



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

"Efecto de la Administración Intrabursal de VIP  
Sobre la Ovulación en la Rata con SOPQ y  
Denervación Simpática"

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGO**

PRESENTA

**ROCIO ORTEGA GOMEZ**

Directora de tesis

Dra. Leticia Morales Ledesma



México, D.F.

Mayo, 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**“Efecto de la Administración Intrabursal de VIP Sobre la  
Ovulación en la Rata con SOPQ y Denervación  
Simpática”**

Tesis presentada por:  
Rocio Ortega Gomez

Directora de Tesis:  
Dra. Leticia Morales Ledesma

Realizada en el Laboratorio de Fisiología Reproductiva de la  
Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción.  
UMIEZ. FES Zaragoza. UNAM.

Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo

financiero de PAPIIT convenio IN-213110-2

## Agradecimientos

A la **UNAM** por todos los conocimientos y recibidos a favor de mi formación académica.

A la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza Campus II**

Agradezco a cada uno de los miembros del jurado:

M. en C. Raúl Zabala Chavero

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dra. Juana Monroy Moreno

Biól. Pamela María Everardo Arévalo

Por el tiempo brindado en la revisión de esta tesis, por sus observaciones, comentarios y sugerencias que enriquecieron esté proyecto.

A la Dra. Lety por todo el tiempo que trabajo conmigo en la escritura y redacción de este trabajo, por sus enseñanzas y por la gran paciencia y dedicación hacia mí durante la realización de este proyecto. Gracias doctora por ayudarme a dar un paso más adelante.

A cada uno de mis compañeros del laboratorio que me brindaron parte de su conocimiento y de alguna manera colaboraron en la realización de esta tesis: Rosa, Gaby, Deyra, Ely, Azu, Juan, Iósif, Iván y Tzayaka, gracias por su apoyo.

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.

Al biólogo Roberto Chávira por su colaboración en la medición hormonal del presente estudio.

A todas las ratitas gordas que fueron sacrificadas para la realización esta tesis.

---

---

# ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	<b>i</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Marco Teórico</b> .....	<b>3</b>
Desarrollo Post-natal de la Rata Hembra .....	3
Pubertad en la Rata .....	3
Eje-Hipotálamo Hipófisis-Gónada .....	6
Ovario .....	7
Desarrollo Folicular .....	10
Ovulación .....	15
Cuerpo Lúteo .....	17
Atresia Folicular .....	18
Esteroidogénesis .....	21
Teoría de la Doble Célula .....	25
Ciclo Estral .....	26
Inervación Ovárica .....	29
Síndrome del Ovario Poliquístico .....	30
SOPQ con Valerato de Estradiol .....	32
Bursa Ovárica .....	33
Péptido Intestinal Vasoactivo .....	35
<b>Planteamiento del Problema</b> .....	<b>37</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>39</b>
<b>Objetivo General</b> .....	<b>40</b>
<b>Objetivos Particulares</b> .....	<b>40</b>
<b>Metodología</b> .....	<b>41</b>

Diseño Experimental .....	41
Tratamientos Quirúrgicos.....	42
Procedimiento de la Autopsia .....	43
Revisión Histológica .....	44
Cuantificación de Hormonas en Suero por Radioinmunoanálisis.....	45
Análisis Estadístico .....	46
<b>Resultados .....</b>	<b>47</b>
<b>Experimento 1.</b> Efecto de la sección unilateral del nervio ovárico superior en animales tratados con valerato de estradiol .....	47
<b>Experimento 2.</b> Efecto de la inyección de VIP en la bursa ovárica en ratas con denervación unilateral del nervio ovárico superior .....	55
<b>Experimento 3.</b> Efecto de la administración de VIP en la bursa ovárica en ratas con SOPQ y denervación unilateral del nervio ovárico superior .....	59
<b>Discusión .....</b>	<b>70</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>79</b>
<b>Modelo .....</b>	<b>80</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>83</b>

## RESUMEN

En la rata, el síndrome de ovario poliquístico (SOPQ) se caracteriza por una mayor actividad de las fibras simpáticas aferentes al ovario por medio del nervio ovárico superior (NOS). Por esta vía llegan al ovario el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y noradrenalina (NA), dos neurotransmisores involucrados en la esteroidogénesis ovárica.

En el presente estudio se evaluó la participación que ejerce el VIP sobre la respuesta ovulatoria y en la secreción de progesterona y estradiol en la rata adulta. Para ello se utilizaron ratas hembras de 60 días de edad, que en la mañana del estro se sometieron a la sección izquierda (SNOI) o derecha (SNOD) del NOS y en el mismo acto quirúrgico se inyectaron 20µl de VIP ( $10^{-6}$ M) o de solución salina en la bursa del ovario denervado, todos los animales fueron sacrificados al segundo estro vaginal post-cirugía.

Los resultados obtenidos mostraron que cuando el ovario derecho es denervado y estimulado con VIP incrementa la ovulación por parte del ovario intacto y la concentración de progesterona y estradiol, con respecto a su animal testigo estimulado con SS. Cuando el ovario denervado y estimulado con VIP fue el izquierdo la respuesta fue semejante a la de su grupo testigo.

