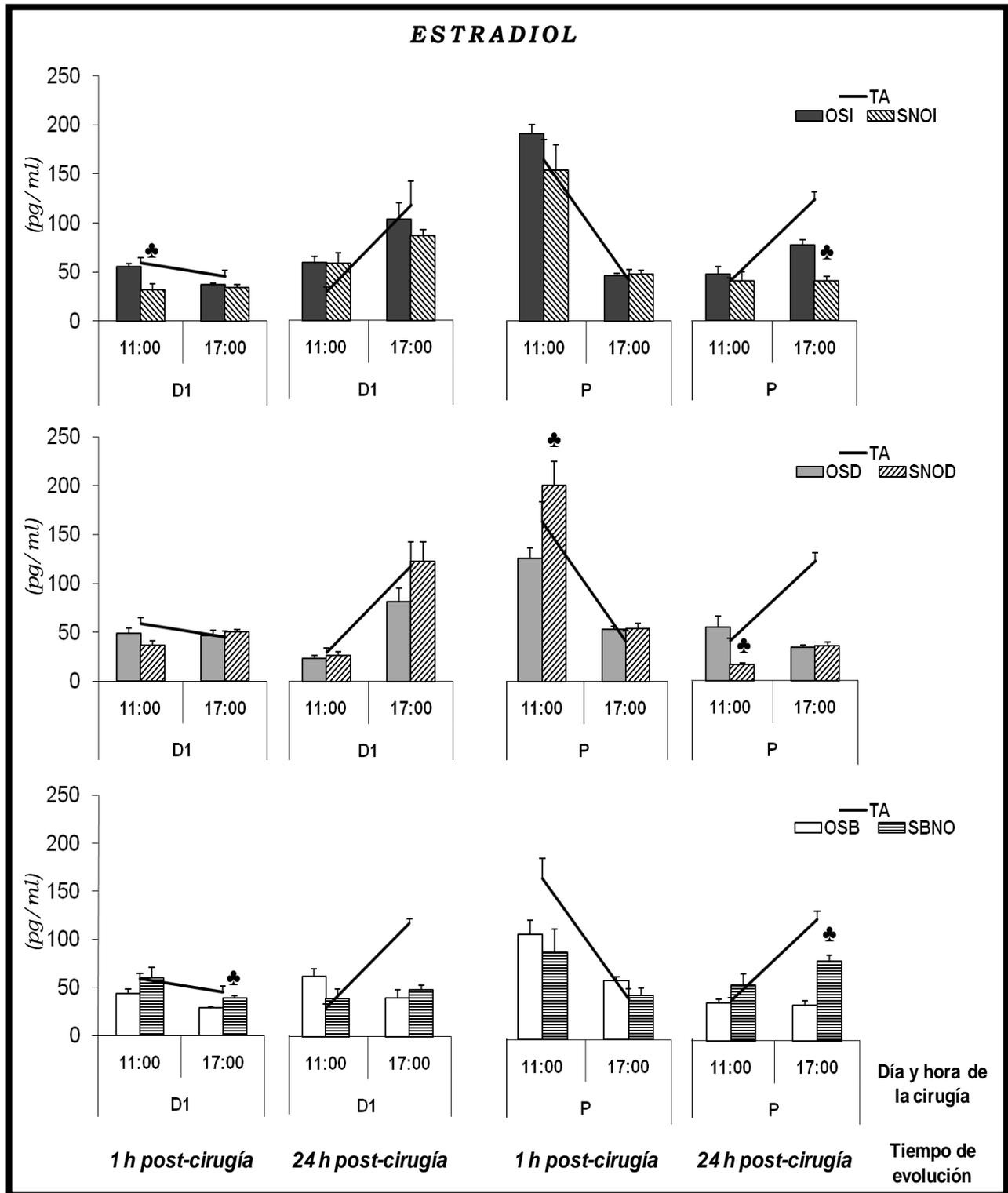


**Figura 16.** Media  $\pm$  e.e.m. de la **concentración sérica de testosterona** de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB), sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) realizada a las **11:00 ó 17:00 h del diestro 1 o proestro** y sacrificadas **1 ó 24 horas post-cirugía**. ♣ $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo con OS (Prueba “t” de Student).

▪ **Concentración de E<sub>2</sub> en suero**

Una o 24 horas después de la SNOI a las 11:00 h del D1 o 17:00 h del P, la concentración de E<sub>2</sub> fue menor que la OSI (**Figura 17**).

La SNOD a las 11:00 h del P, una hora después de la denervación, resultó en una mayor concentración de E<sub>2</sub>, mientras que a las 24 horas, la concentración fue menor que en los animales con laparotomía. Una o 24 horas después de la SBNO a las 17:00 h del D1o P, la concentración de E<sub>2</sub> fue mayor que en los animales de OSB (**Figura 17**).

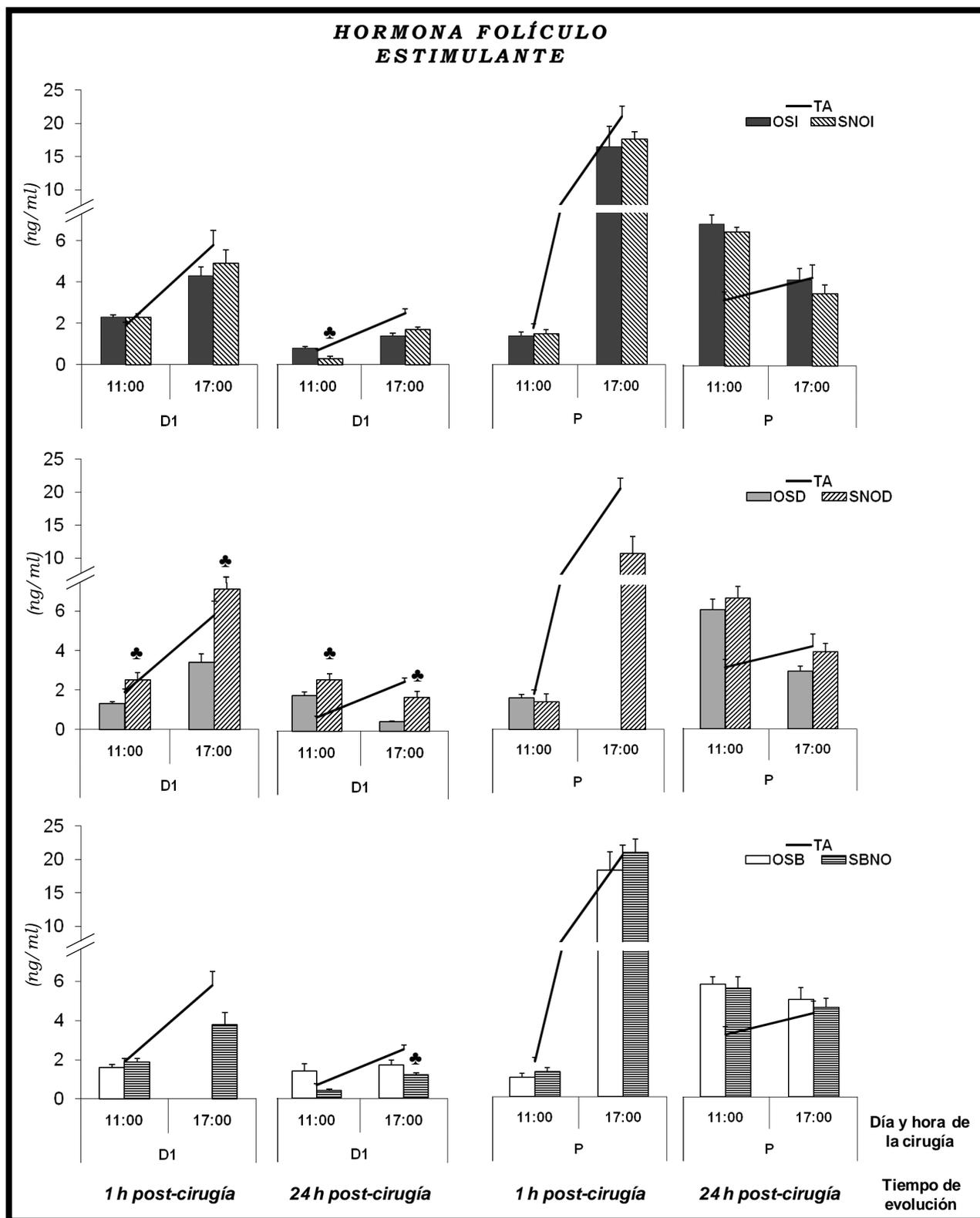


**Figura 17.** Media  $\pm$  e.e.m. de la **concentración sérica de estradiol** de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB), sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) realizada a las **11:00 ó 17:00 h del día 1 o proestro** y **sacrificadas 1 ó 24 horas post-cirugía**. ♣ $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo con OS (Prueba “t” de Student).

▪ **Concentración de la FSH en suero**

Veinticuatro horas después de la SNOI a las 11:00 h del D1, la concentración de **FSH** fue menor al del grupo con OSI (**Figura 18**).

