



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

Participación del Péptido Intestinal Vasoactivo  
en la Regulación de la Ovulación y la Secreción  
Hormonal. La Rata con Síndrome del Ovario  
Poliquístico como Modelo de Estudio.

# TESIS

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

P R E S E N T A

**GABRIELA ROSAS GAVILÁN**

Tutor Principal de Tesis: Dra. Leticia Morales Ledesma.  
Miembros del Comité Tutor: Dr. Roberto Domínguez Casalá.  
Dra. Margarita Virginia González del  
Pliego Olivares.

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2011.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de Abril de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA EXPERIMENTAL)** de la alumna **ROSAS GAVILÁN GABRIELA** con número de cuenta **401052578** con la tesis titulada **"Participación del péptido intestinal vasoactivo en la regulación de la ovulación y la secreción hormonal. La rata con síndrome del ovario poliquístico como modelo de estudio"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LETICIA MORALES LEDESMA**

Presidente: DR. ENRIQUE ANTONIO PEDERNERA ASTEGIANO  
Vocal: DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATZUMURA  
Secretario: DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ  
Suplente: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR  
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 29 de Abril de 2011.

*M. del Coro Arizmendi*  
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
Coordinador del Programa



# *Agradecimientos*

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por haberme permitido ingresar en su programa de estudios y por los conocimientos recibidos a favor de mi formación como profesionalista.

Al CONACYT por haberme brindado la beca 225347, para realizar mis estudios de maestría y a DGAPA-PAPIIT convenio IN-213110, por el apoyo financiero.

A cada uno de los miembros del jurado:

Dr. Enrique Antonio Pedernera Astegiano.

Dr. Roberto Domínguez Casalá.

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura.

Dra. María Elena Ayala Escobar.

Dra. Margarita Virginia González del Piñero Olivares.

Por el tiempo invertido en la revisión de este proyecto, al que enriquecieron con sus conocimientos y con cada una de sus valiosas observaciones. Muchísimas gracias, por aceptar ser parte de este, mi gran sueño, GRACIAS.

A mi Directora de Tesis, la Dra. Leticia Morales Ledezma, por haber confiado en mí, por todo el apoyo que me brindó y por su incansable paciencia y amistad. Gracias doctora Lety por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias de vida que me impulsaron a concluir este nuevo proyecto de vida.

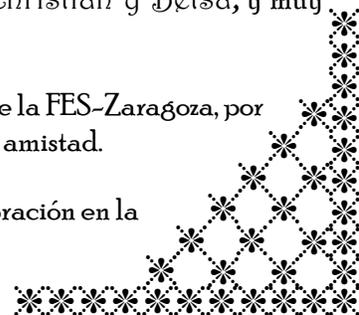
A la Dra. Margarita por la gran persona e investigadora que en usted conocí, por haberme brindado su amistad y apoyo, por sus sabios consejos y por haber contribuido en mi formación no sólo como profesionalista sino también como persona.

Al Dr. Roberto por su apoyo y dirección en la elaboración de esta tesis. Por compartir conmigo muchos de sus conocimientos, porque durante el tiempo que trabajamos juntos me fue dirigiendo de manera exigente, pero siempre objetiva, buscando hacer de mí una mejor profesionalista... gracias doctor por todos sus consejos y valiosos comentarios.

A cada uno de mis compañeros y amigos que compartieron conmigo parte de sus conocimientos, vivencias y experiencias, y que hicieron del **laboratorio 7 de la UIBR**, nuestra segunda casa: Eli, Dey, Azu, Dennisse, Juan, Dan, Ricardo, Chío, Nadia, Iosif, Christian y Betsa, y muy en especial a **Rosé**, por su cariño y amistad incondicional.

A la Dra. Adriana, al Dr. Román y al personal técnico del Bioterio de la FES-Zaragoza, por su apoyo en el cuidado de los animales utilizados en este estudio y por su amistad.

Al Biol. Roberto Chavira y al Biol. Mario Cárdenas por su colaboración en la medición hormonal realizada en el presente estudio.





# Dedicatorias

## *A ti, mi Dios:*

Por darme la vida, por no alejarme de tu mano ni un solo momento, por la dicha de tener a mi lado grandes personas y por haberme dado la fortuna de ser mamá. Gracias Diosito por colocarme en el mejor camino e iluminar cada paso de mi vida y por ayudarme a levantar cuando más lo necesité. Gracias por permitirme hacer de este sueño, una grandiosa realidad, la culminación de mi maestría.

## *A mis Papás:*

*Ger y Lupita*, por todas sus enseñanzas, por ser mi guía, mi fortaleza, mi límite ante los excesos. Gracias por haber creído en mí y por apoyarme incondicionalmente pero sobre todo porque sembraron en mí la semilla de superación que me impulsó a llegar hasta donde hoy me encuentro. Los quiero mucho.

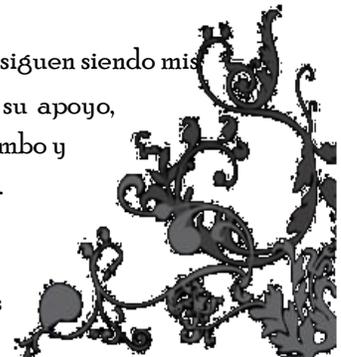
A ti mi Mamita, mi *preciosa*, porque con tu cariño y amor lograste guiarme y hacer de mi una mejor persona. Por enseñarme que nada en esta vida es tan grande ni tan fuerte como para desistir de los sueños anhelados. Porque durante toda mi vida has sido mi más grande complice y mi mejor amiga.

Gracias Pa, por ser mi amigo y mi mejor consejero, porque tu mano firme hizo de mí una persona responsable y perseverante y sobre todo, porque con tus palabras me has dado la fortaleza para no rendirme y seguir adelante en la vida.

## *A mis Hermanos:*

*Dani y Cesarín*, porque aún cuando están bastante crecidos, siguen siendo mis queridos hermanitos. Gracias por todos los momentos compartidos, por su apoyo, confianza y amistad, y porque aún cuando nuestros caminos cambien su rumbo y nuestras prioridades sean otras, sigamos juntos!!!. Los quiero mucho, chavos.

*A ti mi Querido Junis*, por ser el mejor de mis regalos y darle alegría a mi vida.





# Dedicatorias

*A mi Chapis:*

Mi niña, *Suamis*, hoy te dedico este logro porque tu has sido ese angelito incansable que puso Diosito en mi vida para llenarla de alegrías, esperanzas y sobre todo de mil y un razones para seguir adelante, porque tan solo con un abrazo y una sonrisa haces de mi mundo algo tan especial, por demostrarme que no existen momentos buenos o malos, sino que todo depende del cristal con que lo veas. *Gracias* nena por tu picardía y tu alegría, por tus palabras de aliento en los momentos difíciles y *por ser* parte de mi vida y *mi más grande éxito*. Espero que tu camino este lleno de gratas sorpresas y que me permitas ser parte de cada una de ellas. Te amo chikis.

*A la Dra. Lety:*

Por la oportunidad de volver a trabajar bajo su dirección, por hacer de mí una persona más crítica y autosuficiente, por ayudarme a crecer tanto profesional como emocionalmente. Gracias doctora por brindarme su invaluable amistad, apoyo y confianza pero sobre todo por enseñarme que *cada reto en el camino representa una oportunidad más para crecer como persona*. Mil gracias doctora.

*A mi gran amiga Rose:*

Por ser parte de mi existir, porque has hecho de mi camino algo más grato, por haber sido mi paño de lágrimas, porque jamás te rendiste ni te alejaste de mí, aún en los momentos más difíciles... gracias amiga, sabes que te quiero mucho. Espero que logremos seguir juntas cosechando parte de lo mejor que hemos venido sembrando, *nuestra amistad*... gracias por tu amistad y todo tu entusiasmo.

*A mis Amigos:*

*Rose, Vane, Jorge, Magda, Gio, Jaz, Wendy, Silvia, Martín, Sebas, Ely, Dey, Ana Lilia, Beto y Blanca*, porque han sido una parte importante de mi vida. Gracias chavos por todos los momentos compartidos, por esos ratos tan divertidos que pasamos juntos, por las grandiosas salidas a campo, por las noches de insomnio, por las palabras de aliento, por su compañía y sobre todo por haberme brindado su amistad. Gracias por todo, siempre ocuparán un lugar muy especial en mi mente y mi corazón.





# Índice de Contenido

	<b>Páginas</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<i>i</i>
<b>Resumen</b> .....	<i>iii</i>
<b>Abstract</b> .....	<i>v</i>
<b>Introducción</b> .....	1
<b>Marco Teórico</b> .....	3
Regulación del Proceso de Maduración Folicular y de la Ovulación.....	3
Crecimiento y Maduración Folicular.....	3
Regulación Hormonal del Desarrollo Folicular.....	7
Regulación Hormonal de la Ovulación.....	8
Estructura y Función de la Bursa Ovárica.....	10
Inervación Extrínseca del Ovario.....	11
Participación de la Inervación en el Crecimiento Folicular y la Ovulación.....	13
Regulación del Proceso Esteroidogénico del Ovario.....	14
Regulación Hormonal de la Esteroidogénesis.....	17
Participación de la Inervación en la Regulación de la Esteroidogénesis.....	18
Secreción, Metabolismo y Excreción de las Hormonas Esteroides.....	19
Participación del VIP en la en la Regulación de las Funciones Gonadales.....	20
Síndrome del Ovario Poliquístico.....	26



	<b>Páginas</b>
<b>Planteamiento del Problema</b> .....	30
<b>Hipótesis</b> .....	31
<b>Objetivo General</b> .....	32
<b>Objetivos Particulares</b> .....	32
<b>Material y Métodos</b> .....	33
Diseño Experimental.....	33
Efecto de la Inyección Unilateral de VIP en los ovarios de ratas en cada día del Ciclo Estral.....	34
Efecto de la Inyección de VIP en la bursa del ovario denervado de animales con Síndrome del Ovario Poliquístico.....	35
Procedimiento de Autopsia.....	37
Histología del Ovario.....	38
Cuantificación de Hormonas Esteroides y Peptídicas en suero.....	39
Análisis Estadístico.....	41
<b>Resultados</b> .....	42
<b>Experimento 1.</b> Efecto de la Inyección de Solución Salina en la bursa ovárica de animales en las diferentes Etapas del Ciclo Estral.....	42
<b>Experimento 2.</b> Efecto de la Inyección de VIP en la bursa ovárica de animales en las diferentes Etapas del Ciclo Estral.....	51
<b>Experimento 3.</b> Efecto de la Sección Unilateral del Nervio Ovárico Superior de animales sacrificados a las 24 horas de la cirugía.....	60



	<b>Páginas</b>
<b>Experimento 4.</b> Efecto de la Inyección de VE en animales de 10 días de edad, sacrificados en el día del Diestro.....	63
<b>Experimento 5.</b> Efecto de la Sección Unilateral del Nervio Ovárico Superior de animales con Síndrome del Ovario Poliquístico.....	70
<b>Experimento 6.</b> Efecto de la estimulación VIPérgica del Ovario denervado de animales con Síndrome del Ovario Poliquístico.....	74
<b>Discusión</b> .....	81
<b>Modelo</b> .....	91
<b>Conclusiones</b> .....	93
<b>Referencias</b> .....	95



# ABREVIATURAS

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

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

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

**ACTH:** hormona adenocorticotrópica

**AMPc:** Adenosin Monofosfato cíclico

**ARNm:** Ácido Ribonucleico mensajero

**ATP:** Adenosin Trifosfato

**CG:** Ganglio Celiaco

**CGRP:** Péptido Relacionado con el Gen  
que codifica a la Calcitonina

**D1:** Diestro 1

**D2:** Diestro 2

**DHEA:** Dehidroepiandrosterona

**DHT:** Dihidrotestosterona

**E:** Estro

**FSH:** Hormona Estimulante del Folículo

**GnRH:** Hormona Liberadora de  
Gonadotropinas

**GTD:** Guanetidina

**i.p:** intraperitoneal

**IGF-I:** Factor de Crecimiento semejante a  
la Insulina-I

**LH:** Hormona Luteinizante

**NA:** Noradrenalina

**NAérgicas:** Noradrenérgicas

**NGF:** Factor de Crecimiento Neural

**NOS:** Nervio Ovárico Superior

**NPY:** Neuropeptido Y

**NV:** Nervio Vago

**OD:** Ovario Derecho



**OI:** Ovario Izquierdo

**SOPQ:** Síndrome del Ovario Poliquístico.

**OPQ:** Ovario Poliquístico

**SP:** Sustancia P

**P:** Proestro

**SS:** Solución Salina

**PO:** Plexo Ovárico

**TA:** Testigo Absoluto

**RIA:** Radioinmunoanálisis

**TH:** Tiroxina Hidroxilasa

**SHBG:** Globulina Fijadora de Hormonas Sexuales

**VE:** Valerato de Estradiol

**SNOD:** Sección del Nervio Ovárico Superior Derecho

**VG:** Vesícula Germinal

**SNOI:** Sección del Nervio Ovárico Superior Izquierdo

**Vh:** Vehículo (aceite de maíz)

**VIP:** Péptido Intestinal Vasoactivo

---

# RESUMEN

En la rata, el Síndrome del Ovario Poliquístico (SOPQ) se caracteriza por mayor actividad de las fibras simpáticas que arriban al ovario, vía el Nervio Ovárico Superior (NOS). En el ovario del animal con el SOPQ incrementa el contenido del péptido intestinal vasoactivo (VIP) y hay evidencia que llevan a pensar que el VIP puede ser otro de los factores que contribuye al desarrollo del síndrome.

En el presente estudio se evaluó la participación del VIP en la regulación de la secreción de progesterona, testosterona, estradiol, hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH) de la rata adulta cíclica. Para ello, se utilizaron ratas hembras de la cepa CII-ZV de 60 días de edad, que en la mañana del diestro 1, diestro 2, proestro o estro, fueron inyectadas con 20  $\mu$ l de VIP ( $10^{-8}$ M) o de solución salina (SS) en la bursa del ovario izquierdo (OI) o derecho (OD). Todos los animales fueron sacrificados a las 24 horas del tratamiento.

En el día del **diestro 1**, la inyección de VIP en el OI resultó en mayor concentración de la FSH, en comparación al grupo con SS. Cuando el péptido se inyectó en la bursa del OD, la concentración de FSH fue menor. En **diestro 2**, la inyección de VIP en la bursa del OI resultó en mayor concentración de estradiol, que fue menor cuando el péptido se inyectó en el OD. En el día del **proestro**, los animales inyectados con VIP en el OI o derecho mostraron mayor concentración de estradiol en suero, respecto a su grupo con SS. La estimulación VIPérgica del OI de animales en **estro** resultó en menor concentración de testosterona y FSH, en tanto que la LH fue mayor en comparación al grupo con SS.

A fin de evaluar si la falta de inervación noradrenérgica (NAérgica) modifica la reactividad de los ovarios al estímulo con VIP, se utilizaron ratas hembras en el día del estro que fueron sometidas a la sección izquierda (SNOI) o derecha (SNOD) del NOS y en el mismo acto quirúrgico se les inyectó 20  $\mu$ l de VIP ( $10^{-8}$ M) o de SS en la bursa del ovario denervado. Los animales fueron sacrificados a las 24 horas de procedimiento quirúrgico. Las ratas con SNOD e inyección del VIP mostraron mayor concentración de estradiol que las ratas con SNOD e inyección de SS en la bursa del ovario denervado. No hubo diferencias en las ratas con SNOI y estimulación VIPérgica del ovario denervado. Un estudio similar se



realizó en ratas con SOPQ, inducido por la inyección vía intraperitoneal (i.p) de una dosis de 2.0 mg de valerato de estradiol (VE) disueltos en 0.1 ml de aceite de maíz (Vh), a los 10 días de edad. Todos los animales fueron sacrificados a las 24 horas de la cirugía.

La sección unilateral del NOS en ratas con SOPQ resultó en mayor concentración de estradiol en suero, en comparación a ratas sin el SOPQ. En los animales con SOPQ sometidos a la SNOI e inyección de VIP en la bursa del OI, la concentración de testosterona fue mayor que la del grupo inyectado con el Vh y sometido a la SNOI y estimulación del ovario denervado con VIP. En comparación a su respectivo grupo Vh, el grupo con SOPQ más SNOD y estimulación VIPérgica del ovario derecho presentó menor concentración de progesterona y testosterona, así como mayor concentración de estradiol en suero.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que en la rata adulta cíclica, la sensibilidad del ovario al VIP es asimétrica y varía durante el ciclo estral. En el modelo de la rata con SOPQ, sin inervación NAérgica, la participación del VIP en la secreción de testosterona es asimétrica y diferente a la del animal con la inervación ovárica normal. Tomando en conjunto estos resultados, sugerimos que la participación del VIP en la regulación de las funciones ováricas se encuentra relacionada con la inervación NAérgica del ovario.

---

# ABSTRACT

In the rat, Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS) is characterized by an increase in the activity of sympathetic fibers arriving to the ovary, via the Superior Ovarian Nerve (SON). The concentration of the vasoactive intestinal peptide (VIP) is also increased in the ovaries of rats with PCOS, and there are evidences suggesting that VIP may be another factor contributing to the development of the syndrome.

In the present study, the participation of VIP in the regulation of progesterone, testosterone, estradiol, follicle stimulating (FSH) and luteinizing hormone (LH) secretion in the adult rat during the estrous cycle, was evaluated. Sixty days old female rats of the CII-ZV strain, were injected with 20  $\mu$ l of VIP ( $10^{-8}$ M) or with 20  $\mu$ l of saline solution (SS) in the left ovarian bursa (LOB) or right (ROB) at the morning of diestrus 1, diestrus 2, proestrus or estrus. All animals were sacrificed at 24 hours after treatment.

On **diestrus 1**, VIP injected into the LOB resulted in higher serum concentration of FSH than in SS group. The same treatment in the ROB resulted in lower hormone level. On **diestrus 2**, VIP injection in the LOB resulted in a higher estradiol concentration and lower when it was injected in the ROB, than in SS injected animals. On **proestrus**, VIP injection in either LOB or ROB resulted in higher levels of estradiol than in SS injected animals. The VIPergic stimulation in the LOB of animals in **estrus** resulted in lower testosterone and FSH and higher LH levels, than in rats injected with SS.

To evaluate if the lack of noradrenergic ovarian innervation modify the reactivity of the ovaries to the VIP ovarian stimulation, groups of rats at the day of estrus, with unilateral section of the superior ovarian nerve (SON), were immediately injected with VIP or SS into the bursa of denervated ovary. The animals were sacrificed 24 h after treatment. The rats with section of the right SON and VIP injection had higher estradiol than in rats with section of right SON injected with SS. No differences were observed in rats with the



section of the left SON. A similar study was performed in 60 days old rats with PCOS induced by the injection of 2.0 mg. of estradiol valerate (EV) dissolved in 0.1 ml corn oil (Vh), at 10 days of age. All animals were sacrificed at 24 hours after surgery.

The unilateral section of the SON to rats with PCOS resulted in higher levels of estradiol, than in rats without PCOS. In animals with PCOS submitted to the section of the left SON and VIP injection into the left ovary, the testosterone concentration was higher than in the group without PCOS with section of the left SON injected with VIP. Compared to their respective Vh group, the group with SOPQ+right SON section and VIP injection resulted in lower progesterone and testosterone and high estradiol levels.

Present results suggest that in the cyclic adult rat, the ovarian sensitivity to VIP is asymmetric and varies during the estrous cycle. In rats with PCOS without noradrenergic innervation, the participation of the VIP in testosterone secretion is asymmetric and different than an animal with the normal ovarian innervation. Then, the participation of the VIP in the regulation of ovarian functions is related with noradrenergic ovarian innervation.



# INTRODUCCIÓN

La supervivencia de las especies depende de la producción de gametos y de su unión para dar origen a la formación de un embrión. En este proceso reproductivo, las gónadas realizan una doble función: producen y liberan gametos maduros, además de que secretan hormonas que regulan la maduración de los gametos, la función de los órganos reproductores, la expresión de los caracteres sexuales y la conducta sexual (Arias, 2003).

El proceso reproductivo depende del funcionamiento integrado del sistema nervioso central y periférico, los ovarios y los órganos blanco de las hormonas gonadales, que se encuentran vinculados entre sí a través de distintos mecanismos de retroalimentación (Guyton, 1986; Arias, 2003; Silverthorn, 2008).

El desarrollo de patologías que afectan la función reproductiva se ha visto asociado con la alteración de alguno de los componentes de regulación del eje reproductivo. La principal causa de infertilidad en la mujer es el síndrome del ovario poliquístico (SOPQ) que se caracteriza por irregularidad del ciclo menstrual, hiperandrogenismo, anovulación crónica, presencia de quistes foliculares e infertilidad (Franks y col., 2000; Yen, 2001; Hoyt y Schmidt, 2004; Tsilchorozidou y col., 2004; Franks, 2005).

En las últimas décadas se han desarrollado diversos modelos experimentales que buscan dilucidar la etiología del SOPQ. La administración de compuestos con actividad estrogénica como el valerato de estradiol (VE), un estrógeno de larga actividad, induce un estado anovulatorio con características endocrinas y morfológicas (Brawer y col., 1978; 1986; Hemmings y col., 1983; Schulster y col., 1984; Rosas, 2006) semejantes a las observadas en la mujer con SOPQ.



En la rata, la formación de quistes foliculares es precedida por mayor afluencia de noradrenalina (NA) hacia el ovario, mediante el NOS (Lara y col., 1993), vía que al ser eliminada quirúrgicamente y de manera bilateral restablece las funciones ováricas (Barria y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003). Esto llevó a postular que en la rata, el SOPQ es el resultado de una alteración en la actividad de las fibras NAérgica. No obstante, nuestro grupo de trabajo mostró que la denervación catecolaminérgica con guanetidina (GTD) no restablece la respuesta esteroidogénica del animal con SOPQ, donde la secreción de estradiol es incluso mayor que en el animal tratado únicamente con VE (Ruíz y col., 2008).

En la rata con SOPQ, la hiperactividad NAérgica (Lara y col., 1993) se acompaña del incremento del contenido de VIP en el ovario (Parra y col., 2007). Al cultivar los ovarios de animales con SOPQ en presencia de VIP, se amplifica la biosíntesis de andrógenos y estradiol (Parra y col., 2007). Estos resultados han sido considerados como evidencia de que el VIP se encuentra involucrado en el desarrollo del SOPQ.

En el presente estudio se evaluó el papel que juega el VIP en las funciones ováricas del animal con el SOPQ. Debido a que el NOS es un paquete neural por el que ingresan NA y VIP al ovario, se realizó la sección unilateral del NOS y en el mismo acto quirúrgico se estimuló con el VIP, de manera local, al ovario denervado. Si el desarrollo del SOPQ se encuentra asociado a la hiperactividad VIPérgica, como fue propuesto por otros investigadores (Parra y col., 2007; Ruíz y col., 2008), entonces la estimulación del ovario con VIP favorecerá la biosíntesis de hormonas esteroides, evento que dependerá de la integridad de la inervación del ovario.

---

# MARCO TEÓRICO

## Regulación del Proceso de Maduración Folicular y de la Ovulación

El ovario realiza dos funciones, eventos que dependen del crecimiento y la diferenciación folicular: 1.- La ovulación. 2.- La secreción de hormonas esteroides y peptidérgicas, que regulan el ciclo menstrual o estral, el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, y ejercen diversos efectos tróficos sobre otros órganos y tejidos (Sánchez Criado, 1999; Arias, 2003).

La **ovulación** se puede definir como el proceso por el cual el ovario libera hacia el exterior uno o varios ovocitos capaces de ser fecundados. Es el evento menos frecuente, de los dos en los que culmina el crecimiento folicular, ya que la mayoría de los folículos entran en atresia (Domínguez y col., 1991; Van Voorhis, 1999a).

El análisis de los factores que regulan la ovulación se puede dividir en: factores que modulan el crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico, y factores que regulan la expulsión del ovocito (Domínguez y col., 1991).

### Crecimiento y Maduración Folicular

El desarrollo folicular se inicia con el crecimiento de los folículos ováricos, que puede o no culminar en la ovulación (Van Voorhis, 1999a). La mayoría de los folículos que se encuentran en el ovario experimentan un proceso natural de degeneración denominado **atresia**, evento que se presenta desde la vida fetal hasta la vida adulta, en cualquier etapa del desarrollo folicular, donde la tasa más alta de atresia ocurre en los folículos antrales pequeños, justo antes del desarrollo final del folículo (Domínguez y col., 1991; Greenwald y Roy, 1994; Van Voorhis, 1999a).



El folículo es la unidad anatómico-funcional del ovario. Su función es mantener, nutrir, madurar y liberar al ovocito en el momento en que éste sea capaz de ser fecundado. Además, secreta las hormonas que estimulan el crecimiento y la diferenciación de los órganos del aparato reproductor femenino (Domínguez y col., 1991; Berne y Levy, 2006). El folículo ovárico está formado por: un ovocito, una o varias capas de células de la granulosa que rodean al ovocito, una lámina basal y el compartimiento tecal (Domínguez y col., 1991). Los folículos ováricos se clasifican en función de su tamaño y complejidad morfológica en:

**Folículos Primordiales.** Son los folículos más numerosos (figura 1) y constituyen la reserva de folículos en reposo.

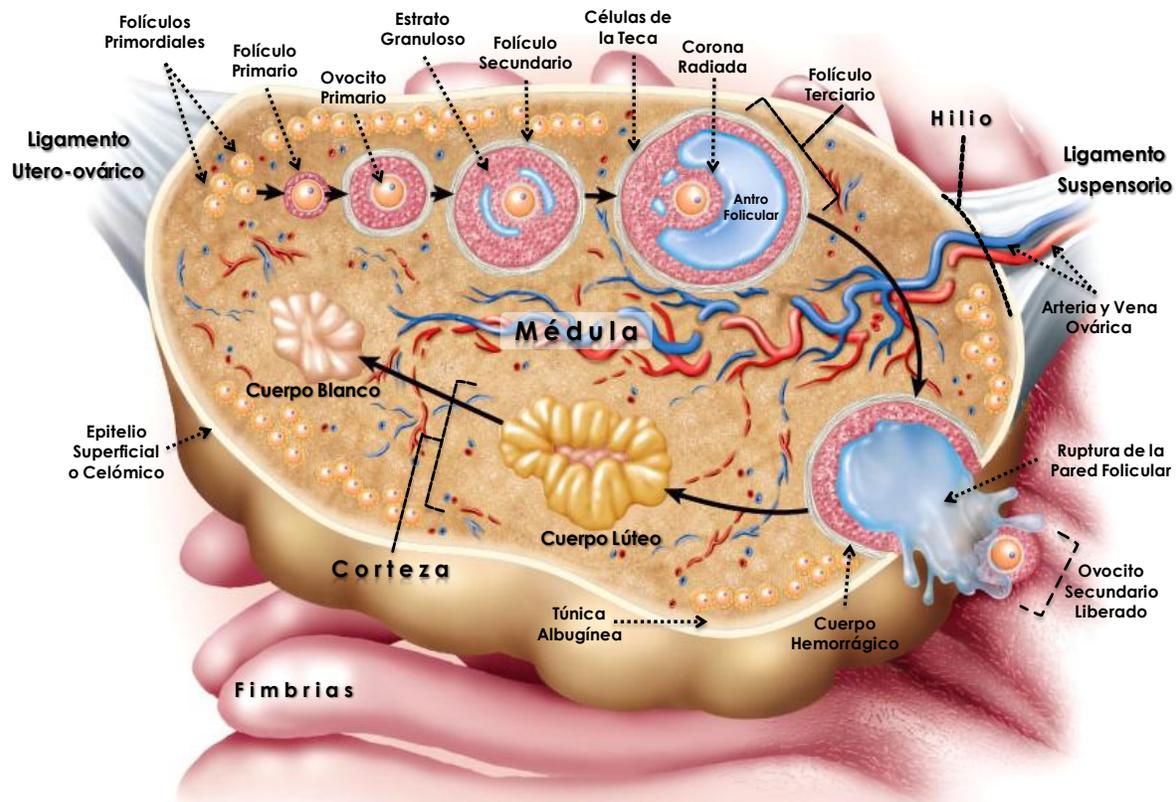
Están conformados por un **ovocito** primario que se origina a partir de las células germinales primordiales. Estas células son de origen extragonadal y durante su migración desde el epiblasto al ovario, comienzan una fase de proliferación mitótica, momento a partir del cual reciben el nombre de ovogonias (Carlson, 2009). Al nacimiento, la mayoría de las ovogonias de los mamíferos han iniciado la primera división meiótica que progresa hasta la etapa de diploteno (o dictioteno, en roedores) de la profase I, que se hace evidente por la presencia de un núcleo prominente, la vesícula germinal (VG). Las ovogonias que han iniciado la meiosis se denominan entonces, ovocitos primarios (Baker, 1982; Domínguez y col., 1991; Lorenzo, 1992; Carlson, 2009).

Alrededor del ovocito se encuentra una capa de **células** aplanadas, llamadas **pregranulosas** (Guyton, 1986; Greenwald y Roy, 1994). Aquellos ovocitos que no son rodeados y aislados por las células pregranulosas son destinados a la muerte y eliminados por medio de los vasos sanguíneos (Domínguez y col., 1991; Picton y Gosden, 1999).

Los folículos presentan una **lámina basal** que durante el desarrollo folicular se hace cada vez más prominente y recibe entonces el nombre de **membrana basal**. Dicha membrana rodea al estrato granuloso y al ovocito y los separa del compartimiento tecal y de los vasos sanguíneos (Greenwald y Roy, 1994; Berne y Levy, 2006). También actúa como una barrera semipermeable a través de la cual difunden oxígeno, nutrientes y precursores esteroideos (Domínguez y col., 1991; Oliver y col., 1999).



**Folículos Primarios.** El primer indicio de que los folículos primordiales han reactivado su proceso de crecimiento, es el aumento en el tamaño del ovocito (Goldfien y Monroe, 2000).



**Figura 1.** Estructura del ovario que muestra la secuencia de la maduración folicular, ovulación y formación del cuerpo lúteo (Netter, 2003).

En los folículos primarios (figura 1), las células pregranulosas adoptan una apariencia cuboidal, momento a partir del cual reciben el nombre de **células de la granulosa** (Greenwald y Roy, 1994; Goldfien y Monroe, 2000). Alrededor del ovocito se forma una membrana translúcida y acelular, denominada **zona pelúcida**, que está constituida por glucoproteínas fibrilares y glucosaminoglicanos (Picton y Gosden, 1999; Carlson, 2009). Las microvellosidades del ovocito y de las células de la granulosa tienen estrecho contacto y



quedan embebidas dentro de la zona pelúcida. Los contactos entre el ovocito y las células de la granulosa son fundamentales para el intercambio metabólico entre ambas células (obtención de aminoácidos, lípidos, carbohidratos, etc.) necesarios para el funcionamiento del ovocito (Carlson, 2009). Las células mesenquimales del estroma se agrupan alrededor de la membrana basal y forman la teca (Bergman y col., 1998; Geneser, 2000).

**Folículos Secundarios.** Se caracterizan por un estrato granuloso compuesto de siete a ocho capas (Domínguez y col., 1991; Greenwald y Roy, 1994; Goldfien y Monroe, 2000). A medida que el folículo aumenta de tamaño, se forman múltiples espacios entre las células de la granulosa (figura 1), que contienen líquido folicular originado por extravasación de componentes plasmáticos y por secreción de las células foliculares (Domínguez y col., 1991; Freeman, 1994; Garther y Hiatt, 2008). Las células de la **teca** proliferan y se diferencian en dos capas, la **interna**, cuyas células cuboides reciben suministro sanguíneo y nervioso; y la teca **externa**, conformada por tejido conectivo, que contiene abundantes fibras de colágeno y fibras musculares lisas, que son importantes en la función contráctil (Domínguez y col., 1991; Yao y Bahr, 1999; Oliver y col., 1999).

**Folículos Terciarios, De Graaf o Preovulatorios.** Los espacios llenos de líquido se agrandan y se conjuntan formando una gran cavidad, el **antro folicular**, que aumenta de tamaño con el desarrollo del folículo (Domínguez y col., 1991; Freeman, 1994; Garther y Hiatt, 2008). Presentan el **cúmulo oóforo** y la **corona radiada** (figura 1), estructuras que se originan a partir de células de la granulosa, las cuales proporcionan nutrientes y numerosos factores necesarios para el crecimiento del ovocito (Domínguez y col., 1991; Freeman, 1994; Gore-Langton y Armstrong, 1994). En estos folículos, el ovocito y el cúmulo oóforo son desplazados de modo gradual hacia una posición excéntrica de la cavidad folicular (Goldfien y Monroe, 2000; Sánchez-Criado, 1999).

---

## Regulación Hormonal del Desarrollo Folicular

La formación y el crecimiento de los folículos primordiales es un evento independiente de las gonadotropinas (LH y FSH) (Domínguez y col., 1991; Van Voorhis, 1999a; Berne y Levy, 2006). Es en el estadio de folículo primario a partir del cual, el eje hipotálamo-hipófisis-ovario participa en el proceso de maduración folicular (Van Voorhis, 1999a). La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es sintetizada por el hipotálamo y vertida al sistema porta hipofisiario mediante el cual llega a los gonadotropos en la adenohipófisis, donde regula la secreción de LH y FSH (Silverthorn, 2008).

En las células de la granulosa de folículos en crecimiento, la FSH estimula la proliferación celular y el aumento del tamaño del folículo, así como la síntesis de sus propios receptores y de los receptores a LH. En tales eventos, los estrógenos actúan de manera sinérgica con la FSH. Asimismo, la FSH incrementa la actividad de las aromatasas y la síntesis de estradiol. En las células de la granulosa, el estradiol aumenta la expresión de sus receptores. La LH estimula la diferenciación final del folículo preovulatorio (Domínguez y col., 1991; Yao y Bahr, 1999; Yeh y Adashi, 2001; Carlson, 2009).

Las células de la granulosa del folículo ovárico sintetizan activina e inhibina, hormonas glucoprotéicas que participan en la regulación del desarrollo folicular (Carlson, 2009). La activina ejerce un efecto doble: actúa sobre los gonadotropos en la adenohipófisis, donde estimula la secreción de la FSH, y de forma autocrina, estimula la proliferación mitótica de las células de la granulosa (Van Voorhis, 1999a; Carlson, 2009). La inhibina se sintetiza por las células del estrato granuloso, en respuesta al estímulo de la FSH. La inhibina en la adenohipófisis modula de manera inhibitoria la secreción de FSH (Sánchez Criado, 1999; Van Voorhis, 1999a; Carlson, 2009).

En la rata, el crecimiento del folículo dura alrededor de 19 días, desde que sale del estado de reposo hasta que culmina con la ovulación. Esto indica que durante la vida del folículo en crecimiento, éste se ve expuesto al menos a cuatro aumentos bruscos en la concentración plasmática de LH previo a la ovulación (“pico” preovulatorio de LH), de tal forma que después de cuatro ciclos estrales, ocurre la ovulación (Domínguez y col., 1991).