Para evaluar el papel del péptido en el modelo del animal con SOPQ se inyectaron intraperitonealmente 2.0 mg de valerato de estradiol disuelto en 0.1ml de aceite de maíz a los 10 días de edad y a los 60 días de edad en la etapa de estro, se les realizó la sección del NOS izquierdo o derecho y en el mismo acto quirúrgico se inyectó en la bursa ovárica 20µl de VIP ( $10^{-6}$ M) o de solución salina, todos los animales fueron sacrificados al segundo estro vaginal post-cirugía. En estos animales VIP incrementó el número de animales ovulantes con una baja cuota ovulatoria y la concentración de progesterona disminuyó, mientras que la de estradiol incrementó en comparación con el grupo inyectado con solución salina.

Con base en los resultados obtenidos podemos concluir que en la rata con sección unilateral del NOS, el VIP ejerce un efecto estimulante en la producción de progesterona y estradiol. En la rata con SOPQ el VIP incrementa el metabolismo de la progesterona y la actividad de las aromatasas, lo que se traduce en un incremento de la concentración de estradiol.

## INTRODUCCIÓN

El síndrome del ovario poliquístico es la causa más común de infertilidad y anovulación que afecta entre el 6 y 10 % de mujeres en edad reproductiva (Tsilchorozidou y col., 2004). Consiste en una patología que se manifiesta clínicamente por una combinación de hiperandrogenismo acompañado de anovulación crónica, así como en un aumento en la relación hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) (Yen., 2001) y se asocia a un incremento en la pulsatilidad hipofisiaria de la LH y resistencia a la insulina (Builes y col., 2006). Desde 1935 Stein y Leventhal señalaron que en el SOPQ existe heterogeneidad tanto en la morfología del ovario como en los resultados clínicos (Tsilchorozidou y col., 2004).

Las secuelas del SOPQ a largo plazo consisten en el desarrollo de cáncer endometrial, diabetes tipo II y trastornos cardiovasculares. En pacientes con SOPQ se han descrito alteraciones funcionales interrelacionadas con el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Yen., 2001).

Los ovarios de los mamíferos están inervados por fibras simpáticas y sensoriales, además de un pequeño componente parasimpático (Burden., 1978). La inervación simpática tiene fibras que transportan neuropéptido Y (NPY), VIP y catecolaminas (principalmente NA). En la inervación sensorial participan fibras que contienen el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y sustancia P (SP), así como VIP (Dissen y Ojeda., 1999). NA y VIP son dos neurotransmisores que llegan al ovario por medio del NOS y se ha postulado que son responsables del incremento de estradiol y andrógenos en ratas tratadas con valerato de estradiol que han desarrollado SOPQ (Ahmed y col., 1986; Dissen y Ojeda., 1999; Parra y col., 2007).

Previamente se mostró que al eliminar de manera selectiva las fibras simpáticas por medio de la administración de guanetidina (GTD), dejando intactas aquellas fibras que contienen VIP, se mantienen las características del SOPQ, por lo que el autor sugiere que el VIP es uno de los factores que participan en el desarrollo de la patología (Ruiz., 2009).

Con base en estos antecedentes, en el presente estudio se analizó en el modelo de rata con SOPQ, la respuesta del ovario denervado a la estimulación intrabursal con VIP.

## **MARCO TEÓRICO**

### **DESARROLLO POST NATAL DE LA RATA HEMBRA**

La rata hembra es utilizada como un modelo de estudio debido a su fácil manejo, a su rápido crecimiento y a su alta tasa de reproducción; los resultados obtenidos en la experimentación con este animal pueden ser aplicables a otras especies, incluido el humano, ya que ha sido mostrada cierta similitud entre la rata y el humano en el control de la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), de las gonadotropinas, así como en el desarrollo folicular ovárico y en la participación de la hormona de crecimiento (GH) en la pubertad (Becu-Villalobos y Lacau-Mengido., 1990).

### **PUBERTAD EN LA RATA**

El inicio de la pubertad implica una serie de cambios neuroendocrinos en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, que culmina con la maduración sexual y el inicio de la capacidad reproductiva.

El tiempo de gestación en la rata es de 21 a 23 días, la primera ovulación se presenta de los 35 a los 45 días de edad dependiendo de la cepa. En las hembras la única señal externa del inicio de la pubertad es la canalización vaginal, que ocurre en respuesta a la estimulación estrogénica (Ojeda y Urbanski., 1988).

Ojeda y colaboradores (1980) propusieron una clasificación con base en cambios morfológicos y fisiológicos relacionados con los distintos componentes

del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, lo que ha permitido dividir las etapas del desarrollo prepuberal en cuatro periodos postnatales:

**Periodo neonatal:** Esta etapa comprende desde el nacimiento hasta el séptimo día de vida. El crecimiento folicular se inicia independiente de las gonadotropinas, ya que los receptores a éstas se forman a partir del quinto día de vida. A partir de este momento, la FSH comienza a estimular la producción de estradiol a partir de testosterona. El control negativo de la secreción gonadotrópica por estradiol es ineficiente debido a la presencia en el suero de  $\alpha$ -feto proteína, la cual une fuertemente a los estrógenos tornándolos biológicamente inactivos. Al final de esta etapa es evidente la respuesta esteroideogénica del ovario a gonadotropinas y hay un pequeño aumento de FSH mientras que la LH se mantiene baja (Becu-Villalobos y Lacau-Mengido., 1990).