Una o 24 horas después de la SNOD a las 11:00 ó 17:00 h del D1, la concentración de **FSH** fue mayor que en el grupo con OSD. La SBNO a las 17:00 h del D1, 24 horas post-denervación, resultó en una menor concentración de la hormona que en los animales con laparotomía (**Figura 18**).



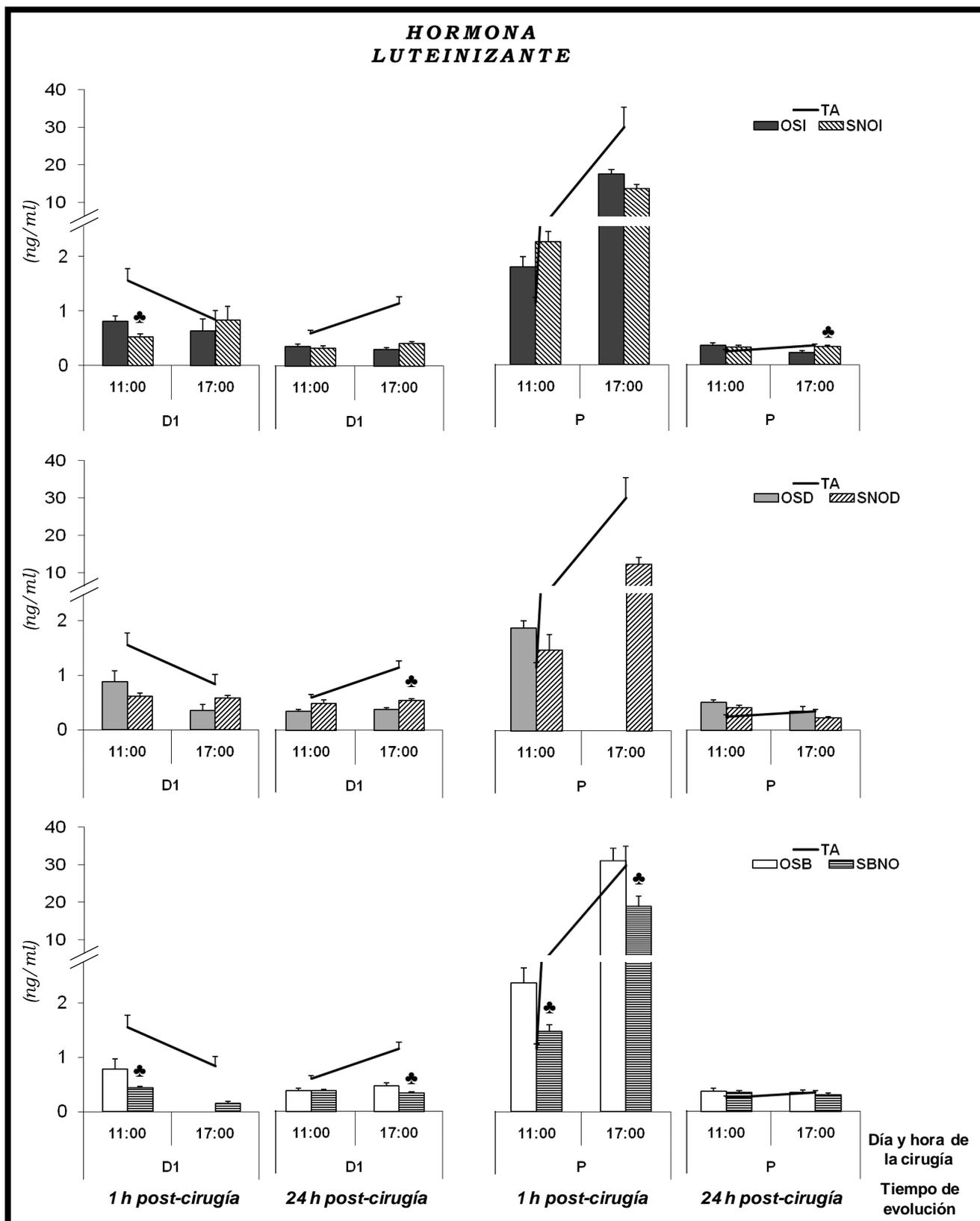
**Figura 18.** Media  $\pm$  e.e.m. de la **concentración sérica de FSH** de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB), sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) realizada a las **11:00 ó 17:00 h del diestro 1 o proestro** y **sacrificadas 1 ó 24 horas post-cirugía**. ♣ $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo con OS (Prueba “t” de Student).

▪ **Concentración de la LH en suero**

La concentración de **LH** en las ratas con SNOI a las 11:00 h del D1, una hora después de la cirugía, fue menor que en el grupo con laparotomía, mientras que la misma cirugía practicada a las 17:00 h del P, evaluada 24 horas post-denervación, la concentración de la hormona fue mayor (**Figura 19**).

En los animales con SNOD a las 17:00 h del D1, 24 horas después de la denervación, la concentración de LH fue mayor en comparación con la operación simulada (**Figura 19**).

Una hora después de la SBNO a las 11:00 h del D1 o P, la concentración de LH fue menor que en el grupo con OSB; hecho similar se observó en los animales con SBNO a las 17:00 h del D1 o P, sacrificados una o 24 horas después de la denervación (**Figura 19**).



**Figura 19.** Media  $\pm$  e.e.m. de la **concentración sérica de LH** de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB), sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO), realizada a las 11:00 ó 17:00 h del diestro 1 o proestro y sacrificadas 1 ó 24 h post-cirugía. ♣ $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo con OS (Prueba “t” de Student).

## RESUMEN DE RESULTADOS

### DIESTRO 1

Tiempo evolución	1 hora			24 horas			1 hora			24 horas		
Hora cirugía	11:00						17:00					
Grupo	SNOI	SNOD	SBNO	SNOI	SNOD	SBNO	SNOI	SNOD	SBNO	SNOI	SNOD	SBNO
P <sub>4</sub>	=	=	=	↑	=	↑	=	=	=	↓	=	↓
T	=	=	↑	↓	=	=	=	=	=	↑	=	↑
E <sub>2</sub>	↓	=	=	=	=	=	=	=	↑	=	=	=
FSH	=	↑	=	↓	↑	=	=	↑	-	=	↑	↓
LH	↓	=	↓	=	=	=	=	=	-	=	↑	↓

### PROESTRO

Tiempo evolución	1 hora			24 horas			1 hora			24 horas		
Hora cirugía	11:00						17:00					
Grupo	SNOI	SNOD	SBNO	SNOI	SNOD	SBNO	SNOI	SNOD	SBNO	SNOI	SNOD	SBNO
TAO	-	-	-	=	=	=	-	-	-	=	=	=
OVO	-	-	-	=	=	↓OI	-	-	-	=	↓OD	=
P <sub>4</sub>	=	=	↓	=	=	=	=	=	=	=	=	=
T	=	=	↓	=	=	=	=	=	=	=	=	↑
E <sub>2</sub>	=	↑	=	=	↓	=	=	=	=	↓	=	↑
FSH	=	=	=	=	=	=	=	-	=	=	=	=
LH	=	=	↓	=	=	=	=	-	↓	↑	=	=

Resumen de los efectos agudos y sub-agudos de la sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) comparados con su respectivo grupo de operación simulada (OS), realizada en ratas adultas a las 11:00 ó 17:00 horas del diestro 1 o proestro y autopsiadas 1 ó 24 horas post-cirugía, sobre el peso corporal (PC), la masa adrenal (MA), el peso del útero (U), la concentración sérica de progesterona (P<sub>4</sub>), testosterona (T), estradiol (E<sub>2</sub>), de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH). Donde los signos de igual (=) indican no diferencias, las flechas hacia abajo señalan disminuciones (↓) y las flechas hacia arriba señalan incrementos (↑) en los parámetros evaluados.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio a partir de la sección uni o bilateral del NOS, confirman que en la rata adulta la ovulación depende de la información simpática que transcurre por el NOS. Muestran que la secreción de P<sub>4</sub>, T, E<sub>2</sub> y FSH son moduladas por la inervación que llega por el NOS, la cual varía en función de la hora y del día del ciclo estral en que se realiza la denervación, y del tiempo transcurrido entre ésta y la autopsia.

En la rata adulta la perforación dorso-lateral de la pared abdominal, realizada a las 7:00 ó 13:00 h del P, no modifica la ovulación espontánea (Flores y col., 1990, 2005a), respuesta similar a la observada en el presente estudio.