---

## Regulación Hormonal de la Ovulación

Una vez que el folículo en crecimiento ha alcanzado el estadio de preovulatorio, el “pico” de gonadotropinas desencadena una serie de eventos intrafoliculares que finalizan con la ruptura del folículo preovulatorio y la liberación del ovocito al oviducto (Espey, 1999; Van Voorhis, 1999a). En respuesta al “pico” preovulatorio de LH:

- ✎ El ovocito primario reinicia la meiosis I, lo que se hace evidente por la desaparición de su VG y su nucléolo (Domínguez y col., 1991; Lorenzo, 1992). Al completarse la primera división meiótica, se origina el *ovocito secundario* que inicia la meiosis II hasta la metafase, donde nuevamente se detiene su maduración. Al momento de la ovulación, el ovocito secundario es expulsado y sólo completa su segunda meiosis en caso de ocurrir la fecundación (Domínguez y col., 1991; Carlson, 2009).
- ✎ Las células de la granulosa sintetizan fibrinolisisina (enzima proteolítica) que degrada las fibras de colágeno que rodean al folículo y los desmosomas presentes en las células de la teca y de la granulosa (Domínguez y col., 1991). Estos eventos debilitan la pared folicular y ocasionan una mayor distensión del folículo (Silverthorn, 2008). En la teca interna ocurre un proceso de isquemia debido a la ruptura de los vasos y la extravasación de sangre (Kilen y Schwartz, 1999; Arias, 2003).
- ✎ Las células de la granulosa del folículo preovulatorio sintetizan prostaglandinas, lo que conlleva a una respuesta pseudoinflamatoria (Sánchez-Criado, 1999; Berne y Levy, 2006). Las prostaglandinas estimulan la contracción de las células musculares lisas de la teca externa, generando la ruptura de la pared folicular en su punto más débil, el estigma (Silverthorn, 2008).
- ✎ Los folículos antrales que no son destinados a liberar al ovocito, experimentan atresia (Feder, 1981).



El aumento brusco en la concentración plasmática de FSH, previo a la ovulación (“pico” preovulatorio de FSH) estimula la producción de glucosaminoglicanos que dispersan al cúmulo oóforo (Guyton, 1986; Sánchez-Criado, 1999; Berne y Levy, 2006). Además, estimula en las células de la granulosa la síntesis del activador del plasminógeno que media la conversión de plasminógeno en plasmina. Esta enzima contribuye a la digestión proteolítica del colágeno de la pared folicular, con lo que disminuye su rigidez y facilita la ruptura del folículo (Domínguez y col., 1991; Yeh y Adashi, 2001).

Finalmente, las células del epitelio superficial que cubren al estigma se rompen y el óvulo es expulsado (figura 1), junto con las células de la corona radiada, el cúmulo oóforo y el líquido del antro folicular (Domínguez y col., 1991; Arias, 2003; Silverthorn, 2008).

En las primeras horas que siguen a la liberación del óvulo, los vasos sanguíneos derivados de la teca interna se infiltran en el folículo colapsado, **cuerpo hemorrágico** (figura 1), e irrigan a la capa granulosa (Van Voorhis, 1999a; Yao y Bahr, 1999). Las células de la teca interna comienzan a dividirse e invaden el espacio antral, evento estimulado por la LH (Silverthorn, 2008). La granulosa y la teca experimentan un proceso de luteinización, que da lugar a la formación del **cuerpo lúteo o amarillo** (figura 1) (Guyton, 1986; Kilen y Schwartz, 1999; Silverthorn, 2008).

En rata y el ratón, el “pico” preovulatorio de LH producido en la tarde del proestro, además de estimular el proceso ovulatorio, provoca la atresia de aquellos folículos con antro muy desarrollado que no presentan las condiciones que permitan la ovulación. En las mismas horas del proestro se produce el “pico” preovulatorio de FSH y en la mañana del estro ocurre un segundo “pico” que participa en la selección de los folículos pequeños con antro que van a crecer hasta alcanzar el estadio preovulatorio en el próximo ciclo estral (Domínguez y col., 1991).

---

## Estructura y Función de la Bursa Ovárica

En muchas especies de mamíferos, el ovario se encuentra recubierto por una delgada membrana peritoneal denominada **bursa ovárica**, que estructuralmente está conformada por tres capas (Martin y col., 1981):

- ☞ *Interna.* Es un epitelio discontinuo, orientado hacia el ovario.
- ☞ *Media.* Capa de tejido conjuntivo que contiene fibroblastos, células de músculo liso y vasos sanguíneos.
- ☞ *Externa.* Epitelio continuo que se encuentra en contacto con la cavidad peritoneal.

La cavidad que se forma entre el ovario y la bursa se denomina **cavidad bursal** (Li y col., 2007). Contiene líquido y su volumen es regulado por paquetes de células musculares lisas. Por estudios realizados con trazadores se observó que la bursa ovárica sólo permite el intercambio de sustancias entre la cavidad bursal y los vasos sanguíneos que se encuentran ubicados dentro de ella e impide la salida del líquido hacia la cavidad peritoneal (Martin y col., 1981).

En los roedores, la bursa del ovario juega un papel en el paso de los ovocitos hacia el oviducto. Según Vanderhyden y colaboradores (1986), la remoción de la bursa ovárica resulta en un menor número de ovocitos observados en el oviducto. Los fluidos en la cavidad bursal con un bajo contenido proteico, proveen a los ovocitos de un microambiente adecuado durante su tránsito hacia el oviducto (Shalgi y col., 1977).

---

## Inervación Extrínseca del Ovario

La inervación extrínseca del ovario esta compuesta en su mayoría por fibras de naturaleza simpática y sensorial, con algunas fibras parasimpáticas (Burden, 1978). En la rata, los somas de la inervación ovárica se encuentran en el ganglio celiaco (GC), el ganglio mesentérico y los nervios esplánicos lumbares. El CG, localizado en la pared ventral de la aorta abdominal (Anesetti y col., 2009), se conecta con otros nervios a través de paquetes ganglionares (Baljet y Drukker, 1980; Isomura y col., 1985).

El ovario recibe fibras nerviosas no mielinizadas (Carr, 1999). Los componentes que lo inervan son el nervio vago (NV), el plexo ovárico (PO) y el NOS (Burden, 1978; Lawrence y Burden, 1980).

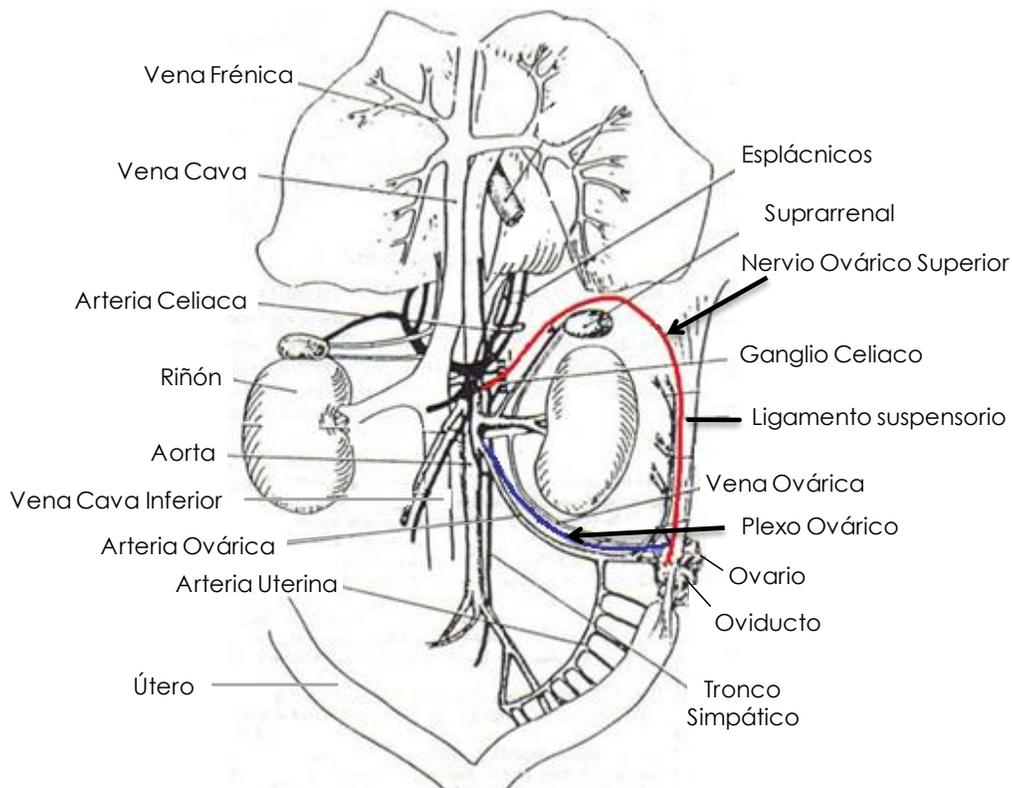
**Nervio Vago.** Es un nervio mixto que contiene en su mayoría fibras de naturaleza parasimpática (75%), así como algunas fibras sensoriales y motoras. Este paquete neural transporta acetilcolina, sustancia P (SP) y en menor proporción VIP y somatostatina. Los somas de las neuronas del NV, se localizan en el ganglio nodoso y en las células ganglionares de la raíz dorsal de los segmentos T10 a L2 (Burden y col., 1983).

**Plexo Ovárico.** Contiene en su mayoría fibras de naturaleza sensorial (Burden, 1978) que aportan al ovario SP y el péptido relacionado con el gen que codifica a la calcitonina (CGRP) (Dees y col., 1986; Klein y Burden, 1988). Algunas de sus fibras son de naturaleza simpática y transportan NA y neuropéptido Y (NPY), los cuales pueden ser sintetizados por una misma fibra. Las fibras nerviosas del PO (figura 2) corren a lo largo de la arteria ovárica (Lawrence y Burden, 1980; Dissen y Ojeda, 1999). La inervación sensorial del ovario, deriva del ganglio nodoso y del ganglio dorsal, que se localizan entre el segmento torácico caudal (T9-T11) y el segmento lumbar craneal (L2-L4) de la médula espinal (Burden, 1978; Burden, 1985).



**Nervio Ovárico Superior.** Posee axones de naturaleza simpática asociados al ligamento suspensorio (figura 2) y embebidos en una fina matriz de tejido conectivo. Aporta catecolaminas y VIP a los compartimientos ováricos. La porción simpática de la innervación ovárica se origina en los segmentos T11 a L4 de la médula espinal y hace sinapsis en los ganglios celiaco y mesentérico superior (Burden, 1978; Lawrence y Burden, 1980; Burden, 1985; Dissen y Ojeda, 1999).

Las fibras del NOS inervan el ovario, el oviducto y el útero. En el ovario, las terminaciones nerviosas del NOS se encuentran asociadas a la vasculatura, rodean a los folículos en desarrollo e inervan células de la teca y de la glándula intersticial. El cuerpo lúteo y la capa de células granulosas carecen de innervación, no obstante responden ante un estímulo catecolaminérgico, debido a la presencia de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Lawrence y Burden, 1980; Dissen y Ojeda, 1999).



**Figura 2.** Trayectoria que sigue el Nervio Ovárico Superior y el Plexo Ovárico, desde su origen en el GC, hasta su ingreso al ovario (Modificado de Lawrence y Burden, 1980).

---

## Participación de la Inervación en el Crecimiento Folicular y la Ovulación

En el ovario de la rata, el desarrollo de la inervación ocurre antes del proceso de foliculogénesis (Malamed y col., 1992). La formación de folículos se inicia cerca de la región medular del ovario, donde se localiza la mayoría de la inervación (Hirshfield, 1991). Esto ha llevado a sugerir que existe una estrecha relación entre la distribución de las fibras nerviosas y el inicio de la foliculogénesis (Dissen y Ojeda, 1999). Un estudio mostró que el estímulo NAérgico y VIPérgico es necesario para que el folículo primordial adquiera su capacidad de respuesta a las gonadotropinas e inicie su crecimiento (Mayerhofer y col., 1997).

En la rata, la pérdida de inervación simpática por la administración crónica de GTD, un neurotóxico de las neuronas simpáticas (Lara y col., 1990b), o de anticuerpos para el factor de crecimiento neural (NGF) (Lara y col., 1990a) resulta en la alteración de la población folicular total, con el incremento del número de folículos antrales pequeños y disminución de los folículos antrales grandes. El tratamiento con GTD ocasiona además, la disminución de los folículos preantrales y de la población folicular total (Lara y col., 1990b), contrario al tratamiento con anticuerpos para el NGF, que los incrementa (Lara y col., 1990a). Tales diferencias fueron atribuidas al hecho de que los anticuerpos para el NGF afectan el desarrollo de las fibras simpáticas y sensoriales (Lara y col., 1990b).

La sección bilateral del NOS en la rata prepúber (Selstam y col., 1985) o adulta (Aguado y Ojeda, 1984a), no modifica la respuesta ovulatoria. Esto llevó a los autores a sugerir que la inervación simpática de la gónada no participa en la regulación de la ovulación. Sin embargo, cuando se realiza la sección unilateral del NOS en la rata prepúber, el ovario denervado libera menor número de ovocitos (Morales y col., 1993), evento que no se restablece aún después de la administración de gonadotropinas (Morales y col., 1998), lo cual apoya la idea de que la inervación simpática modula la respuesta del folículo a las gonadotropinas. Debido a que ante la sección unilateral del NOS incrementa el número de ovocitos liberados por la gónada inervada (Morales y col., 1993), se postuló que existe una vía de comunicación neural entre los ovarios (Chávez y col., 1991; Morales y col., 1993, 1998) que podría estar dada por el NOS (Morán y col., 2005).

---

# Regulación del Proceso Esteroidogénico del Ovario

El ovario sintetiza tres clases de hormonas esteroideas sexuales: **progestinas** (pregnenolona,  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona y progesterona); **andrógenos** (androstenediona y testosterona) y **estrógenos** (estrón y  $17\beta$ -estradiol) (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Van Voorhis, 1999b; Goldfien y Monroe, 2000).

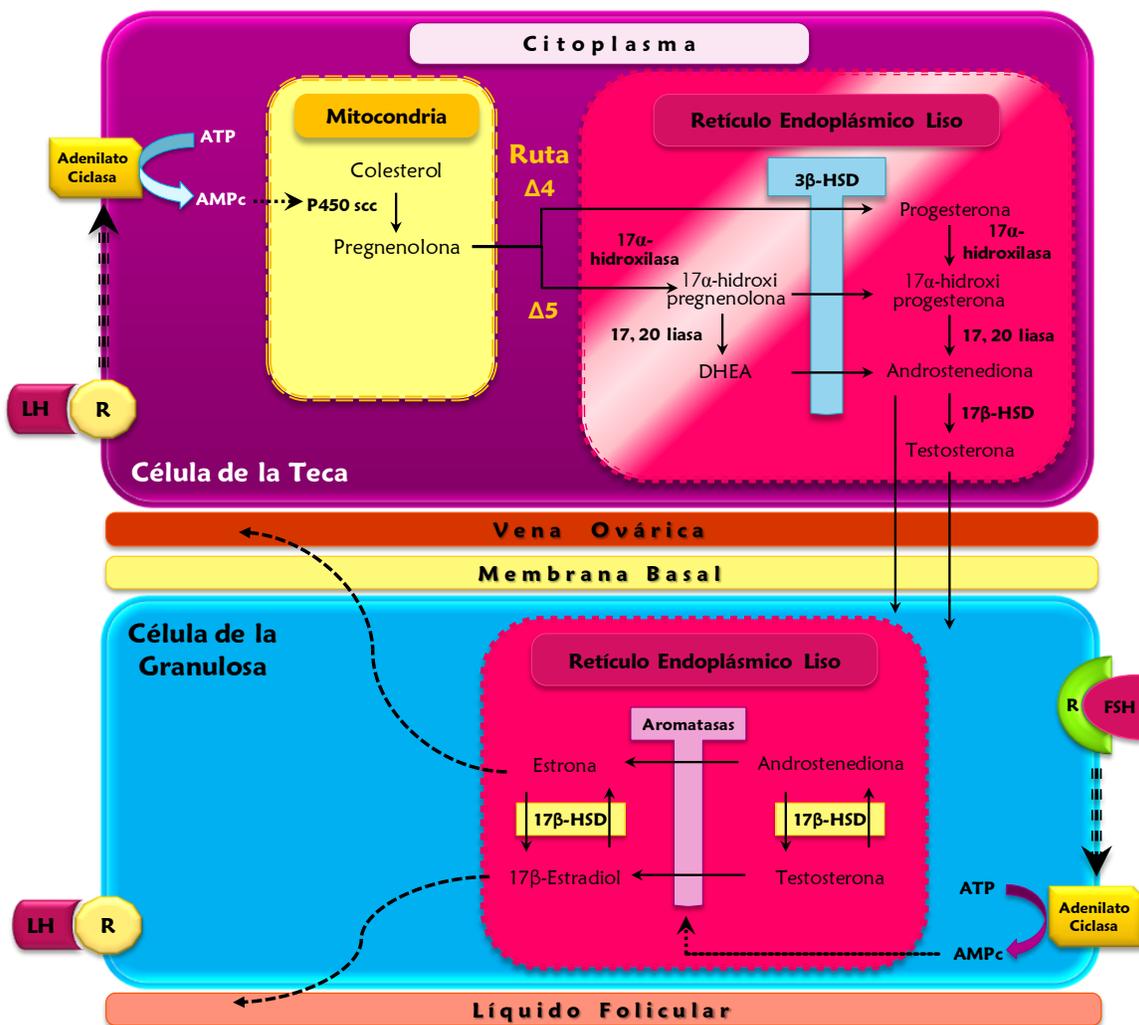
Todas las hormonas esteroideas son sintetizadas a partir del **colesterol**, compuesto de 27 átomos de carbono, que es transportado en el plasma sanguíneo por *lipoproteínas de baja densidad* (Pedernera, 1993; Gore-Langton y Armstrong, 1994; Van Voorhis, 1999b; Sánchez Criado, 1999; Goldfien y Monroe, 2000).

En la mitocondria de las células foliculares, el colesterol es convertido a pregnenolona (figura 3), por acción del citocromo P450<sub>sc</sub>, enzima que rompe la cadena lateral del colesterol (Van Voorhis, 1999b). Una vez sintetizada la pregnenolona, su metabolismo puede seguir dos vías alternas. En la primer **vía**, denominada  **$\Delta 4$**  (figura 3), la pregnenolona es convertida a progesterona por actividad de la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $3\beta$ -HSD) localizada en el retículo endoplásmico liso de las células teca, granulosa y luteales. Por lo general, esta ruta se realiza en el cuerpo lúteo (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Van Voorhis, 1999b; Sánchez-Criado, 1999).

La segunda ruta metabólica de la pregnenolona, nombrada **vía  $\Delta 5$**  (figura 3), es utilizada en su mayoría por las células de la teca, y se lleva a cabo dentro del retículo endoplásmico liso. En esta ruta, las enzimas  $17\alpha$ -hidroxilasa y la  $17, 20$  liasa convierten la pregnenolona a dehidroepiandrosterona (DHEA), que por actividad de la  $3\beta$ -HSD, será transformada posteriormente en androstenediona. Por último, la  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $17\beta$ -HSD) interviene en la conversión de la androstenediona a testosterona (Pedernera, 1993; Van Voorhis, 1999b).



Una vez que los andrógenos son sintetizados por las células de la teca interna, difunden a través de la membrana basal y son captados por las células de la granulosa, donde ingresan al retículo endoplásmico liso y por acción de las aromatasas son convertidos en estrógenos (figura 3). Posteriormente son vertidos al torrente sanguíneo de la vena ovárica o al líquido folicular (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Van Voorhis, 1999b; Sánchez-Criado, 1999).



**Figura 3.** Biosíntesis de hormonas esteroides en las células de la teca y la granulosa. R, receptor; LH, hormona luteinizante; FSH, hormona estimulante del foliculo; ATP, adenosin trifosfato; AMPc, adenosin monofosfato cíclico (Modificado de Gore-Langton y Armstrong, 1994).



El folículo dominante posee un gran número de células de la granulosa, de ahí su capacidad de secretar cerca del 90% del estradiol circulante (Van Voorhis, 1999b). En la rata, la síntesis de hormonas esteroides depende de la capacidad de biosíntesis de cada ovario, donde el izquierdo secreta mayor cantidad de progesterona (Flores y col., 2005), testosterona (Flores y col., 2006) y estradiol (Cruz y col., 2006) que el ovario derecho. Durante el ciclo estral, son las glándulas adrenales la principal fuente de progesterona, excepto en la etapa del diestro 1, donde su síntesis proviene principalmente del cuerpo lúteo (Flores y col., 2008).

Las hormonas esteroides que sintetiza el ovario ejercen diversos efectos tróficos sobre sus órganos o tejidos blanco (Sánchez-Criado, 1999). En la vagina, causan cambios cíclicos de su citología (Feder, 1981; Sánchez-Criado, 1999; Kilen y Schwartz, 1999). Así, el aumento en la concentración de estradiol que se presenta en el diestro 2 y proestro se acompaña, aunque no de manera inmediata, de la presencia de células epiteliales escamosas que corresponden a un estro vaginal. En ratas ovariectomizadas se ha observado que la administración de  $17\beta$ -estradiol induce cornificación vaginal, evento que parece requerir entre 48 y 72 horas para que el epitelio vaginal prolifere y se presenten células escamosas (Feder, 1981).

---

## Regulación Hormonal de la Esteroidogénesis

La secreción de estradiol requiere de la cooperación entre dos tipos celulares, las células de la teca y la granulosa, cuya función esteroidogénica se encuentra regulada por la acción de las gonadotropinas (Gore-Langton y Armstrong, 1994). La LH y la FSH tienen receptores transmembranales en las células foliculares. Cuando las gonadotropinas (primer mensajero) se unen a su receptor, acoplado a la proteína G, se activa la enzima adenilato ciclasa (figura 3) que induce la transformación de adenosin trifosfato (ATP) en adenosin monofosfato cíclico (AMPc). Éste último actúa como el segundo mensajero que activa la vía de la fosfoquinasa A en las células foliculares (Van Voorhis, 1999a, b; Arias, 2003).

En células de la teca, la LH activa su receptor y con ello aumenta la recaptura del colesterol y la actividad enzimática, lo que favorece una mayor síntesis de progesterona y andrógenos (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Van Voorhis, 1999a, b; Yeh y Adashi, 2001). A partir del estadio primario, las células de la granulosa expresan receptores a FSH y su activación favorece la transcripción y síntesis de las aromatasas (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Van Voorhis, 1999a, b).

La acción conjunta del estradiol y la FSH sobre las células de la granulosa del folículo preovulatorio, estimula la formación de receptores a LH, lo que aumenta la sensibilidad del folículo al “pico” preovulatorio de la gonadotropina (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Van Voorhis, 1999a, b; Carlson, 2009).

---

## Participación de la Inervación en la Regulación de la Esteroidogénesis

El VIP y la NA son dos neurotransmisores que estimulan la esteroidogénesis del ovario (Dissen y Ojeda, 1999). La activación de los receptores Vipérgicos incrementa la secreción de progesterona, andrógenos y estradiol (Ahmed y col., 1986; Parra y col., 2007), a diferencia de la noradrenalina que sólo estimulan la secreción de progesterona y de andrógenos (Aguado y Ojeda 1984b; Dyer y Erickson, 1985; Barria y col., 1993).

El grupo de Weiss (1982) mostró que en la rata adulta, la estimulación eléctrica del NOS inhibe la secreción de progesterona a través de la activación de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, contrario a lo que sucede al activar los receptores  $\beta$ , que la incrementan.

Cuando las células de la granulosa o las tecales-intersticiales son cultivadas en presencia de un agonista  $\beta$ -adrenérgico, la secreción de progesterona y androstenediona (Aguado y Ojeda, 1984b; Dyer y Erickson, 1985) incrementa, sólo cuando estas células son preincubadas con gonadotropinas. Estas evidencias apoyan la idea de que las catecolaminas modulan la respuesta de las células de foliculares a las gonadotropinas (Domínguez y col., 1991; Dissen y Ojeda, 1999).

La sección unilateral (Chávez y col., 1994) o bilateral del NOS (Aguado y Ojeda, 1984b) disminuye la concentración de NA en el ovario, evento que altera la concentración sérica de hormonas esteroides en suero (Aguado y Ojeda, 1984a; Morán y col., 2000).

La estimulación *in vitro* del GC con agentes colinérgicos o adrenérgicos modula de forma diferente la secreción de progesterona, androstenediona y estradiol durante el ciclo estral de la rata (Sosa y col., 2004; Delgado y col., 2010).



## Secreción, Metabolismo y Excreción de las Hormonas Esteroides

La naturaleza lipofílica de las hormonas esteroides provoca que una vez sintetizadas, no sean almacenadas por mucho tiempo y difundan a través de la membrana celular hacia el torrente sanguíneo de la vena ovárica (Tresguerres, 1999). Una vez secretadas, las hormonas circulan por el plasma unidas a proteínas transportadoras específicas o no específicas (albúmina). Estas proteínas cumplen dos funciones: solubilizan las sustancias lipoides en el plasma y permiten la creación de una especie de “reserva circulante”, ya que las hormonas unidas a una proteína transportadora no son biológicamente activas pero tampoco son metabolizadas (Tresguerres, 1999; Greenspan y Strewler, 2000).

El estradiol y la testosterona se unen principalmente a la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG). La síntesis de la SHBG en el hígado es estimulada por el estradiol e inhibida por la testosterona. La progesterona también es transportada por la SHBG, aunque su afinidad es mayor por la globulina fijadora de corticosteroides (Greenspan y Strewler, 2000).

El ovario y las adrenales son las principales glándulas productoras de hormonas esteroides, aunque parte de los andrógenos y estrógenos pueden formarse a partir de la conversión periférica de precursores esteroideos (Greenspan y Strewler, 2000). La concentración total de las hormonas en la circulación sanguínea es el resultado de: 1) el proceso secretor que realiza la glándula, 2) la síntesis que ocurre en otros sitios a partir de precursores circulantes y 3) la hormona que se obtiene de sus posibles transformaciones metabólicas (Tresguerres, 1999; Greenspan y Strewler, 2000).

La degradación metabólica de las hormonas esteroides ocurre por medio de enzimas que realizan procesos de oxidación-reducción o de adición de grupos funcionales. El hígado es el lugar donde se lleva a cabo el metabolismo de prácticamente todas las hormonas, donde son conjugadas con el ácido glucorónico y con grupos sulfato. En el hígado, la progesterona es metabolizada hasta pregnandiol, mientras que el estradiol y la estrona, son convertidos a estriol, una forma casi inactiva (Guyton, 1986; Greenspan y Strewler, 2000). Una vez que las hormonas esteroides son convertidas a una forma biológicamente inactiva, la gran mayoría son eliminadas por la orina y el resto por medio de la bilis (Guyton, 1986; Tresguerres, 1999).

---

## Participación del Péptido Intestinal Vasoactivo en la Regulación de las Funciones Gonadales

El VIP está conformado por 28 aminoácidos (Said y Mutt, 1970). Tiene diversos efectos biológicos como la vasodilatación, la relajación del músculo liso gastrointestinal y la estimulación de la secreción de hormonas pancreáticas, adenohipofisarias (Onoue y col., 2008) y ováricas (Davoren y Hsueh, 1985; Ahmed y col., 1986).

Las fibras VIPérgicas se han observado en estructuras del sistema nervioso central como el hipotálamo, la adenohipófisis y el sistema porta-hipofisario (Besson y col., 1979; Said y Porter, 1979), así como en el tracto genital femenino en asociación con vasos sanguíneos, el estroma ovárico y el útero (Larsson y col., 1977; Alm y col., 1980a, b).

Los efectos del VIP sobre sus células blanco son mediados a través de su interacción con dos tipos de receptores, el VPAC1 (Ishihara y col., 1992) y el VPAC2 (Lutz y col., 1993). Ambos, son receptores transmembranales acoplados a la proteína G (Laburthe y col., 1996) que activan la vía del adenilato ciclasa e inducen la producción de AMPc (figura 4) (Vaccari y col., 2006; Onoue y col., 2008).

Los receptores VIPérgicos se expresan en el ovario de la rata desde la etapa neonatal y varían a lo largo del desarrollo del animal (Vaccari y col., 2006). En el folículo ovárico, el receptor VPAC1 se localiza en células teco-intersticiales, en tanto que el VPAC2 tiene una mayor distribución sobre la pared folicular, al presentarse tanto en el estrato granuloso (Gras y col., 2000; Vaccari y col., 2006) como en las células teco-intersticiales (figura 4) (Vaccari y col., 2006).



En el ovario, el VIP tiene un doble origen: el intrínseco, sintetizado de manera local (Gozes y Tsafiriri, 1986; Hulshof y col., 1994) y el extrínseco, que proviene de fibras nerviosas simpáticas que ingresan a la gónada (Dees y col., 1986). La expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) del VIP en los ovarios de ratas juveniles evidencia la síntesis local del péptido en la gónada (Gozes y Tsafiriri, 1986). Algunos autores han descartado que provenga de fibras VIPérgicas intrínsecas dada su ausencia dentro de ganglios ováricos (Ahmed y col., 1986). No obstante, es posible que el VIP sea sintetizado en otro tipo celular y no propiamente en neuronas. Por estudios realizados en ovarios bovinos se observó que las células de la granulosa de folículos preovulatorios sanos presentan inmunoreactividad al VIP, lo que podría indicar que el estrato granuloso es el sitio de síntesis del péptido (Hulshof y col., 1994).

Las fibras VIPérgicas que recibe el ovario son aportadas en su mayoría por el NOS. En 1986, el grupo de Dees mostró que al realizar la sección bilateral del NOS, las fibras positivas al VIP desaparecen en su totalidad, a diferencia de lo que ocurre ante la sección bilateral del NV o del PO, que no modifican la cantidad de tales fibras en el ovario. Sin embargo, no descartan que algunas fibras vagales transporten al neuropéptido, tal y como ha sido mostrado (Said y Rosenberg, 1976) y que posiblemente su baja densidad en el NV sea la razón de que no hayan sido detectadas por técnicas de inmunohistoquímica (Dees y col., 1986).

En la rata, las fibras VIPérgicas se encuentran alrededor de folículos preantrales y antrales asociadas a la capa tecal y a la glándula intersticial (Ahmed y col., 1986). En el caso de las aves, el compartimiento tecal del ovario de gallina, recibe proyecciones tanto en la capa externa como interna, en tanto que el estrato granuloso carece de tal inervación (Johnson y col., 1994). Asimismo, las fibras VIPérgicas se encuentran frecuentemente asociadas con la túnica adventicia de las vénulas y ocasionalmente se observan próximas a pequeñas arterias (Ahmed y col., 1986).

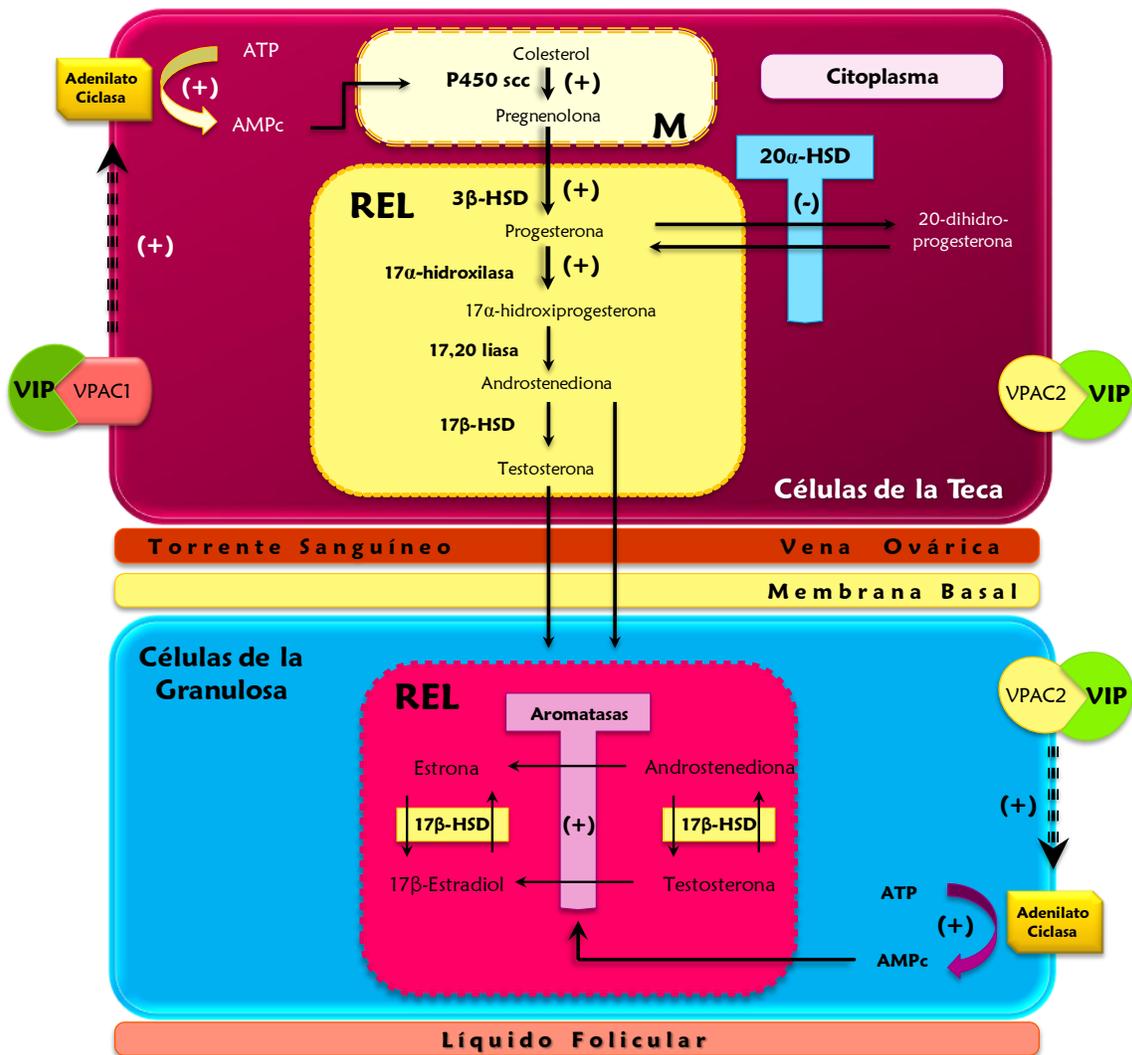


El empleo de modelos *in vivo* e *in vitro*, ha permitido analizar la participación del VIP como un potente estimulador de la esteroidogénesis. En la coneja, la administración intravenosa de VIP estimula un rápido incremento en la concentración plasmática de progesterona (Fredericks y col., 1983). Cuando se cultivan células de la granulosa de ovarios de ratas juveniles en presencia de VIP, incrementa la síntesis de progestinas y estradiol de manera dosis-dependiente (Davoren y Hsueh, 1985). En tanto que, las células tecales de folículos preovulatorios del ovario de gallina, responden al estímulo VIPérgico produciendo androstenediona (Tilly y Johnson, 1989).