**Periodo infantil:** Transcurre del día 8 al día 21 de vida. Durante esta etapa se presentan altas concentraciones plasmáticas de FSH, necesarias para el reclutamiento y crecimiento de los folículos. En esta etapa comienzan a aumentar rápidamente la concentración de LH, al aumento brusco en la concentración de esta hormona se le conoce como “picos” esporádicos de LH. Al parecer, los picos esporádicos de LH en la etapa infantil tienen su origen en la activación de neuronas noradrenérgicas en el área preóptica anterior (POA). Durante la etapa infantil, la producción ovárica de estrógenos a partir de precursores exógenos se incrementa considerablemente y FSH es capaz de inducir la actividad de la enzima aromatasa (Ojeda y Urbanski., 1994).

A partir del día 15 de vida disminuye la concentración de FSH y son menos visibles los picos de LH. Comienza a ser detectable la inhibina en el

suero, y la desaparición de  $\alpha$ -feto proteína facilita la retroalimentación negativa del estradiol sobre las gonadotropinas (Becu-Villalobos y Lacau-Mengido., 1990).

**Periodo juvenil:** Este periodo se comprende del día 22 al 32 de vida. Al inicio de esta etapa se registra la concentración más baja de LH y se mantiene sin variaciones en un comienzo pero tiende a aumentar y su secreción se da en forma pulsátil a intervalos de 30 minutos (Becu-Villalobos y Lacau-Mengido.,1990). Hacia el final de esta etapa se establece un ritmo de secreción circadiano de LH, ya que la concentración y la amplitud de sus pulsos aumentan diariamente durante la tarde. A nivel ovárico se da un aumento de receptores a LH (Smith-White y Ojeda., 1981), lo que se traduce en una mayor esteroidogénesis. En cambio, las concentraciones plasmáticas de FSH permanecen bajas.

El aumento gradual de la prolactina y de la hormona del crecimiento (GH) en este periodo es facilitatorio de la acción estimuladora de las gonadotropinas (Ojeda y col., 1980).

**Periodo peripuberal:** Comprende desde el día 30 hasta la primera ovulación. En el ovario se da el máximo número de receptores para FSH y LH, lo que se traduce en una mayor respuesta esteroidogénica. Hacia la quinta semana de vida las concentraciones basales de LH y la amplitud de los pulsos son mayores durante la tarde, por lo que el patrón circadiano de la LH se establece de forma clara y regular. El establecimiento de los pulsos de secreción de LH es el responsable de estimular al ovario para una mayor producción de estradiol. La secreción de prolactina es semejante a la de LH, esta concentración

baja durante la mañana con "picos" vespertinos cada día (Becu-Villalobos y Lacau-Mengido., 1990; Ojeda y Urbanski., 1994).

Consecuentemente aumentan las concentraciones plasmáticas de estradiol, progesterona y testosterona; esta última es responsable de la canalización vaginal. Las altas concentraciones de hormonas esteroideas inducen en el hipotálamo la secreción de GnRH que culmina con el surgimiento brusco de gonadotropinas y la primera ovulación (Becu-Villalobos y Lacau-Mengido., 1990).

## **EJE – HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GONADA**

Las funciones ováricas están bajo el control neuroendócrino en el que interviene el hipotálamo, en donde se concentran las señales del sistema nervioso central. El hipotálamo es el encargado de la secreción de la GnRH que viaja a través del sistema porta hipotálamo-hipofisario hasta la hipófisis y allí estimula la secreción de gonadotropinas: LH y FSH; ambas actúan en el ovario modulando el crecimiento y maduración de los folículos.

La secreción de GnRH, LH y FSH es regulada por mecanismos de control positivo y negativo, ejercido por los estrógenos producidos en los folículos ováricos (Tresguerres., 2003).

## OVARIO

Los ovarios son dos glándulas de secreción interna con estructura ovoide de color rosado grisáceo y superficie irregular (Jubiz., 1988). Están recubiertos por una capa de células epiteliales-cúbicas llamada epitelio germinal (Tresguerres., 2003). Su aporte nervioso, vascular y linfático ocurre precisamente a través del mesovario, que juntamente con otras estructuras fibromusculares, mantienen el ovario en posición a la entrada de las trompas de falopio y unido al útero (Tresguerres., 2005). Los vasos sanguíneos y linfáticos entran y salen de los ovarios por el hilio y se distribuyen a través de células de tejido conjuntivo denso denominadas estroma. Está constituido por tejido estromal que contiene ovocitos primarios, folículos primordiales y células intersticiales glandulares (Pocock., 2005; Jubiz., 1988)

El ovario realiza las siguientes funciones: la maduración de la célula germinal femenina (foliculogénesis), la producción de óvulos maduros (ovulación) aptos para ser fecundados, así como la secreción de hormonas esteroideas y peptídicas (Tresguerres y col., 1999). Dichas funciones se encuentran reguladas por la unidad hipotálamo-hipofisiaria.