Los resultados del presente estudio apoyan la hipótesis de que la perforación de la pared abdominal se traduce en cambios en las concentraciones séricas de las hormonas ováricas, las que dependen del día del ciclo estral en que se realiza la cirugía, tal y como ha sido mostrado por otros (Barco y col., 2003; Flores y col., 2005b, 2006; Cruz y col., 2006). También muestran que los cambios en las concentraciones hormonales dependen no sólo del día del ciclo estral en que se tratan a los animales, sino también de la hora del día en que se realizan las cirugías. Este hecho nos lleva a proponer que existen cambios en la sensibilidad, la respuesta o ambas del sistema de regulación, quizás vinculados con un ritmo circádico de los mecanismos de regulación. Según Uchida y colaboradores (2005) la estimulación mecánica de la piel del abdomen resulta en un incremento en la actividad del plexo ovárico izquierdo, por lo que concluyen que existe una comunicación nerviosa entre la pared abdominal y los nervios que llegan al ovario. Los cambios en las concentraciones hormonales observadas en los animales sometidos a laparotomía, podrían ser explicadas por la estimulación de una vía nerviosa multisináptica que desde la pared abdominal envía información a través del NOS y del plexo ovárico al ovario, a las adrenales por la inervación que se origina en el ganglio celíaco-

mesentérico superior (Morán y col., 2005), al sistema nervioso central quizás por el nervio vago, tal y como ha sido propuesto (Barco y col., 2003; Flores y col., 2005b, 2006; Cruz y col., 2006).

El aumento en la concentración de  $P_4$  en los animales con operación simulada se ha atribuido al estrés inducido por la laparotomía y que dicho aumento depende de la actividad de las adrenales (Flores y col., 2005b, 2008). Dado que los efectos de la operación simulada sobre la secreción de  $P_4$  dependen del lado donde se realiza la cirugía, de la etapa del ciclo estral, de la hora del día, así como del tiempo de evolución, sugerimos que secreción de  $P_4$  por las adrenales presenta un ritmo circádico tal y como se describe para la secreción de corticosterona (Guyton y Hall, 2001; Yen y col., 2001).

La laparotomía unilateral practicada en el D1 no modificó la secreción de  $E_2$ , mientras que la laparotomía bilateral resultó en una menor concentración de la hormona. Al parecer el día del P es más sensible a la incisión de la pared abdominal ya que cuando ésta se practica a las 17:00 h disminuye la concentración de  $E_2$ , 24 h post-cirugía, similar a lo que ocurre cuando la laparotomía se realiza a las 13:00 h del P y se sacrifican 1 h después (Cruz y col., 2006). Estos resultados apoyan parcialmente la interpretación del grupo de Cruz (2006), quienes sugieren que la modificación de la información neural procedente de la pared abdominal, inhibe los mecanismos que regulan la actividad de la aromatasa en el folículo ovárico.

El estrés quirúrgico ocasiona cambios en el sistema endocrino y la activación del sistema nervioso simpático como resultado de alteraciones en la función de centros hipotalámicos que controlan las funciones de la hipófisis anterior (Armstrong, 1986; Desborough, 2000). El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal es activado por cualquier factor estresante, lo cual resulta en un efecto inhibitorio en el sistema reproductivo de la hembra (Chrousos y col., 1998). El incremento en la secreción de glucocorticoides inhibe la de GnRH por el hipotálamo y disminuye la secreción de gonadotropinas hipofisarias (Armstrong, 1986; Chrousos y col., 1998).

Esto explicaría el porqué en el presente estudio, el estrés quirúrgico ocasionado por la operación simulada en la mañana o tarde del D1, disminuye la concentración de LH y FSH. Sin embargo, en la mañana o tarde del P, el mismo tipo de estrés resultó en el aumento de la concentración de ambas gonadotropinas, lo cual indica que los cambios en la respuesta del sistema hipotálamo-hipófisis-ovario al estrés no sólo dependen del aumento de la concentración de corticosteroides, sino que otros factores nerviosos, humorales o ambos, modulan la capacidad de respuesta del sistema.

El incremento del peso de los ovarios observado por la sección uni o bilateral del NOS puede ser explicado por la hiperemia que experimenta la gónada, tal y como ya fue sugerido (Chávez y col., 1994), efecto que no se observa si ha transcurrido varios días después de la denervación (Aguado y Ojeda, 1984a; Selstam y col., 1985; Chávez y col., 1991; Forneris y Aguado, 2002). El útero recibe inervación que transcurre por el NOS (Lawrence y Burden, 1980). Por ello, los aumentos y disminuciones del peso del útero en respuesta a la SNOI o SBNO pueden ser explicados por los cambios vasculares del órgano (disminución o acumulación de sangre). La inervación simpática del útero es abundante en la zona vascular que se encuentra entre las capas de músculo circular y liso (Zoubina y col., 1998). Sin embargo, dado que la SNOD no modificó el peso del útero, proponemos que hay un componente nervioso que actúa por medios no vasculares en la regulación del peso del útero.

En la rata prepúber la SBNO no modifica la cuota ovulatoria, lo que llevó a sugerir que la información que transcurre por el NOS no participa en el proceso que culmina con la ovulación (Aguado y Ojeda 1984a; Selstam y col 1985; Morales y col 1993). En el presente estudio, el número de ovocitos liberados por los animales con SBNO realizada a las 11:00 del P (sacrificados a las 24 h) no se puede explicar por la pequeña disminución de la concentración de LH observada. Según Everett (1989) y Gosden (1976) la cantidad de LH que se libera en la tarde del P es mucho

mayor que la necesaria para inducir la ovulación, por lo que la inervación que llega al ovario por el NOS modularía la respuesta de los folículos a la acción de las gonadotropinas (Domínguez y col., 2003). El hecho de que el mismo tratamiento a las 17:00 h del P no modifique la cuota ovulatoria indica que la señal nerviosa debe llegar al ovario antes de esta hora.

El efecto crónico de la sección unilateral del NOS en la rata prepúber o adulta, resulta en una disminución de la respuesta ovulatoria por parte del ovario denervado, lo que indica que el NOS modula de manera estimulante la ovulación (Chávez y col., 1991; Morales y col 1993). Dado que la sección unilateral del NOS en el día del P no afecta la ovulación espontánea por el ovario denervado, sugerimos que los resultados observados por Chávez y col. (1991) y Morales y col (1993) son el resultado de la adaptación del sistema de regulación a la falta crónica de información del ovario denervado hacia los centros hipotalámicos. Según Morán y col. (2010), el NOS lleva información desde el ovario hacia el ganglio celíaco-mesentérico superior y fibras del nervio vago hacen sinapsis en dicho ganglio, lo cual apoya nuestra proposición.

En conjunto con lo observado por Velasco y col. (2010), sugerimos que en períodos sub-agudos el NOS-izquierdo no parece ser fundamental en la ovulación, mientras que el NOS-derecho se encuentra más comprometido en la regulación de dicho proceso.

Con base en nuestros resultado proponemos que en el día del D1, la información neural que transcurre por el NOS-derecho no es fundamental en la regulación de la secreción de  $P_4$  mientras que el papel del NOS-izquierdo está en función de la hora del día, por la mañana la modula de manera inhibitoria y por la tarde es estimulante. El papel del NOS-izquierdo se mantiene aún cuando se seccionan ambos nervios.

En la rata adulta, la sección bilateral del NOS realizada a las 11:00 ó 16:00 h del P, disminuye la concentración de  $P_4$  a partir de los 4' y se mantiene hasta los 24' (Aguado y Ojeda, 1984b). En el presente estudio la sección bilateral realizada a las 11:00 del P resultó en una menor concentración de la hormona a la hora, la cual se recupera 24 h más tarde, en tanto que la sección unilateral no la modifica en ninguno de los dos tiempos evaluados. A partir de estos resultados sugerimos que en el día del P existen otras vías nerviosas que estimulan la secreción de progesterona ovárica a la falta de la información simpática, mientras que en los animales con sección unilateral, basta la integridad de uno de los nervios para regular la secreción de la hormona. En apoyo a esta interpretación Forneris y Aguado (2002) mostraron que la sección bilateral del NOS en la rata neonata no modifica la actividad de la  $3\beta$ -HSD (enzima implicada en la síntesis de  $P_4$ ) en el cuerpo lúteo ni la concentración sérica de  $P_4$ , 56 días después de la denervación. Al parecer la actividad de la enzima limitante en la síntesis de  $P_4$  depende más de la información parasimpática aportada por el nervio vago, ya que en la rata preñada la sección bilateral de éste nervio resulta en un decremento de la actividad en la  $\Delta^5$ - $3\beta$ -HSD en glándula intersticial y cuerpo lúteo (Burden y Lawrence, 1977b).

En la rata adulta los ovarios son la principal fuente de testosterona en el día del D2, P o E, dado que la ovariectomía resulta en un decremento de la concentración sérica de T (Barco y col., 2003; Flores y col., 2006, 2008). En el cultivo de células teco-intersticiales, las catecolaminas amplifican la acción de la hCG, lo que resulta en un incremento en la síntesis de andrógenos (androstenediona y testosterona), por lo que se sugiere que la función de las células teco-intersticiales puede ser modulada por cambios en el tono neural (Dyer y Erickson, 1985). Las células de la teca reciben inervación proveniente del NOS y la sección de este nervio provoca hipertrofia de las células tecales (Forneris y Aguado, 2002; Doganay y col., 2009) que se acompaña por un incremento en la actividad secretora, lo que resulta en aumento en la concentración de androstenediona (Forneris y Aguado, 2002). En el presente estudio se muestra que la regulación de la secreción de T por

el NOS varía durante el ciclo estral y la hora del día (estimulante en la mañana del D1 e inhibitoria por la tarde).