La participación del VIP en la regulación de la esteroidogénesis ovárica es el resultado del efecto que ejerce sobre la actividad enzimática (figura 4) donde:

- ∞ Incrementa la actividad del **complejo enzimático P450<sub>scc</sub>**, enzima limitante en la biosíntesis de esteroides ováricos, que cataliza la conversión de *colesterol* a *pregnenolona* (Trzeciak y col., 1986; Johnson y col., 1994).
- ∞ Estimula una mayor actividad de la enzima **3β-HSD** y disminuye la actividad de la 20α-hidroxiesteroide deshidrogenasa (**20α-HSD**) (Davoren y Hsueh, 1985). La 20α-HSD reduce los compuestos de 21 carbonos a sus correspondientes derivados 20-hidroxi, por lo que transforma la progesterona en 20α-hidroxiprogesterona (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Greenwald y Roy, 1994). Tales eventos en conjunto, dirigen la biosíntesis de hormonas esteroides hacia una mayor producción de *progesterona* (Davoren y Hsueh, 1985).
- ∞ Favorece el aumento del ARNm que codifica para la enzima **17α-hidroxilasa**, evento que se acompaña de una mayor biosíntesis de *androstenediona* (Johnson y col., 1994).

Estimula la actividad de las **aromatasa**s (George y Ojeda, 1987) lo que conlleva al aumento de *estradiol* (Ahmed y col., 1986; Parra y col., 2007).



**Figura 4.** Efectos del VIP sobre las células de la teca y la granulosa. La unión del VIP a su receptor VPAC1 o VPAC2 estimula (+) o inhibe (-) la actividad de ciertas enzimas que participan en la esteroidogénesis ovárica. M, mitocondria; REL, retículo endoplásmico liso; ATP, adenosin trifosfato; AMPc, adenosin monofosfato cíclico.



En la rata, la formación de los folículos ocurre en las primeras 36 horas de vida postnatal (Rajah y col., 1992; Malamed y col., 1992). Los folículos primordiales recién formados comienzan a crecer y experimentan un proceso de diferenciación durante el cual adquieren receptores a gonadotropinas y su capacidad de responder a las mismas (Smith-White y Ojeda, 1981; Richards y col., 1987; Hirshfield, 1991). El grupo de Mayerhofer en 1997 mostró que en ovarios de ratas neonatas de dos días de edad, el VIP y la NA contribuyen en la diferenciación de los folículos primordiales al inducir la formación de receptores a FSH, los cuales son biológicamente activos dada su capacidad para estimular la síntesis de AMPc.

Por estudios morfológico y bioquímico de folículos antrales y células de la granulosa aisladas en presencia de VIP (Flaws y col., 1995; Cecconi y col., 2004; Vaccari y col., 2006), se ha mostrado que el péptido tiene un papel antiapoptótico y antiatretogénico. El grupo de Flaws (1995) mostró que la acción del VIP como inhibidor de la apoptosis (muerte celular programada) es mediado por la activación de la vía del AMPc y sugirieron que su acción regula las endonucleasas apoptóticas que son las responsables de la ruptura del ADN.

Algunas evidencias indican que el VIP posiblemente favorece el riego sanguíneo del ovario y por ende la exposición del folículo preovulatorio a las gonadotropinas, tales como: la presencia de fibras nerviosas VIPérgicas (Ahmed y col., 1986; Schmidt y col., 1990) y de receptores a VIP alrededor de los vasos sanguíneos (Vaccari y col., 2006), la síntesis del VIP por células de la granulosa de folículos preovulatorios (Hulshof y col., 1994) y su efecto vasodilatador (Said, 1980). Asimismo, se ha sugerido que el VIP participa en los eventos previos al proceso ovulatorio. El VIP estimula la maduración del ovocito (Tornell y col., 1988) e incrementa la síntesis del activador del plasminógeno en el complejo cúmulo-ovocito y en el estrato granuloso (Liu y col., 1987). Cuando los ovarios de ratas prepúberes



mantenidos *in vitro*, son perfundidos con VIP se induce la ovulación en el 100% de los ovarios, aunque el número de ovocitos liberados resulta ser menor que el estimulado por la LH (Schmidt y col., 1990).

La acción del VIP en las funciones del ovario es mediada por el sistema del segundo mensajero AMPc-proteína kinasa A (Davoren y Hsueh, 1985; George y Ojeda, 1987; Johnson y col., 1994; Romero y col., 2002). Al cultivar células de la granulosa con VIP y un inhibidor de la fosfodiesterasa (enzima que degrada el AMPc), se prolonga la presencia de AMPc y con ello se potencializa el efecto del VIP en la esteroidogénesis (Davoren y Hsueh, 1985).



## Síndrome del Ovario Poliquístico

El síndrome del ovario poliquístico (SOPQ) es un desorden endocrino y metabólico que afecta del 6 al 10% de la población femenina en edad reproductiva (Hoyt y Schmidt, 2004; Tsilchorozidou y col., 2004). Se caracteriza por infertilidad, irregularidad del ciclo menstrual, hiperandrogenismo, alteraciones en la ovulación, formación de quistes foliculares, una mayor concentración de LH y menor o normal de FSH (Malacara, 1990; Franks y col., 2000; Yen, 2001; Franks, 2005). En las pacientes con SOPQ se incrementa el riesgo de desarrollar dislipidemia, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia y cáncer endometrial, ovárico o de mama (Yen, 2001; Hoyt y Schmidt, 2004; Franks, 2005).

Para el estudio de la fisiopatología del SOPQ se han desarrollado diversos modelos experimentales (Singh, 2005), cada uno de los cuales ha permitido evaluar diferentes aspectos de la patología del SOPQ que se observan en la mujer.

El uso de andrógenos como el propionato de testosterona induce el desarrollo del ovario poliquístico (OPQ), sin embargo su efecto depende de la edad del animal, ya que el OPQ únicamente se desarrolla cuando los animales son inyectados a los 9 días de vida. En este modelo experimental no se modifica la concentración de FSH, estradiol o testosterona en suero (Tamura y col., 2005). El grupo de Manneras (2007) utilizó el modelo del animal androgenizado con dihidrotestosterona (DHT, andrógeno no aromatizable) o tratado con letrozol (inhibidor de las aromatasas) y observó que en ambos casos se desarrolla el OPQ que se acompaña de una condición de diestro constante, baja concentración de progesterona, sin modificación de estradiol en suero y donde sólo la inyección de letrozol resulta en el incremento de testosterona. Aún cuando en el animal con SOPQ, inducido por la inyección de DHT, no presenta hiperandrogenismo o hiperestrogenismo, este modelo animal ha sido utilizado debido a que en él se han observado alteraciones metabólicas tales como el incremento en la concentración de insulina plasmática y la resistencia a la insulina,

---

que se acompañan de una acumulación de tejido adiposo subcutáneo e intraabdominal (Manneras y col., 2007).

Otro de los modelos utilizados para el estudio del SOPQ es el del animal expuesto a luz constante y el del animal tratado con ACTH (hormona adenocorticotrópica) (Baravalle y col., 2007). Ambos modelos han sido utilizados para evaluar la participación del estrés en el desarrollo del OPQ. El grupo de Baravalle (2007) mostró que la inyección crónica de ACTH no induce la morfología del OPQ, a diferencia de lo que ocurre cuando los animales son expuestos a luz constante donde la morfología del ovario se caracteriza por la presencia de quistes foliculares, hiperplasia de la glándula intersticial y ausencia de cuerpos lúteos. En estos animales disminuye la concentración de gonadotropinas y testosterona en suero, sin modificar progesterona ni estradiol.

En la mujer, una de las características del SOPQ es la falta de ovulación. En el laboratorio uno de los modelos que más se asemeja es en el que se induce el síndrome por la administración del valerato de estradiol (VE) (Brawer y col., 1986), un estrógeno de larga actividad que tiene vida media de 15 días (Rosa-E-Silva y col., 2003). Estos animales se caracterizan por presentar concentraciones variables de gonadotropinas (Schulster y col., 1984; Brawer y col., 1986), elevada concentración de estradiol y andrógenos, que se acompañan de la formación de quistes foliculares, anovulación y alteración del ciclo estral, con periodos prolongados de estro (Barria y col., 1993; Lara y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003; Rosas, 2006; Morales-Ledesma y col., 2010). En este modelo animal no se desarrollan alteraciones metabólicas (Stener-Victorin y col., 2005; Sotomayor-Zárate y col., 2008).

En la rata se ha sugerido que el SOPQ resulta de una mayor actividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario, vía el NOS. Esto es evidenciado por el incremento en la capacidad de las terminales nerviosas para incorporar y liberar NA (Lara y col., 1993), así como por mayor contenido del neurotransmisor en el ovario (Barria y col., 1993; Lara y



col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003). Tales alteraciones preceden la formación de quistes foliculares (Lara y col., 1993). Cuando los animales con SOPQ son sometidos a la sección bilateral del NOS, se normaliza el ciclo estral, la ovulación y la esteroidogénesis (Barria y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003). Sin embargo, al realizar la sección unilateral del NOS, se restablece la ovulación en el ovario inervado, lo que no sucede en el denervado, que mantiene su condición quística aun cuando el contenido de noradrenalina ha disminuido significativamente (Morales-Ledesma y col., 2010).

En la rata adulta tratada con VE, se incrementa el contenido de NGF (Lara y col., 2000; Stener-Victorin y col., 2000; Parra y col., 2007) y su receptor de baja afinidad, el p75 (Lara y col., 2000). En estos animales, al bloquear la acción del NGF mediante anticuerpos, se restablece el ciclo estral así como la población de folículos antrales sanos, disminuye la presencia de prequistes y quistes foliculares, y se observan nuevamente cuerpos lúteos, estructura indicativa del restablecimiento de la función ovulatoria (Lara y col., 2000). El grupo de Dissen (2000) mostró que en la rata intacta la inyección en el ovario de células modificadas genéticamente para producir NGF, resulta en la alteración del ciclo estral, caracterizado por un mayor número de días en estro, se forman prequistes, disminuye la población de folículos antrales sanos, se observan quistes (aunque su número es semejante al del control) e incrementa la síntesis de androstenediona. Estas evidencias llevaron a sugerir que en la rata, el incremento intraovárico de NGF es suficiente para iniciar algunas de las alteraciones estructurales y funcionales que caracterizan al SOPQ (Dissen y col., 2000; Lara y col., 2000).

El mecanismo por el que se ha explicado que el NGF, sintetizado en las células de la teca (Dissen y col., 1996), induce la hiperactividad de las fibras simpáticas (Dissen y col., 2000; Lara y col., 2000) es el siguiente: el NGF se une a su receptor transmembranal, el p75, localizado en el botón terminal de las células nerviosas (Anesetti y col., 2009). Localmente, el NGF inicia una serie de reacciones bioquímicas y envía información de



manera retrógrada hasta el núcleo del soma neuronal (Ye y col., 2003), que se encuentra en el GC (Dissen y Ojeda, 1999). Estas señales modifican la expresión de genes que codifican para ciertas proteínas (Campenot y MacInnis, 2004) como la tiroxina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la biosíntesis de NA. Una mayor influencia neurotrófica favorece el desarrollo del SOPQ al incrementar la actividad de las fibras simpáticas (Lara y col., 2000; Greiner y col., 2005).

En la rata con el SOPQ, repetidos tratamientos de electro-acupuntura en los segmentos somáticos que corresponde a la inervación de los ovarios (T12-L2, S2-4), disminuyen la concentración ovárica de NGF y la hiperactividad de las fibras simpáticas, aunque no modifican la morfología de la gónada (Stener-Victorin y col., 2000).

En el animal con SOPQ, la sección unilateral (Morales-Ledesma y col., 2010) o bilateral del NOS (Rosa-E-Silva y col., 2003) disminuye la concentración de estradiol en plasma, contrario a lo que sucede ante la denervación catecolaminérgica con GTD, donde la concentración del estrógeno se mantiene elevada (Ruíz y col., 2008). El grupo de Parra (2007) recientemente mostró que 60 días después de la administración de VE, incrementa el contenido ovárico de VIP, lo que llevó a los autores a sugerir que en la rata, el SOPQ se encuentra asociado a una mayor actividad de las fibras VIPérgicas.

Estas evidencias apoyan la idea de que el VIP puede ser otro de los factores que participan en el desarrollo del SOPQ. A fin de evaluar la participación del neuropéptido en la regulación de la esteroidogénesis ovárica de la rata con el síndrome, en el presente estudio se eliminó el aporte de NA y VIP al ovario, mediante la sección unilateral del NOS, e inmediatamente se le estimuló con VIP.

---

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Evidencias experimentales han permitido esclarecer algunos de los componentes neuroendocrinos del síndrome del ovario poliquístico, aunque su etiología permanece desconocida. Con base en la información disponible, parece claro que su iniciación y persistencia pueden ser determinadas por una variedad de factores interrelacionados tales como el hiperandrogenismo, las elevadas concentraciones de estrógenos y la hiperactividad de las fibras simpáticas que arriban a la gónada.

Dos de los neurotransmisores que participa en la regulación de la esteroidogénesis ovárica son la NA y el VIP. Ambos son sintetizados por las fibras nerviosa del NOS. En el modelo del animal con SOPQ, inducido por la inyección de valerato de estradiol, la sección bilateral del NOS restablece la biosíntesis de hormonas esteroides, contrario a lo que sucede al realizar la destrucción selectiva de las fibras catecolaminérgica con GTD, donde se mantiene la elevada concentración de estradiol que caracteriza al animal con esta patología.

Recientemente se observó que en el ovario de los animales con SOPQ, el contenido de VIP es mayor al de un animal sin la patología y al cultivar la gónada en presencia del péptido, se amplifica la esteroidogénesis. Estas evidencias apoyan la idea de que en la rata, el VIP puede ser otro factor que participa en el desarrollo del síndrome. Con la finalidad de evaluar el papel del VIP en la esteroidogénesis del animal con SOPQ, en el presente estudio se analizaron los efectos de privar al ovario del aporte NAérgico y VIPérgico, mediante la sección unilateral del NOS, y de manera inmediata exponerlo únicamente al estímulo con VIP.



# HIPÓTESIS

Si el desarrollo del síndrome del ovario poliquístico en la rata se encuentra asociado a la hiperactividad VIPérgica, entonces, al eliminar estas fibras de uno de los ovarios, por la sección del nervio ovárico superior, y reemplazar de manera inmediata la señal VIPérgica con la inyección del neurotransmisor en la bursa del ovario denervado, se favorecerá la biosíntesis de hormonas esteroideas, evento que dependerá de la integridad de la inervación del ovario.

---

# OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos de la estimulación VIPérgica del ovario con Sección del Nervio Ovárico Superior, en el modelo de la Rata con Síndrome del Ovario Poliquístico.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- ✎ Analizar los efectos de la inyección de VIP en la bursa ovárica de animales en diestro 1, diestro 2, proestro o estro, sobre la secreción de hormonas esteroides y gonadotropinas, a las 24 horas de la cirugía.
- ✎ Evaluar los efectos del estímulo VIPérgico del ovario de animales en proestro, sobre la respuesta ovulatoria.
- ✎ Analizar en la rata con SOPQ, inducido por la inyección de VE, los efectos de la sección unilateral del NOS, sobre la concentración sérica de progesterona, testosterona y estradiol, a las 24 horas de la cirugía.
- ✎ En el modelo del animal adulto con SOPQ, evaluar los efectos de la sección unilateral del NOS seguido de la estimulación VIPérgica de la gónada denervada, sobre la concentración sérica de progesterona, testosterona y estradiol, a las 24 horas del procedimiento quirúrgico.
- ✎ Corroborar por la morfología ovárica, la inducción del síndrome del ovario poliquístico.

---

# MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras de la cepa CII-ZV mantenidas en condiciones controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e iluminación, con 14 horas de luz por 10 horas de oscuridad (luces encendidas de las 05:00 a las 19:00 horas). Durante el desarrollo de la parte experimental, se siguieron las normas establecidas por la Ley Mexicana de Protección Animal para el Uso de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio).

## Disño Experimental

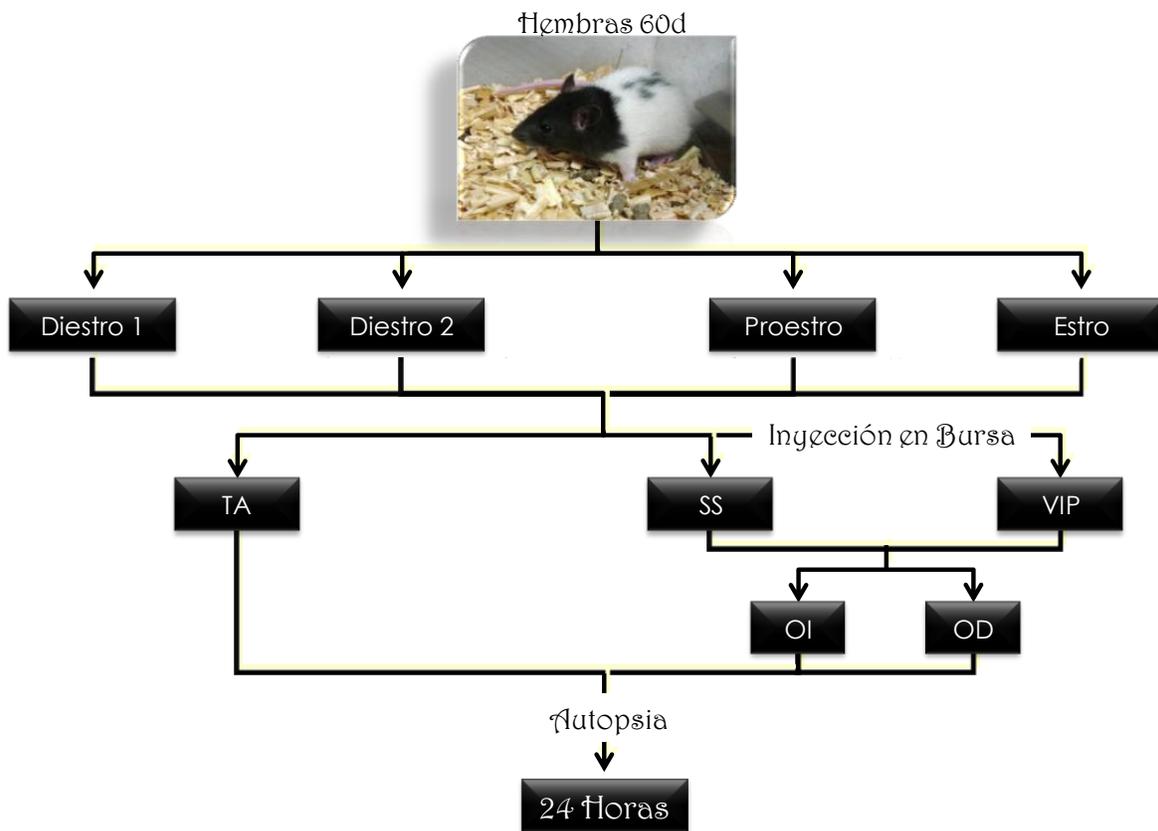
Los animales fueron divididos al azar en diferentes grupos experimentales, cada uno de los cuales está conformado por 10 a 12 animales. Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo anestesia con éter, entre las 10:30 y 11:30 horas. Los animales fueron sacrificados a las 24 horas de la cirugía.

La solución utilizada de VIP (Sigma Chemical Co., St Louis Mo. USA) se preparó en una concentración de  $10^{-8}$  M (0.1 mg de VIP disueltos en 30 ml de solución salina 0.9% NaCl), de la cual se administraron  $20 \mu\text{l}$  en la bursa ovárica. La finalidad de utilizar esta concentración fue evitar la sobre-estimulación del ovario, razón por la cual fue ligeramente mayor que la concentración plasmática basal (Ottesen, 1983).

El VE (Sigma Chemical Co., St Louis Mo. USA) fue inyectado vía intraperitoneal i.p en una concentración de 2.0 mg disueltos en 0.1 ml de aceite de maíz (Vh).

## Efecto de la Inyección unilateral de VIP en los Ovarios de Ratas en cada día del Ciclo Estral

El ciclo estral de hembras adultas vírgenes, de 60 días de edad, fue monitoreado por la examinación citológica de los frotis vaginales diarios. Los animales utilizados en este estudio fueron los que mostraron al menos dos ciclos estrales consecutivos de cuatro días.



**Figura 5.** Esquema que muestra los grupos experimentales utilizados para evaluar los efectos de la estimulación VIPérgica del ovario de animales en cada día del ciclo estral. TA, testigo absoluto; SS, solución salina; VIP, péptido intestinal vasoactivo; OI, ovario izquierdo; OD, ovario derecho.

Animales en diestro 1 (D1), diestro 2 (D2), proestro (P) o estro (E) fueron anestesiados con éter y sometidos a una incisión dorso-lateral de piel, músculo y peritoneo. Se

---

exteriorizó uno de los ovarios, el izquierdo (OI) o derecho (OD), y se procedió a realizar la microinyección de VIP en la bursa ovárica (figura 5), siguiendo el procedimiento habitual del laboratorio (Domínguez y col., 1998). Para ello, con una jeringa de 50 unidades (500  $\mu$ l) se administraron 20  $\mu$ l de una solución de  $10^{-8}$  M de VIP. La aguja se mantuvo dentro de la bursa durante un minuto, asegurando de esta forma que el péptido difundiera al tejido ovárico. Transcurrido este tiempo se retiró la aguja, el ovario se regresó a la cavidad abdominal y se suturó la herida.

Como grupos de comparación se utilizaron animales testigo absoluto (TA) o animales que a los 60 días de edad fueron inyectados con 20  $\mu$ l de solución salina (SS) en la bursa ovárica (figura 5). La microinyección de VIP o SS se realizó en uno de los ovarios (izquierdo o derecho) de cada animal.

La respuesta ovulatoria fue evaluada únicamente en los animales que se inyectaron en el día del proestro y se sacrificaron a las 24 horas, que corresponden al día del estro.

## **Efecto de la Inyección de VIP en la Bursa del Ovario**

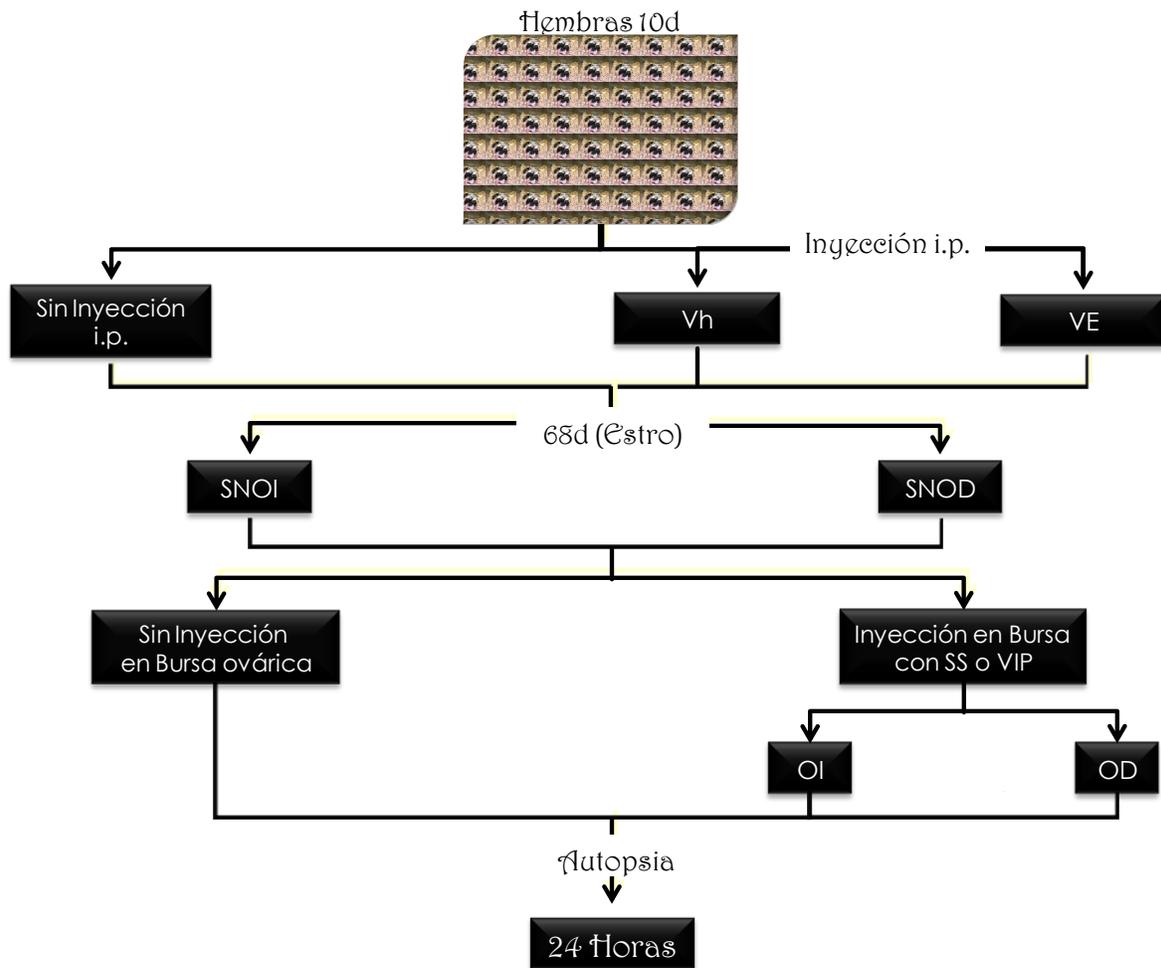
### **Denervado de Animales con SOPQ**

Se utilizaron hembras neonatas que al momento del nacimiento (día cero) fueron separadas en función del sexo y colocadas en camadas de cinco hembras y un macho. Las crías tuvieron libre acceso a la madre hasta los 24 días de vida (día del destete) y posteriormente al agua y al alimento, hasta el día de la autopsia.

Hembras de 10 días de edad fueron inyectadas vía i.p con una dosis de VE (2.0mg/0.1 ml). Como grupos de comparación se utilizaron animales TA o animales que a los 10 días de edad fueron inyectados vía i.p. con 0.1 ml de aceite de maíz (Vh) (figura 6).



En los animales tratados con VE, el monitoreo de la canalización vaginal se inició un día después de la fecha de inyección del estrógeno. Para el caso de las hembras TA o Vh, la apertura vaginal se verificó a partir del día 30 de edad. Una vez ocurrida la canalización de la vagina, el ciclo estral fue evaluado mediante la toma de frotis vaginal diario por un periodo de ocho días, equivalente a dos ciclos estrales. A los 60 días de edad se reinició la toma de frotis.



**Figura 6.** Grupos experimentales utilizados para evaluar los efectos de la estimulación con VIP del ovario denervado de animales con SOPQ. Vh, vehículo; VE, valerato de estradiol; SNOI, sección del nervio ovárico superior izquierdo; SNOD, sección del nervio ovárico superior derecho; SS, solución salina; VIP, péptido intestinal vasoactivo; OI, ovario izquierdo; OD, ovario derecho

---

Cuando los animales presentaron un estro vaginal, fueron sometidos a la sección del NOS izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) (figura 6). Para ello, las ratas fueron anestesiadas con éter y posteriormente se les realizó una incisión dorso-lateral (izquierda o derecha) de piel, músculo y peritoneo, se exteriorizó el ovario, se identificó el ligamento suspensorio y se seccionó el NOS a una distancia de aproximadamente 1 cm. de la gónada. Seguido de la denervación simpática y en el mismo acto quirúrgico, se inyectaron 20  $\mu$ l de VIP ( $10^{-8}$  M) en la bursa del ovario denervado (figura 6). El ovario se regresó a la cavidad peritoneal y se suturó la herida.

Como grupos de comparación se utilizaron (figura 6):

- \* Animales TA o inyectados a los 10 días de edad con Vh o VE, y sacrificados a los 68 días de vida, en el día del diestro.
- \* Hembras que fueron o no inyectadas a los 10 días de edad con Vh o VE, a las que se les realizó la sección unilateral del NOS a los 68 días de edad.

La sección del NOS se realizó en uno de los ovarios (izquierdo o derecho) de cada animal y se inyectó VIP o SS en la bursa del ovario denervado. Todas las cirugías se llevaron a cabo en animales en estro.

## Procedimiento de Autopsia

Todos los animales se pesaron y se sacrificaron por decapitación. La sangre del tronco fue colectada en tubos de ensaye y se dejó coagular por 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 3500 gravedades durante 15 minutos. Posteriormente el suero fue separado del botón celular y se dividió en cinco alícuotas de 150 $\mu$ l que inmediatamente se conservaron a -20 °C hasta el momento de la cuantificación de hormonas esteroideas y gonadotropinas por radioinmunoanálisis (RIA).



Los ovarios, el útero y las glándulas adrenales se disecaron y pesaron (peso húmedo) en balanza analítica. El tejido graso de los oviductos fue removido y mediante el uso de un microscopio estereoscópico se examinó la presencia de ovocitos y se realizó el conteo de los mismos.

## Histología del Ovario

Cinco ovarios por cada grupo experimental fueron fijados en solución de Bouin durante 6 horas, deshidratados en alcohol (80%, 96% y absoluto) y cloroformo e incluidos en parafina. Posteriormente se realizaron los cortes histológicos de manera seriada a 10  $\mu$ m de grosor y se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina.

En los cortes histológicos se analizó la presencia de cuerpos lúteos, folículos atrésicos, prequistes y quistes foliculares. Como **folículos atrésicos** se consideraron aquellos que presentaron al menos una de las siguientes características: picnosis nuclear de las células de la granulosa, descamación de éstas en la cavidad antral e hiperplasia de las capas celulares de la teca (Greenwald y Roy, 1994).

Los **quistes foliculares** se definieron como aquellos folículos con una cavidad antral amplia, disminución de las capas de células de la granulosa, hiperplasia tecal y ausencia de ovocito (Brawer y col., 1986; Lara y col., 2000).

Se consideraron como **prequistes (folículos tipo III)** aquellos folículos grandes que presentan o no ovocito y que contienen de cuatro a cinco capas de células de la granulosa y una teca aparentemente normal, con invaginaciones y evaginaciones de la pared folicular (Lara y col., 2000). De acuerdo con los autores, los prequistes representan un estadio transitorio entre el folículo preovulatorio normal y el quiste folicular.

---

# Cuantificación de Hormonas Esteroides y Peptídicas en Suero

La concentración sérica de **hormonas esteroides** (progesterona, testosterona y estradiol) se cuantificó en suero mediante la técnica de **RIA de fase sólida**, con un kit Coat-A-Count (Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA). En tubos de polipropileno impregnados con un anticuerpo específico (anti-progesterona, anti-estradiol, anti-testosterona), se adicionaron 100µl de la muestra problema (excepto para la cuantificación de testosterona, donde sólo se adicionaron 50µl) y 1 ml de la hormona radioactiva ( $I^{125}$ ). Para incrementar la velocidad de reacción, la mezcla se agitó en un vortex durante un minuto y se incubó por tres horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la muestra se decantó, se retiró el sobrenadante y los tubos se colocaron en un contador de centelleo (modelo Cobra 5005, Packard™) para la determinación de la concentración de la hormona en la muestra problema, en función de las cuentas por minuto y de una curva de calibración. La concentración de progesterona fue expresada en ng/ml de suero, en tanto que la de testosterona y estradiol se expresó en pg/ml de suero.

Los coeficientes de variación intra e interespecíficos para progesterona fue de 8.35 y 9.45%, para testosterona de 9.65 y 10.2%, y para estradiol de 8.12 y 9.28%. La sensibilidad del análisis fue de 0.02 ng/ml para progesterona, de 0.04 ng/ml para testosterona y de 8 pg/ml para estradiol.



La cuantificación de **hormonas peptídicas** (FSH y LH) se realizó por **RIA de doble anticuerpo**. En tubos de vidrio se añadieron 100µl de la muestra problema, 100µl de la hormona marcada con FSH-I<sup>125</sup> o LH-I<sup>125</sup> y el anticuerpo obtenido de suero de conejo anti-FSH o anti-LH, según sea el caso. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 24 horas. A continuación, se agregaron 100µl del segundo anticuerpo obtenido de suero normal de borrego. La mezcla se dejó incubar durante 2 horas. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 3000 gravedades a -4°C durante 30 minutos. El sobrenadante fue decantado, las paredes de cada tubo se secaron y se colocaron en un contador de centelleo líquido (modelo Cobra 5005, Packard™). La concentración de la hormona en la muestra problema se determinó a partir de una curva de calibración, realizada a partir de estándares para FSH (rFSH-RP2) o LH (rLH-RP2) y de las cuentas por minuto. La concentración de FSH o LH fue expresada en ng/ml de suero.

Los coeficientes de variación intra e interespecíficos fueron de 4 y 7.9% para FSH, y de 5.1 y 6.5% para LH. La sensibilidad del análisis fue de 0.1 ng/ml para FSH y de 0.02 ng/ml para LH.

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



## Análisis Estadístico

Los resultados de la edad de apertura vaginal y del primer estro se analizaron por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de U de Mann-Whitney.

Las diferencias estadísticas en la concentración de hormonas esteroides y gonadotropinas en suero, así como en el peso corporal y el peso de los ovarios, útero y glándulas adrenales fueron examinados por la prueba de Análisis de Varianza Multifactorial (ANDEVA) seguida por la prueba de Tukey-Kramer.

La prueba “t” de Student se utilizó en aquellos casos donde se requirió efectuar una comparación entre dos grupos. Aquellas diferencias cuya probabilidad fue menor o igual a 0.05, se consideraron estadísticamente significativas.

---

# RESULTADOS

## EXPERIMENTO 1

### Efecto de la Inyección de Solución Salina en la Bursa Ovárica de Animales en las diferentes Etapas del Ciclo Estral

El presente experimento se realizó con la finalidad de evaluar si la administración de solución salina en la bursa ovárica de animales cíclicos, tiene efectos sobre la secreción de hormonas esteroides y si éstos dependen del ovario tratado.

#### Peso Corporal y Peso Relativo de Órganos

En comparación con el grupo TA, la inyección de SS en la bursa del ovario derecho de animales en **Diestro 1** resultó en mayor masa adrenal (Cuadro 1).

En el día del **Diestro 2**, no se observaron diferencias significativas en el peso corporal ni en el peso de los ovarios, útero o masa adrenal de los animales inyectados con SS en la bursa del ovario izquierdo o derecho (Cuadro 1).

Respecto al grupo TA, la inyección de SS en el OI de animales en **Proestro** resultó en mayor masa adrenal. Al inyectar la SS en el OD, el peso del útero y las adrenales fue mayor (Cuadro 1).

En la etapa del **Estro**, la inyección de SS en el OI resultó en menor peso del OD al ser comparado a su TA (Cuadro 1).