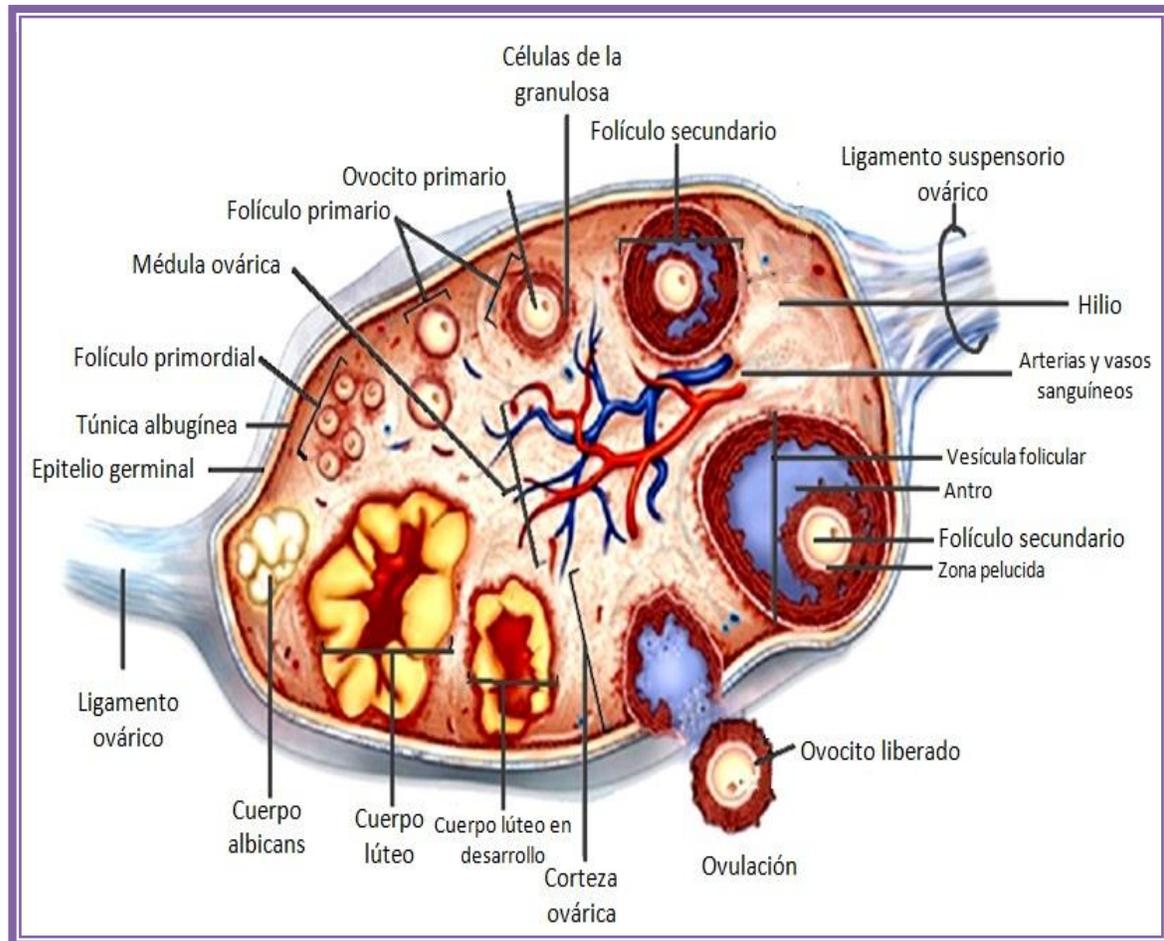
En el ovario se pueden distinguir tres zonas:

- *La corteza.* Es la zona más abundante, en ella se encuentran los folículos en sus diferentes estados de maduración con los ovocitos. Entre los folículos se encuentran el tejido conectivo de sostén y las células intersticiales (Sánchez-Criado., 1999).

- *La región medular.* La forman una rica red vascular y tejido conectivo laxo y fibroso (Sánchez-Criado., 1999).
- *El hilio.* Es la región donde se encuentra la arteria y la vena ovárica, los vasos linfáticos y algunas terminales neurales aportadas por el sistema nervioso simpático y parasimpático (Burden., 1985; Sánchez-Criado., 1999).

Compartimentos funcionales del ovario (Figura. 1):

1. El folicular, formado por los folículos en diferentes fases de desarrollo: primordial, primario, secundario y preovulatorio. El folículo ovárico constituye la unidad estructural y funcional del ovario.
2. Cuerpo lúteo, que se forma del folículo que expulsa el ovocito durante la ovulación.
3. La glándula intersticial, la que se forma a partir de la teca interna de los folículos atrésicos que tienen receptores a LH (Domínguez y col.,1991).



**FIGURA 1.** Estructura histológica de un ovario de mamífero que indica sus tres regiones (médula, corteza e hilio) y los estadios de desarrollo folicular (Modificado de Pocock., 2005).

## DESARROLLO FOLICULAR

La foliculogénesis es el proceso de maduración del folículo ovárico y se desarrolla de manera paralela a la ovogénesis.