En la rata de 16 días de edad, el NOS izquierdo o derecho modulan de manera inhibitoria la secreción de  $E_2$  cuando el animal se aproxima a la pubertad (Morán y col., 2000). En la rata adulta la sección unilateral del NOS practicada a las 13:00 del D1 ó P no modifica la concentración de la hormona una hora post-denervación (Flores y col., 2007), similar a lo que se observado en nuestros animales operados en el D1. Sin embargo difieren a lo encontrado en el día del P, donde en la mañana del P el NOS-derecho inicialmente inhibe la secreción de  $E_2$  y después lo hace de forma estimulante. La eliminación de la información nerviosa aportada por el NOS-izquierdo no modifica la secreción de  $E_2$  a la hora, sin embargo la modula de manera estimulante después de 24 horas. Con estas evidencias sugerimos que la secreción de  $E_2$  es modulada por el NOS de manera asimétrica, que depende de la hora del día, del tiempo de evolución y de la etapa del ciclo estral.

Aguado y Ojeda (1984a) sugieren que en el día del P el NOS modula de manera estimulante la secreción de  $E_2$ , ya que la SBNO resulta en una disminución de la concentración de la hormona desde los 4 hasta los 24'. Sin embargo, parece que la participación del nervio depende del tiempo transcurrido entre la cirugía y la autopsia, dado que cuando se evaluó 30' ó 4.5 h después de la denervación no se modificó la concentración de  $E_2$  (Erskine y Weaver 1988). Nuestros resultados muestran que en el modelo del animal con SBNO realizada a las 17:00 del P, el NOS modula de manera inhibitoria la secreción de la hormona, sólo cuando se ha dejado transcurrir 24 horas. Resultados similares se observan cuando la denervación se realiza a los dos días de edad y se evalúa a los 30 ó 90 días de edad (Zhang y col., 2010).

El nervio vago regula la capacidad esteroidogénica del ovario (Ojeda y col., 1983; Morales y col., 2007). A nivel del ganglio celiaco se localizan los somas de

las fibras del NOS y fibras provenientes del nervio vago (Berthoud y Powley, 1996), de manera que el sistema colinérgico podría modular la actividad simpática post-ganglionar y la capacidad secretora de los ovarios a través del NOS (Cruz y col., 2006). La estimulación del ganglio celiaco con acetilcolina incrementa la secreción de E<sub>2</sub> durante el ciclo estral (Delgado y col. 2010).

En el presente estudio los efectos de la denervación simpática varían con el día del ciclo estral, por lo que proponemos la existencia de una asimetría en la conexión neural entre los ovarios y el complejo ganglio celiaco-mesentérico superior, donde el número de conexiones activas va cambiando a lo largo del ciclo estral (Morán y col., 2005).

Según Forneris y Aguado (2002) en la rata de 4 días de edad, el NOS modula de manera estimulante la secreción de FSH desde los 26 hasta los 56 días después de la denervación. Nuestros resultados muestran a las 17:00 h del D1, el NOS derecho inhibiría la secreción de FSH ya que su sección resultó en una mayor concentración de la hormona.

Se ha mostrado que la SBNO en el animal neonato (Forneris y Aguado, 2002) o juvenil (Aguado y Ojeda, 1984a) no modifica la concentración de LH, cuando los efectos se evalúan de los 7 hasta los 56 días post-denervación. Estos resultados difieren cuando los efectos son analizados en períodos muy cortos de tiempo (30´ hasta las 72 horas) donde la modulación que ejercen ambos nervios sobre la secreción de LH es estimulante (Morales y col., 2008). Cuando en la rata adulta evaluamos la participación del NOS en tiempos agudos o sub-agudos (una a 24 horas) se mantiene el efecto estimulante sobre la secreción de LH.

Las variaciones en la secreción de LH podrían ser explicados a partir de los cambios en la secreción de esteroides ováricos, los cuales podrían estar actuando de manera indirecta sobre aquellas áreas hipotalámicas que se encargan de regular la secreción de gonadotropinas. En apoyo a esta idea se sabe que la administración de

$E_2$  o  $P_4$  en la rata ovariectomizada reduce la liberación de NA en el area preóptica del hipotálamo a los 60' post-tratamiento y con ello la secreción de LH (Helena y col., 2009). La administración intracerebroventricular de NA 15' antes del tratamiento con los esteroides, previene la inhibición en la liberación de LH provocado por las hormonas ováricas (Helena y col., 2009). Con base en estas evidencias se podría explicar parcialmente algunos de los efectos obtenidos en el presente estudio, ya que los cambios en gonadotropinas no siempre coinciden con las modificaciones en la concentración de hormonas esteroides ováricas. Otra explicación podría ser una alteración en la secreción de corticosterona que pudiera inhibir la secreción de LH.

Tomados en conjunto, los resultados del presente estudio muestran que en la rata adulta la información nerviosa que transcurre por el NOS y que llega al ovario, modula de manera asimétrica la secreción de hormonas esteroides ováricas, dicha asimetría depende de la etapa del ciclo estral, de la hora del día en que se realizan las cirugías y del tiempo de evolución. Por tanto, el ritmo de secreción ovárico es modulado por la información que llega por el NOS, el cual parece estar en función del fotoperiodo.

## CONCLUSIONES

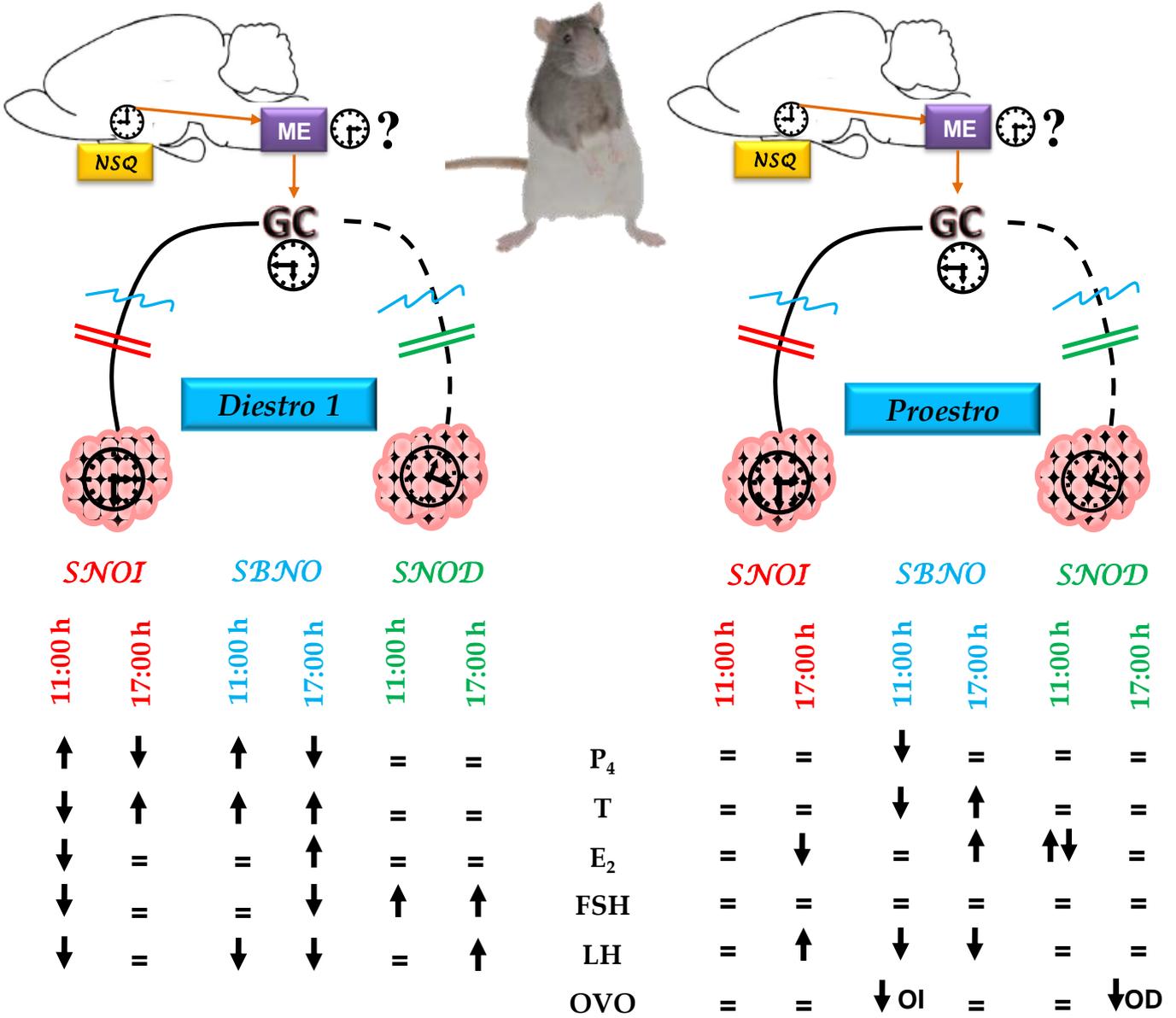
- ✓ La operación simulada no modifica la cuota ovulatoria. Las variaciones en la concentración de  $P_4$ , T y  $E_2$  dependen de la hora del día, del tiempo de evolución y del día del ciclo estral en que se realizó la laparotomía.
- ✓ Las variaciones en la concentración en suero de gonadotropinas en respuesta a la operación simulada, dependió del día del ciclo y de la hora en la que se realizó la laparotomía y del tiempo de evolución.
- ✓ El NOS-izquierdo estimula la ovulación en la mañana del P, mientras que NOS-derecho la estimula por la tarde.
- ✓ En la rata adulta en D1, la información nerviosa que transcurre por el NOS-derecho no es fundamental en la regulación de la secreción de  $P_4$ , mientras que la participación del NOS-izquierdo está en función de la hora del día. En el día del P, la secreción de  $P_4$  no depende de la integridad de la información simpática.
- ✓ En el D1, el NOS-izquierdo regula la secreción de T dependiendo de la hora del día en que se efectuó la denervación. Mientras que en el día del P, la falta de la información que es aportada por ambos nervios ováricos depende la hora del día y del tiempo de evolución.