**Cuadro 1.** Media  $\pm$  eem del **peso corporal (g)** y de los **pesos relativos (mg/100g)** de los ovarios, útero y masa adrenal de animales testigo absoluto (TA) o de animales inyectados en los días del diestro 1 (D1), diestro 2 (D2), proestro (P) o estro (E) con solución salina (SS) en la bursa del ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) y sacrificados a las 24 horas post-tratamiento.

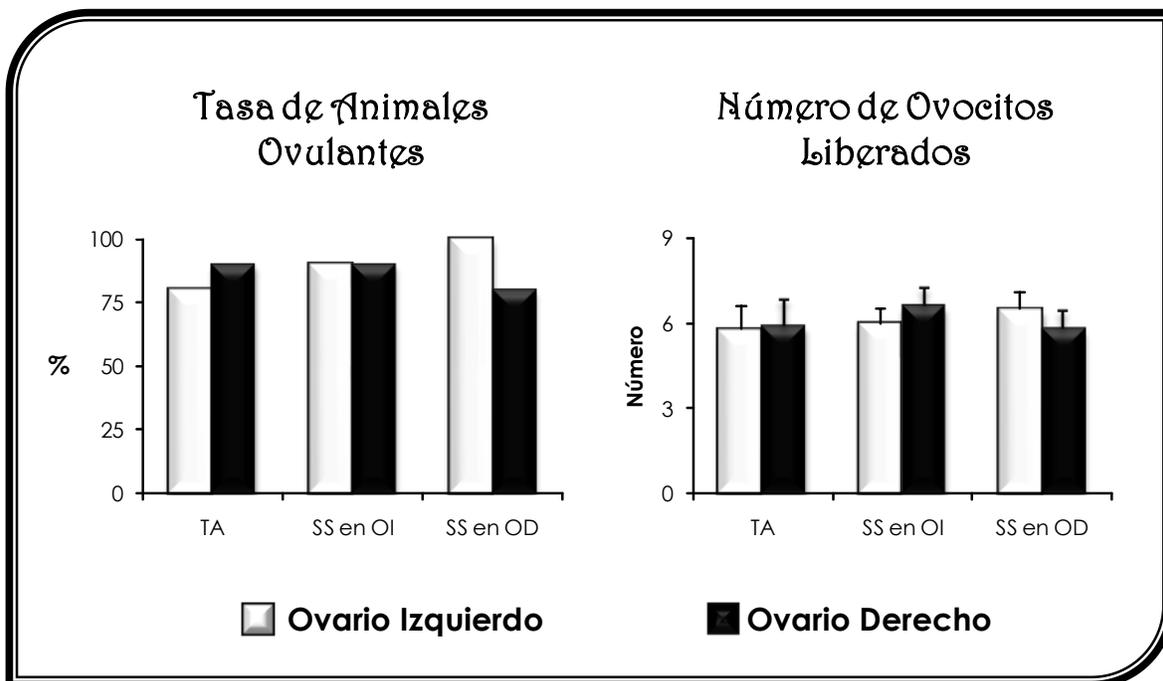
Grupos	Día de Inyección	n	Peso Corporal (g)	Ovario		Peso de Útero	Masa Adrenal
				Izquierdo	Derecho		
TA (D2)	Diestro 1	10	218 $\pm$ 6.3	11.83 $\pm$ 0.6	13.1 $\pm$ 0.9	114.8 $\pm$ 2.8	18.0 $\pm$ 2.2
SS en OI		11	213 $\pm$ 4.5	11.5 $\pm$ 0.6	12.9 $\pm$ 0.6	121.4 $\pm$ 1.7	25.1 $\pm$ 2.6
SS en OD		10	215 $\pm$ 5.7	13.5 $\pm$ 0.4	13.9 $\pm$ 0.5	112.6 $\pm$ 3.8	27.5 $\pm$ 2.2 *
TA (P)	Diestro 2	10	206 $\pm$ 4.5	12.2 $\pm$ 0.8	12.1 $\pm$ 0.8	156.9 $\pm$ 5.3	22.8 $\pm$ 1.1
SS en OI		10	216 $\pm$ 3.7	11.5 $\pm$ 0.9	10.8 $\pm$ 0.9	165.0 $\pm$ 4.99	23.9 $\pm$ 1.3
SS en OD		10	218 $\pm$ 3.2	13.4 $\pm$ 0.9	12.0 $\pm$ 1.1	154.2 $\pm$ 9.6	27.1 $\pm$ 1.8
TA (E)	Proestro	10	199 $\pm$ 3.4	13.03 $\pm$ 0.7	13.7 $\pm$ 0.6	134.7 $\pm$ 3.1	17.9 $\pm$ 1.7
SS en OI		10	209 $\pm$ 4.2	14.6 $\pm$ 0.6	15.6 $\pm$ 0.7	134.6 $\pm$ 4.7	25.6 $\pm$ 0.9 *
SS en OD		10	200 $\pm$ 7.4	14.7 $\pm$ 0.8	14.3 $\pm$ 0.9	150.1 $\pm$ 4.2 *	25.4 $\pm$ 0.8 *
TA (D1)	Estro	10	208 $\pm$ 5.1	14.6 $\pm$ 0.6	14.6 $\pm$ 0.4	105.1 $\pm$ 3.4	22.7 $\pm$ 0.9
SS en OI		11	225 $\pm$ 3.9	12.9 $\pm$ 0.4	11.5 $\pm$ 0.5 *	99.1 $\pm$ 5.3	24.8 $\pm$ 1.2
SS en OD		10	213 $\pm$ 7.2	13.6 $\pm$ 0.5	14.04 $\pm$ 0.9	109.7 $\pm$ 3.9	26.9 $\pm$ 2.1

\*  $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo TA (prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey-Kramer).

## Respuesta Ovulatoria

La tasa de animales ovulantes y el número de ovocitos liberados de los animales inyectados en el día del proestro, con SS en la bursa del ovario izquierdo o derecho fue similar a la del grupo TA (figura 7).

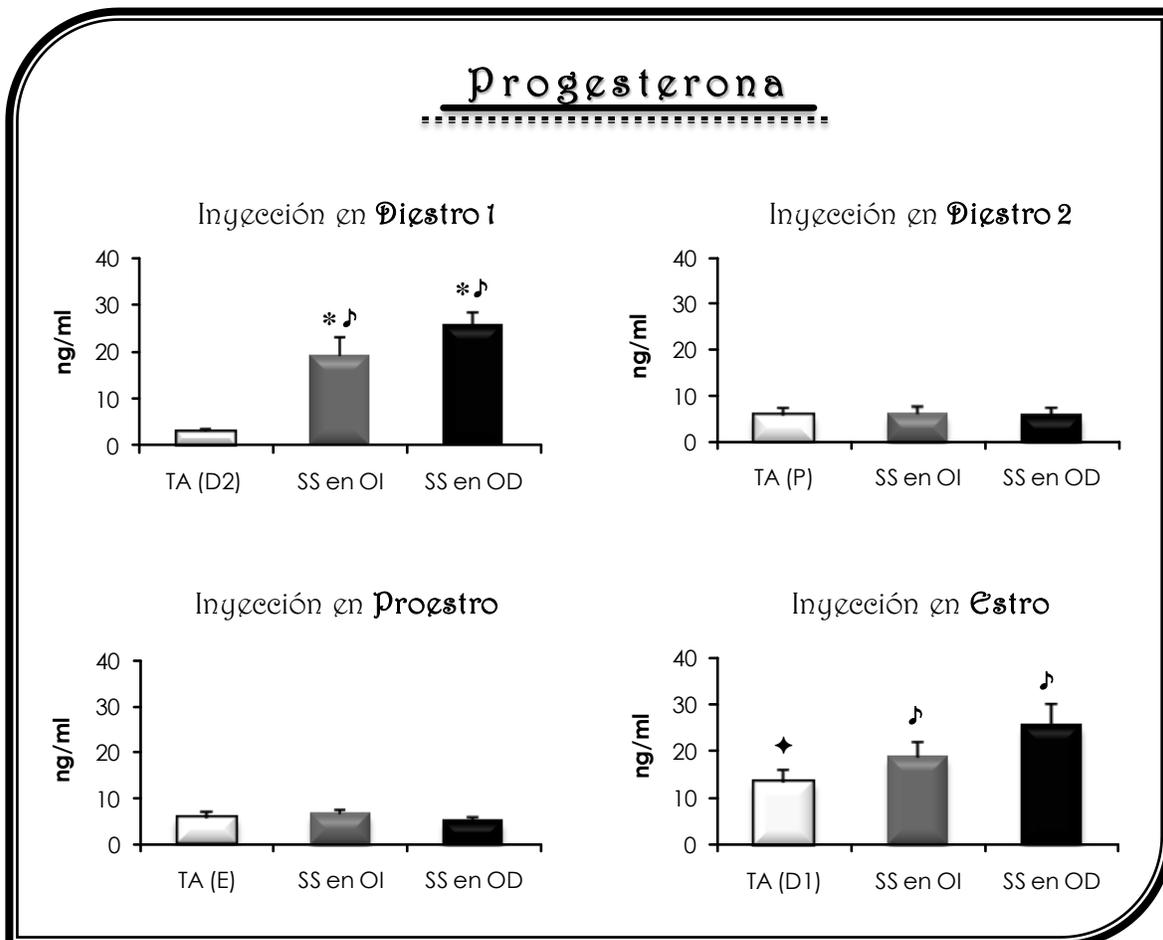
**Figura 7. Porcentaje de animales ovulantes y media  $\pm$  eem del número de ovocitos liberados, por el ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) de animales testigo absoluto (TA) o inyectados a los 60 días de edad, en el día del proestro, con solución salina (SS) y sacrificados a las 24 horas post-tratamiento.**



## Concentración de Hormonas en Suero

En los animales intactos, sacrificados en el día del D1, la concentración de progesterona es más alta que en el resto de los días del ciclo estral. La inyección de SS en el OI o derecho de animales en D1 o E resultó en una mayor concentración de progesterona, en comparación a los que fueron inyectados en D2 o P. En el día del D1, la inyección de SS en la bursa del ovario izquierdo o derecho, resultó en una mayor concentración de progesterona, respecto a su grupo TA (figura 8).

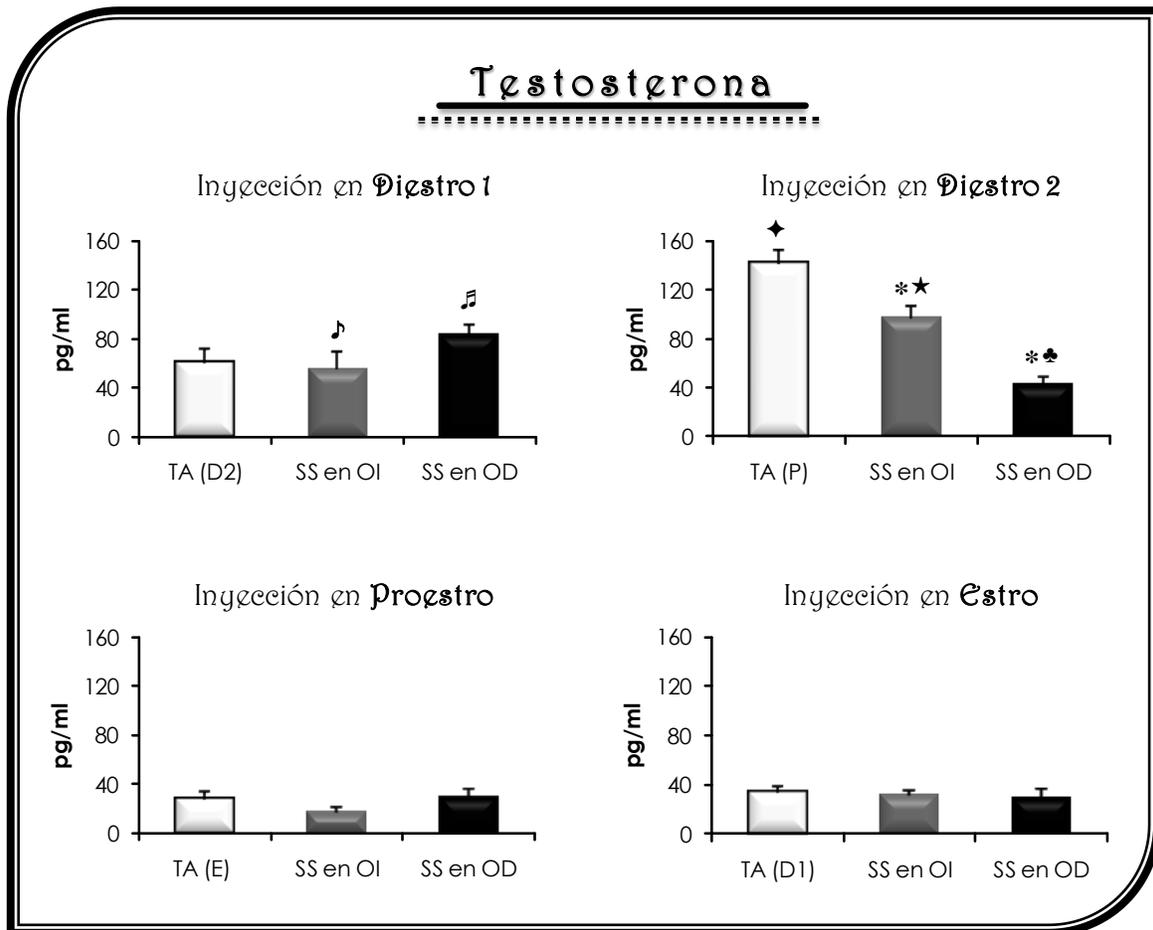
**Figura 8.** Media  $\pm$  eem de la concentración sérica de **Progesterona** de animales testigo absoluto (TA) o de animales inyectados en los días del diestro 1 (D1), diestro 2 (D2), proestro (P) o estro (E) con solución salina (SS) en la bursa del ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) y sacrificados a las 24 horas post-tratamiento.



♦  $p < 0.05$  vs. el TA en D2, P y E; ♪  $p < 0.05$  vs. SS su respectivo OI, OD (D2 y P); \*  $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo TA (prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey-Kramer). En ( ) se indica el día del ciclo en que fueron sacrificados los animales intactos. Todos los grupos estuvieron conformados de 8 a 10 animales.

Durante el ciclo estral de la rata intacta, la máxima concentración de testosterona se presenta en el día del proestro. En comparación al resto de los días del ciclo estral, en el D2 la administración de SS en el OI resultó en una mayor concentración del andrógeno, semejante a lo que ocurre en el día del D1, cuando la SS se inyecta en el OD. En el día del D2, la inyección de SS en la bursa del ovario izquierdo o derecho resultó en una menor concentración de testosterona, respecto al animal intacto, siendo más pronunciada cuando la solución se administró en la gónada derecha (figura 9).

**Figura 9.** Media  $\pm$  eem de la concentración sérica de **Testosterona** de animales testigo absoluto (TA) o de animales inyectados en los días del diestro 1 (D1), diestro 2 (D2), proestro (P) o estro (E) con solución salina (SS) en la bursa del ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) y sacrificados a las 24 horas post-tratamiento.

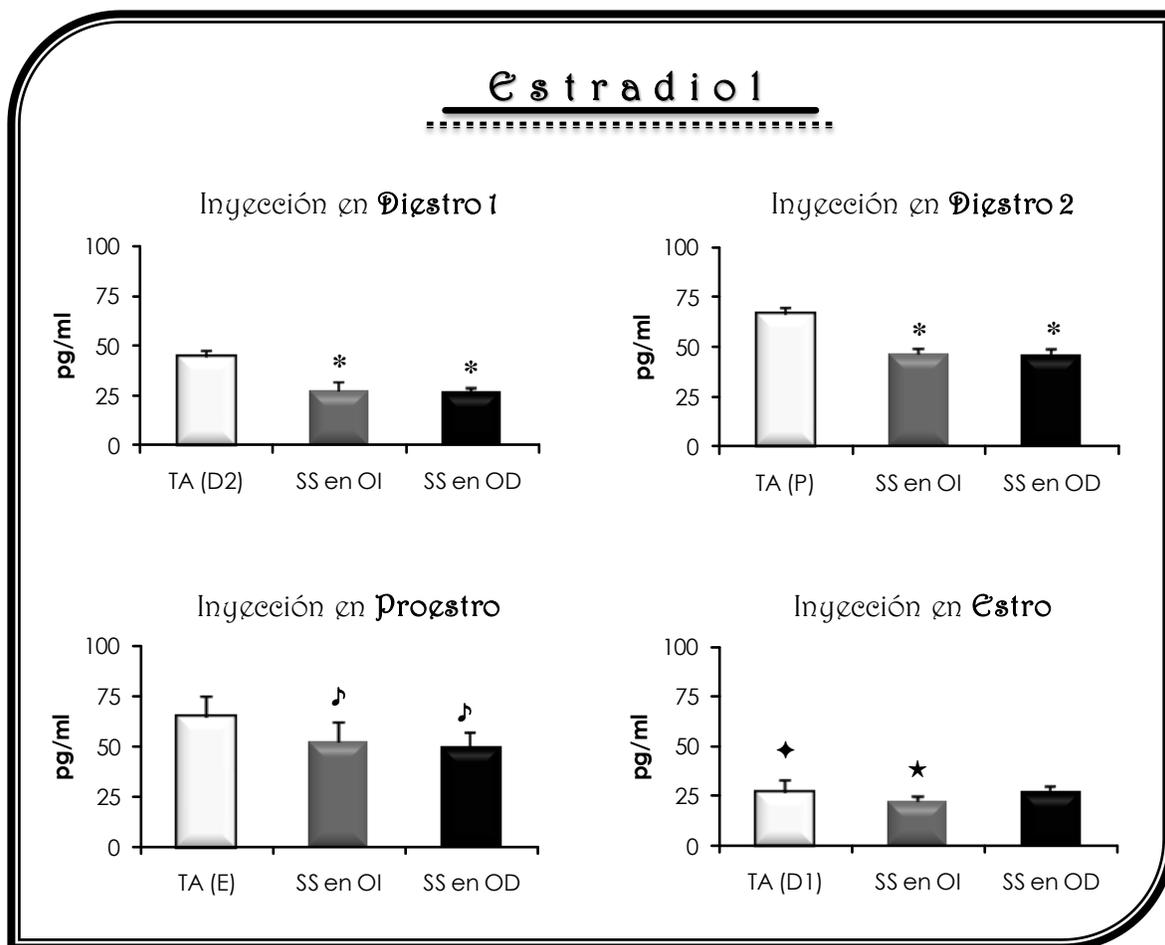


♦  $p < 0.05$  vs. el TA en D1, D2 y E; ♯  $p < 0.05$  vs. SS en OI (P); ★  $p < 0.05$  vs. SS en OI (D1, P y E); ♯  $p < 0.05$  vs. SS en OD (D2, P y E); \*  $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo TA; ♣  $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo con SS en OI (prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey-Kramer). En ( ) se indica el día del ciclo en que fueron sacrificados los animales intactos.

Todos los grupos estuvieron conformados de 8 a 10 animales.

En la rata intacta, la concentración menor de estradiol se presenta en el día del D1. En el día del P, la inyección de SS en la bursa del OI o derecho resultó en mayor concentración de estradiol, en comparación a los días del D1 y E. En los días del diestro 1 y 2, la inyección de SS en el ovario izquierdo o derecho resultó en una menor concentración de estradiol, respecto a su grupo TA (figura 10).

**Figura 10.** Media  $\pm$  eem de la concentración sérica de **Estradiol** de animales testigo absoluto (TA) o de animales inyectados en los días del diestro 1 (D1), diestro 2 (D2), proestro (P) o estro (E) con solución salina (SS) en la bursa del ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) y sacrificados a las 24 horas post-tratamiento.



♦  $p < 0.05$  vs. el TA en P y E; ♪  $p < 0.05$  vs. SS respectivo OI u OD (D1 y E); ★  $p < 0.05$  vs. SS en OI (D2 y P);

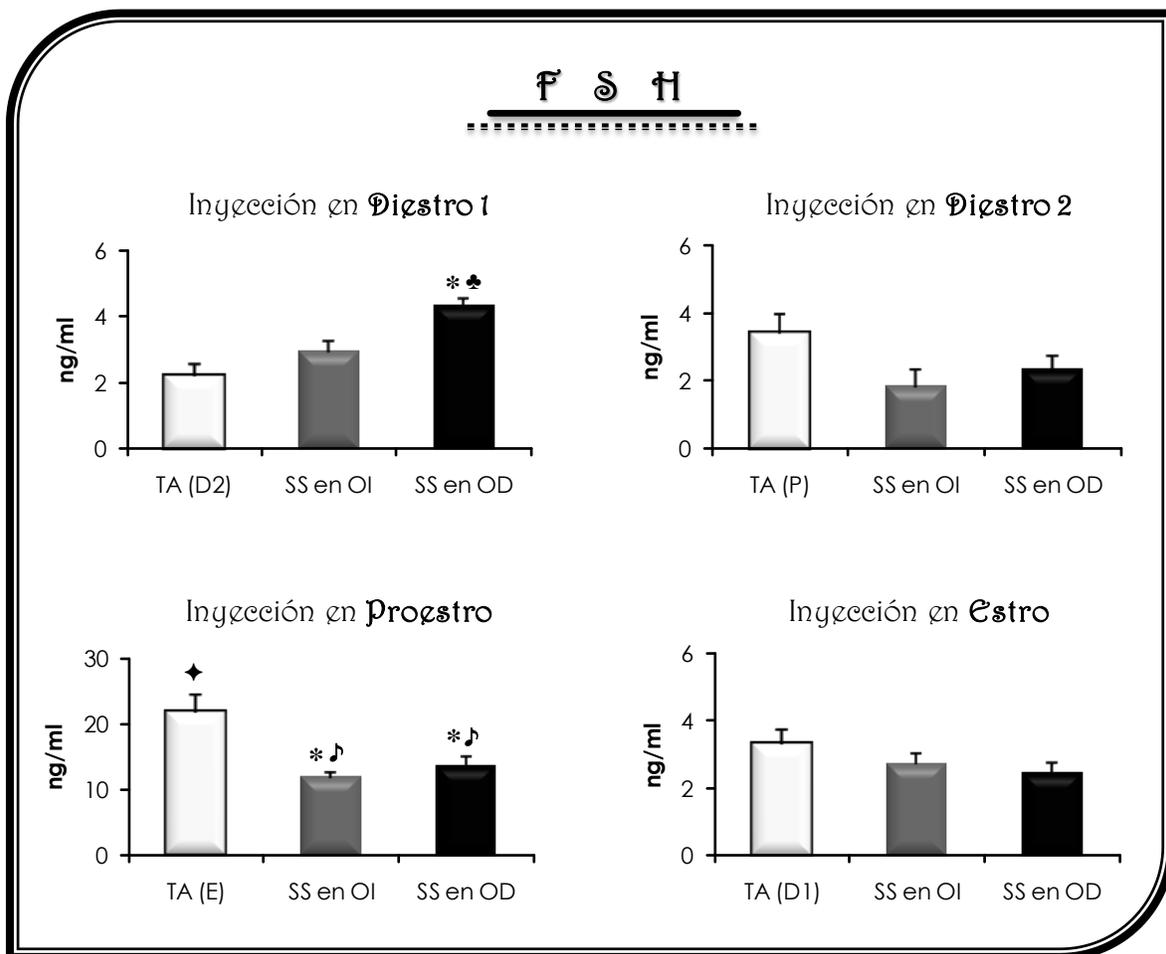
\*  $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo TA (prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey-Kramer).

En ( ) se indica el día del ciclo en que fueron sacrificados los animales intactos.

Todos los grupos estuvieron conformados de 8 a 10 animales.

En la rata intacta, la concentración mayor de FSH observada durante el ciclo estral, fue en el día del estro. En el día del proestro, la inyección de SS en la bursa del OI o derecho resultó en menor concentración de FSH respecto a su TA, pero fue mayor en comparación al resto de los días del ciclo estral. La administración de SS en el OD de animales en D1, resultó en mayor concentración de FSH en comparación a su grupo TA y al grupo de animales inyectados con SS en el OI (figura 11).

**Figura 11.** Media  $\pm$  eem de la concentración sérica de **FSH** de animales testigo absoluto (TA) o de animales inyectados en los días del diestro 1 (D1), diestro 2 (D2), proestro (P) o estro (E) con solución salina (SS) en la bursa del ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) y sacrificados a las 24 horas post-tratamiento.



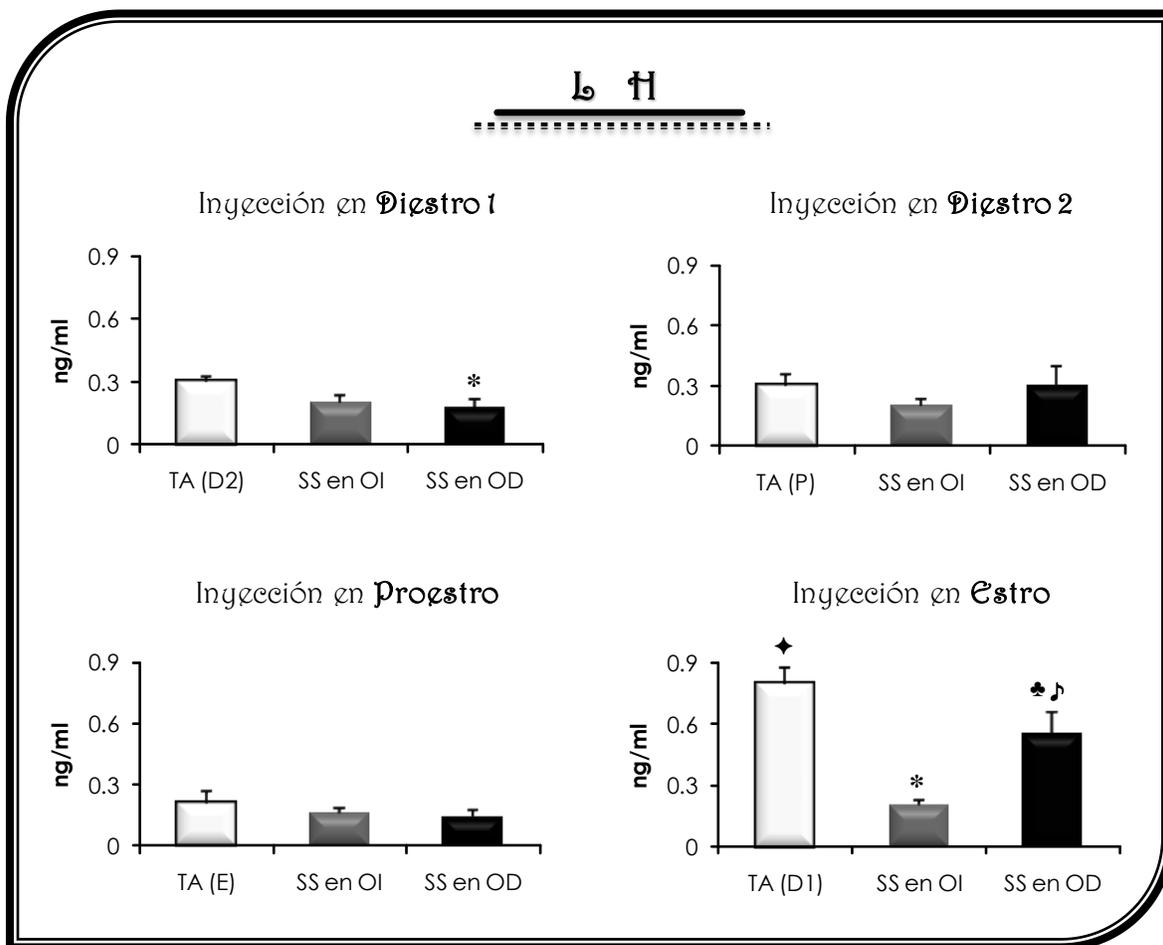
♦  $p < 0.05$  vs. el TA en D1, D2 y P; ♪  $p < 0.05$  vs. SS su respectivo OI u OD (D1, D2 y E); \*  $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo TA; ♣  $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo con SS en OI (prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey-Kramer).

En ( ) se indica el día del ciclo en que fueron sacrificados los animales intactos.

Todos los grupos estuvieron conformados de 8 a 10 animales.

Los animales intactos sacrificados en el D1 mostraron la concentración más alta de LH durante el ciclo estral. La inyección de SS en la bursa del OD de animales en estro resultó en la mayor concentración de LH con respecto a los días del D1 y P. En comparación a su grupo TA, las ratas en D1 inyectadas con SS en la bursa del OD, mostraron una menor concentración de LH, semejante a lo observado en el día del E, cuando la SS se inyectó en la bursa del OI. La inyección de SS en el OD de animales en E, resultó en una mayor concentración de LH que el grupo inyectado en el OI (figura 12).

**Figura 12.** Media  $\pm$  eem de la concentración sérica de LH de animales testigo absoluto (TA) o de animales inyectados en los días del diestro 1 (D1), diestro 2 (D2), proestro (P) o estro (E) con solución salina (SS) en la bursa del ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) y sacrificados a las 24 horas post-tratamiento.



♦  $p < 0.05$  vs. el TA en D2, P y E; ♪  $p < 0.05$  vs. SS en OD (D1 y P); \*  $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo TA; ♣  $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo con SS en OI (prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey-Kramer). En ( ) se indica el día del ciclo en que fueron sacrificados los animales intactos. Todos los grupos estuvieron conformados de 8 a 10 animales.



## CONCLUSIONES

A lo largo del ciclo estral de la rata intacta, el modelo de secreción de las hormonas esteroides (progesterona, testosterona y estradiol) es similar al descrito en la literatura (Barco y col., 2003; Cruz y col., 2006; Flores y col., 2005, 2006, 2008). La concentración de las gonadotropinas es relativamente baja, dada la hora del día en el que se sacrificaron los animales.

Los efectos de la inyección de la solución salina en la bursa ovárica de animales cíclicos, sobre la esteroidogénesis ovárica, son asimétricos y dependen del día del ciclo estral en que se realice la cirugía. Es posible que dichos efectos sean el resultado de la exposición de los animales a ciertos agentes estresores durante el proceso quirúrgico, tales como:

- 1) La **anestesia con éter**, que pudiera activar el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal-ovario (Barco y col., 2003; Flores y col., 2008).
- 2) La **perforación del peritoneo** (Barco y col., 2003; Cruz y col., 2006; Flores y col., 2006, 2008), lo que posiblemente implique la activación de algunas fibras nerviosas que inervan las diferentes partes del peritoneo.

---

## EXPERIMENTO 2

### Efecto de la Inyección de VIP en la Bursa Ovárica de Animales en las diferentes Etapas del Ciclo Estral

Para evaluar la participación del VIP sobre la ovulación y la esteroidogénesis ovárica del animal cíclico, el péptido fue inyectado en la bursa del ovario izquierdo o derecho en cada uno de los días del ciclo estral y sus efectos se evaluaron a las 24 horas post-estimulo. Se utilizó como grupo de comparación a los animales inyectados en la bursa ovárica con solución salina (datos del experimento 1).

#### Peso Corporal y Peso Relativo de Órganos

En comparación a su grupo inyectado con SS, la estimulación VIPérgica del OI en el día del **Diestro 1**, resultó en menor peso del útero. La inyección de VIP en el OD, resultó en menor masa de las adrenales (Cuadro 2).

En el día del **Diestro 2**, la inyección de VIP en la bursa del ovario izquierdo resultó en menor peso del útero (Cuadro 2).

Las ratas inyectadas con VIP en la bursa del OD, en el día del **Proestro**, mostraron mayor masa adrenal (Cuadro 2).

En el día del **Estro**, la inyección de VIP en la bursa ovárica no modificó de manera significativa el peso corporal ni el peso de los ovarios, útero o masa adrenal (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Media  $\pm$  eem del **peso corporal (g)** y de los **pesos relativos (mg/100g)** de los ovarios, útero y masa adrenal de animales inyectados en los días del diestro 1, diestro 2, proestro o estro con solución salina (SS) o péptido intestinal vasoactivo (VIP) en la bursa del ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) y sacrificados a las 24 horas post-tratamiento.