El folículo es la unidad anatómico-funcional del ovario. Su función es mantener, nutrir, madurar y liberar al ovocito en el momento en que este sea capaz de ser fecundado (Domínguez., 1991). En cada ciclo ovárico, un folículo progresa a través de una serie de estadios de desarrollo que incluyen: crecimiento y maduración, ovulación, formación del cuerpo lúteo y en ausencia de fecundación, la degeneración del cuerpo lúteo (Pocock., 2005).

La primera mitad del ciclo consta de los estadios preantral, antral y preovulatorio que se relacionan con el crecimiento y desarrollo folicular (Figura 2). La ovulación se produce a mitad de ciclo y a continuación el folículo colapsado se convierte en un cuerpo lúteo por un proceso conocido como luteinización (Pocock., 2005).

### *Folículos primordiales*

Son los más pequeños y numerosos y constituyen la reserva de folículos en reposo. Cada uno de ellos está conformado por un ovocito esférico, rodeado por una capa de células foliculares (células epiteliales aplanadas) y delimitado por una membrana basal poco evidente (Bergman y col., 1998).

En la rata la aparición de los folículos primordiales y primarios se dan en la etapa neonatal (Dissen y col., 2004; Malamed., 1992).

### ***Folículo preantral***

El folículo preantral aumenta su diámetro que pasa de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  a 200-400  $\mu\text{m}$ , el ovocito primario también aumenta de tamaño dentro del folículo hasta alcanzar aproximadamente los 120  $\mu\text{m}$ . Durante esta fase del crecimiento se produce una gran actividad anabólica dentro del ovocito, destinada a cargar su citoplasma con los nutrientes que requerirá para su maduración. Las células estromales que rodean el ovocito se dividen formando diversas capas de células de la granulosa y secretan una glucoproteína que deja una región alrededor del ovocito sin células, conocida como zona pelúcida. Además las células adyacentes a la lámina basal se multiplican y se diferencian formando capas concéntricas, alrededor del folículo primario denominadas teca. Las capas más externas de las células tecales son planas y de naturaleza fibromuscular (teca externa), mientras que las capas internas son más cuboidales (teca interna) (Pocock., 2005).

Hacia el final del estadio preantral las células de la granulosa desarrollan receptores para los estrógenos y para la FSH hipofisaria, mientras que las células tecales desarrollan receptores para la LH hipofisaria (Pocock., 2005).

### ***Folículo antral o secundario***

El flujo continuo de folículos por el estadio preantral, no dependiente de hormonas, garantiza la presencia de varios folículos disponibles que han completado su crecimiento preantral y poseen los receptores apropiados para las gonadotropinas y los estrógenos. Su posterior desarrollo depende del estado endocrino del organismo en ese momento. Siempre que las concentraciones de FSH y LH circulantes sean adecuadas cualquier folículo que disponga de receptores entrará en el siguiente estadio de desarrollo (Pocock., 2005).

Las gonadotropinas FSH y LH, convierten los folículos preantrales en antrales. El estadio antral de desarrollo suele durar de 8 a 10 días. Durante ese tiempo, las células de la granulosa empiezan a secretar líquido folicular alrededor del ovocito. Este líquido forma el antro, que da nombre a este estadio. El folículo es mucho mayor (alrededor de 5mm de diámetro) aunque el ovocito sigue teniendo más o menos el mismo tamaño (120  $\mu\text{m}$ ). Rodeado de células de la granulosa, el ovocito queda virtualmente suspendido en el líquido folicular y permanece unido al borde principal de las células de la granulosa por un tallo fino (Pocock., 2005).