- ✓ En la rata adulta, la participación del NOS en la secreción de E<sub>2</sub> es asimétrica y varía en función de la hora del día, del tiempo de evolución y de la etapa del ciclo estral.
  
- ✓ En el D1, el NOS-derecho inhibe la secreción de FSH y el NOS-izquierdo estimula la secreción de la hormona por la mañana. Mientras que en el día del P no se requiere la información que transcurre por el NOS en la regulación de la secreción de FSH.
  
- ✓ La regulación de la secreción de LH por el NOS es estimulante y depende de la hora y la etapa del ciclo estral en que se realiza la denervación y del tiempo transcurrido entre ésta y la autopsia.
  
- ✓ El ritmo de secreción ovárico es modulado por la información que llega por el NOS, el cual parece estar en función del fotoperiodo.

# ABREVIATURAS

<b>AMPC</b>	<b>Monofosfato de adenosina cíclico</b>
<b>DHEA</b>	<b>Dehidroepiandrosterona</b>
<b>D1</b>	<b>Diestro 1</b>
<b>D2</b>	<b>Diestro 2</b>
<b>E</b>	<b>Estro</b>
<b>E<sub>2</sub></b>	<b>Estradiol</b>
<b>FSH</b>	<b>Hormona folículo estimulante</b>
<b>GnRH</b>	<b>Hormona liberadora de gonadotropinas</b>
<b>LH</b>	<b>Hormona luteinizante</b>
<b>NA</b>	<b>Noradrenalina</b>
<b>NOS</b>	<b>Nervio ovárico superior</b>
<b>NSQ</b>	<b>Núcleo supraquiasmático</b>
<b>OSB</b>	<b>Operación simulada bilateral</b>
<b>OSD</b>	<b>Operación simulada derecha</b>
<b>OSI</b>	<b>Operación simulada izquierda</b>
<b>P</b>	<b>Proestro</b>
<b>P<sub>4</sub></b>	<b>Progesterona</b>
<b>P450<sub>arom</sub></b>	<b>Citocromo P450 aromatasa</b>
<b>PO</b>	<b>Plexo ovárico</b>
<b>SBNO</b>	<b>Sección bilateral del nervio ovárico superior</b>
<b>SNC</b>	<b>Sistema nervioso central</b>
<b>SNOD</b>	<b>Sección del nervio ovárico superior derecho</b>
<b>SNOI</b>	<b>Sección del nervio ovárico superior izquierdo</b>
<b>T</b>	<b>Testosterona</b>
<b>TA</b>	<b>Testigo absoluto</b>
<b>TAO</b>	<b>Tasa de animales ovulantes</b>

# MODELO



**Figura 20.** En este modelo se resumen los efectos de la sección del nervio ovárico superior (NOS) izquierdo (SNOI-en rojo), derecho (SNOD-en verde) o bilateral (SBNO-en azul) realizada en la rata adulta a las 11:00 ó 17:00 horas del diestro 1 o proestro y evaluados 1 ó 24 horas post-denervación, sobre la concentración de progesterona ( $P_4$ ), testosterona (T), estradiol ( $E_2$ ), de la hormona folículo estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH) en suero y el número de ovocitos liberados (OVO). Las flechas indican disminuciones o aumentos en los parámetros evaluados y los signos de igual indican que no se presentaron cambios significativos. Como observamos en el modelo, las diferencias en las concentraciones hormonales en dos horas diferentes del día, sugiere que la información nerviosa que llega a los ovarios a través del NOS ésta regulando su actividad rítmica, la cual parece estar en función del fotoperiodo. Ésta información nerviosa simpática es asimétrica, varía durante el ciclo estral y de la hora del día. Por lo que una posible vía de comunicación entre el reloj maestro y los relojes periféricos de los ovarios pudiera darse de la siguiente manera: alguna señal rítmica hormonal o nerviosa que proviene del reloj biológico maestro en el núcleo supraquiasmático (NSQ) llega a la medula espinal (ME), donde se origina las neuronas pre-ganglionares del sistema nervioso simpático y hacen sinapsis con las neuronas post-ganglionares localizadas a nivel del complejo ganglio celiaco (GC)-mesentérico superior, de donde surge el NOS y llega hasta los ovarios para transmitir la información rítmica.

## **P E R S P E C T I V A S**

- Evaluar en la rata adulta en cada día del ciclo estral y en diferentes horas de la fase de iluminación y de oscuridad, los efectos de la sección del NOS sobre la concentración de noradrenalina ovárica y de corticosterona en suero.
  
- Evaluar la concentración de hormonas esteroides y gonadotropinas en suero, utilizando el mismo modelo experimental con denervación simpática en cada día del ciclo estral y en diferentes horas de la fase de oscuridad,
  
- Analizar la participación de la inervación parasimpática proveniente del nervio vago en el animal con sección del NOS en cada día del ciclo estral y en función del fotoperiodo sobre la concentración de hormonas esteroides, corticosterona y gonadotropinas.
  
- Estudiar en la rata adulta la modulación de la inervación intrínseca del ovario a diferentes horas del día sobre la respuesta ovulatoria y capacidad secretora del ovario.

## BIBLIOGRAFÍA

- ◆ Adashi EY (1991) The ovarian life cycle. En: Reproductive Endocrinology. Yen SSC y Jaffe RB (Eds.). Saunders, Philadelphia. pp.181-237.
- ◆ Adashi EY y Hsueh AJW (1981) Stimulation of  $\beta_2$ -adrenergic responsiveness by follicle-stimulating hormona in rat granulosa cells *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology* 108: 2170-2178.
- ◆ Aguado LI (2002) Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microsc Res Tech.* 59:462-473.
- ◆ Aguado LI y Ojeda SR (1984a) Prepuberal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. Role of nodrenergic innervation. *Endocrinology*. 114 (5):1845-1853.
- ◆ Aguado LI y Ojeda SR (1984b) Ovarian adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion. *Endocrinology*. 114 (5):1944-1946.
- ◆ Aguado LI, Petrovic SL y Ojeda SR (1982) Ovarian  $\beta_2$ -adrenergic receptors during the onset of puberty: Characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology* 110: 1124-1132.
- ◆ Aguilar-Roblero R, Mercado C, Guadarrama P y Chávez JL (2004) Fisiología celular y molecular. Principios y conceptos. Hernández ME y Ortega A (Eds.). Universidad Veracruzana. pp. 181-192.
- ◆ Andrews WW y Ojeda SR (1981) A detailed analysis of the serum luteinizing hormone secretory profile in conscious, free-moving female rats during the time of puberty. *Endocrinology*. 109(6): 2032-2039.
- ◆ Antle MC y Silver R (2005) Orchestrating time: Arrangements of the brain circadian clock. *Trends Neurosci.* 28:145-151.
- ◆ Armstrong DT (1986) Enviromental stress and ovarian function. *Biol Rep* 34: 29-39.
- ◆ Aschoff JA (1981). Survey in biological rhytms. En: Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol. 4. Biological Rhytms. Aschoff J (Ed.). Plenum Press. New York. 3-10.