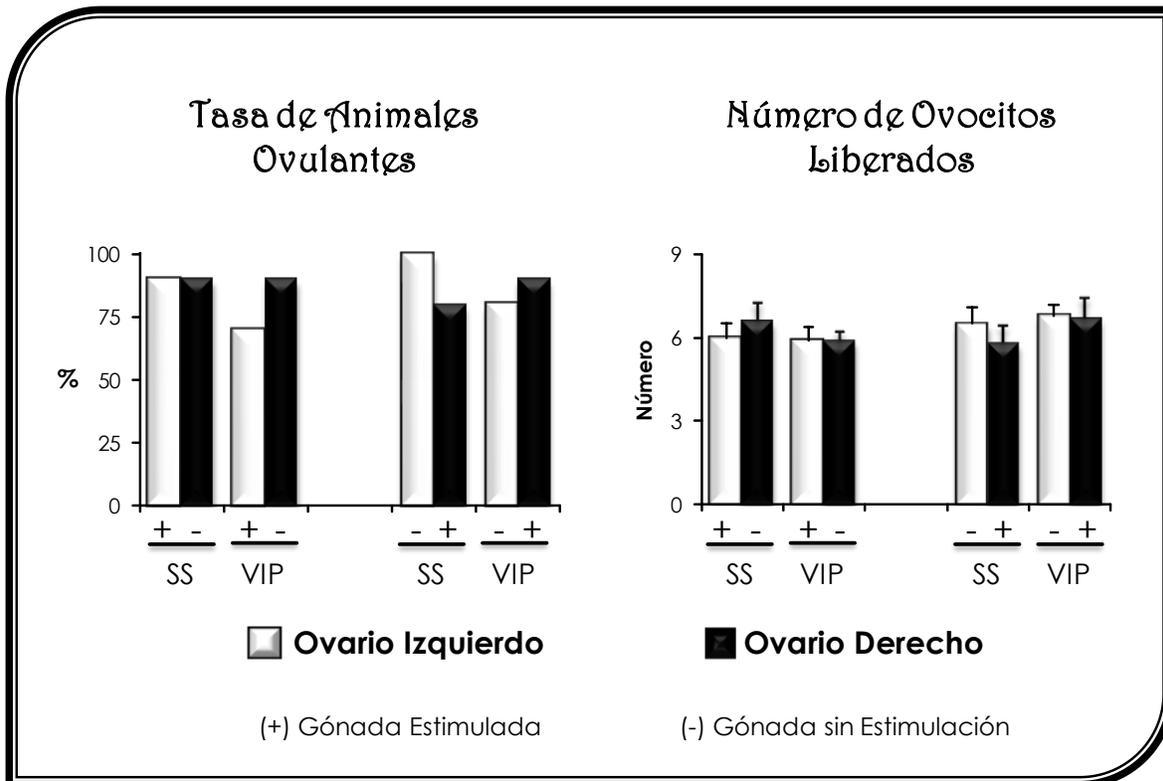
Grupos	Día de Inyección	n	Peso Corporal (g)	Ovario		Peso de Útero	Masa Adrenal
				Izquierdo	Derecho		
SS en OI	Diestro 1	11	213 $\pm$ 4.5	11.5 $\pm$ 0.6	12.9 $\pm$ 0.6	121.4 $\pm$ 1.7	25.1 $\pm$ 2.6
VIP en OI		10	215 $\pm$ 2.9	12.1 $\pm$ 0.6	11.9 $\pm$ 0.4	111.5 $\pm$ 4.3 *	21.6 $\pm$ 1.7
SS en OD		10	215 $\pm$ 5.7	13.5 $\pm$ 0.4	13.9 $\pm$ 0.5	112.6 $\pm$ 3.8	27.5 $\pm$ 2.2
VIP en OD		10	211 $\pm$ 4.1	15.1 $\pm$ 0.8	14.0 $\pm$ 0.5	100.5 $\pm$ 4.5	22.0 $\pm$ 0.9 *
SS en OI	Diestro 2	10	216 $\pm$ 3.7	11.5 $\pm$ 0.9	10.8 $\pm$ 0.9	165.0 $\pm$ 4.99	23.9 $\pm$ 1.3
VIP en OI		10	223 $\pm$ 6.8	12.9 $\pm$ 0.5	12.3 $\pm$ 0.8	145.6 $\pm$ 7.1 *	26.2 $\pm$ 1.7
SS en OD		10	218 $\pm$ 3.2	13.4 $\pm$ 0.9	12.0 $\pm$ 1.1	154.2 $\pm$ 9.6	27.1 $\pm$ 1.8
VIP en OD		10	207 $\pm$ 5.8	14.7 $\pm$ 0.9	12.9 $\pm$ 0.8	144.5 $\pm$ 3.0	27.0 $\pm$ 1.7
SS en OI	Proestro	10	209 $\pm$ 4.2	14.6 $\pm$ 0.6	15.6 $\pm$ 0.7	134.6 $\pm$ 4.7	25.6 $\pm$ 0.9
VIP en OI		10	208 $\pm$ 5.2	14.8 $\pm$ 0.7	15.7 $\pm$ 0.5	141.3 $\pm$ 4.0	27.2 $\pm$ 0.9
SS en OD		10	200 $\pm$ 7.4	14.7 $\pm$ 0.8	14.3 $\pm$ 0.9	150.1 $\pm$ 4.2	25.4 $\pm$ 0.8
VIP en OD		10	203 $\pm$ 7.2	15.8 $\pm$ 1.0	14.3 $\pm$ 1.1	154.3 $\pm$ 4.1	28.9 $\pm$ 1.1 *
SS en OI	Estro	11	225 $\pm$ 3.9	12.9 $\pm$ 0.4	11.5 $\pm$ 0.5	99.1 $\pm$ 5.3	24.8 $\pm$ 1.2
VIP en OI		10	217 $\pm$ 4.5	12.9 $\pm$ 0.6	13.8 $\pm$ 1.2	108.8 $\pm$ 4.1	24.6 $\pm$ 1.6
SS en OD		10	213 $\pm$ 7.2	13.6 $\pm$ 0.5	14.04 $\pm$ 0.9	109.7 $\pm$ 3.9	26.9 $\pm$ 2.1
VIP en OD		10	220 $\pm$ 3.9	12.6 $\pm$ 0.8	13.4 $\pm$ 0.8	108.5 $\pm$ 3.5	25.9 $\pm$ 1.1

\* p < 0.05 vs. su respectivo grupo inyectado con SS (prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey-Kramer).

## Respuesta Ovulatoria

En comparación a su grupo inyectado con SS, la estimulación con VIP del ovario izquierdo o derecho de ratas en proestro no modificó la tasa de animales ovulantes ni el número de ovocitos liberados (figura 13).

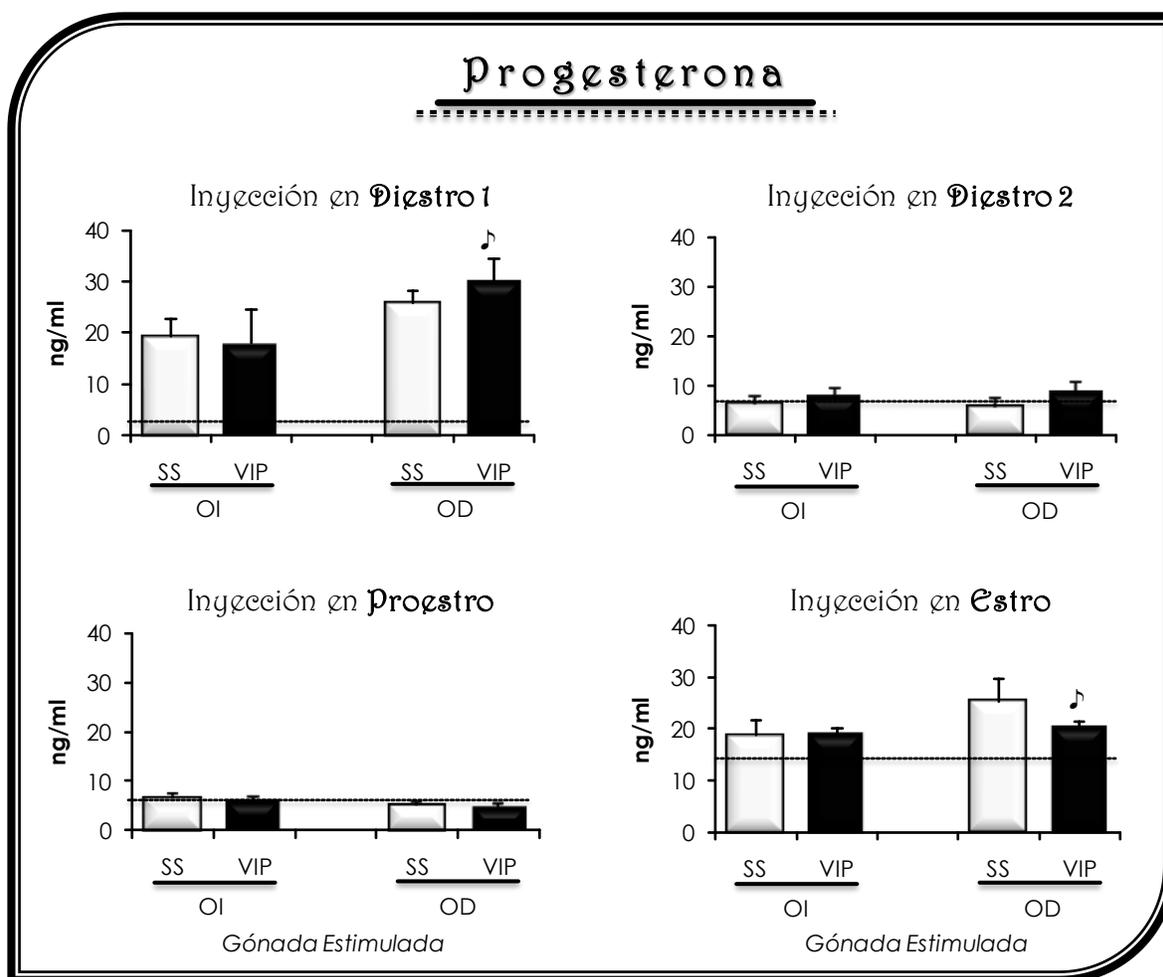
**Figura 13. Porcentaje de animales ovulantes y media  $\pm$  eem número de ovocitos liberados,** por el ovario izquierdo o derecho de animales inyectados a los 60 días de edad, en el día del proestro, con solución salina (SS) o péptido intestinal vasoactivo (VIP) y sacrificados a las 24 horas post-tratamiento.



## Concentración de Hormonas en Suero

La inyección de VIP en la bursa ovárica de ratas en los diferentes días del ciclo estral, no modificó la concentración de progesterona, respecto a su grupo con SS (figura 14).

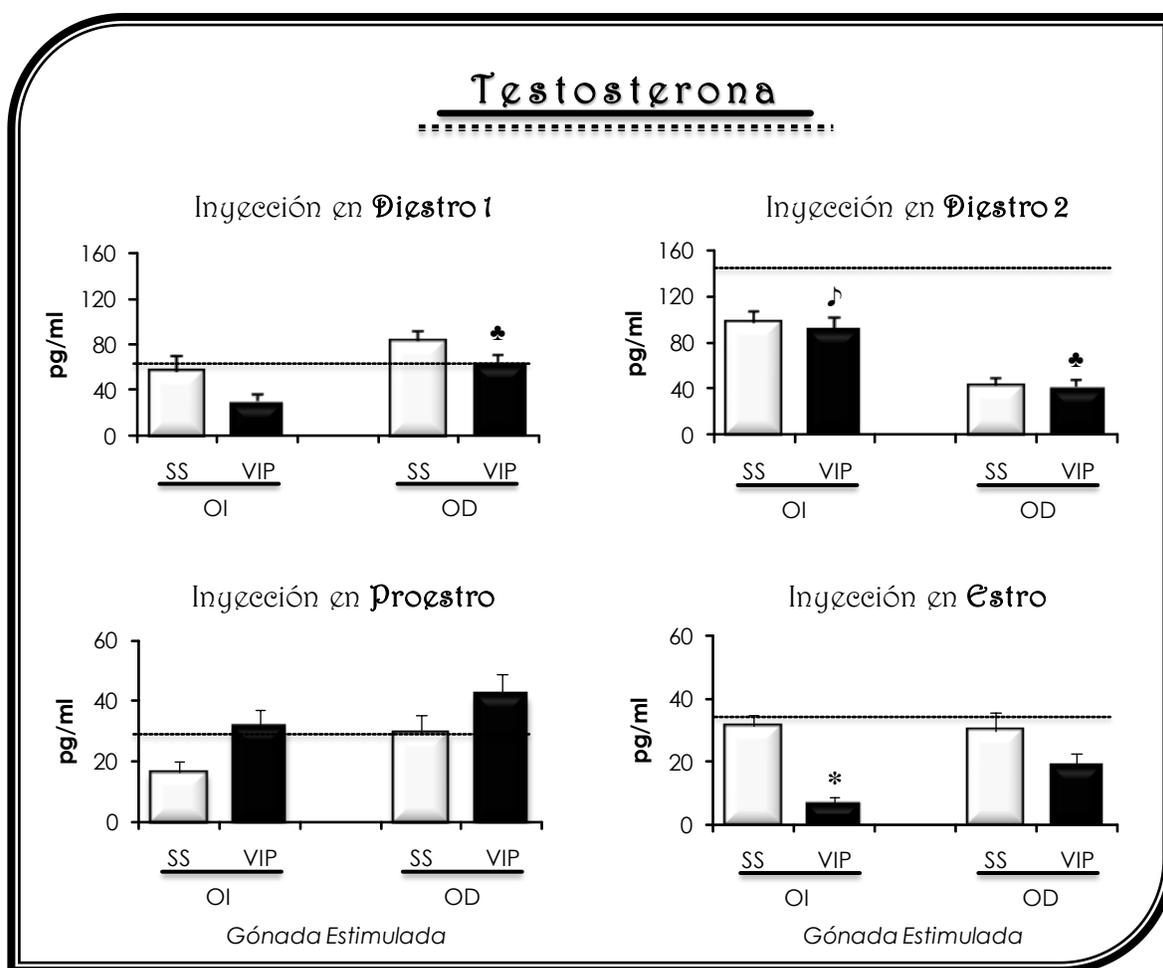
**Figura 14.** Media  $\pm$  eem de la concentración sérica de **Progesterona** de animales inyectados en los días del diestro 1, diestro 2, proestro o estro, con solución salina (SS) o con el péptido intestinal vasoactivo (VIP) en la bursa del ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) y sacrificados a las 24 horas post-tratamiento.



♯  $p < 0.05$  vs. VIP en OD (D2 y P) (prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey-Kramer). Con línea punteada se representa la concentración hormonal del TA, correspondiente a cada día del ciclo estral. Todos los grupos estuvieron conformados de 8 a 10 animales.

En el día del D1, la estimulación del OD con VIP resultó en una mayor concentración de testosterona, en comparación al grupo inyectado con VIP en el OI; contrario a lo que ocurre en el D2. En el día del estro, la estimulación del OI con VIP resultó en menor concentración de testosterona que su grupo inyectado con SS (figura 15).

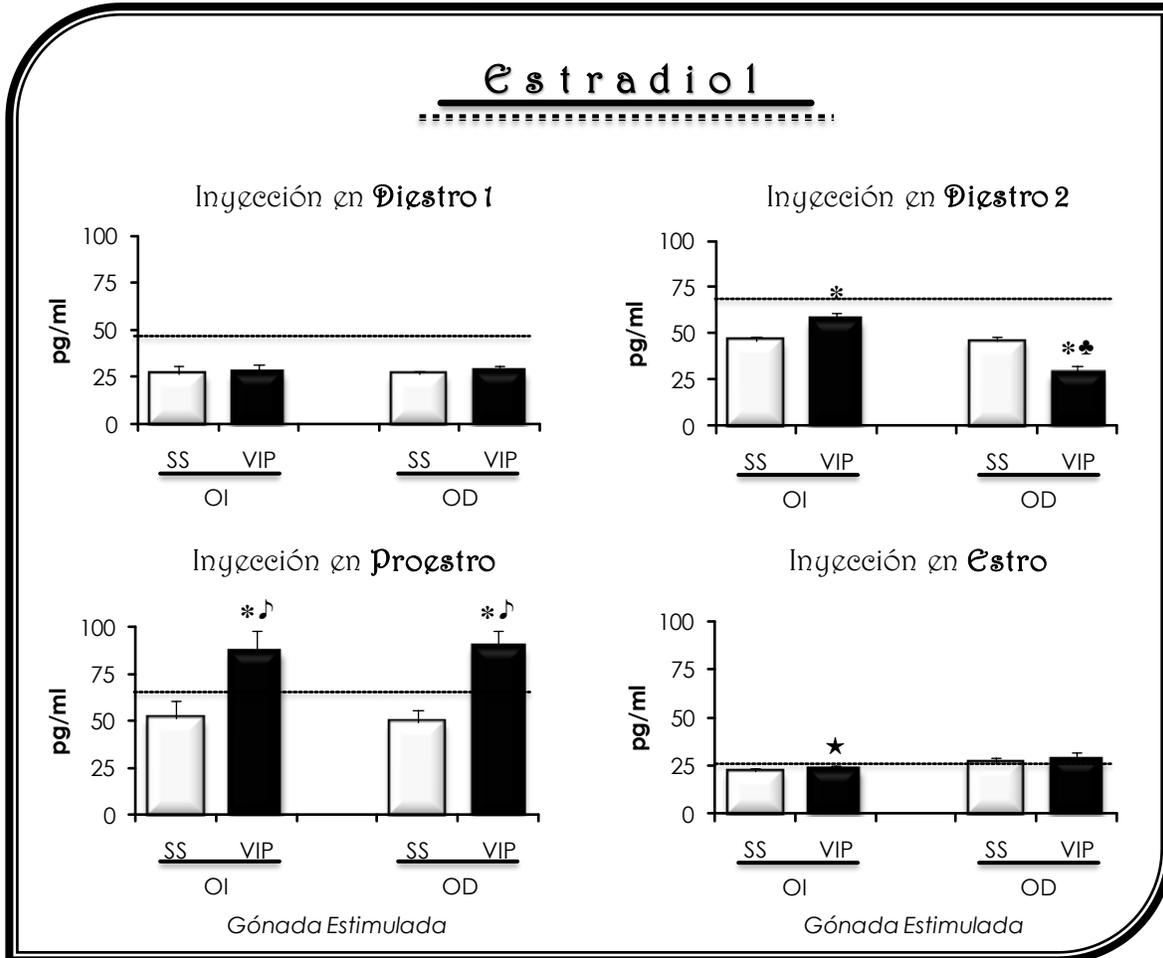
**Figura 15.** Media  $\pm$  eem de la concentración sérica de **Testosterona** de animales inyectados en los días del diestro 1, diestro 2, proestro o estro, con solución salina (SS) o con el péptido intestinal vasoactivo (VIP) en la bursa del ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) y sacrificados a las 24 horas post-tratamiento.



♪  $p < 0.05$  vs. VIP en OI (D1, P y E); ♣  $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo con VIP en OI; \*  $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo con SS (prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey-Kramer). Con línea punteada se representa la concentración hormonal del TA, correspondiente a cada día del ciclo estral. Todos los grupos estuvieron conformados de 8 a 10 animales.

La estimulación VIPérgica del OI o derecho de animales en proestro resultó en la máxima concentración de estradiol durante el ciclo estral de la rata. En el día del D2, la estimulación del OI resultó en una mayor concentración de estradiol en comparación a su grupo inyectado con SS, y menor cuando el VIP se inyectó en el OD. En el día del proestro, la inyección de VIP en el ovario izquierdo o derecho resultó en una mayor concentración de estradiol, en comparación a su grupo inyectado con SS (figura 16).

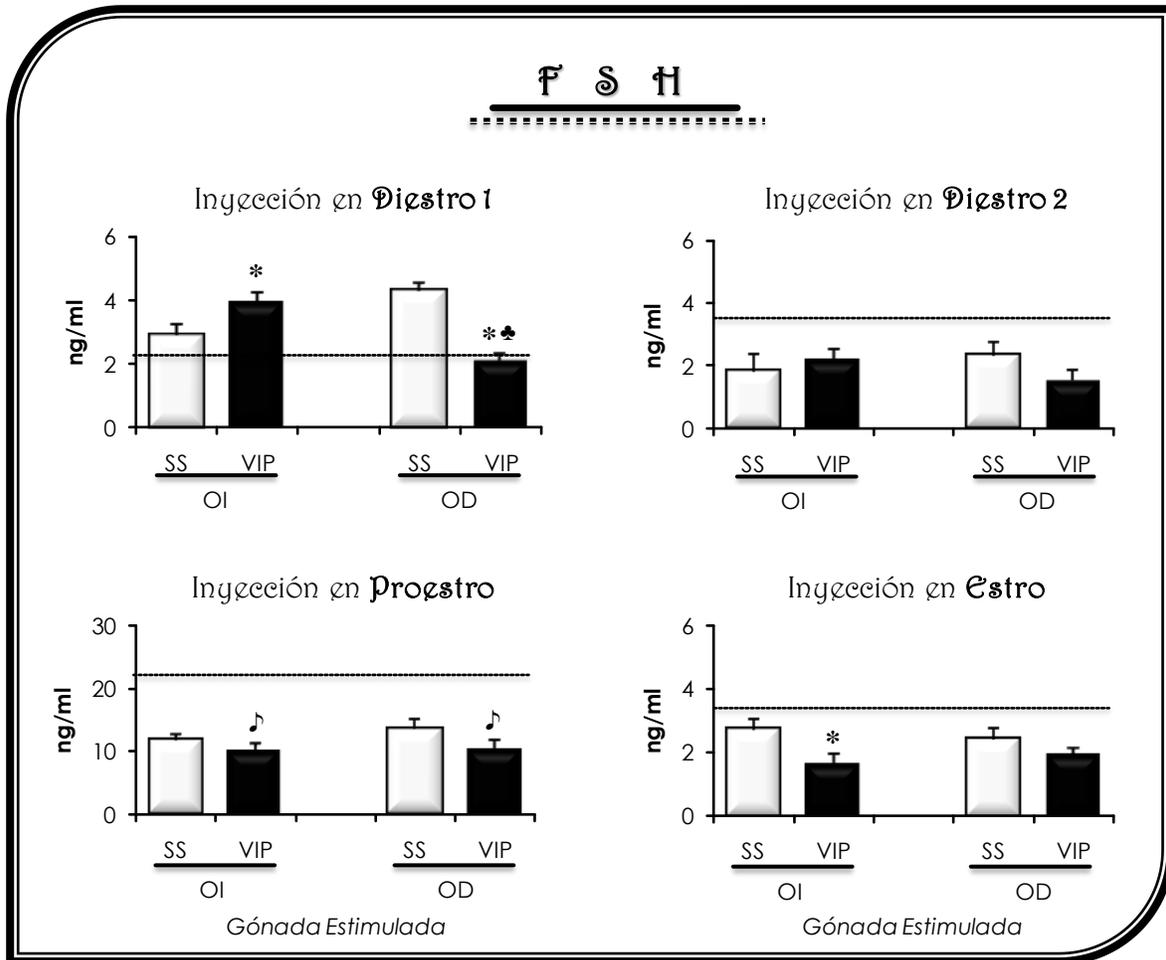
**Figura 16.** Media  $\pm$  eem de la concentración sérica de **Estradiol** de animales inyectados en los días del diestro, diestro 2, proestro o estro, con solución salina (SS) o con el péptido intestinal vasoactivo (VIP) en la bursa del ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) y sacrificados a las 24 horas post-tratamiento.



♪  $p < 0.05$  vs. VIP su respectivo OI u OD (D1, D2 y E); ★  $p < 0.05$  vs. VIP en OI (P y D2); \*  $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo inyectado con SS; ♣  $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo inyectado con VIP en OI (prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey-Kramer). Con línea punteada se representa la concentración hormonal del TA, correspondiente a cada día del ciclo estral. Todos los grupos estuvieron conformados de 8 a 10 animales.

La estimulación con VIP del OI de animales en D1, resultó en una mayor concentración de FSH en comparación a su grupo inyectado con SS, efecto contrario se observó cuando se administró el VIP en el OD. En el día del estro, la inyección de VIP en el OI resultó en menor concentración de FSH, en comparación a su grupo con SS (figura 17).

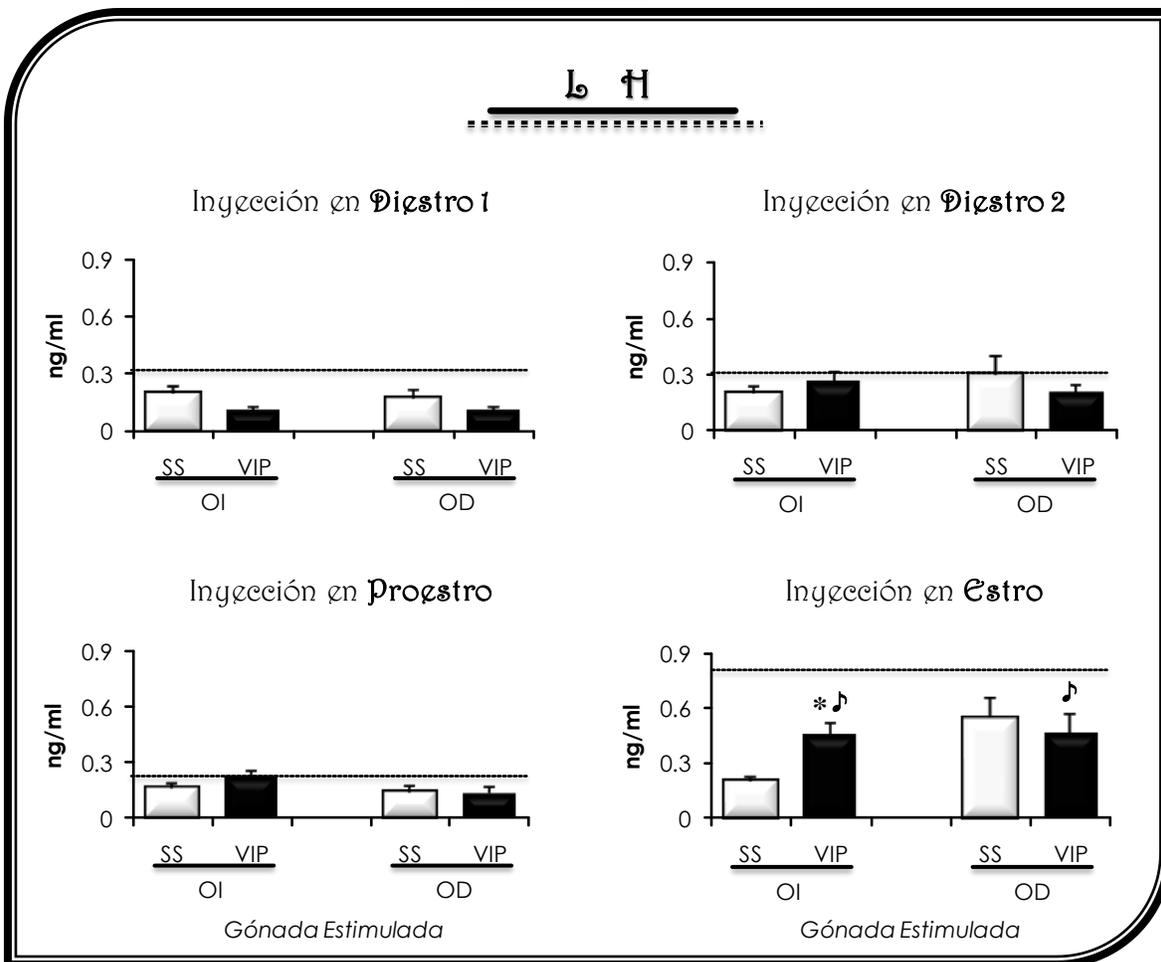
**Figura 17.** Media  $\pm$  eem de la concentración sérica de **FSH** de animales inyectados en los días del diestro 1, diestro 2, proestro o estro, con solución salina (SS) o con el péptido intestinal vasoactivo (VIP) en la bursa del ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) y sacrificados a las 24 horas post-tratamiento.



♪  $p < 0.05$  vs. VIP su respectivo OI u OD (D1, D2 y E); \*  $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo inyectado con SS; ♣  $p < 0.05$  vs. VIP en OI (prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey-Kramer). Con línea punteada se representa la concentración hormonal del TA, correspondiente a cada día del ciclo estral. Todos los grupos estuvieron conformados de 8 a 10 animales.

En el día del estro, la inyección de VIP en el OI resultó en una concentración mayor de LH, respecto a su grupo con SS. De igual manera en éste grupo se observó la mayor concentración de LH con respecto al resto de los días del ciclo estral (figura 18).

**Figura 18.** Media  $\pm$  eem de la concentración sérica de LH de animales inyectados en los días del diestro 1, diestro 2, proestro o estro, con solución salina (SS) o con el péptido intestinal vasoactivo (VIP) en la bursa del ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) y sacrificados a las 24 horas post-tratamiento.



♪  $p < 0.05$  vs. VIP su respectivo OI u OD (D1, D2 y P); \*  $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo inyectado con SS (prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey-Kramer). Con línea punteada se representa la concentración hormonal del TA correspondiente a cada día del ciclo estral. Todos los grupos estuvieron conformados de 8 a 10 animales.



## CONCLUSIONES

Aún cuando por estudios *in vitro* se ha mostrado que el VIP tiene un efecto estimulante sobre la esteroidogénesis ovárica (Davoren y Hsueh, 1985; Ahmed y col., 1986; Johnson y col., 1994; Parra y col., 2007), la administración *in vivo* del péptido muestra que su efecto no siempre es estimulante y ello pudiera depender de la influencia endocrina o neural que modula la función ovárica en cada día del ciclo estral. En nuestra cepa de animales se observó que los ovarios responden de manera asimétrica al estímulo con VIP, evento que depende del día del ciclo estral y de la hormona analizada.

## EXPERIMENTO 3

### Efecto de la Sección Unilateral del Nervio Ovárico

#### Superior de Animales sacrificados a las

#### 24 HORAS de la Cirugía

Este experimento se realizó con la finalidad de analizar la participación del NOS en la regulación de la secreción de hormonas esteroideas. Para ello, los animales en el día del estro fueron sometidos a la sección izquierda o derecha del NOS y sus efectos se evaluaron a las 24 horas del procedimiento quirúrgico.

### Peso Corporal y Peso Relativo de Órganos

En comparación al grupo TA, la sección izquierda o derecha del NOS resultó en mayor masa adrenal (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Media  $\pm$  eem del **peso corporal (g)** y de los **pesos relativos (mg/100g)** de los ovarios, útero y masa adrenal de animales testigo absoluto (TA) o de animales que fueron sometidos, a los 60 días de edad, en el día del **estro**, a la sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) y sacrificados a las 24 horas de la cirugía.

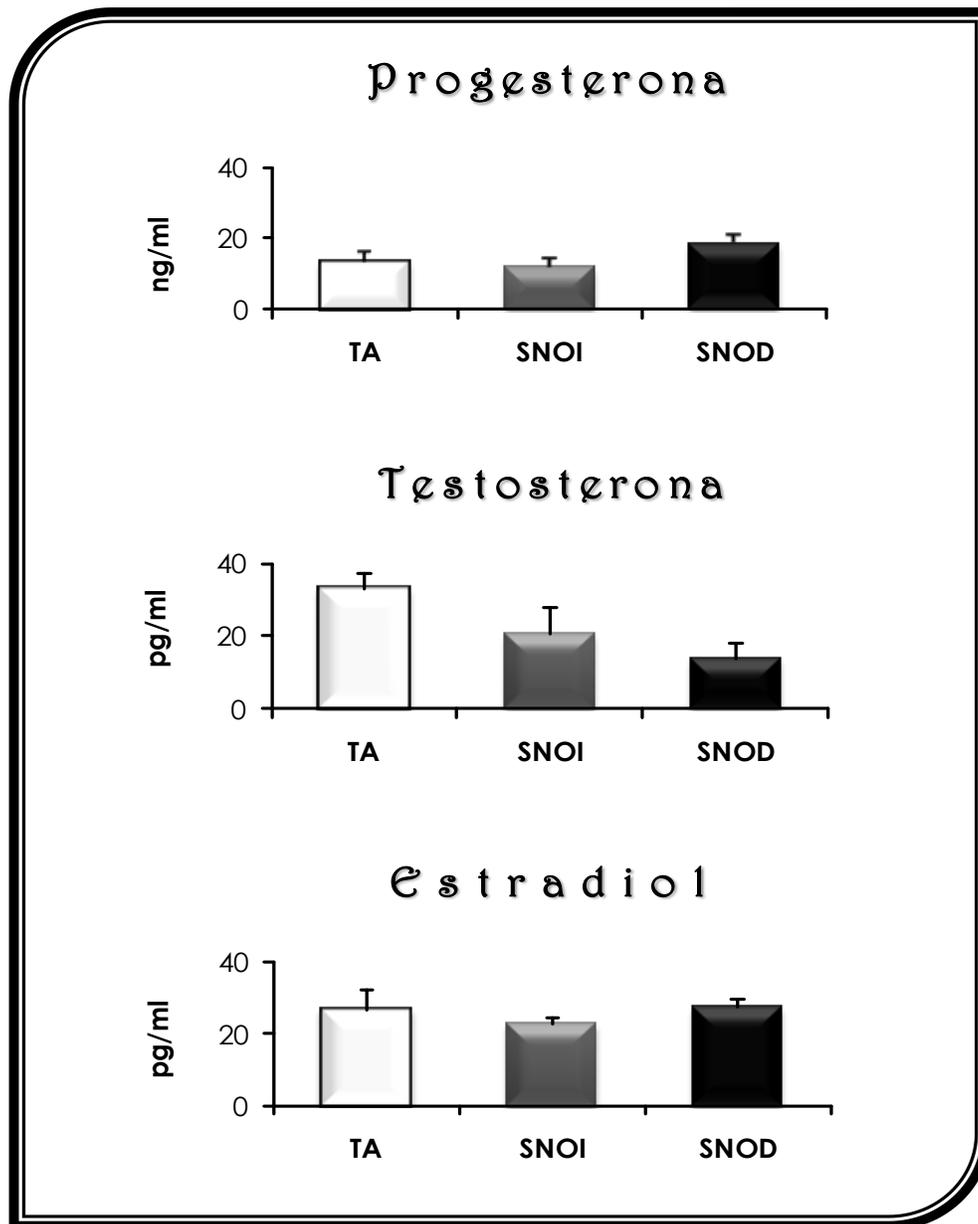
Grupos	n	Peso Corporal (g)	Ovario		Peso de Útero	Masa Adrenal
			Izquierdo	Derecho		
TA	10	208 $\pm$ 5.1	14.6 $\pm$ 0.6	14.6 $\pm$ 0.4	105.1 $\pm$ 3.4	22.7 $\pm$ 0.9
SNOI	6	197 $\pm$ 5.1	12.9 $\pm$ 1.5	12.5 $\pm$ 0.8	111.4 $\pm$ 8.7	29.2 $\pm$ 0.4 *
SNOD	6	201 $\pm$ 3.2	13.7 $\pm$ 1.2	13.0 $\pm$ 1.3	104.2 $\pm$ 7.2	26.9 $\pm$ 1.5 *

\* p < 0.05 vs. su grupo TA (prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey-Kramer).

## Concentración de Hormonas Esteroides en Suero

En el día del estro, la SNOD resultó en menor concentración de testosterona, aunque no llegó a ser estadísticamente significativo, respecto a su grupo TA. La sección unilateral del NOS no modificó la concentración de progesterona ni de estradiol (figura 19).

**Figura 19.** Media  $\pm$  eem de la concentración sérica de **PROGESTERONA, TESTOSTERONA y ESTRADIOL** de animales testigo absoluto (TA) y de aquellos que fueron sometidos *en el día del estro*, a la sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) y sacrificados a las **24 horas** de la cirugía.



Todos los grupos estuvieron conformados de 8 a 10 animales.



## CONCLUSIONES

Se ha descrito que la información que transcurre por el NOS ejerce un efecto estimulante en la esteroidogénesis ovárica (Aguado y Ojeda 1984a; Morán y col., 2000; Flores y col., 2011). En el presente estudio, no se observaron cambios en la concentración de hormonas ováricas en respuesta a la sección del NOS. Esta discrepancia podría explicarse por el tiempo transcurrido entre la denervación y la autopsia, ya que en la mayor parte de los reportes la evaluación se ha realizado hasta 60 minutos post-denervación, mientras que en el presente estudio se realizó a las 24 horas del procedimiento quirúrgico.

## EXPERIMENTO 4

### Efecto de la Inyección de VE en Animales de 10 días de edad, sacrificados en el día del Diestro

En este experimento se administró el VE en la rata infantil y se evaluó sus efectos en la etapa adulta en el día del diestro. Los animales fueron sacrificados en el día del diestro, para poder ser utilizados como grupos de comparación en los experimento 5 y 6.

#### Peso Corporal y Peso Relativo de Órganos

En comparación al grupo TA, la inyección i.p del Vh resultó en menor peso del ovario izquierdo y derecho. No se observaron diferencias significativas en el peso corporal, de los ovarios, útero o adrenales de las hembras tratadas con VE, respecto al grupo Vh (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Media  $\pm$  eem del **peso corporal (g)** y de los **pesos relativos (mg/100g)** de los ovarios, útero y masa adrenal de animales testigo absoluto (TA) o de animales que fueron inyectados vía i.p con aceite de maíz (Vh) o valerato de estradiol (VE) y sacrificados, a los 60 días de edad, en el día del diestro.