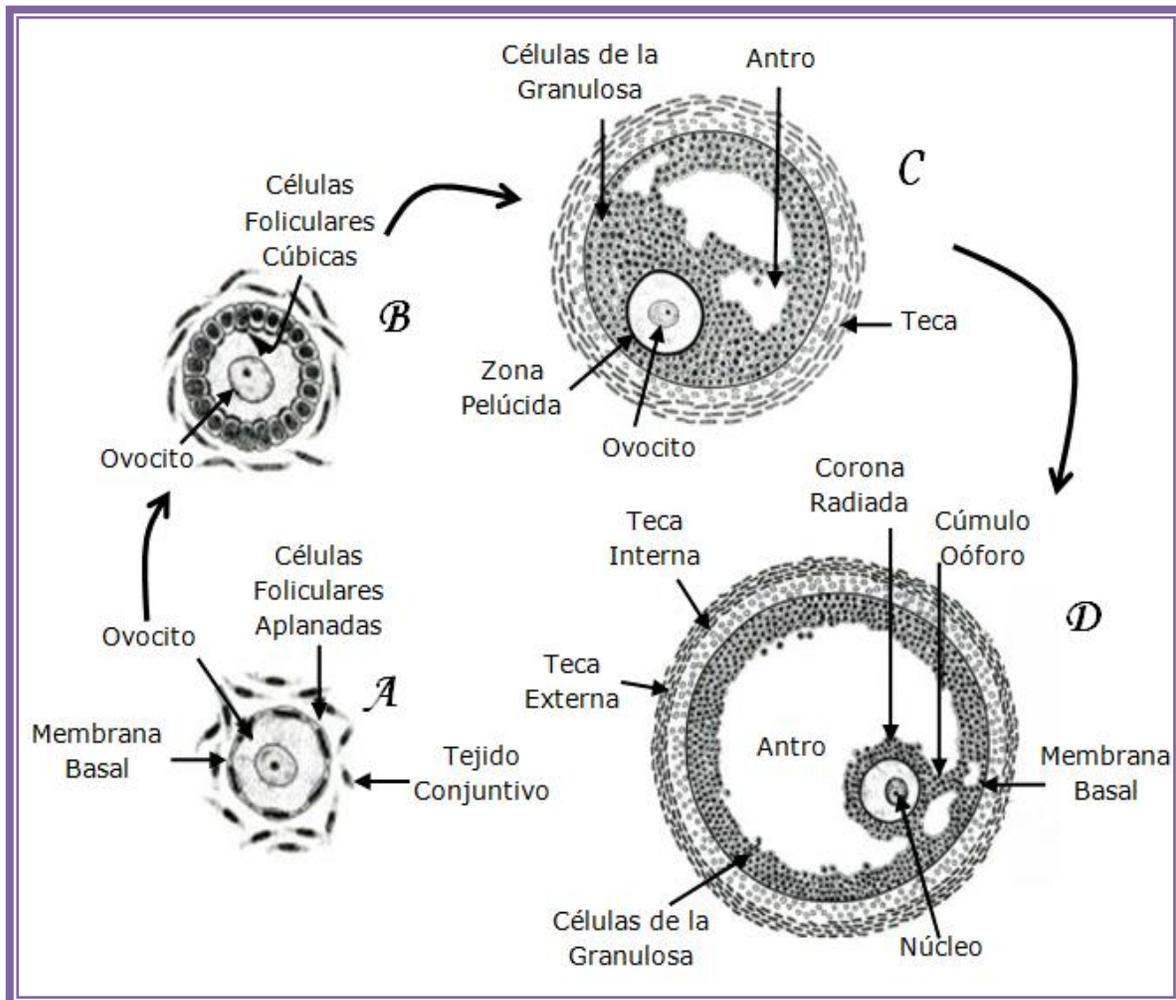
Bajo la influencia de las gonadotropinas, las células del folículo antral empiezan a secretar grandes cantidades de hormonas. Tanto células de la granulosa como tecales adoptan las características del tejido secretor de esteroides, con numerosas gotitas de lípidos, microtúbulos y retículo endoplásmico liso en su interior. Bajo la influencia de la LH hipofisaria, las células de la teca interna sintetizan y secretan los andrógenos testosterona y androstediona y producen pequeñas cantidades de estrógenos. Las células de la granulosa, que poseen receptores para la FSH parecen responder a la presencia de esta hormona convirtiendo los andrógenos en estrógenos (en especial, 17 $\beta$ -estradiol). El resultado es un aumento sustancial de las concentraciones circulantes tanto de andrógenos como de estrógenos (Pocock., 2005).

En el folículo antral los estrógenos producidos por las células foliculares, se unen a sus receptores y estimulan la proliferación de células de la granulosa sensibles a estrógenos y convierten los andrógenos en estrógenos, durante los 2 ó 3 días finales de este estadio aumentan rápidamente los valores de los estrógenos (Pocock., 2005).

### ***Folículo preovulatorio***

A medida que el folículo se acerca al final de la fase antral de desarrollo y se produce un aumento repentino de estrógenos, es preciso que coincidan dos importantes acontecimientos para que el folículo continúe su desarrollo y alcance el estadio preovulatorio, en donde las células de la granulosa deben adquirir receptores para la LH y las concentraciones circulantes de esta hormona deben aumentar súbitamente (Pocock., 2005).

La síntesis de receptores de LH se produce como respuesta a la FSH y a los estrógenos. El intervalo entre el aumento de LH y FSH varía de 12 a 15 horas en la rata y cerca de 36 horas en la mujer. Las concentraciones de FSH y LH se elevan por lo que alcanzan una concentración óptima que regula el número de óvulos a ser liberados (Baker., 1982).