- ◆ Baljet B y Drukker J (1980) The extrinsic innervation of pelvic organ in the female rat. *Acta Anat.* 107:241-267.
- ◆ Balsalobre A (2002) Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res.* 309: 193-199.
- ◆ Balsalobre A, Damiola F y Schibler U (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell.* 93 (6):929-937.
- ◆ Barbacka-Surowiak G, Surowiak J y Stoklosowa S (2003) The involvement of the suprachiasmatic nuclei in the regulation of estrous cycles in rodents. *Reprod. Biol.* 3(2):99-129.
- ◆ Barco AI, Flores A, Chavira R, Damián-Matsumura P, Domínguez R y Cruz ME (2003) Asymmetric effects of acute hemiovariectomy on steroid hormone secretion by the *in situ* ovary. *Endocrine.* 21(3):209-215.
- ◆ Baynes JW y Dominiczak MH (2006) *Bioquímica Médica.* 2ª ed. Elsevier. España. pp. 213-224.
- ◆ Berg JM, Stryer L, Tymoczko J, Macarulla JM. (2008) *Bioquímica.* 6ª ed. Reverte. España. pp. 750-755.
- ◆ Berne RM, Levy M y Harcourt B (1999) *Fisiología.* 2ª ed. Elsevier. España. pp. 697-701.
- ◆ Berthoud HR y Powley TL (1996) Interaction between parasympathetic and sympathetic nerves in prevertebral ganglia morphological evidence for vagal efferent innervation of ganglion cells in the rat. *Micros Res Tech.* 35: 80-86.
- ◆ Buchanan GF y Gillette MU (2005) New light on an old paradox: side-dependent effects of carbachol on circadian rhythms. *Exp Neurol.* 193(2):489-496.
- ◆ Buijs RM, La Fleur SE, Wortel J, Van Heyningen C, Zuiddam L, Mettenleiter TC, Kalsbeek A, Nagai K y Nijima A (2003) Suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *J Comp Neurol.* 464: 36-48.
- ◆ Buijs RM y Kalsbeek A (2001) Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci.* 2: 521-526.

- ◆ Burden HW (1978) Ovarian innervations. En: The vertebrate ovary: comparative biology and evolution. Jones RE (Ed.). Plenum Press. pp. 615-638.
- ◆ Burden WH (1985) The adrenergic innervation of mammalian ovaries. En: Catecholamines as hormone regulators. Ben-Jonathan N, Bahr JM y Weiner RI (Eds.). Raven Press. New York. pp. 261-278.
- ◆ Burden HW y Lawrence IE (1977a) The effect of denervation on compensatory ovarian hypertrophy. *Neuroendocrinology*. 23:368-378.
- ◆ Burden HW y Lawrence IE (1977b) The effects of denervation on the localization of  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the rat ovary during pregnancy. *Acta Anat.* 97:286-290.
- ◆ Burden HW, Leonard M, Smith CP y Lawrence I (1983) The sensory innervations of the ovary: A horse-radish peroxidase study in the rat. *Anat. Rec.* 207:623-627.
- ◆ Campos AE, Moreno LA y Mendoza N (2008) Cronofarmacología: variaciones temporales en la respuesta a los medicamentos. *Rev Fac Med. UNAM* (51)2:70-74.
- ◆ Clancy AN, Whitman C, Michael RP y Albers HE (1994) Distribution of androgen receptor-like immunoreactivity in the brains of intact and castrated male hamsters. *Brain Res Bull.* 33(3):325-332.
- ◆ Clarkson J y Herbison AE (2006) Development of GABA and glutamate signaling at the GnRH neurin in relation to puberty. *Moll Cell Endocrinol.* 25: 32-38.
- ◆ Constanzo LS (2000) Fisiología. McGraw-Hill Interamericana. México. pp. 432-446.
- ◆ Coon PM (1994) The molecular mechanism of gonadotrophin-releasin hormone action in the pituitary. En The physiology of reproduction. 2a ed. Knobil E and Neill JD (Eds.). Raven Press. New York.
- ◆ Cruz ME, Chávez r, Rosas P, Lujambic VM, Morán JL y Domínguez R (1990) Diurnal changes in hypothalamic acetylcholinesterase activity during the oestrus cycle of the rat. *Med Sci Res.* 18: 137-138.

- ◆ Cruz ME, Flores A, Palafox MI, Melendez G, Rodriguez JO, 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. *Rep Biol Endocr.* 4(43): 1-8.
  
- ◆ Chávez R, Carrizosa L y Dominguez R (1991) Effects of superior ovarian nerve section on spontaneous and induced ovulation in adult rats. *Med Sci Res.* 19:41-42.
  
- ◆ Chávez R y Domínguez R (1994) Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of compensatory ovarian hypertrophy: the effects of its section performed on each day of the oestrous cycle. *J Endocr.* 140: 197-201.
  
- ◆ Chávez R, Morales L, González ME y Domínguez R (1994) Ovarian norepinephrine content in prepuberal rats with superior ovarian nerve section: temporal studies. *Med Sci Res* 22: 789-790.
  
- ◆ Chrousos GP, Torpy DJ y Gold PW (1998) Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann Intern Med* 129: 229-240.
  
- ◆ D'Albora H, Anesetti G, Lombide P, Dess W y Ojeda SR (2002) Intrinsic neurons in the mammalian ovary. *Micr Res Tech.* 59:484-489.
  
- ◆ Davoren JB y Hsueh AJW (1985) Vasoactive intestinal peptide: A novel stimulator of steroidogenesis by cultured rat granulosa cells. *Biol Reprod* 33: 37-52.
  
- ◆ De Bortoli MA, Garraza MH y Aguado LI (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 MA, Garraza MH y Aguado LI (2000) Epinephrine intracerebroventricular stimulation modifies the LH effects on ovarian progesterone and androstenedione release. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 74: 19-24.
  
- ◆ Dees WL, Ahmed C y Ojeda SR (1986) Substance P and vasoactive intestinal peptide containing fibers reach the ovary by independent routes. *Endocrinology.* 119: 638-641.

- ◆ Dees WL, Hiney JK, Shultea TD, Mayherhofer A, Danilchik M, Diseen GA, y Ojeda SR (1995) The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuronlike cells expressing nerve growth factor receptors. *Endocrinology*. 136: 5760-5768.
- ◆ De la Iglesia HO, Blaustein JD y Bittman EL (1999) Oestrogen receptor- $\alpha$ -immunoreactive neurones project to the suprachiasmatic nucleus of the female Syrian hamster. *J Neuroendocrinol*. 11: 481-490.
- ◆ De la Iglesia HO, Meyer J, Carpino AJr, Schwartz WJ (2000) Antiphase oscillation of the left and right suprachiasmatic nuclei. *Science* 290(5492):799-801.
- ◆ De la Iglesia HO, Meyer J y Schwartz WJ (2003) Lateralization of circadian pacemaker output: activation of left-and right-sided luteinizing hormone-releasing hormone neurons involves a neural rather than a humoral pathway. *J Neurosci*. 23 (19): 7412-7414.
- ◆ Delgado M, Casais M, Sosa Z y Rastrilla A (2006) Ganglionic adrenergic action modulates ovarian steroid and nitric oxide in prepubertal rat. *J Endocr*. 53:547-554.
- ◆ Delgado SM, Escudero CG, Casais M, Gordillo M, Anzulovich AC, Sosa Z y Rastrilla AM (2010) Ovaric physiology in the first oestral cycle: influence of noradrenergic and cholinergic neural stimuli from coelic ganglion. *Steroids*. 75:6585-694.
- ◆ Delgado M, Sosa Z, Dominguez N, Casais M, Aguado L y Rastrilla AM (2004) Effect of the relation between neural cholinergic action and nitic oxide on ovarian steroidogenesis in prepubertal rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 91: 139-145.
- ◆ Desborough JP (2000) The stress response to trauma and surgery. *Br J Anaesth* 85:109-117.
- ◆ Dissen GA y Ojeda SR (1999) Ovarian innervation. En: Encyclopedia of Reproduction. Knobil E y Neill JD (Eds.). Vol. 3. Academic Press. USA. Pp. 583-589.
- ◆ Dolatshad H, Davis FC y Jonson M (2009) Circadian clock genes in reproduction tissues and the developing conceptus. *Reprod Fertil Develop*. 21: 1-9.

- ◆ Domínguez R, Chávez R y Cruz ME (1991) La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción. Programa Universitario de Investigación en Salud. Coordinación de la Investigación Científica (Eds.). UNAM. pp. 163-188.
- ◆ Domínguez R, Morales L y Cruz ME (2003) Ovarian asymmetry. *Annu Rev Biomed Sci.* 5:95-104.
- ◆ Domínguez R, Riboni L, Zipitría D y Revilla R (1982) Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat? *J Endocrinol.* 95; 175-180.
- ◆ Domínguez R y Smith ER (1974) Barbiturate blockade of ovulation on Day other than proestrus in the rat. *Neuroendocrinology.* 14; 212-223.
- ◆ Domínguez-González A, Damian-Matsumura P, Timossi C, Cruz ME y Domínguez R (1998) Characterization of monoamine neural activity in the preoptic anterior hypothalamic area and medial basal hypothalamus in rats during the day pro-oestrus and its relation to gonadotropins and sexual steroids hormone plasma levels. *Med Sci Res.* 26:275-278.
- ◆ Doganay M, Simsek A, Tapisiz OL, Mulazimoglu BS, Yumusak N y Gungor T (2009) Superior ovarian nerve (SON) transection leads to stunted follicular maturation: a histomorphologic and morphometric analysis in the rat model. *Fertil Steril.* 1-4.
- ◆ Dyer Ch y Erickson GF (1985) Norepinephrine amplifies human chorionic gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by ovarian theca-interstitial cells. *Endocrinology* 116:1645-1652.
- ◆ Enright JT (1981) Methodology. En: Handbook of Behavioral Neurobiology. Biological Rhythms. Aschoff J (Ed.). Vol. 4. Plenum Press. New York. pp. 11-20.
- ◆ Erskine MS y Weaver ChE Jr. (1988) The role of ovarian sympathetic innervation in the control of estrous responsiveness in the rat. *Horm Behav.* 22:1-11.
- ◆ Everett JW (1989) Neurobiology of reproduction in the female rat. A fifty-year perspective. *Monogr Endocrinol.* 32:1-33.