Grupos	n	Peso Corporal (g)	Ovario		Peso de Útero	Masa Adrenal
			Izquierdo	Derecho		
TA	10	208 $\pm$ 5.1	14.6 $\pm$ 0.6	14.6 $\pm$ 0.4	105.1 $\pm$ 3.4	22.7 $\pm$ 0.9
Vh	10	199 $\pm$ 5.1	11.9 $\pm$ 0.7 *	11.9 $\pm$ 0.6 *	98.0 $\pm$ 2.9	21.1 $\pm$ 0.5
VE	12	213 $\pm$ 5.3	13.9 $\pm$ 0.7	13.8 $\pm$ 0.6	89.9 $\pm$ 3.0	21.6 $\pm$ 0.6

\* p < 0.05 vs. el grupo TA (prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey-Kramer).

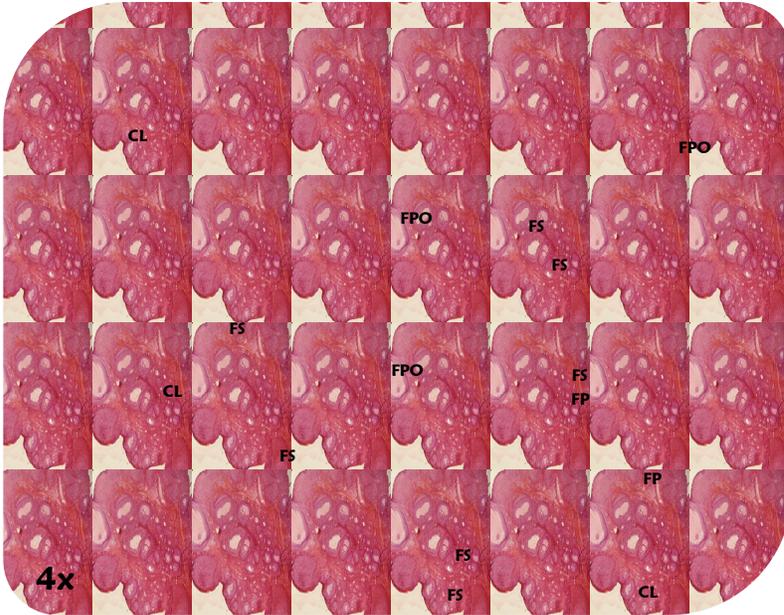


## Inicio de la Pubertad

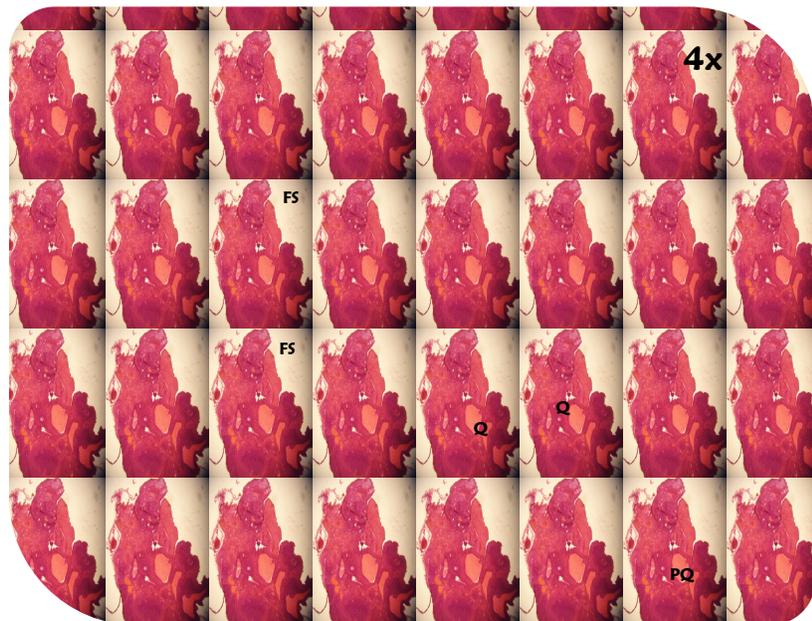
En comparación a los animales tratados con el Vh, las hembras inyectadas con VE mostraron adelanto en la **edad de apertura vaginal** ( $19.2 \pm 0.3$  vs.  $32.5 \pm 0.3$ ,  $p < 0.05$ ) y del **primer estro vaginal** ( $19.9 \pm 0.4$  vs.  $33.2 \pm 0.5$ ,  $p < 0.05$ ).

## Histología del Ovario

El ovario de los animales inyectados con el VE mostró la presencia de estructuras prequísticas y quistes foliculares, lo que nos permitió confirmar el desarrollo del SOPQ. En la figura 20 se observa el corte histológico representativo del ovario de animales inyectados a los 10 días de edad con el Vh (A) o el VE (B) y sacrificados a los 60 días de edad, en el día del diestro.



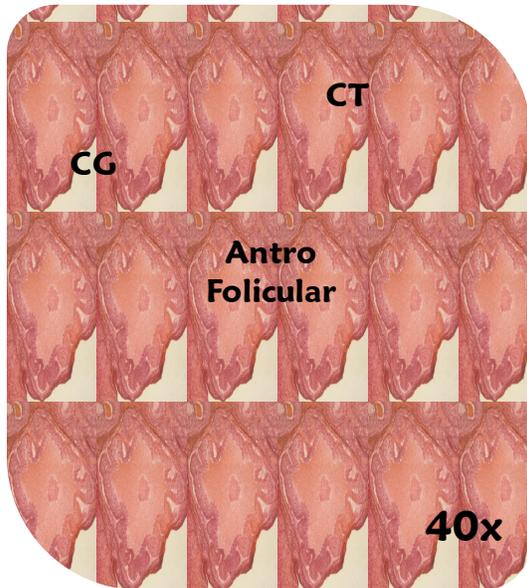
**Figura 20A.** Fotomicrografía del ovario de un animal testigo, en el que se observan folículos primarios (FP), secundarios (FS), preovulatorios (FPO) y algunos cuerpos lúteos (CL).



**Figura 20B.** Fotomicrografía del ovario de un animal con SOPQ, en el que se muestran algunos folículos secundarios (FS), un prequiste (PQ) y algunos quistes foliculares (Q).

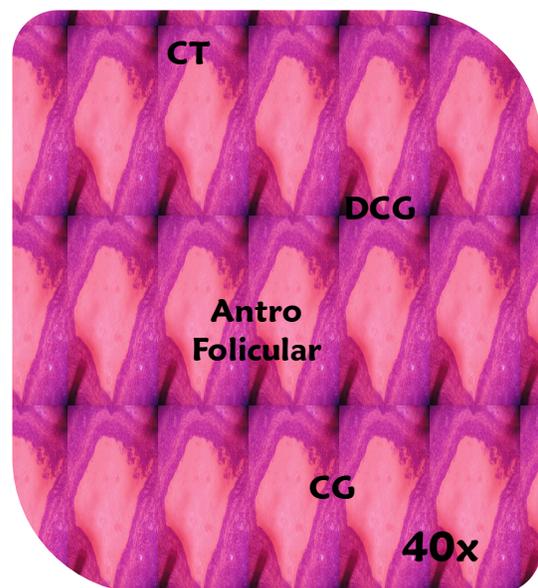


En la figura 21 se muestran las fotomicrografías de una estructura prequística (A) y de un quiste folicular (B) del ovario de un animal con SOPQ, donde se resaltan sus características.



**Figura 21A.** Fotomicrografía de una **estructura prequística**, donde se observa un compartimento granuloso (CG) con invaginaciones y evaginaciones, ausencia de ovocito, y el compartimento tecal (CT).

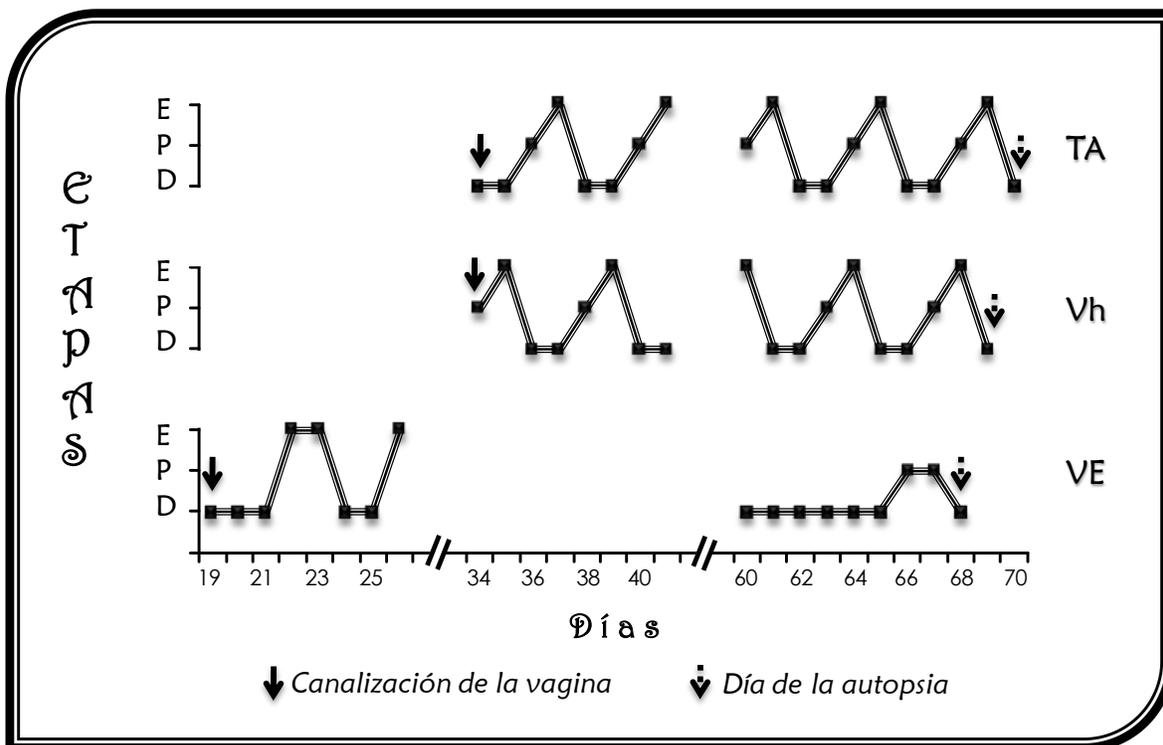
**Figura 21B.** Fotomicrografía de un **quiste folicular**, donde se observa una disminución de las capas de células granulosas (CG), ausencia de ovocito, hiperplasia de las células de la teca (CT) y descamación de las células de la granulosa (DCG) en el antro folicular.



## Ciclo Estral

En comparación al ciclo estral de animales TA, la inyección del Vh no modificó el patrón cíclico. Aproximadamente el 80% de las hembras inyectadas con VE mostraron una citología vaginal caracterizada por varios días en diestro (figura 22).

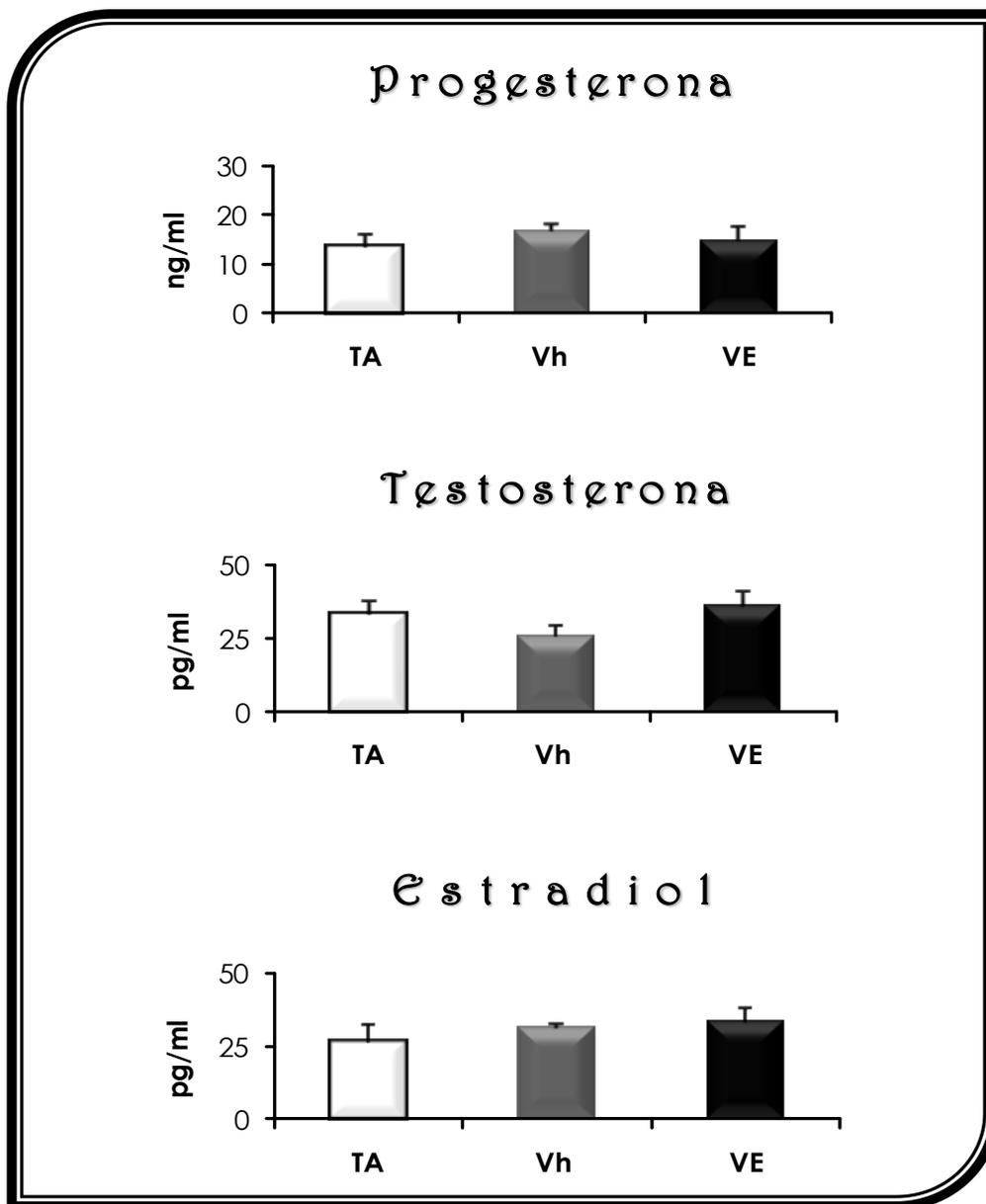
**Figura 22.** Patrón representativo del **ciclo estral** de animales testigo absoluto (TA) o inyectados i.p. con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) a los 10 días de edad y sacrificados en la etapa adulta, en el día del **DIESTRO 1**.



## Concentración de Hormonas Esteroides en Suero

La concentración de progesterona, testosterona y estradiol de los animales inyectados con Vh o VE, fue similar al de los animales TA (figura 23).

**Figura 23.** Media  $\pm$  eem de la concentración sérica de **Progesterona, Testosterona y Estradiol** en animales testigo absoluto (TA) o inyectados i.p. con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) a los 10 días de edad y sacrificados en la etapa adulta, en el día del **DIESTRO**.



Todos los grupos estuvieron conformados de 8 a 10 animales.



## CONCLUSIONES

En el animal infantil, la inyección de una dosis de VE es suficiente para inducir una condición de ovario poliquístico, semejante a la descrita en la literatura (Rosa-E-Silva y col., 2003; Rosas, 2006) que se caracteriza por la formación de prequistes y quistes foliculares, alteración del ciclo estral y adelanto en el inicio de la pubertad.

En la literatura se ha mencionado que la administración de VE induce aumento en la concentración de testosterona y estradiol (Rosa-E-Silva y col., 2003; Morales-Ledesma y col., 2010), sin embargo, en el presente estudio no observamos este comportamiento. Lo que se podría atribuir a que en nuestro caso los animales se sacrificaron al presentar un diestro, mientras que en los otros casos los animales fueron sacrificados al estro vaginal.

## EXPERIMENTO 5

### Efecto de la Sección Unilateral del Nervio Ovárico Superior de Animales con SOPQ

Para analizar en el modelo del animal con SOPQ, la participación del NOS en la regulación de la secreción de hormonas esteroideas, en el presente experimento se realizó la sección unilateral del NOS en el día del estro y sus efectos fueron evaluados 24 horas post-cirugía.

#### Peso Corporal y Peso Relativo de Órganos

La SNOI en animales tratados con el Vh resultó en menor masa adrenal, respecto al grupo con SNOI. En las hembras inyectadas con VE, la SNOI resultó en un menor peso corporal en comparación con el grupo Vh. La SNOD en animales tratados con VE ocasionó mayor peso corporal y menor peso del útero, respecto al grupo con VE y SNOI (cuadro 5).

**Cuadro 5.** Media  $\pm$  eem del **peso corporal (g)** y de los **pesos relativos (mg/100g)** de los ovarios, útero y masa adrenal de animales que fueron o no, inyectados i.p. con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) a los 10 días de edad, sometidos en el día del **estro** a la sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) y sacrificados a las **24 horas** de la cirugía.

Grupos	n	Peso Corporal (g)	Ovario		Peso de Útero	Masa Adrenal
			Izquierdo	Derecho		
SNOI	6	197 $\pm$ 5.1	12.9 $\pm$ 1.5	12.5 $\pm$ 0.8	111.4 $\pm$ 8.7	29.2 $\pm$ 0.4
Vh SNOI	10	209 $\pm$ 3.7	13.5 $\pm$ 0.9	13.5 $\pm$ 0.8	105.0 $\pm$ 2.8	22.5 $\pm$ 1.3 *
VE SNOI	10	188 $\pm$ 4.8 ♣	12.7 $\pm$ 1.2	11.5 $\pm$ 0.9	112.0 $\pm$ 6.5	22.6 $\pm$ 0.9
SNOD	6	201 $\pm$ 3.2	13.7 $\pm$ 1.2	13.0 $\pm$ 1.3	104.2 $\pm$ 7.2	26.9 $\pm$ 1.5
Vh SNOD	10	214 $\pm$ 4.6	13.6 $\pm$ 0.6	14.2 $\pm$ 0.4	104.4 $\pm$ 2.7	25.8 $\pm$ 1.0
VE SNOD	9	213 $\pm$ 8.1 †	13.8 $\pm$ 1.2	12.7 $\pm$ 1.2	95.9 $\pm$ 3.5 †	23.2 $\pm$ 0.8

\* p < 0.05 vs. su respectivo grupo sin inyección; ♣ p < 0.05 vs. su respectivo grupo Vh; † p < 0.05 vs. SNOI (prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey-Kramer).

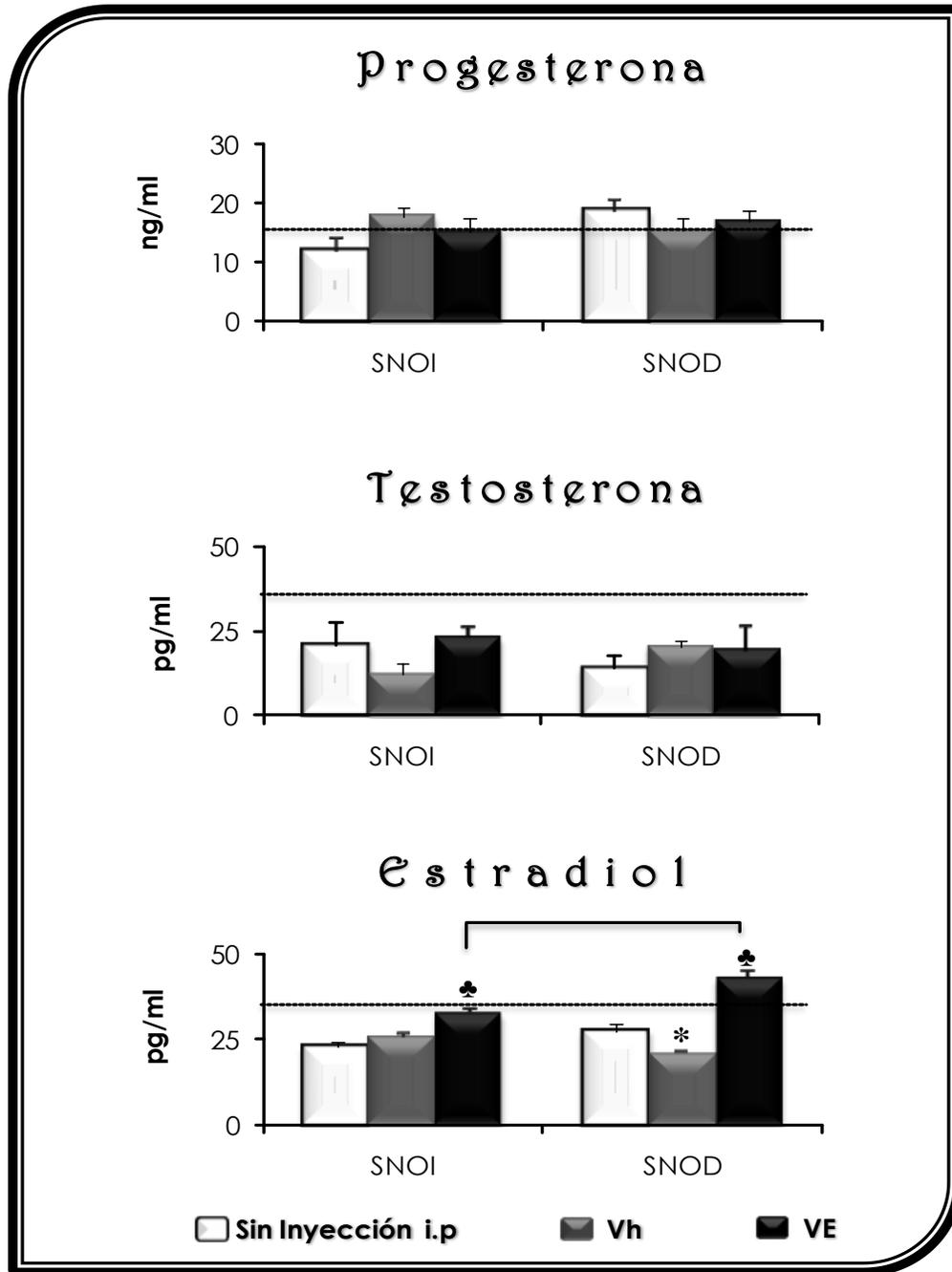


## Concentración de Hormonas Esteroideas en Suero

La concentración de **Progesterona** o **Testosterona**, de los animales inyectados i.p con el Vh o VE y sometidos a la sección unilateral del NOS, fue similar a la de su grupo control (figura 24).

La SNOD realizada en los animales inyectados con el Vh resultó en menor concentración de **Estradiol** en comparación a su grupo control. En las hembras inyectadas con VE, la sección izquierda o derecha del NOS resultó en mayor concentración de estradiol, respecto a su grupo Vh; efecto que fue más pronunciado ante la SNOD (figura 24).

**Figura 24.** Media  $\pm$  eem de la concentración sérica de **Progesterona, Testosterona y Estradiol** en animales que fueron o no, inyectados i.p. con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) a los 10 días de edad, sometidos en el día del **estro** a la sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) y sacrificados a las **24 horas** de la cirugía.



\*  $p < 0.05$  vs. su grupo sin inyección; ♣  $p < 0.05$  vs. su Vh; en *línea continua* se muestran las diferencias con los grupos sometidos a la SNOI (prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey-Kramer). Con línea punteada se representa la concentración hormonal del grupo VE. Todos los grupos estuvieron conformados de 8 a 10 animales.



## CONCLUSIONES

En la rata con SOPQ, inducido por la administración de VE, la eliminación del NOS derecho resultó en el incremento de la concentración sérica de estradiol. Estos resultados nos permite sugerir que en el modelo del animal con SOPQ, el NOS derecho regula de manera inhibitoria la secreción de la hormona.

A diferencia de lo reportado en la literatura (Morales-Ledesma y col., 2010), en el presente experimento observamos que en la rata con SOPQ después de realizar la sección unilateral del NOS no se modifica la concentración sérica de progesterona ni testosterona. Es posible que esto se deba a la edad en que se realizó la cirugía o bien al periodo transcurrido entre el proceso quirúrgico y la autopsia.

---

## EXPERIMENTO 6

### Efecto de la Estimulación VIPérgica del Ovario Denervado de Animales con SOPQ

En el presente experimento se analizó la participación del VIP en la regulación de la esteroidogénesis ovárica del animal con SOPQ. Para ello, se eliminó una de las fuentes de inervación simpática, mediante la sección unilateral del NOS, y en el mismo acto quirúrgico se realizó el remplazo del VIP mediante la inyección del péptido en la bursa del ovario denervado.

#### Peso Corporal y Peso Relativo de Órganos

La inyección de SS en la bursa del OI de las hembras con VE y **SNOI** resultó en menor masa adrenal, respecto a su grupo Vh; mientras que la inyección de VIP ocasionó un menor peso del útero en comparación a su grupo Vh y a su grupo inyectado con SS en la bursa del OI. Los animales con SNOI inyectados con VIP en la bursa del ovario denervado mostraron un menor peso del OI que el del grupo inyectado con SS (cuadro 6).



**Cuadro 6.** Media  $\pm$  eem del **peso corporal (g)** y de los **pesos relativos (mg/100g)** de los ovarios, útero y masa adrenal de animales que fueron o no, inyectados i.p. con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) a los 10 días de edad, sometidos en el día del **estro** a la sección del nervio ovárico superior izquierdo (**SNOI**) más la inyección de solución salina (SS) o péptido intestinal vasoactivo (VIP) en la bursa del ovario denervado y sacrificados a las **24 horas** de la cirugía.

Grupos	n	Peso Corporal (g)	Ovario		Peso de Útero	Masa Adrenal
			Izquierdo	Derecho		
SNOI SS	6	182 $\pm$ 7.3	18.5 $\pm$ 1.9	17.2 $\pm$ 1.8	121.2 $\pm$ 8.9	30.5 $\pm$ 2.3
Vh SNOI SS	10	208 $\pm$ 6.9	14.7 $\pm$ 0.8	14.1 $\pm$ 0.7	118.5 $\pm$ 5.8	28.7 $\pm$ 1.1
VE SNOI SS	8	216 $\pm$ 11.4	12.8 $\pm$ 0.6	11.6 $\pm$ 1.1	106.9 $\pm$ 2.3	24.0 $\pm$ 0.9 ♣
SNOI VIP	6	188 $\pm$ 7.8	12.4 $\pm$ 1.2 ♦	13.1 $\pm$ 1.1	111.6 $\pm$ 8.2	25.9 $\pm$ 1.3
Vh SNOI VIP	11	210 $\pm$ 7.5	14.6 $\pm$ 0.6	14.7 $\pm$ 0.8	111.6 $\pm$ 4.6	27.5 $\pm$ 1.0
VE SNOI VIP	9	197 $\pm$ 10.2	12.8 $\pm$ 1.0	13.5 $\pm$ 0.7	86.2 $\pm$ 0.9 ♣♦	24.3 $\pm$ 1.1

♣ p < 0.05 vs. su respectivo grupo Vh; ♦ p < 0.05 vs. su respectivo grupo inyectado con SS (prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey-Kramer).



En los animales con **SNOD**, la inyección de VIP en la bursa del ovario denervado resultó en mayor peso corporal y menor peso del OI, respecto al grupo inyectado con SS. En los animales tratados con VE, la SNOD seguida de la estimulación con VIP en el ovario denervado resultó en mayor peso corporal, en comparación a su grupo inyectado con el Vh (cuadro 7).

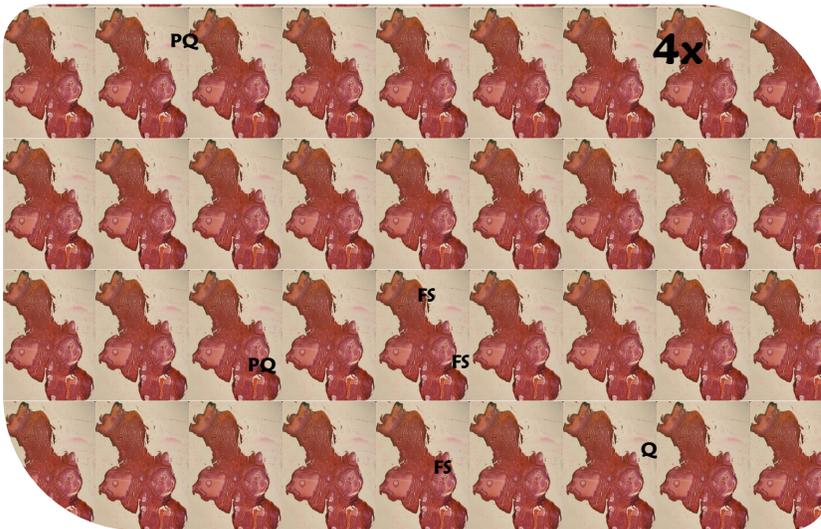
**Cuadro 7.** Media  $\pm$  eem del **peso corporal (g)** y de los **pesos relativos (mg/100g)** de los ovarios, útero y masa adrenal de animales que fueron o no, inyectados i.p. con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) a los 10 días de edad, sometidos en el día del **estro** a la sección del nervio ovárico superior derecho (**SNOD**) más la inyección de solución salina (SS) o péptido intestinal vasoactivo (VIP) en la bursa del ovario denervado, y sacrificados a las **24 horas** de la cirugía.

Grupos	n	Peso Corporal (g)	Ovario		Peso de Útero	Masa Adrenal
			Izquierdo	Derecho		
SNOD SS	6	189 $\pm$ 3.1	15.2 $\pm$ 0.5	14.2 $\pm$ 0.7	101.4 $\pm$ 4.7	27.5 $\pm$ 1.4
Vh SNOD SS	9	206 $\pm$ 8.5	13.8 $\pm$ 0.9	14.9 $\pm$ 0.8	107.7 $\pm$ 3.5	28.2 $\pm$ 1.6
VE SNOD SS	9	207 $\pm$ 5.8	12.2 $\pm$ 1.1	12.1 $\pm$ 0.9	102.1 $\pm$ 3.9	24.9 $\pm$ 1.2
SNOD VIP	6	205 $\pm$ 4.7 $\blacklozenge$	13.1 $\pm$ 0.5 $\blacklozenge$	14.8 $\pm$ 0.9	108.2 $\pm$ 7.6	28.9 $\pm$ 1.1
Vh SNOD VIP	8	189 $\pm$ 3.5	13.9 $\pm$ 1.0	16.0 $\pm$ 1.3	127.2 $\pm$ 11.7	25.2 $\pm$ 2.2
VE SNOD VIP	8	217 $\pm$ 8.4 $\clubsuit$	11.3 $\pm$ 0.9	13.9 $\pm$ 1.8	112.2 $\pm$ 6.3	25.9 $\pm$ 1.7

$\clubsuit$  p < 0.05 vs. su respectivo grupo Vh;  $\blacklozenge$  p < 0.05 vs. su respectivo grupo inyectado con SS (prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey-Kramer)

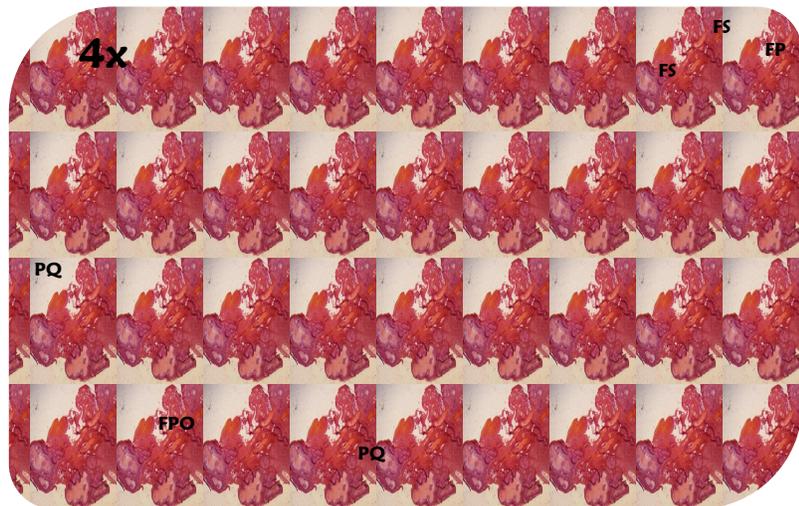
## Histología del Ovario

En el animal con SOPQ, la estimulación VIPérgica del ovario denervado, fuese el izquierdo o el derecho, no modificó la morfología de la gónada denervada (figura 25A) ni de la que mantuvo intacta su inervación (figura 25B), donde las estructuras predominantes son los prequistes y quistes foliculares. En la figura 25 (A, B) se muestra el corte histológico representativo del ovario de animales inyectados a los 10 días de edad con VE, sometidos a los 60 días de edad, en el día del estro, a la sección unilateral del NOS más la estimulación del ovario denervado con VIP y sacrificados a las 24 horas de la cirugía.



**Figura 25A.** Fotomicrografía del ovario denervado y estimulado con VIP de un animal con SOPQ, en el que se muestran algunos folículos secundarios (FS), estructuras prequísticas (PQ) y un quiste folicular (Q).

**Figura 25B.** Fotomicrografía del ovario contralateral al ovario denervado y estimulado con VIP de un animal con SOPQ, en el que se muestran algunos folículos primarios (FP), secundarios (FS), un folículo preovulatorio (FPO) y algunas estructuras prequísticas (PQ).