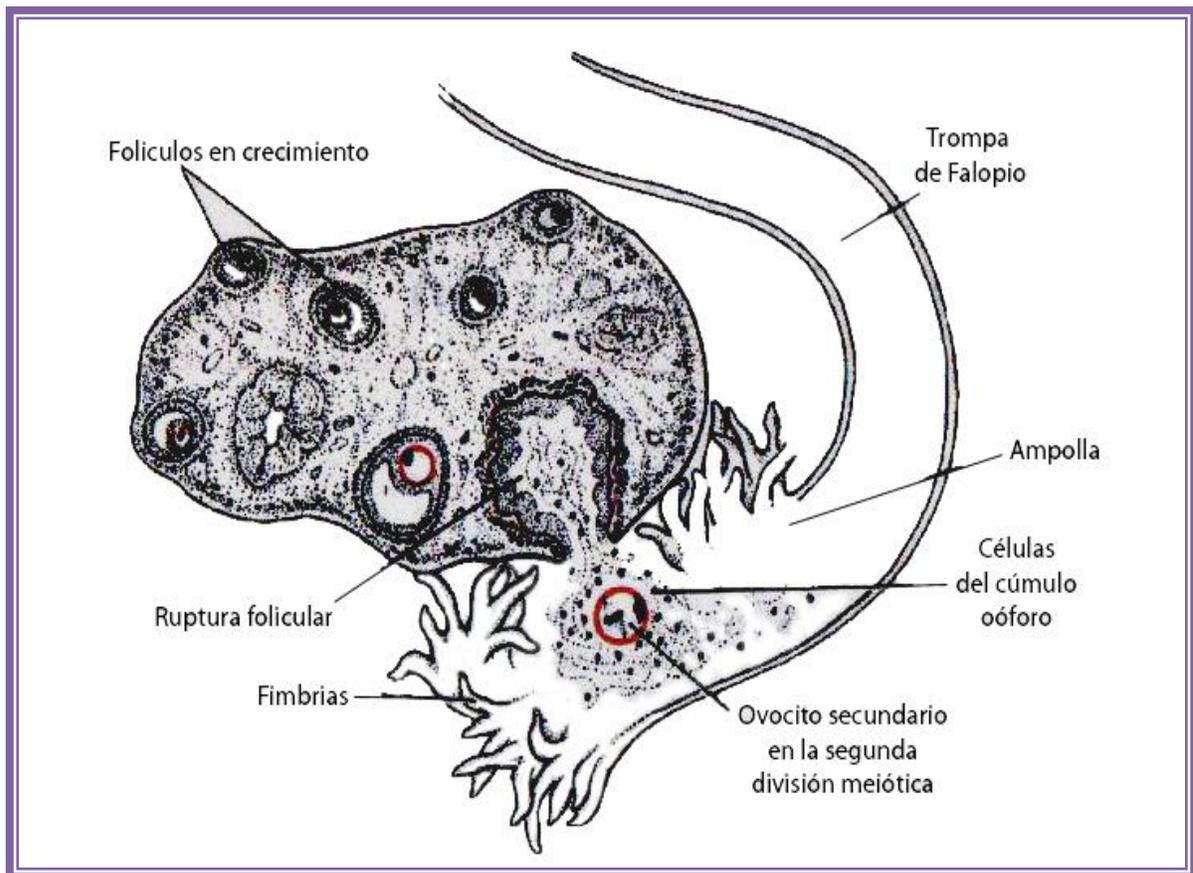
**FIGURA 2.** Esquema que muestra las características del folículo ovárico en diferentes etapas de crecimiento en el ovario: (A) primordial, (B) primario, (C) secundario y (D) preovulatorio (Modificado de Berne y col., 1999).

## OVULACIÓN

Las últimas fases del desarrollo folicular, los estrógenos junto con las gonadotropinas coordinan la maduración del folículo de preovulatorio, y ejercen una acción de retroalimentación positiva sobre el eje hipotálamo-hipofisario que provoca la liberación ovulatoria de gonadotropinas. Además, las células de la granulosa del folículo preovulatorio experimentan un cambio en la esteroidogénesis que induce la producción adicional de progesterona (señal temprana de luteinización). La producción de estradiol y progesterona por la granulosa incrementa los receptores de LH en ésta y estimula la liberación ovulatoria de LH (Tresguerres., 1999).

El folículo preovulatorio crece rápidamente y el ovocito primario, completa su primera división meiótica. Entretanto, la superficie del ovario comienza a presentar un abultamiento, en cuyo vértice aparece una zona avascular, el llamado estigma. Una elevada concentración de LH aumenta la actividad de colagenasa, resultando en la digestión de las fibras de colágeno que rodean al folículo. Los niveles de prostaglandinas también se incrementan en respuesta al aumento brusco de LH y causan contracciones musculares locales en la pared del ovario. Estas contracciones expulsan al ovocito que, junto con las células de la granulosa que lo rodean desde la región del cúmulo oóforo, se desprende y flota fuera del ovario. Algunas de las células del cúmulo oóforo vuelven a organizarse alrededor de la zona pelúcida y forman la corona radiada. En el momento en que el ovocito con las células del cúmulo oóforo es expulsado del ovario (ovulación) termina la primera división meiótica y el ovocito secundario inicia su segunda división meiótica (Langman y Sadler., 2001).

En las últimas fases del desarrollo folicular, los estrógenos junto con las gonadotropinas coordinan la maduración del folículo preovulatorio, tras la liberación ovulatoria de LH se produce un aumento de la concentración de AMP cíclico tisular, lo que induce luteinización y activación de enzimas luteolíticas responsables de la ruptura de la pared folicular (Tresguerres., 1999) (Figura 3).



**FIGURA 3.** Relación entre las fimbrias y el ovario. Durante la ovulación se considera que las fimbrias experimentan un movimiento de barrido sobre el folículo rompiéndose, para recoger el ovocito y conducirlo hasta la trompa uterina. (Tomado de Langman y Sadler., 2001).

## CUERPO LÚTEO

Después de la ovulación hay cambios espectaculares en el folículo. Estos cambios dan como resultado la formación de una verdadera glándula endocrina dentro del ovario: el cuerpo lúteo.

Inicialmente el folículo se reduce a una fracción de su tamaño anterior y la membrana granulosa es arrojada en los pliegues. Los remanentes del antro son obliterados rápidamente por la proliferación de células de la granulosa que se transforman en células del cuerpo amarillo (células luteínicas); también hay una infiltración por medio de capilares que provienen de la teca interna. Algunas de las células de la teca penetran junto con los capilares para formar las paredes de subdivisión, las trabéculas, pero el mayor componente de la glándula se deriva de la granulosa. Las células luteínicas contienen gránulos secretorios y el pigmento amarillo del que se deriva el nombre de cuerpo lúteo (que significa cuerpo amarillo) (Baker., 1982).