- ◆ Farhenkrug J, Georg B, Hannibal J, Hindersson P y Gräs S. (2006) Diurnal rhythmicity of the clock genes *per1* and *per2* in the rat ovary. *Endocrinology*. 147 (8) 3769-3776.
  
- ◆ Feder HH (1981) Neuroendocrinology of reproduction. Physiology and Behavior. Adler NT (Ed.). Plenum Press. New York. pp. 279-291.
  
- ◆ Fernandez-Guasti A, Krujiver FP, Fodor M y Swaab DF (2000) Sex differences in the distribution of androgen receptors in the human hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 425(3): 422-435.
  
- ◆ Flores A, Flores K, Madrigal G, Orozco EM, Everardo PM, Chavira R, Cruz ME y Domínguez R (2005a) Interacciones entre las adrenales y los ovarios en la regulación de la secreción de progesterona, estrógenos y la ovulación. XXX Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. Guanajuato, Gto. Publicado en las memorias de la academia. pp. 306-319.
  
- ◆ Flores A, Meléndez G, Palafox MT, Rodríguez JO, Barco AI, Chavira R, Domínguez R y Cruz ME (2005b) The participation of the cholinergic system in regulating progesterone secretion through the ovarian-adrenal crosstalk varies along the estrous cycle. *Endocrine*. (28)2:1-7.
  
- ◆ Flores A, Morales L, Aguirre-Ulloa 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. *Med Sci Res* 18:819-821.
  
- ◆ Flores A, Rodríguez JO, Palafox MT, Meléndez G, Barco AI, Chavira R, Cruz ME y Domínguez R (2006) The acute asymmetric effects of hemiovariectomy on testosterone secretion vary long the estrous cycle. The participation of the cholinergic system. *Reprod Biol Endocrinol.* 4:1-10.
  
- ◆ Flores A, Gallegos AI, Velasco J, Mendoza D, Everardo PM, Cruz ME y Domínguez R (2008) The acute effects of bilateral ovariectomy or adrenalectomy on progesterone, testosterone and estradiol serum levels depend on the surgical approach and the day of the estrous cycle when they are performed *Reprod Biol Endocrinol.* 6:1-7.

- ◆ Flores A, Velasco J, Gallegos AI, Mendoza FD, Chavira R, Cruz ME y Domínguez R (2007) Efectos de la sección del nervio ovárico superior contralateral al ovario in situ sobre la concentración de progesterona y estradiol durante el ciclo estral de la rata con ovariectomía unilateral. XXXII Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. Guadalajara, Jal. Publicado en las memorias de la academia. pp. 98-109.
  
- ◆ Forneris M y Aguado L (2002) Neonatal superior ovarian nerve transection disturbs the cycle activity of the female rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 82: 75-82.
  
- ◆ Freeman ME (1994) The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. 2a ed. Knobil E y Neill JD (Eds.). Raven Press. New York. pp. 613-615.
  
- ◆ Garraza MH, Aguado LI y De Bortoli MA (2004) *In vitro* effect of neuropeptides on ovary or celiac ganglion affects the release of progesterone from ovaries of rat. *Med Sci Monit*. 10(12):BR440-BR446.
  
- ◆ Gerendai I, Tóth IE, Boldogkoi Z, Medveczky I y Halász B (1998) Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique. *Neuroendocrinology*. 68: 244-256.
  
- ◆ Gerendai I, Tóth IE, Boldogkoi Z, Medveczky I y Halász B (2000) CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function. *J Auton Nervous Syst*. 80: 40-45.
  
- ◆ Gore-Langton RE y Armstrong DT (1994) Follicular steroidogenesis and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. 2a ed. Knobil E y Neill JD (Eds.). Raven Press. New York. pp. 571-580.
  
- ◆ Gosden RG, Everett JW y Tyrey L (1976) Luteinizing hormone requirements for ovulation in the pentobarbital-treated proestrous rat. *Endocrinology*. 99(4):1046-1053.
  
- ◆ Graham-Lorence S, Amarneh B, White RE, Peterson JA y Simpson ER (1995) A three-dimensional model of aromatase cytochrome P450. *Prot Sci*. 4:1065-1080.
  
- ◆ Granados D, Salazar A, Vergara P, Escandón J, Vega A y Aguilar R (1995) Los ritmos circádicos en mamíferos: Conceptos, implicaciones y bases biológicas. En: *Temas Selectos de Neurociencias*. Velázquez Moctezuma J (Ed.). UAM. México. pp. 433-458.

- ◆ Granados D, Saxena MT, Prolo LM, Aton SJ y Herzog ED (2004) Olfactory bulb neurons express functional, entrainable circadian rhythms. *Eur J Neurosci.* 19: 898-906.
- ◆ Gruart A, Delgado JM, Escobar C y Aguilar-Roblero R (2002) Los relojes que gobiernan la vida. La ciencia para todos.188. Fondo de Cultura Económica. México. pp. 45-65.
- ◆ Guyton AC y Hall JE (2001) Tratado de Fisiología Médica. 10ª ed. Mc. Graw-Hill Interamericana. México. pp. 1117-1122.
- ◆ He P-J, Hirata M, Yamauchi N, Hashimoto S y Hattori M (2007) Gonadotropic regulation of circadian clockwork in the rat granulosa cells. *Mol Cell Biochem.* 302:111-118.
- ◆ Helena CVV, Szawka RE y Anselmo-Franci JA (2009) Noradrenaline involvement in the negative-feedback effects of ovarian steroids on luteinising hormone secretion. *J Neuroendocrinol.* 20:805-812.
- ◆ Hernández ER, Jimenez JL, Payne DW y Adashi EY (1988) Adrenergic regulation of ovarian androgen biosynthesis is mediated via  $\beta_2$ -adrenergic theca-interstitial cell recognition sites. *Endocrinology* 122:1592-1602.
- ◆ Hernández M y Ramos M (2002) Motivación animal y humana. El Manual Moderno. México. UNAM. pp. 134-140.
- ◆ Hsueh AJW, Adashi EY, Jones PBC y Welsh THJ (1984) Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev.* 5(1): 76-127.
- ◆ Hsueh AJW, Billing H y Tsafiriri A (2005) Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev.* 15(6):707-724.
- ◆ Johnson JT y Levine S (1973) Influence of water deprivation on adrenocortical rhythms. *Neuroendocrinology.*11: 268-273.
- ◆ Kagitani F, Uchida S y Hotta H (2008) Effects of electrical stimulation of the superior ovarian nerve and the ovarian plexus on the ovarian estradiol secretion rate in rats. *J. Physiol. Sci.* 2 (58): 133-138.

- ◆ Karman BN y Tischkau SA (2006) Circadian clock gene expression in the ovary : Effects of luteinizing hormone. *Biol. Reprod.* 75: 624-632.
- ◆ Kashon ML, Arbogast JA y Sisk CL (1996) Distribution and hormonal regulation of androgen receptor immunoreactivity in the forebrain of the male European ferret. *J Comp Neurol.* 376(4):567-586.
- ◆ Kennaway DJ (2004) The role of circadian rhythmicity in reproduction. *Hum Reprod Update.* 11(1): 91-101.
- ◆ Kilen SM y Schwartz NB (1999) Estrous cycle. En: Encyclopedia of Reproduction. Knobil E y Neill JD (Eds.). Vol. 2. Academic Press. USA. pp. 27-135.
- ◆ Klein CM y Burden HW (1988) Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neurosci Lett.* 85: 217-222.
- ◆ Klein DC, Moore RY, Reppert SM (1991) Suprachiasmatic nucleus: The Mind's Clock. Oxford University Press. Nueva York.
- ◆ Kriegsfeld LJ y Silver R (2006) The regulation of neuroendocrine function: Timing is everything. *Hormon Behav* 49: 557-574.
- ◆ Kruijver FP y Swaab DF (2002) Sex hormone receptors are presents in the human suprachiasmatic nucleus. *Neuroendocrinology.* 75 (5): 296-305.
- ◆ Lara HE, Dissen A, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL y Ojeda SR (2000) An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology.* 141:1059-1072.
- ◆ Lara HE, Dorfman M, Venegas M, Luza SM, Luna SL, Mayerhofer A, Guimaraes MA, Rosa E Silva AAM, y Ramírez VD (2002) Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: Studies on norepinephrine release. *Microsc Res Tech.* 59:495-502.
- ◆ Lawrence IE Jr y Burden HW (1980) The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *Anat Rec* 196: 51-59.
- ◆ Leung PCK y Adashi EY (2004) The ovary. 2a ed. Elsevier. España. pp. 4-7.