---

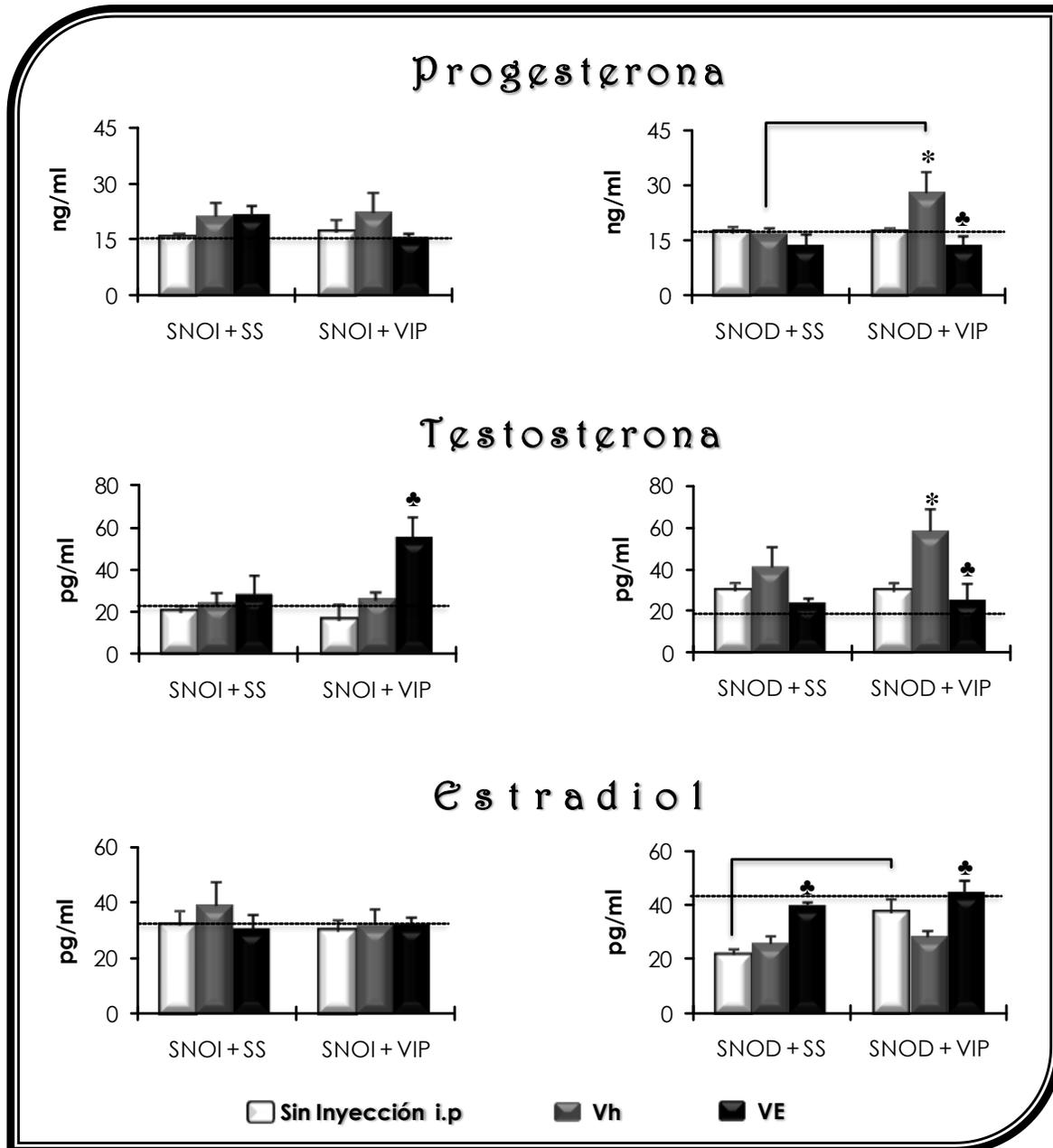
## Concentración de Hormonas Esteroides en Suero

En los animales inyectados con VE, la **SNOI** seguida de la estimulación VIPérgica del ovario denervado resultó en mayor concentración de **testosterona** que su grupo Vh (figura 26).

En comparación a su respectivo grupo control, los animales tratados con el Vh y sometidos a la **SNOD** seguida de la estimulación con VIP del ovario denervado, presentaron una mayor concentración de **progesterona** y **testosterona**, que fue menor cuando los animales se inyectaron previamente con el VE (figura 26).

La SNOD seguida de la inyección de VIP en la bursa del ovario denervado resultó en mayor concentración de **estradiol**, en comparación al grupo inyectado con SS. En los animales tratados con VE y SNOD, la inyección de SS o VIP en la bursa de la gónada denervada resultó en una mayor concentración de estradiol que su grupo Vh; efecto que no se observó cuando el ovario denervado fue el izquierdo (figura 26).

**Figura 26.** Media  $\pm$  eem de la concentración sérica de **PROGESTERONA, TESTOSTERONA y ESTRADIOL** de animales que fueron o no, inyectados i.p. con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) a los 10 días de edad, sometidos en el día del **estro** a la sección del nervio ovárico superior izquierdo (**SNOI**) o derecho (**SNOD**) más la inyección de solución salina (SS) o péptido intestinal vasoactivo (VIP) en la bursa del ovario denervado, y sacrificados a las **24 horas** de la cirugía.



\*  $p < 0.05$  vs. su grupo sin inyección i.p.; ♣  $p < 0.05$  vs. su Vh en *línea continua* se muestran las diferencias contra los grupos inyectados en la bursa ovárica con SS (prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey-Kramer). Con línea punteada se representa la concentración hormonal del grupo VE con SNOI o SNOD. Todos los grupos estuvieron conformados de 8 a 10 animales.



## CONCLUSIONES

Por estudios *in vitro* se ha mostrado que al estimular con VIP el ovario de animales con SOPQ aumenta la secreción de andrógenos (Parra y col., 2007). No obstante, al realizar la estimulación *in vivo* del ovario denervado, se observa que cada ovario responde de manera diferente al estímulo con VIP, donde sólo el izquierdo aumenta la secreción de testosterona. Estos resultados nos permiten sugerir que en los ovarios existe una expresión diferente de los receptores a VIP, o bien, que la información que transcurre por el NOS izquierdo es diferente a la del derecho.

---

# DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que en el modelo de la rata adulta cíclica, la respuesta esteroideogénica del ovario al péptido intestinal vasoactivo varía en función del día del ciclo estral y del ovario estimulado. En el modelo del animal con SOPQ, la respuesta del ovario al estímulo con VIP es asimétrica y depende del ovario denervado.

En nuestros animales se observó que la inyección de la solución salina en la bursa ovárica de animales cíclicos modifica la esteroideogénesis ovárica, efectos que dependen tanto del día del ciclo estral como del ovario en que se administre la SS. Proponemos que algunos de los factores causantes de estos cambios son los agentes estresores a los que están expuestos los animales durante el proceso quirúrgico, tales como: 1) La **anestesia con éter**. Previamente hemos mostrado que al anestesiar con éter a los animales en los diferentes días del ciclo estral se modifica la concentración de progesterona, testosterona, estradiol y LH (Barco y col., 2003; Flores y col., 2005). Los efectos del anestésico fueron atribuidos a la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Ante condiciones de estrés, incrementa la secreción del factor liberador de corticotropinas (CRF) y la ACTH, las cuales en su momento inhiben la secreción de la GnRH y de la LH, respectivamente (Chrousos y col., 1998). 2) La **perforación del peritoneo**. La operación simulada, que implica sección de piel, músculo y peritoneo trae consigo alteraciones en las hormonas esteroideas (Barco y col., 2003; Cruz y col., 2006; Flores y col., 2006, 2008). La interpretación que se ha dado a éstos resultados se ha basado en el hecho de que el peritoneo recibe fibras que se proyectan hacia el ovario (Barco y col., 2003), de ahí que su perforación resulte en la modificación de la concentración de hormonas esteroideas.

No descartamos la posibilidad de que al momento de la administración de la solución salina, la sola manipulación del ovario pudiera dar lugar a la **activación de algunas fibras** que inervan la gónada, a través de las cuales se envíe información hacia las adrenales. En apoyo a esta interpretación, se ha descrito que ciertas fibras de origen vagal alcanzan la



glándula adrenal vía el ganglio celiaco (Coupland y col., 1989; Berthoud y Powley, 1993), centro en el que además se originan y se proyectan fibras principalmente de naturaleza simpática hacia el ovario (Dissen y Ojeda, 1999). El ganglio celiaco actuaría entonces como un centro de comunicación entre el ovario y las adrenales, al enviar inervación hacia ambas glándulas, como ha sido ya propuesto (Flores y col., 2006). Asimismo, se ha observado que la inyección de la glándula adrenal izquierda y del ovario izquierdo con dos trazadores virales retrógrados, muestra doble marcaje en varias estructuras del cerebro (Tóth y col., 2008). Lo que ha permitido sugerir que a nivel neuronal, existe un control integrado de la función ovárica y adrenal (Tóth y col., 2008). Partiendo de estas evidencias, nuestros resultados apoyan la idea de una comunicación neural entre el ovario y la adrenal ya que ante la administración de solución salina en la bursa del ovario, la adrenal responde con el aumento de su masa.

El VIP estimula la maduración del ovocito (Tornell y col., 1988) e incrementa la síntesis del activador del plasminógeno (Liu y col., 1987). El grupo de Schmidt (1990) mostró que el VIP estimula la liberación del ovocito de manera dosis dependiente, ya que la perfusión de los ovarios de ratas prepúberes con VIP a una concentración de  $10^{-7}$  M, estimula la ovulación en el 100% de los ovarios perfundidos, a diferencia de la concentración de  $10^{-9}$  M que sólo lo hace en el 50% de los ovarios y con una cuota ovulatoria muy baja. Con base en tales resultados, se sugirió que el VIP estimula algunos de los eventos previos que culminan con la ovulación (Liu y col., 1987; Schmidt y col., 1990). En el presente estudio se observó que la inyección unilateral de VIP en los ovarios de animales en proestro, no aumentó el número de **ovocitos liberados** independientemente de la gónada estimulada. Estas diferencias pueden ser explicadas por la dosis utilizada.

La concentración de VIP en los ovarios disminuye desde el día 32 de edad hasta el día del primer estro o primer diestro vaginal (Advis y col., 1989). Durante el ciclo estral de la rata, la concentración ovárica de VIP es mayor en el diestro 2 que en el proestro y estro (Parra y col., 2007). El VIP estimula la actividad enzimática del ovario, lo que favorece una mayor biosíntesis de hormonas esteroides (Davoren y Hsueh, 1985; Ahmed y col., 1986; Trzeciak y col., 1986; George y Ojeda, 1987). Los resultados del presente estudio muestran



que los efectos *in vivo* del VIP, sobre la síntesis de progesterona, testosterona y estradiol, dependen de la etapa del ciclo estral en que se administre el péptido y de la gónada estimulada. Las variaciones en la concentración de hormonas esteroides observadas a lo largo del ciclo estral, podrían explicarse por la expresión de los receptores a VIP en células de la granulosa y del compartimiento teco-intersticial (Vaccari y col., 2006; Cecconi y col., 2004) así como por el número de células de la granulosa que responden al péptido en cada etapa del ciclo estral. De acuerdo con el grupo de Kasson (1985), en el estrato granuloso existen dos subpoblaciones, de las cuales una responde al VIP y otra a la FSH. Es posible que el número de células que responden al VIP, así como la expresión de sus receptores, pudieran estar dado en función del desarrollo folicular.

En células de la granulosa en cultivo, el VIP estimula la actividad de la  $3\beta$ -HSD (Davoren y Hsueh, 1985) y la síntesis de **progesterona** (Davoren y Hsueh, 1985; Ahmed y col., 1986), lo cual no ocurre cuando el estímulo con VIP se realiza en la bursa del ovario, independientemente del día del ciclo o de la gónada estimulada. Estas diferencias podrían explicarse porque en los días del diestro 2, proestro y estro, la principal fuente de progesterona es la adrenal (Barco y col., 2003; Flores y col., 2005; 2008). Al momento, no contamos con una explicación del porqué en el día del diestro 1, el VIP no fue capaz de inducir una mayor secreción de progesterona, ya que en este día del ciclo, la progesterona circulante es principalmente de origen ovárico (Flores y col., 2008).

El VIP estimula la actividad de la  $17\alpha$ -hidroxilasa (Johnson y col., 1994), lo que favorece una mayor biosíntesis de andrógenos (Ahmed y col., 1986; Johnson y col., 1994; Parra y col., 2007). Nuestros resultados muestran que el ovario izquierdo tiene una mayor sensibilidad al efecto del VIP y que en el día del estro su efecto es inhibitorio sobre la secreción de **testosterona**. Al momento, tenemos tres posibilidades para explicar la respuesta al estímulo VIPérgico durante el ciclo estral: 1) por una diferente capacidad de síntesis de testosterona por el ovario derecho e izquierdo, tal y como ya se ha descrito que ocurre a lo largo del ciclo estral de la rata (Barco y col., 2003; Flores y col., 2006). 2) que la expresión del receptor VPAC2 en las células teco-intersticiales varíe en función del día del ciclo estral, que pudiera estar modulada por la LH. En la rata, las células tecales-intersticiales



presentan los dos receptores de VIP, de los cuales, sólo la expresión del receptor VPAC2 es amplificada cuando las ratas son previamente inyectadas con gonadotropina coriónica humana, mientras que la gonadotropina coriónica equina no modifica la expresión de ninguno de los receptores (Vaccari y col., 2006). 3) que la inervación que recibe cada gónada es diferente. En apoyo a ésta interpretación se ha mostrado que existe una vía de comunicación multisináptica entre el ovario y el cerebro, que es más abundante hacia el ovario izquierdo (Tóth y col., 2007). El área preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA) envía eferencias hacia el ovario que regulan de manera asimétrica la concentración de VIP, donde el ovario izquierdo recibe una mayor cantidad de fibras nerviosas que el derecho (Advis y col., 1989).

El VIP estimula la actividad de las aromatasas (George y Ojeda, 1987), lo que resulta en una mayor biosíntesis de **estradiol** (Davoren y Hsueh, 1985; Ahmed y col., 1986; Parra y col., 2007). Nuestros resultados muestran que tal evento depende del día del ciclo estral y presenta asimetría. En el día del diestro 2, el VIP estimula la secreción de estradiol en el ovario izquierdo y la inhibe en el derecho; mientras que en el día del proestro, la inyección del péptido en cualquiera de los ovarios estimula la secreción de estradiol. Por lo anterior, sugerimos que el papel del VIP en la secreción de estradiol depende del tipo y tamaño del folículo. La respuesta del estrato granuloso al neuropéptido depende de tres factores: 1) de la presencia de una determinada subpoblación de células de la granulosa que responden al estímulo VIPérgico (Kasson y col., 1985); y 2) del tamaño folicular, puesto que, conforme el folículo se acerca al estadio preovulatorio, la respuesta esteroideogénica de las células de la granulosa ante el estímulo VIPérgico deja de ser dosis-dependiente (Johnson y col., 1994). 3) que el efecto del VIP sea regulado por la concentración plasmática de estradiol, el cual modula la expresión de los receptores VPAC2 en células de la granulosa. En apoyo a esta interpretación se ha descrito que en la mujer postmenopáusica el VIP pierde su capacidad de incrementar el flujo sanguíneo vaginal, a diferencia de lo que ocurre cuando son previamente tratadas con hormonas sexuales donde se observa su efecto vasodilatador (Palle y col., 1991).



La asimetría que observamos en la concentración de estradiol en el día del diestro 2, apoya la idea de que la capacidad de cada gónada para sintetizar la hormona es diferente durante el ciclo estral (Barco y col., 2003; Cruz y col., 2006; Flores y col., 2008), lo cual pudiera ser el resultado de las diferencias en la inervación que reciben las gónadas (Klein y Burden, 1988; Advis y col., 1989; Tóth y col., 2007). Nuestros resultados nos permiten sugerir que en el día del diestro 2, el VIP en la gónada izquierda modula de manera estimulante la secreción de estradiol y la inhibe en el ovario derecho, en tanto que en el día del proestro el efecto es estimulante en ambos ovarios, lo que además apoyaría la idea de que la inervación modula la sensibilidad del ovario a las gonadotropinas, como ha sido propuesto por otros (Morales y col., 1998; Morán y col., 2000).

Con base en los cambios observados en la concentración plasmática de **FSH** en respuesta a la inyección unilateral de VIP. Sugerimos que el VIP activa algunas fibras nerviosas en el ovario y envía información hasta el sistema nervioso central, lo que pudo haber modificado la actividad de las neuronas GnRHérgicas. Esto además explicaría la diferencia en el patrón de secreción de ambas gonadotropinas. Además de que la regulación es asimétrica y varía durante el ciclo estral. Debido a que la inyección del VIP se realizó de manera local en la gónada, descartamos que el péptido haya actuado directamente sobre el hipotálamo o la misma hipófisis.

En la rata, la sección unilateral del NOS en el día del estro resulta en un aumento de la concentración sérica de progesterona, medida 1 hr después de la sección (Flores y col. 2011). En nuestro estudio, en el que los animales fueron sacrificados 24 hrs después de la sección unilateral, no se observaron efectos significativos sobre las concentraciones de progesterona, testosterona y estradiol. La diferencia observada en los efectos sobre la concentración de progesterona puede ser explicada por: 1) el lapso entre la denervación y la autopsia (1 hr vs. 24 hrs); 2) la vía de abordaje quirúrgico al realizar la denervación (ventral en el primer caso y dorso-lateral en nuestro estudio); 3) el día del ciclo estral en que fueron autopsiados los animales (estro en el primer caso y diestro 1 en nuestro estudio) y 4) la hora del día en que se realizó la cirugía (13.00 hrs en el primer caso y 10.30-11.30 hrs en el presente estudio). Según Ramírez (2011), los efectos de la sección unilateral del NOS

---

sobre la concentración sérica de la hormonas ováricas dependen del lapso transcurrido entre la cirugía y la autopsia. Además, los efectos agudos de la castración o la adrenalectomía bilateral sobre las concentraciones de progesterona, testosterona y estradiol dependen del día del ciclo estral estudiado y de la vía de abordaje (ventral o dorso-lateral) (Flores y col., 2008). A partir de estos resultados los autores han sugerido que diferentes fibras nerviosas llegan a las zonas del peritoneo.

Según Klein y Burden (1988) el ovario derecho recibe un mayor número de fibras simpáticas que el izquierdo, lo que explicaría la diferente respuesta a la sección unilateral del NOS (Chávez y col., 1994; Morán y col., 2000). En el presente estudio, la sección del NOS derecho seguida de la inyección de VIP en la bursa del ovario derecho, resultó en una mayor concentración sérica de estradiol, respuesta que no se observó en el ovario izquierdo. Con base en estos resultados proponemos que los ovarios responden de manera diferente al estímulo con VIP en función del número de fibras que recibe cada uno. No descartamos que el incremento en la capacidad de respuesta del ovario derecho al estímulo VIPérgico se deba a una mayor expresión de los receptores VPAC2, que son los únicos receptores a VIP presentes en el compartimiento granuloso (Vaccari y col., 2006), lo que favorecería por un lado, la formación de receptores a FSH (Mayerhofer y col., 1997) y por otro, el aumento en la síntesis de andrógenos aromatizables (Johnson y col., 1994), eventos que en su conjunto estimularían una mayor secreción de estradiol (Davoren y Hsueh, 1985).

En la rata infantil o adulta, la inyección de **VE** resulta en la aparición de un cuadro de poliquistosis ovárica (Brawer y col., 1978, 1986; Rosa-E-Silva y col., 2003; Morales-Ledesma y col., 2010), similar al del SOPQ en la mujer (Yen, 2001; Hoyt y Schmidt, 2004). Los ovarios de estos animales presentan folículos atrésicos, prequistes, **quistes foliculares**, no se observan cuerpos lúteos y las concentraciones plasmáticas de estradiol y andrógenos son mayores que en el grupo control (Barria y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003, Morales-Ledesma y col., 2010). Esta descripción histológica, corresponde a la que se observó en el presente estudio, donde después de la administración del estrógeno se desarrollan prequistes y quistes foliculares, morfología que no se modifica por el estímulo con VIP. Es posible que este evento se deba al periodo tan corto al que estuvo expuesto el ovario al

---

neuropéptido. En apoyo a esta interpretación se ha mostrado que 15 días después de la administración del VE, incrementa el grado de atresia folicular (Brawer y col., 1986), a los 30 días comienzan a observarse las estructuras prequisticas (Lara y col., 2000), y los quistes foliculares se hacen evidentes a los 60 días post inyección del estrógeno (Brawer y col., 1986; Lara y col., 2000). Estas evidencias estarían indicando que tras la hiperactividad simpática (Lara y col., 1993; Parra y col., 2007), inducida por la administración del VE, se requiere de un periodo prolongado para que la morfología del ovario sea modificada.

En el presente estudio, la administración del VE adelantó el inicio de la **pubertad**, tal y como se ha observado previamente (Rosa-E-Silva y col., 2003; Rosas, 2006; Morales-Ledesma y col., 2010). Este evento puede explicarse por el incremento en la concentración sérica de estradiol, que se produce 15 días después de la administración del VE (Rosas, 2006), y que al actuar sobre el epitelio vaginal, resulta en su ruptura.

En nuestros animales, la inyección de VE en hembras infantiles resultó en la modificación del patrón del **ciclo estral**, caracterizado por un mayor número de días en diestro. Se ha descrito en la literatura que en los animales con el SOPQ, pueden observarse diferentes etapas del ciclo, aunque su duración se modifica (Brawer y col., 1986; Barria y col., 1993; Sotomayor-Zárate y col., 2008). Es posible que la aciclicidad sea el resultado de una alteración en el patrón de secreción de las gonadotropinas. En apoyo a ésta interpretación, se ha mostrado que la concentración sérica de gonadotropinas (Hemmings y col., 1983; Schulster y col., 1984; Rosa-E-Silva y col., 2003) así como la relación LH/FSH (Rosa-E-Silva y col., 2003) se modifica, lo que se traduce en la interrupción del ciclo estral.

No se descarta la posibilidad de que la alteración del ciclo estral de los animales con el SOPQ resulte del incremento en la actividad de las fibras NAérgica que inervan al ovario, dado que la sección unilateral (Morales-Ledesma y col., 2010) o bilateral del NOS (Barria y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003), permite el restablecimiento del patrón del ciclo estral.

En nuestro estudio, la administración de VE a los 10 días de edad no modificó la concentración sérica de hormonas esteroides, semejante a lo observado por otros autores

---

(Hemmings y col., 1983; Farookhi y col., 1985; Sotomayor-Zárate y col., 2008). Una posible explicación para este hecho es que no existe una relación directa entre la morfología del ovario y la concentración sérica de las hormonas. En la hembra del cerdo con ovarios poliquísticos, la concentración de progesterona, testosterona y estradiol es normal en suero, pero es mayor en el fluido folicular del quiste (Szulanczyk-Mencel y col., 2010). Otra posibilidad es que la modificación en la concentración hormonal dependa de las características de la mucosa vaginal del animal con SOPQ, esto se ve apoyado por el hecho de que los animales que presentan una histología vaginal similar a la del día del estro (presencia de escamas y ausencia de leucocitos), se caracterizan por altas concentraciones de estradiol y testosterona (Rosas, 2006; Morales-Ledesma y col., 2010).

En los animales con SOPQ, los efectos a largo plazo de la sección unilateral del NOS (realizada a los 24 días de edad), son asimétricos: mayor concentración de **progesterona** cuando se secciona el NOS izquierdo y menor cuando se secciona el derecho (Morales-Ledesma y col., 2010). En el presente estudio, la sección unilateral del NOS en el animal adulto con SOPQ no modificó la concentración de la hormona. Estas diferencias pueden ser explicadas por: 1) el lapso transcurrido entre la sección de los nervios y la autopsia (66 días en el estudio de Morales-Ledesma y 24 hrs en el presente estudio) y 2) en el primer caso la denervación se realizó en la etapa juvenil (24 días de edad), mientras que en el presente estudio se llevó a cabo en la etapa adulta (60 días de edad), lo que podría indicar que los efectos de la denervación simpática dependen de la edad del animal en que se realice la cirugía. En la rata sin el SOPQ se ha observado que la actividad del ganglio celiaco varía entre la rata de 24 y 28 días de edad, lo que hace pensar que los ovarios reciben diferente información por el NOS (Morán y col., 2009); y a partir de los 35 días de edad, el número de neuronas simpáticas presentes en el ganglio (Morán y col., 2009) es semejante al del animal adulto (Morán y col., 2005). Estas evidencias apoyan la idea de que el papel de la innervación depende de la edad del animal.

La estimulación VIPérgica del ovario denervado de un animal con SOPQ, resultó en una menor concentración sérica de progesterona, independiente del ovario denervado. Estos resultados muestran que en el animal con SOPQ, el VIP estimula la actividad

---

enzimática de la 17-hidroxilasa (Johnson y col., 1994), lo que explicaría la disminución de la concentración sérica de progesterona a causa de su rápido metabolismo hacia testosterona. Estos resultados nos permiten sugerir que la información que viaja por el NOS modula el efecto estimulante del VIP sobre la actividad enzimática y la secreción de progesterona, evento que pudiera estar dado en función de los receptores adrenérgicos que se activen. En apoyo a ésta interpretación, se ha mostrado que el NOS tiene un efecto dual en la regulación de la secreción de progesterona, donde la estimulación de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos inhibe la secreción de la hormona, mientras que la activación de los  $\beta$ , la estimula (Weiss y col., 1982).

En el animal con SOPQ, la sección unilateral (Morales-Ledesma y col., 2010) o bilateral (Barria y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003) del NOS disminuye la concentración elevada de **testosterona**, contrario a lo observado en el presente estudio, donde no la modifica. Al igual que para el caso de la progesterona, estas diferencias pudieran deberse al tiempo de evolución entre la cirugía y la autopsia, que de acuerdo a lo descrito en la literatura, fue mayor a los 10 días (Barria y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003; Morales-Ledesma y col., 2010), mientras que en el presente estudio fue de 24 hrs.

En los animales con SOPQ, la secreción de testosterona como respuesta a la estimulación VIPérgica de la gónada denervada es asimétrica. Sugerimos que el ovario derecho es más eficiente para aromatizar andrógenos que el izquierdo, lo que explicaría la disminución en la concentración de testosterona y el aumento de estradiol. La asimetría también podría deberse a que cada ovario responde de manera diferente al efecto vasodilatador del VIP (Said, 1980).

El aumento en la concentración sérica de andrógenos podría ser además el resultado de un mayor sustrato celular sobre el que esté actuando el VIP. En apoyo a ésta interpretación se ha observado que en los ovarios de la rata con SOPQ se incrementa la población de folículos atrésicos y se forman quistes foliculares (Lara y col., 2000; Sotomayor-Zárate y col., 2008), ambas estructuras presentan una teca hipertrofiada, sobre la que estaría actuando el péptido.

---

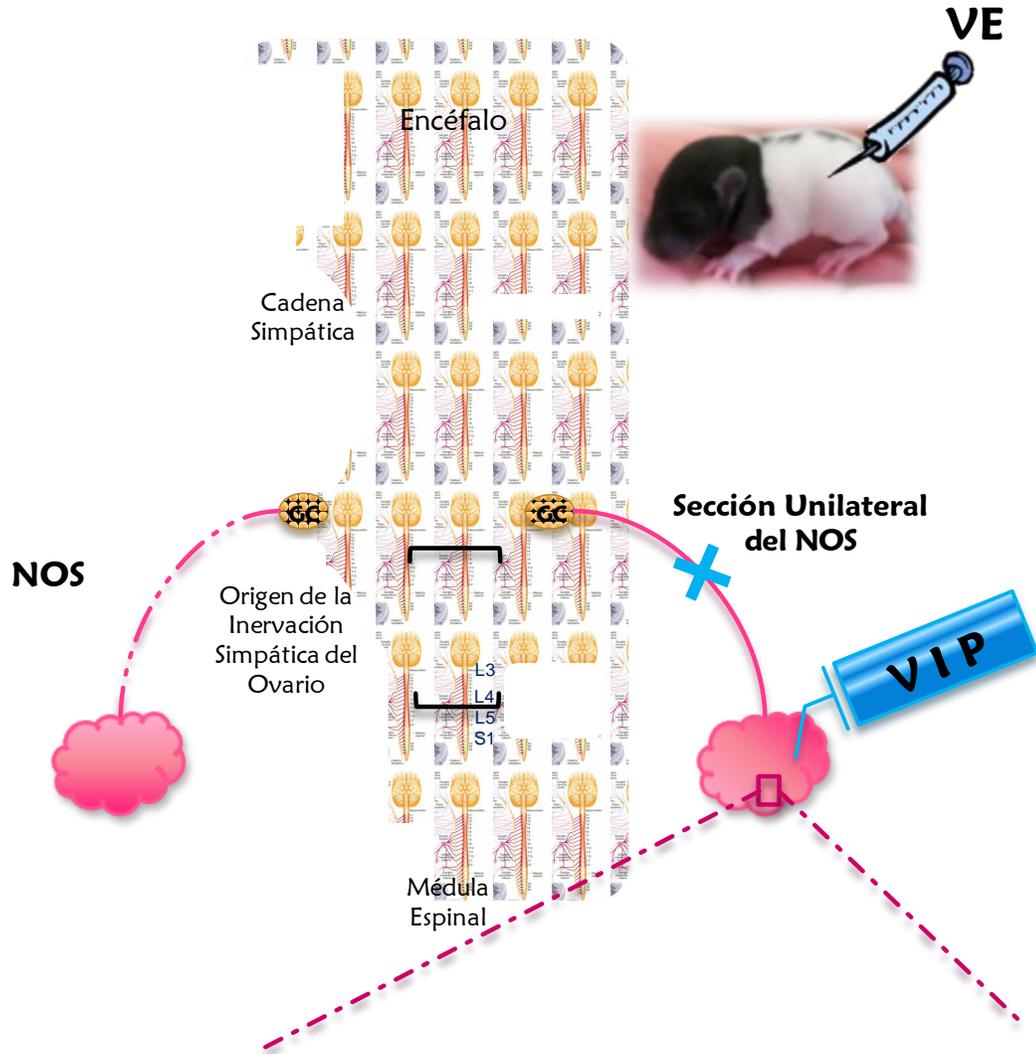
Es posible que el incremento de testosterona en suero que resulta del estímulo VIPérgico podría influenciar el desarrollo de la condición del SOPQ, como ha sido mostrado que ocurre ante la administración de letrozol (Manneras y col., 2007), o de DHT (Manneras y col., 2007; Feng y col., 2009).

En el animal con SOPQ, la sección unilateral del NOS incrementó la concentración sérica **de estradiol**, lo cual podría indicar que la inervación simpática modula de manera inhibitoria la secreción de la hormona. En apoyo a esta interpretación se ha observado que la administración crónica de guanetidina en el animal con SOPQ, aumenta la secreción de estradiol (Ruíz y col., 2008). En esos animales la inervación VIPérgica es la única que llegaría al ovario por el NOS (Ruíz y col., 2008). Según George y Ojeda, (1987) el VIP estimula actividad de las aromatasas.

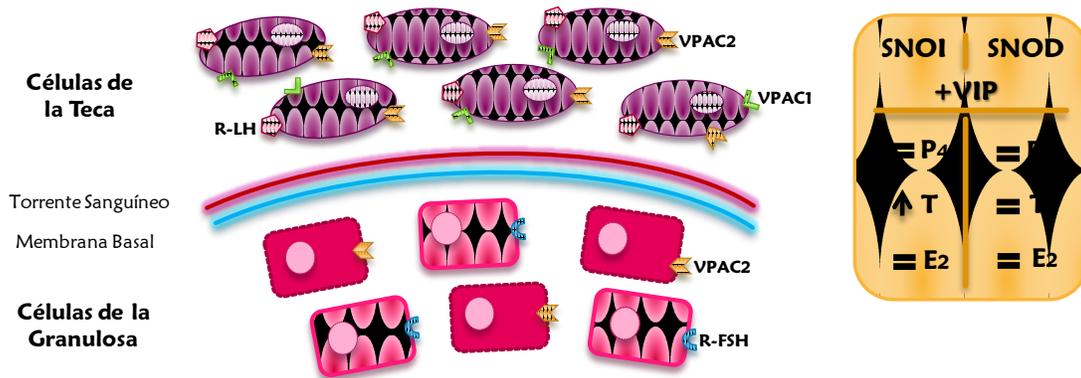
La estimulación VIPérgica del ovario denervado del animal con SOPQ, no amplifica la secreción de estradiol. Estos resultados difieren a la respuesta que se observa al cultivar los ovarios de animales con SOPQ donde el VIP estimula la secreción del estrógeno (Parra y col., 2007). A partir de nuestros resultados sugerimos que la biosíntesis de estradiol en el ovario derecho es modulada de manera inhibitoria por la inervación que recibe el ovario a través del NOS, dado que su eliminación resulta en una mayor secreción de estradiol que no se modifica aún después del estímulo con VIP.

Tomados en conjunto, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que en el animal cíclico, la respuesta esteroideogénica del ovario al péptido intestinal vasoactivo varía en función del día del ciclo estral y del ovario estimulado. En el modelo del animal con SOPQ, el péptido en el ovario denervado participa de manera estimulante en la regulación de la secreción de testosterona, lo que contribuye al desarrollo de la patología y al parecer la secreción de estradiol es independiente del estímulo VIPérgico.

# MODELO



## Pared Folicular:





En el modelo se muestra que en los animales con SOPQ, la estimulación local del ovario izquierdo con VIP incrementa la concentración de andrógenos en suero. Esta respuesta no se presenta cuando el ovario denervado es el derecho. Lo que nos permite sugerir que por cada uno de los nervios llega diferente información a los ovarios lo que hace que, la modulación que ejerce la inervación en la esteroidogénesis sea diferente. O bien, que la respuesta de cada ovario ante un estímulo dado es diferente, efecto que podría estar dado en función de la población de receptores a VIP (figura 27).

---

**Figura 27.** Modelo de los efectos del estímulo VIPérgico del ovario denervado de animales con SOPQ, sobre la biosíntesis de hormonas esteroideas. **VE**, valerato de estradiol; **GC**, ganglio celiaco; **NOS**, nervio ovárico superior; **VIP**, péptido intestinal vasoactivo; **SNOI**, sección del nervio ovárico superior izquierdo; **SNOD**, sección del nervio ovárico superior derecho; **P4**, progesterona; **T**, testosterona; **E2**, estradiol; **R-LH**, receptor de la LH; **R-FSH**, receptor de la FSH; **VPAC1**, **VPAC2**, receptores 1 y 2 de VIP.

---

# CONCLUSIONES

- ◆ La respuesta ovulatoria de animales en proestro no se modifica por efecto de la estimulación con VIP, independientemente del ovario inyectado.
- ◆ La estimulación del ovario con VIP no modifica la secreción de progesterona, independientemente del día del ciclo estral o del ovario estimulado.
- ◆ En el día del estro, el VIP modula de manera inhibitoria la secreción de testosterona en el ovario izquierdo.
- ◆ En el día del diestro 2, el VIP participa de manera asimétrica en la regulación de la secreción de estradiol, mientras que en el día del proestro su efecto es estimulante en ambos ovarios.
- ◆ La concentración sérica de hormonas esteroideas no se modifica por la sección unilateral del nervio ovárico superior en el día del estro.
- ◆ La estimulación VIPérgica del ovario denervado de animales sin el SOPQ, modula de manera asimétrica la secreción de estradiol en el día del estro.
- ◆ En el modelo del animal con SOPQ, el nervio ovárico superior derecho regula de manera inhibitoria la secreción de estradiol.
- ◆ En el ovario izquierdo (denervado) de los animales con SOPQ, el VIP regula de manera estimulante la secreción de testosterona.

- 
- ◆ En la rata con SOPQ, el VIP no participa en la regulación de la secreción de progesterona ni estradiol, independientemente del ovario denervado y estimulado.
  
  - ◆ En los animales con SOPQ, la estimulación VIPérgica de la gónada denervada no modificó la morfología del ovario estimulado ni del contralateral al estímulo.

---

# REFERENCIAS

- ☞ Advis JP, Ahmed CE, Ojeda SR. (1989) "Direct Hypothalamic Control of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) levels in the Developing Rat Ovary". **Brain Research Bulletin**. 22: 605 - 610.
- ☞ Aguado LI, Ojeda S.R. (1984a) "Ovarian Adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion". **Endocrinology**. 114: 1944 - 1946.
- ☞ Aguado LI, Ojeda SR. (1984b) "Prepubertal Ovarian Function is finely regulated by Direct Adrenergic Influences. Role of Noradrenergic Innervation". **Endocrinology**. 114: 1845 - 1853.
- ☞ Ahmed CE, Dees WL, Ojeda SR. (1986) "The Immature Rat Ovary is Innervated by Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)-Containing Fibers and Responds to VIP with Steroid Secretion". **Endocrinology**. 118: 1682 - 1689.
- ☞ Alm P, Alumets J, Hakanson R, Helm G, Owman C, Sjoberg N-O, Sundler F. (1980a) "Vasoactive Intestinal Polypeptide Nerves in the Human Female Genital Tract". **Am. J. Obstet. Gynecol**. 136: 349 - 351.
- ☞ Alm P, Alumets J, Hakanson R, Owman C, Sjoberg N-O, Sundler F, Wallis B. (1980b) "Origin and Distribution of VIP (Vasoactive Intestinal Peptide)-Nerves in the Genitourinary Tract". **Cell. Tissue Res**. 205: 337 - 347.
- ☞ Anesetti G, Lombide P, Chávez-Genaro R. (2009) "Prepubertal estrogen exposure modifies neurotrophin receptor expression in celiac neurons and alters ovarian innervation". **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**. 145: 35 - 43.
- ☞ Arias P. (2003) "Endocrinología de la Reproducción". En: Dvorkin MA, Cardinali DP. (Eds.) **Bases Fisiológicas de la Práctica Médica**. 13a edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Cap. 38. pp. 659 - 681.

- 
- ☞ Baker TG. (1982) “Células Germinales Primordiales”. En: Austin CR, Short RV. (Coordinadores). **Células Germinales y Fertilización**. Ediciones Científicas La Prensa Médica Mexicana, Cap.1, pp. 1 - 14.
  - ☞ Baljet B, Drukker J. (1980) “The Extrinsic Innervation of the Pelvic Organs in the Female Rat”. **Acta Anat.** 107: 241-267.
  - ☞ Baravalle C, Salvetti NR, Mira GA, Lorente JA, Ortega HH. (2007) “The Role of ACTH in the Pathogenesis of Polycystic Ovarian Syndrome in Rats: Hormonal Profiles and Ovarian Morphology”. **Physiological Research.** 56: 67-78.
  - ☞ Barco AI, Flores A, Chavira R, Damián-Matsumara P, Domínguez R, Cruz ME. (2003) “Asymmetric Effects of Acute Hemiovariectomy on Steroid Hormone Secretion by the In situ Ovary”. **Endocrine.** 21(3): 209 - 215.
  - ☞ Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE. (1993) “Ovarian Steroidal Response to Gonadotropins and  $\beta$ -adrenergic Stimulation is enhanced in Polycystic Ovary Syndrome: Role of Sympathetic Innervation”. **Endocrinology.** 133: 2696 - 2703.
  - ☞ Bergman RA, Afifi AK, Heidger PM. (1998) “Sistema Reproductor Femenino”. En: **Histología**. Editorial McGraw-Hill•Interamericana. México. Cap. 16. pp. 307 - 320.
  - ☞ Berne RM, Levy M.N. (2006) **Fisiología**. 4a edición, Editorial Elsevier-Science, Madrid, España. Cap. 51.
  - ☞ Berthoud HR, Powley TL (1993) “Characterization of Vagal Innervation to the Rat Celiac, Suprarenal and Mesenteric Ganglia”. **J Auton Nerv Syst.** 42: 153-170.
  - ☞ Besson J, Rotsztein W, Laburthe M, Epelbaum J, Beaudet A, Kordon C, Rosselin G. (1979) “Vasoactive Intestinal Peptide (VIP): Brain distribution, subcellular localization and effect of deafferentation of the hypothalamus in male rats”. **Brain. Res.** 165: 79 - 85.

- 
- ☞ Brawer JR, Munoz M, Farookhi R. (1986) "Development of the Polycystic Ovarian Condition (PCO) in the Estradiol Valerate-Treated Rat". **Biology of Reproduction**. 35: 647 - 655.
  - ☞ Brawer JR, Naftolin F, Martin J, Sonnenschein C. (1978) "Effects of a single Injection of Estradiol Valerate on the Hypothalamic Arcuate Nucleus and on Reproductive Function in the Female Rat". **Endocrinology**. 107: 274 - 279.
  - ☞ Burden H.W, Leonard M, Smith C.P y Lawrence I.E. (1983). The Sensory Innervation of the Ovary. "A horseradish peroxidase study in the rat". **The Anatomical Record**. 207: 623-627.
  - ☞ Burden H.W. (1978) "Ovarian Innervation". En: Jones R.E. (ed.) **The Vertebrate Ovary Comparative Biology**. Plenum Press. New York. pp. 615-628.
  - ☞ Burden HW. (1985) "The Adrenergic Innervation of Mammalian Ovaries". En: Ben-Jonathan N, Barh JM, Weiner RI. (Eds.) **Catecholamines as Hormone Regulator**. Raven Press. New York. pp. 261 - 278.
  - ☞ Campenot RB, MacInnis BL. (2004) "Retrograde Transport of Neurotrophins: fact and function". **J. Neurobiol**. 58: 217 - 229.
  - ☞ Carlson BM. (2009) "Embriología Humana y Biología del Desarrollo". 4a edición, Editorial Elsevier, Ámsterdam. Cap. 1, 16. pp. 3-13, 416 - 428.
  - ☞ Carr BR. (1999) "Female Reproductive System, Humans". En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) **Encyclopedia of Reproduction**. Academic Press. San Diego. Vol. 2. pp. 205-214.
  - ☞ Cecconi S, Rossi G, Barberi M, Scaldaferrri L, Canipari R. (2004) "Effect of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Vasoactive Intestinal Polypeptide on Mouse Preantral Follicle Development in Vitro". **Endocrinology**. 145: 2071 - 2079.
  - ☞ 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”. **Journal of Endocrinology.** 140: 197-201.
- ☞ Chávez R, Carrizosa L, Domínguez R. (1991) “Effects of Superior Ovarian Nerve Section on Spontaneous and induced Ovulation in Adult Rats”. **Med. Sci. Res.** 19: 41 - 42.
  - ☞ Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW. (1998) “Interactions between the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and the female reproductive system: Clinical Implications”. **An Intern. Med.** 129: 229-240.
  - ☞ Coupland RE, Parker TL, Kesse WK, Mohamed AA. (1989) “The innervations of the Adrenal Gland. III. Vagal Innervation”. **J Anat.** 163: 173-181.
  - ☞ Cruz ME, Flores A, Palafox MT, Meléndez G, Rodríguez JO, Chavira R, Domínguez R. (2006) “The Role of the Muscarinic System in Regulation Estradiol Secretion varies during the estrous cycle: The Hemiovariectomized Rat Model”. **Reproductive Biology and Endocrinology.** 4: 43.
  - ☞ Davoren JB, Hsueh AJW. (1985) “Vasoactive Intestinal Peptide: a novel stimulator of Steroidogenesis by Cultured Rat Granulosa Cells”. **Biology of Reproduction.** 33: 37 - 52.
  - ☞ Dees WL, Ahmed CE, Ojeda SR. (1986) “Substance P and Vasoactive Intestinal Peptide-Containing Fibers Reach the Ovary by Independent Routes”. **Endocrinology.** 119: 638 - 641.
  - ☞ Delgado S.M, Escudero C.G, Casais M, Gordillo M, Anzulovich A.C, Sosa Z y Rastrilla A. M. (2010) “Ovariz Physiology in the first Oestral Cycle: Influence of Noradrenergic and Cholinergic Neural Stimuli from Coeliac Ganglion”. **Steroids.** 75: 685-694.
  - ☞ Dissen G, Ojeda SR (1999) “Ovarian Innervation”. **Encyclopedia of Reproduccion.** Academic Press. USA. 3: 583 - 589.

- 
- ☞ Dissen GA, Hill DF, Costa ME, Dees WL, Lara HE, Ojeda SR. (1996) “A role for trkA nerve growth factor receptors in mammalian ovulation”. **Endocrinology**. 137:198–209.
  - ☞ Dissen GA, Lara HE, Leyton V, Paredes A, Hill DF, Costa ME, Martínez-Serrano A, Ojeda SR. (2000) “Intraovarian excess of Nerve Growth Factor increases Androgen secretion and disrupts Estrous Cyclicity in the Rat”. **Endocrinology**. 141: 1073 - 1082.
  - ☞ Domínguez R, Chávez R, Cruz ME. (1991) “La Regulación del Crecimiento y del Desarrollo del Folículo Ovárico”. En: **Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción**. Miguel Ángel Porrúa. México. pp. 161 - 192.
  - ☞ Domínguez R, Cruz ME, Moran C. (1998) “Differential Effects of Ovarian Local Anaesthesia during pro-oestrus on Ovulation by the Right or Left Ovary in normal and hemi-ovariectomized Adult Rats”. **Journal of Reproduction and Fertility**. 113: 185 - 190.
  - ☞ Dyer C, Erickson G. (1985) Norepinephrine Amplifies Human Chorionic Gonadotropin-Stimulated Androgen Biosynthesis by Ovarian Theca-Interstitial Cells. **Endocrinology**. 116: 1645 - 1652.
  - ☞ Espey LL. (1999) “Ovulation”. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) **Encyclopedia of Reproduction**. Academic Press. San Diego. Vol. 3. pp. 605 - 614.
  - ☞ Farookhi R, Hemmings R, Brawer JR. (1985) “Unilateral Ovariectomy restores Ovulatory Cyclicity in Rats with a Polycystic Ovarian Condition”. **Biology of Reproduction**. 32: 530 - 540.
  - ☞ Feder HH. (1981) “Estrous Cyclicity in Mammals” En: Adler NT. (Ed.) **Neuroendocrinology of Reproduction, Physiology and Behavior**. Plenum Press. New York. Chapter 10. pp. 279 - 308.



- ☞ Feng Y, Johansson J, Shao R, Mannerás L, Fernández-Rodríguez J, Billig H, Stener-Victorin E. (2009) “Hypothalamic Neuroendocrine Functions in Rats with Dihydrotestosterone-Induced Polycystic Electro-Acupuncture”. **Plos one**. 4 (8): 1-12.
  
- ☞ Flaws JA, Desanti A, Tilly KI, Javid RO, Kugu K, Johnson AL, Hirshfield AN, Tilly JL. (1995) “Vasoactive Intestinal Peptide-Mediated Suppression of Apoptosis in the Ovary: Potential Mechanisms of Action and Evidence of a Conserved Antiatretogenic Role through Evolution”. **Endocrinology**. 136: 4351 - 4359.
  
- ☞ Flores A, Gallegos AI, Velasco J, Mendoza FD, Montiel C, Everardo PM, Cruz ME, Domínguez R. (2008). “The Acute Effects of Bilateral Ovariectomy or Adrenalectomy on Progesterone, Testosterone and Estradiol Serum Levels depend on the surgical approach and the day of the Estrous Cycle when they are performed”. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 6: 48.
  
- ☞ Flores A, Meléndez G, Palafox MT, Rodríguez JO, Barco AI, Chavira R, Domínguez R, Cruz ME. (2005). “The Participation of the Cholinergic System in regulating Progesterone secretion through the ovarian-adrenal crosstalk varies along the estrous Cycle”. **Endocrine**. 28: 145 - 151.
  
- ☞ Flores A, Rodríguez JO, Palafox MT, Meléndez G, Barco AI, Chavira R, Cruz ME, Domínguez R. (2006). “The Acute Asymmetric Effects of Hemiovariectomy on Testosterone secretion vary along the estrous Cycle. The Participation of the Cholinergic System”. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 1: 4 - 11.
  
- ☞ Flores A, Velasco J, Gallegos AI, Mendoza FD, Everardo PM, Cruz ME, Domínguez R. (2011) “Acute effects of unilateral sectioning the superior ovarian nerve of rats with unilateral ovariectomy on ovarian hormones (progesterone, testosterone and estradiol) levels vary during the estrous cycle”. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 9:34.

- 
- ☞ Forneris ML, Aguado LI. (2002) “Neonatal Superior Ovarian Nerve Transection disturbs the Cyclic Activity of the Female Rats”. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. 82: 75 - 82.
  - ☞ Franks S, Mason H, Willis D. (2000) “Follicular Dinamics in the Polycystic Ovary Syndrome”. **Molecular and Celular Endocrinology**. 163: 49 - 52.
  - ☞ Franks S. (2005) “Polycystic Ovary Syndrome”. **Medical Progress**. 333(13): 853 - 861.
  - ☞ Fredericks CM, Lundquist LE, Mathur RS, Ashton SH, Landgrebe SC. (1983) “Effects of Vasoactive Intestinal Peptide upon Ovarian Steroids, Ovum Transport, and Fertility in the Rabbit”. **Biol. Reprod**. 28: 1052 - 1060.
  - ☞ Freeman ME. (1994) “The Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat”. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) **The Physiology of Reproduction**. 2nd edition. Editorial Raven Press. New York. Vol. 2. Cap. 46. pp. 615 - 620.
  - ☞ Garther LP, Hiatt JL. (2008) “Texto de Atlas de Histología”. 3a edición. Editorial McGraw Hill, China. Capítulo 20.
  - ☞ Geneser F. (2000) “Órganos de la Reproducción”. En: **Histología sobre Bases Biomoleculares**. 3a edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Cap. 22. pp. 613 - 638.
  - ☞ George FW, Ojeda SR. (1987) “Vasoactive Intestinal Peptide enhances Aromatase Activity in the Neonatal Rat Ovary before Development of Primary Follicles or Responsiveness to Follicle-Stimulating Hormone”. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 84: 5803 - 5807.
  - ☞ Goldfien A, Monroe SE. (2000) “Ovarios”. En: Greenspan FS, Strewler GJ. (Eds.) **Endocrinología Básica y Clínica**. 4a edición. Editorial El Manual Moderno. México, D.F. Cap. 13. pp. 497 - 554.

- 
- ☞ Gore-Langton RE, Armstrong DT. (1994) "Follicular Steroidogenesis and its Control". En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) **The Physiology of Reproduction**. 2nd edition. Editorial Raven Press. New York. Vol. 2. Cap. 11. pp. 571 - 611.
  - ☞ Gozes I, Tsafirri A. (1986) "Detection of Vasoactive Intestinal Peptide-Encoding Messenger Ribonucleic Acid in the Rat Ovaries". **Endocrinology**. 119: 2606 - 2610.
  - ☞ Gras S, Hedetoft C, Pedersen SH, Fahrenkrug J. (2000) "Pituitary adenylate cyclase-activating peptide stimulates acute progesterone production in rat granulosa/lutein cells via two receptor subtypes". **Biology of Reproduction**. 63: 206 - 212.
  - ☞ Greenspan FS, Stewler GJ (2000) "**Endocrinología Básica y Clínica**" 4a Edición, Editorial Manual Moderno, México
  - ☞ Greenwald GS, Roy SK. (1994) "Follicular Development and its Control". En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) **The Physiology of Reproduction**. 2nd edition. Editorial Raven Press. New York. Vol. 2. Cap. 12. pp. 629 - 724.
  - ☞ Greiner M, Paredes A, Araya V, Lara HE. (2005) "Role of Stress and Sympathetic Innervation in the Development of Polycystic Ovary Syndrome". **Endocrine**. 28(3): 319 - 324.
  - ☞ Guyton A. (1986) "**Tratado de Fisiología Médica**". 6a edición, Nueva Editorial Interamericana, México, D.F. Cap. 81, pp. 1186 - 1198.
  - ☞ Hemmings R, Farookhi R y Brawer J.R. (1983) "Pituitary and Ovarian Responses to Luteinizing Hormone Releasing Hormone in a Rat with Polycystic Ovaries". **Biology of Reproduction** 29: 239-248.
  - ☞ Hirshfield AN. (1991) "Development of Follicles in the Mammalian Ovary". **Int. Rev. Cytol.** 124: 43 - 101.
  - ☞ Hoyt KL, Schmidt MC. (2004) "Polycystic Ovary (Stein-Leventhal) Syndrome: Etiology, Complications and Treatment". **Clin Lab Sci**. 17(3): 155 - 163.

- 
- ☞ Hulshof SCJ, Dijkstra G, Van Der Beek EM, Bevers MM, Figueiredo JR, Beckers JF, Van Den Hurk R. (1994) “Immunocytochemical localization of Vasoactive Intestinal Peptide and Neuropeptide Y in the Bovine Ovary”. **Biology of Reproduction**. 50: 553 - 560.
  - ☞ Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Takahashi K, Nagata S. (1992) “Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide”. **Neuron**. 8: 811 - 819.
  - ☞ Isomura G, Iwata S, Chiba M y Shimizu N. (1985) “Constitution of the Greater Splanchnic Nerve in the Rat”. **Anat. Anz**. 159: 159-171.
  - ☞ Johnson AL, Jean ZLI, Sasha Malamed (1994) “Vasoactive Intestinal Peptide induced Expression of Cytochrome P450 Cholesterol Side Chain Cleavage and 17 $\alpha$ -Hydroxylase Enzyme Activity in Hen Granulosa Cells”. **Biology of Reproduction**. 51: 327 - 333.
  - ☞ Kasson BG, Meidan R, Davoren JB, Hsueh AJW. (1985) “Identification of Subpopulations of Rat Granulosa Cells: Sedimentation Properties and Hormonal Responsiveness”. **Endocrinology**. 117: 1027.
  - ☞ Kilen SM, Schwartz NB. (1999) “Estrous Cycle”. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) **Encyclopedia of Reproduction**. Academic Press. San Diego. Vol. 2. pp. 127 - 135.
  - ☞ Klein CM, Burden HW. (1988) “Anatomical localization of Afferent and Postganglionic Sympathetic Neurons Innervating the Rat Ovary”. **Neuroscience Letters**. 85: 217 - 222.
  - ☞ Laburthe M, Couvineau A, Gaudin P, Maoret JJ, Rouyer-Fessard C, Nicole P. (1996) “Receptors for VIP, PACAP, secretin, GRF, glucagon, GLP-1, and other members of their new family of G protein-linked receptors: structure–function relationship with special reference to the human VIP-1 receptor”. **Ann N Y Acad Sci**. 805: 94 - 109.
  - ☞ Lara H.E, McDonald J.K y, Ojeda S.R. (1990a) “Involvement of nerve growth factor in female sexual development”. **Endocrinology**. 126: 364-375.

- 
- ☞ Lara H.E, McDonald J.K, Ahmed C.E y Ojeda S.R. (1990b) “Guanethidine-Mediated Destruction of Ovarian Sympathetic Nerves Disrupts Ovarian Development and Function in Rats”. **Endocrinology**. 127: 2199-2209.
  - ☞ Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, 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, Ferruz J, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR. (1993) “Activation of Ovarian Sympathetic Nerves in Polycystic Ovary Syndrome”. **Endocrinology**. 133: 2690 - 2695.
  - ☞ Larsson LI, Fahrenkrug J, Schaffalitzky de Muckadell OB. (1977) “Vasoactive Intestinal Peptide occurs in Nerves of the Female Genitourinary Tract”. **Science**. 197: 1374 - 1375.
  - ☞ Lawrence Jr. IE, Burden HW. (1980) “The Origin of the Extrinsic Adrenergic Innervation to the Rat Ovary”. **The Anatomical Record**. 196: 51 - 59.
  - ☞ Li M. Zhou T, Gao Y, Zhang N, Li J. (2007) “Ultrastructure and Estrogen Regulation of the Lymphatic Stomata of Ovarian Bursa in Mice” **The Anatomical Record**. 290: 1195 - 1202.
  - ☞ Liu Y, Kasson BG, Dahl KD, Hsueh AJW. (1987) “Vasoactive Intestinal Peptide Stimulates Plasminogen Activator Activity by Cultured Rat Granulosa Cells and Cumulus-Oocyte Complexes”. **Peptides**. 8: 29 - 33.
  - ☞ Lorenzo GPL. (1992). “Maduración in vitro de Oocitos de Ganado Vacuno”. **Tesis de Doctorado**. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria.
  - ☞ Lutz EM, Sheward WJ, West KM, Morrow JA, Fink G, Harmar AJ. (1993) “The VIP2 receptor: molecular characterization of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. **FEBS Lett**. 334: 3 - 8.

- 
- ☞ Malacara JM. (1990) “Síndrome de Ovarios Poliquísticos”. **Fundamentos de Endocrinología**. 4a edición. JGH editores. México D. F. pp: 418 - 422.
  - ☞ Malamed S, Gibney JA, Ojeda SR. (1992). “Ovarian Innervation Develops before Initiation of Folliculogenesis in the Rat”. **Cell and Tissue Research**. 270: 87 - 93.
  - ☞ Manneras L, Cajander S, Holmang A, Seleskovic Z, Lysting T, Lonn M y Stener-Victorin E. (2007) “A New Rat Exhibing both Ovarian and Metabolic Characteristics of Polycystic Ovary Syndrome”. **Endocrinology: 148(8): 3781-3791**.
  - ☞ Martin GG, Sack M, Talbot P. (1981) “Structure of Bursae Ovaricae Surrounding the Ovaries of Golden Hamster”. **The Anatomical Record**. 201(3): 485 - 498.
  - ☞ Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR. (1997) “A Role for Neurotransmitters in Early Follicular Development: Induction of Functional Follicle-Stimulating Hormone Receptors in Newly Formed Follicles of the Rat Ovary”. **Endocrinology**. 138: 3320 - 3329.
  - ☞ Morales L, Chávez R, Ayala M.E, Domínguez R. (1998) “Effects of Unilateral or Bilateral Superior Ovarian Nerve Section in Prepubertal Rats on the Ovulatory Response to Gonadotrophin Administration”. **Journal of Endocrinology**. 158: 213 - 219.
  - ☞ Morales L, Chávez R, Domínguez R. (1993) “Participation of the Superior Ovarian Nerve in the Regulation of Ovulation in the Prepubertal Rat: Differential Effects of Unilateral and Bilateral Section of the Nerve”. **Medical Science Research**. 21: 15 - 17.
  - ☞ Morales-Ledesma L, Linares R, Rosas G, Morán C, Chavira R, Cárdenas M, Domínguez R. (2010) “Unilateral sectioning of the Superior Ovarian Nerve of Rats with Polycystic Ovarian Syndrome restores Ovulation in the Innervated Ovary”. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 8: 99.

- 
- ☞ 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(2): 147-152.
- ☞ Morán C, Morales L, Quiróz U, Domínguez R. (2000) “Effects of Unilateral or Bilateral Superior Ovarian Nerve Section in Infantile Rats on Follicular Growth”. **Journal of Endocrinology**. 166: 205-211.
- ☞ Morán C, Zarate F, Morán JL, Handal A y Domínguez R. (2009). “Lateralization of the Connections of the Ovary to the Celiac Ganglia in Juvenile Rats”. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 7:50.
- ☞ Netter FH. (2003) “Atlas de Anatomía Humana”. 3a Edición, Editorial Masson, España.
- ☞ Oliver RH, Chen GD, Yeh J. (1999) “Graafian Follicle”. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) **Encyclopedia of Reproduction**. Academic Press. San Diego. Vol. 2. pp. 565 - 568.
- ☞ Onoue S, Misaka S, Yamada S. (2008) “Structure-activity relationship of vasoactive intestinal peptide (VIP): potent agonists and potential clinical applications”. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**. 377: 579 - 590.
- ☞ Palle C, Bredkjaer HE, Fahrenkrug J, Ottesen B. (1991) “Vasoactive intestinal polypeptide loses its ability to increase vaginal blood flow after menopause”. **Am J Obstet Gynecol**. 164(2):556 - 568.
- ☞ Parra C, Fiedler JL, Luna SL, Greiner M, Padmanabhan V, Lara HE. (2007) “Participation of Vasoactive Intestinal Polypeptide in Ovarian Steroids production during the Rat Estrous Cycle and in the Development of Estradiol Valerate-induced Polycystic Ovary”. **Reproduction**.133: 147 - 154.
- ☞ Pedernera EA. (1993) “Cooperación Celular en la Biosíntesis de Hormonas Esteroides”. En: **Comunicación Neuroendócrina, Bases Celulares y Moleculares**. Editorial Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. México. pp. 33 - 46.

- 
- ☞ Picton HM, Gosden RG. (1999) "Oogenesis, in Mammals". En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) **Encyclopedia of Reproduction**. Academic Press. San Diego. Vol. 3. pp. 488 - 497.
  - ☞ Rajah R, Glaser EM, Hirshfield AN. (1992) "The Changing Architecture of the Neonatal Rat Ovary during Histogenesis". **Dev Dyn**. 194: 177 - 192.
  - ☞ Ramírez D. (2011) "¿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". **Tesis de Maestría**. UNAM, FES Zaragoza.
  - ☞ Richards JS, Jahnsen T, Hedin L, Lifka J, Ratoosh S, Durica JM, Goldring NB. (1987) "Ovarian Follicular Development: from Physiology to Molecular Biology". **Recent. Prog. Horm. Res.** 43: 231 - 270.
  - ☞ Romero C, Paredes A, Dissen GA, Ojeda SR. (2002) "Nerve Growth Factor Induces the Expression of Functional FSH Receptors in Newly formed Follicles of the Rat Ovary". **Endocrinology**. 143: 1485 - 1494.
  - ☞ Rosa-E-Silva A, Guimaraes MA, Padmanabhan V, Lara HE. (2003) "Prepubertal Administration of Valerate Disrupts Cyclicity and Leads to Cystic Ovarian Morphology during Adult life in the Rat: Role of Sympathetic Innervation". **Endocrinology**. 144: 4289 - 4297.
  - ☞ Rosas GG. (2006) "Efecto de la Inducción del Síndrome del Ovario Poliquístico en la Rata Infantil, sobre la Dinámica del Crecimiento Follicular y la Secreción de Hormonas Esteroides". **Tesis de Licenciatura**. UNAM, FES Zaragoza.
  - ☞ Ruíz KV, Chavira R, Domínguez R, Morales L. (2008) "Efecto de la Denervación Catecolaminérgica del Ovario realizada desde la Etapa Infantil, sobre el desarrollo del Síndrome del Ovario Poliquístico en la Rata". **II Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas**. Cd. de Mérida, Yucatán.

- 
- ☞ Said SI, Mutt V. (1970) "Polypeptide with broad Biological Activity: isolation from small Intestine". **Science**. 169: 1217 - 1218.
  - ☞ Said SI, Porter JC. (1979) "Vasoactive Intestinal Polypeptide: Release into Hypophyseal Portal Blood". **Life. Sci**. 24: 227 - 230.
  - ☞ Said SI, Rosenberg RN. (1976) "Vasoactive Intestinal Peptide: abundant immunoreactivity in neural cell lines and normal nervous tissue". **Science**. 192: 907.
  - ☞ Said SI. (1980) "VIP: Isolation, Distribution, Biological Actions, Structure-function Relationships and possible functions". In: **Gastrointestinal Hormones** (GBJ Glass, ed.). Raven Press, New York, pp 245-273.
  - ☞ Sánchez Criado JE. (1999) "Fisiología del Ovario". En: Tresguerres JA. (Ed.) **Fisiología Humana**. 2a edición. Editorial McGraw-Hill•Interamericana. Madrid. Cap. 75. pp. 1020 - 1032.
  - ☞ Schmidt G, Jörgensen J, Kannisto P, Liedberg F, Ottesen B, Owman Ch. (1990) "Vasoactive Intestinal Polypeptide in the PMSG-primed immature Rat Ovary and its effects on Ovulation in the Isolated Rat Ovary Perfused in vitro". **J. Reprod. Fert.** 90: 465 - 472.
  - ☞ Schulster A, Farookhi R, Brawer JR. (1984) "Polycystic Ovarian condition in Estradiol Valerate-Treated Rats: Spontaneous Changes in Characteristics Endocrine Features". **Biology of Reproduction**. 31: 587 - 593.
  - ☞ Selstam G, Norjavaara E, Tegenfelt T, Lundberd S, Sandström C, Persson S. (1985) "Partial Denervation of the Ovaries by Transection of the Suspensory Ligament does not inhibit ovulation in Rats treated with pregnant mare serum gonadotropin". **The Anatomical Record**. 213: 392-395.
  - ☞ Shalgi R, Kaplan R, Kraicer PF. (1977) "Proteins of Follicular, Bursal and Ampullar Fluids of Rats". **Biology of Reproduction**. 17: 333 - 338.

- 
- ☞ Silverthorn D.U. (2008) “**Fisiología Humana, Un Enfoque Integrado**”. 4a Edición, Editorial Médica-Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
  - ☞ Singh KB. (2005) “Persistent Estrus Rat Models of Polycystic Ovary disease: an update”. **Fertility and Sterility**. 84(2): 1228-1234.
  - ☞ Smith-White S, Ojeda SR. (1981) “Changes in Ovarian Luteinizing Hormone (LH) and Follicle Stimulating Hormone (FSH) Receptor Content and in gonadotropin-induced ornithine decarboxylase activity during Prepubertal and Pubertal Development of the Rat”. **Endocrinology**. 109: 152 - 161.
  - ☞ Sosa Z., Delgado M., Casais M., Aguado L. y Rastrilla A.M. (2004) “Release of Ovarian Progesterone during the Rat Oestrous Cycle by Ganglionic Cholinergic Influence. The Role of Norepinephrine”. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. 91: 179-184.
  - ☞ Sotomayor-Zárate R, Dorfman M, Paredes A y Lara HE. (2008) “Neonatal Exposure to Estradiol Valerate Programs Ovarian Sympathetic Innervation and Follicular Development in the Adult Rat”. **Biology of Reproduction**. 78: 673 - 680.
  - ☞ Stener-Victorin E, Lundeberg T, Waldenstrom U, Manni L, Aloe L, Gunnarsson S, Olof P. (2000a) “Effects of Electro-Acupuncture on Nerve Growth Factor and Ovarian Morphology in Rats with experimentally induced Polycystic Ovaries”. **Biology of Reproduction**. 63: 1497 - 1503.
  - ☞ Stener-Victorin E, Ploj K, Larsson BM, Holmäng A. (2005) “Rats with Steroid-induced Polycystic Ovaries develop Hypertension and increased Sympathetic Nervous System Activity”. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 3:44.
  - ☞ Szulanczyk-Mencel K, Rzasa A y Bielas W. (2010) “Relationships between Ovarian Cystic and Morphological and Hormonal State of Ovarian Cortex in Sows”. **Animal Reproduction Science**. 121: 273-278.

- 
- ☞ Tamura N, Kurabayashi T, Nagata H, Matsushita H, Yahata T, Tanaka K. (2005) “Effects of Testosterone on Cancellous Bone, Marrow Adipocytes, and Ovarian Phenotype in a young Female Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome”. **Fertility and Sterility**. 84(2): 1277-1284.
  - ☞ Tilly JL, Johnson AL. (1989) “Regulation of Androstenedione Production by Adenosine 3', 5'-monophosphate and phorbol myristate acetate in Ovarian Thecal Cell of the Domestic Hen”. **Endocrinology**. 125: 1691 - 1699.
  - ☞ Törnell J, Carlsson B, Hillensjö T. (1988) “Vasoactive intestinal peptide stimulates oocyte maturation, steroidogenesis, and cyclic adenosine 3',5'- monophosphate production in isolated preovulatory rat follicles”. **Biology of Reproduction**. 39(2):213-20.
  - ☞ Tóth I.E, Wiesel O, Boldogkoi Z, Bálint K, Tapaszi Z y Gerendai I. (2007) “Predominance of supraspinal innervation of the left ovary”. **Microsc Res Tech** 70:710-718.
  - ☞ Tóth IE, Wiesel O, Tóth DE, Boldogkoi Z, Halász B, Gerendai I. (2008) “Transneuronal Retrograde Viral labeling in the Brain stem and Hypothalamus is more intense from the Left than Right Adrenal Gland”. **Microcopy Research and Technique**. 71: 503-509.
  - ☞ Tresguerres JAF. (1999) “Introducción al Sistema Endocrino: Concepto de Hormona”, En: Aguilar BLE, Cachafeiro MV, Cardinali D, Gil LP, Lahera JV, Martínez VJ, Mora TF, Rodríguez RR, Romano PM, Tamargo MJ, Zarco GP. (Eds.) **Fisiología Humana**. 2a edición. Editorial Mc Graw Hill. Madrid España. pp. 814 - 844.
  - ☞ Trzeciak WH, Ahmed CE, Simpson ER, Ojeda SR. (1986) “Vasoactive Intestinal Peptide induces the Synthesis of the Cholesterol Side-Chain Cleavage Enzyme Complex in Cultured Rat Ovarian Granulosa Cells”. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 83: 7490 - 7494.
  - ☞ Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS. (2004) “The Pathophysiology of Polycystic Ovary Syndrome”. **Clin Endocrinol (Oxf)**. 60:1 - 7.

- 
- ☞ Vaccari S, Latini S, Barberi M, Teti A, Stefanini M, Canipari R. (2006) “Characterization and expression of different pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide receptors in rat ovarian follicles”. **Journal of Endocrinology**. 191: 287 - 299.
  - ☞ Van Voorhis BJ. (1999a) “Follicular Development”. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) **Encyclopedia of Reproduction**. Academic Press. San Diego. Vol. 2. pp. 376 - 389.
  - ☞ Van Voorhis BJ. (1999b) “Follicular Steroidogenesis”. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) **Encyclopedia of Reproduction**. Academic Press. San Diego. Vol. 2. pp. 389 - 395.
  - ☞ Vanderhyden BC, Rouleau A, Armstrong DT. (1986) “Effect of Removal of the Ovarian Bursa of the Rat on Infundibular Retrieval and subsequent Development of Ovulated Oocytes”. **J Reprod Fertil**. 77: 393 - 399.
  - ☞ Weiss G.K, Dail W.G, Ratner A. (1982) “Evidence for Direct Neural Control of Ovarian Steroidogenesis in Rats”. **J. Reprod. Fertil**. 65: 507-511.
  - ☞ Yao HHC, Bahr JM. (1999) “Ovary, Overview”. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) **Encyclopedia of Reproduction**. Academic Press. San Diego. Vol. 3. pp. 590 - 597.
  - ☞ Ye H, Kuruvilla R, Zweifel LS, Ginty DD. (2003) “Evidence in support of signaling endosome-based retrograde survival of sympathetic neurons”. **Neuron**. 39, 57 - 68.
  - ☞ Yeh J, Adashi EY. (2001) “El Ciclo Ovárico”. En: Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RL. (Eds.) **Endocrinología de la Reproducción**. 4a edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Cap. 6. pp. 164 - 202.
  - ☞ Yen SSC. (2001) “Síndrome del Ovario Poliquístico: Anovulación Crónica Hiperandrogénica”. En: Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RL. (Eds.) **Endocrinología de la Reproducción**. 4a edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Cap. 17. pp. 465 - 510.