- ◆ Moore RY, Speh JC y Leak RK (2002) Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res.* 309: 89-98.
- ◆ Morales L, Chávez R y Domínguez R (1993) Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve. *Med Sci Res.* 21:15-17.
- ◆ Morales L, Ricardo B, Bolaños A, Chavira R y Domínguez R (2007) Ipsilateral vagotomy to unilaterally ovariectomized pre-pubertal rats modifies compensatory ovarian responses. *Reprod Biol Endocrinol.* 5(24):1-9.
- ◆ Morales L, Vieyra E, Ramírez DA y Domínguez R (2008) Efecto agudo de la sección uni o bilateral del nervio ovárico superior en la rata prepúber sobre la concentración de gonadotropinas. XXXIII Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. Tlaxcala, Tlax. Publicado en las memorias de la academia. pp. 185-201.
- ◆ Morán C, Franco A, Morán JL, Handal A, Morales L y Domínguez R. (2005) Neural activity between ovaries and the prevertebral celiac-superior mesenteric ganglia varies during the estrous cycle of the rat. *Endocrine.* 26:147-152.
- ◆ Morán C, Morales L, Quiróz U y Domínguez R (2000) Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in infantile rats on follicular growth. *J Endocrinol.* 166: 205-211.
- ◆ Morán C, Robledo B, Scott HE, Morán JL, Handal A y Domínguez R (2010) The neural activity in the rat celiac-superior mesenteric ganglia related with the ovary via the superior ovarian nerve during the estrus cycle. Society for Neuroscience. San Diego, CA. Programa No. 185.10
- ◆ Nakamura TJ, Sellix MT, Kudo T, Nakao N, Yoshimura T, Ebihara S, Colwell Ch y Block GD (2010) Influence of the estrous cycle on clock gene expression in reproductive tissues. Effects of fluctuating ovarian steroid hormone levels. *Steroids.* 75:203-212.
- ◆ Netter FH (2003) Atlas de anatomía humana. 3ª ed. Masson. España.
- ◆ Vega A, Sosa Z, Delgado S, Casais M y Rastrilla AM (2010) Involvement of ganglionic cholinergic receptors on the steroidogenesis in the luteal phase in rat. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 120:45-52.

- ◆ Petersen SL, Ottem EN y Carpenter CD (2005) Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. *Biol Reprod.* 69(6): 1771-1778.
- ◆ Pittendrigh CS (1981) Circadian system: General perspective. En: Handbook of Behavioral Neurobiology. Aschoff J (Ed.). Vol. 4. Plenum Press. Nueva York. pp. 95-123.
- ◆ Pittendrigh CS y Daan S (1976) A functional analysis of circadian peacemaker in nocturnal rodents. I-V. *Comp. Physiol.* 106: 256-266.
- ◆ Prieto B y Velázquez M (2002) Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. *Rev. Fac. Med. UNAM.* 45(6):252-256.
- ◆ Ratner A, Weiss GK y Sanborn CR (1980) Stimulation by  $\beta_2$ -adrenergic receptors of the production of cyclic AMP and progesterone in rat ovarian tissue. *J Endocr.* 87:123-129.
- ◆ Reppert SM, Weaver DR (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol.* 63: 647-676.
- ◆ Roenneberg T, Daan S y Meroow M (2003) The art of entrainment. *J. Biol. Rhythms.* 18 (3):183-94.
- ◆ Rusak B (1982) Physiological models of the rodent circadian system. En: Vertebrate Circadian System: Structure and physiology. Aschoff J, Daan S y Groos G (Eds.). Springer-Verlag. Heilderbeg. pp. 62-74.
- ◆ Salazar A, Parra L, Barbosa S, Leff F y Antón B (2006) Sincronización luminosa. Conceptos Básicos. Primera Parte. *Salud Mental.* (29)2: 11-17.
- ◆ Selstam G, Norjavaara E, Tegenfelt T, Lundberd S, Sandström C y Persson S (1985) Partial denervation of the ovaries by transaction of the suspensory ligament does not inhibit ovulation in rats treated with pregnant mare serum gonadotropin. *Anat Record* 213:392-395.
- ◆ Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I (1997) Comparative distribution of estrogen receptors-alpha and-beta mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 388 (4): 507-525.
- ◆ Scheer FA, Ter Horst GJ, van Der Vliet J y Buijs RM (2001) Physiological and anatomic evidence for regulation of the heart by suprachiasmatic nucleus in rats. *Am J Physiol.* 208(3): H1391-H1399.

- ◆ Smith MJ, Jennes L y Wise PM (2000) Localization of the VIP2 receptor protein on GnRH neurons in the female rat. *Endocrinology*. 141: 4317-4320.
- ◆ Sosa Z, Casais M, Rastrilla AM y Aguado L (2000) Adrenergic influences on celiac ganglion affect the release of progesterone from cycling ovaries: characterization of an in vitro system. *J Endocrinol*. 166. 307-318.
- ◆ Sosa Z, Delgado M, Casais M. Aguado L y Rastrilla AM (2004) Release of ovarian progesterone during the rat oestrous cycle by ganglionic cholinergic influence. The role of norepinephrine. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 91: 179-184.
- ◆ Tavakoli-Nezhad M y Schwartz WJ (2005) c-Fox expression in the brains of behaviorally “split hamsters in constant light: calling attention to a dorsolateral region of the supraquiasmatic nucleus and the medial division of the lateral habenula. *J Biol Rhythms*. 20:419-429.
- ◆ Tresguerres JAF (2003) Fisiología Humana. 2ª ed. McGraw-Hill Interamericana. España. pp. 1036-1048.
- ◆ Tresguerres JAF (2008) Fisiología Humana. 4ª ed. McGraw-Hill Interamericana. España. pp. 1007-1022.
- ◆ Trzeciak WH, Waterman MR, Simpson ER y Ojeda SR (1987) Vasoactive intestinal peptide regulates cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 (P-450scc) gene expression in granulosa cells from immature rat ovaries. *Mol Endocrinol*. 1: 500-504.
- ◆ Uchida S, Kagitani F, Hotta H, Hanada T y Aikawa Y (2005) Cutaneous mechanical stimulation regulates ovarian blood flow via activation of spinal and supraspinal reflex pathways in anesthetized rats. *Jap J Physiol*. 55:265-277.
- ◆ Van der Beek EM, Horvath TL, Wiegant VM, Van Den Hurk R y Buijs RM (1997) Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J Comp Neurol*. 384; 569-579.
- ◆ Van der Beek EM, Wiegant VM, Van Der Donk HA, Van Den Hurk R y Buijs RM (1993) Lesions of the suprachiasmatic nucleus indicate the presence of a direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection to gonadotrophin-releasing hormone neurons in the female rat. *J Neuroendocrinol*. 5:137-144.

- ◆ Van den Pol AN (1980) The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: Intrinsic anatomy. *J Comp Neurol.* 191: 661-702.
- ◆ Van den Pol AN (1991) The suprachiasmatic nucleus: Morphological and cytochemical substrates for cellular interaction. En: Suprachiasmatic nucleus. The mind's clock. Klein DC, Moore RY y Reppert SM (Eds.). Oxford University Press. New York. pp. 17-50.
- ◆ Velazco J, Flores A, Cruz ME y Domínguez R (2010) Efectos asimétricos de la sección del nervio ovárico superior sobre la ovulación compensadora y la secreción hormonal XXXV Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. Xalapa, Ver. Publicado en las memorias de la academia.
- ◆ Vieyra E (2007) Efecto agudo de la sección uni o bilateral del nervio ovárico superior sobre la concentración de hormonas esteróides. La rata prepúber como modelo de estudio. Tesis de licenciatura. FES-Z.
- ◆ Watsson RE Jr, Langub MC Jr, Engle MG y Maley BE (1995). Estrogen-receptive neurons in the anteroventral periventricular nucleus are synaptic targets of the suprachiasmatic nucleus and peri-suprachiasmatic region. *Brain Res.* 689: 254-264.
- ◆ Yen SSC, Jaffe RB y Barbieri RL (2001) Endocrinología de la reproducción. 4a ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. pp. 118-132.
- ◆ Yoshikawa T, Sellix M, Pezuk P y Menaker M (2009) Timing of the ovarian circadian clock is regulated by gonadotropins. *Endocrinology.* 150:4338-4347.
- ◆ Yoshinaga K (1999) Estrogen secretion, Regulation of. En: Encyclopedia of Reproduction. Knobil E y Neill JD (Eds.). Vol. 2. Academic Press. USA. pp. 108-118.
- ◆ Zhang X, Zhang L, Huo S, Wang J y Cui S (2010) Neonatal superior ovarian nerve transection inhibits follicle development by enhancing follicular atresia and suppressing granulosa cell proliferation in rats. *Reprod Fertil Develop.* 22:1148-1158.
- ◆ Zoubina EV, Fan Q y Smith PG (1998) Variations in uterine innervation during the estrous cycle in rat. *J Comp Neurol.* 397:561-571.