La función del cuerpo amarillo es secretar progesterona, que es muy importante para controlar la duración del ciclo reproductor en muchas especies y que, sirve también para mantener el embarazo. La glándula tiene una vida limitada que depende de que el embarazo continúe o no. Hacia el final de su existencia cesa la secreción de progesterona y las células luteínicas degeneran. La regresión se completa con la infiltración de fibroblastos que convierten a la glándula en una masa de tejido cicatricial (*corpus albicans*) (Baker., 1982).

En el caso de la rata, después de que ocurre la ovulación se forman varios cuerpos lúteos que en el diestro del siguiente ciclo estral presentan un tamaño máximo. Estos cuerpos lúteos presentan signos de regresión en el diestro del

segundo ciclo. Las concentraciones de progesterona secretadas por el cuerpo lúteo de roedores son bajas durante uno o dos días. Cuando ocurre la fertilización de los ovocitos, la hipófisis secreta altas cantidades de LH que rescatan al cuerpo lúteo y permiten su permanencia durante la etapa de gestación (que dura de 20 a 22 días). Finalmente el cuerpo lúteo experimenta regresión o luteólisis (Freeman., 1994).

## **ATRESIA FOLICULAR**

La atresia representa uno de los fenómenos más importantes y menos conocidos en la biología reproductiva. En la fisiología ovárica la atresia es el proceso por el cual los folículos y ovocitos se eliminan del ovario. El término atresia es de origen griego, literalmente significa la clausura u obliteración de un orificio o pasaje del cuerpo (a=no, tresos=perforación) (Rosales., 1998).

Varios procesos anatomo-fisiológicos están asociadas con la atresia folicular, entre ellos se encuentra: desprendimiento y degeneración de células de la granulosa, presencia de células con núcleos picnóticos en la granulosa, fragmentación de la lámina basal, reducción en la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN), disminución de la síntesis de estrógenos y disminución de la capacidad de fijación de gonadotropinas. Recientemente se ha reportado que las células de la granulosa y de la teca, colectadas de folículos atrésicos, presentan fragmentación internucleosomal del ADN, característico de las células que sufren apoptosis, lo cual ha llevado a postular, que la apoptosis es el principal mecanismo de degeneración celular durante el proceso de la atresia. Recientemente la atresia ha sido asociada con una falla en la producción o

activación de las enzimas que participan en la remodelación tisular del tejido ovárico (Rosales., 1998).

La apoptosis es un modelo de muerte celular no tóxica que elimina células en los tejidos sin desencadenar una respuesta inflamatoria. Este proceso requiere la síntesis de proteínas y normalmente posee un patrón típico de fragmentación del ADN. Este proceso está regulado por genes específicos (Yeh y Adashi., 2001).

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

A las gonadotropinas se les considera como factores que inhiben el proceso por el que los folículos degeneran y van a la atresia (Ojeda y Urbanski., 1994). Durante la etapa prepúber, la incidencia de atresia parece deberse a la presencia de bajas concentraciones de FSH, que son capaces de iniciar el desarrollo de los folículos hasta el estadio antral, pero que son ineficientes para estimular el crecimiento folicular a término.

Los signos primarios de atresia en los “folículos en crecimiento” y en los preovulatorios son:

- a) Condensación de los cromosomas y encogimiento de la membrana que envuelve al núcleo del oocito.
- b) Picnosis de los núcleos de las células granulosas.
- c) Desprendimiento de las células de la granulosa lo que permite que floten libremente en el líquido folicular.

Puede parecer que el oocito complete su división meiótica anormalmente (seudomaduración) o que presente una fragmentación de tal manera que superficialmente parezca una mórula. Ocasionalmente se observan cambios de seudomaduración en folículos primordiales atrésicos, por lo general, las células granulosas sobreviven mientras que el oocito es fagocitado por macrófagos (Baker., 1982).

La atresia representa un proceso cíclico que involucra folículos de diferentes tamaños, incluso aquellos de diámetro inferior al milímetro. Si bien los mecanismos exactos involucrados en la atresia son inciertos (Billig., 1993), gran cantidad de información parece implicar a los andrógenos derivados de las células teca intersticiales. Por lo tanto, la biosíntesis de andrógenos estimulada por la LH en las células de la teca, podría producir efectos adversos en las células de la granulosa adyacentes mediados por receptores. En apoyo a esta idea se ha visto que el tratamiento con antisuero contra LH o contra la androstendiona, aumenta la tasa de ovulación, probablemente por la disminución en la atresia de los folículos preovulatorios (Yeh y Adashi., 2001).

## ESTEROIDOGÉNESIS

Los principales esteroides sexuales producidos en el ovario son el estradiol y la progesterona, aunque también se producen pequeñas cantidades de estrona, androstenediona, testosterona, 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona y varias hormonas no esteroides, como la inhibina, activina y la relaxina. Todos los esteroides ováricos se producen fundamentalmente en las estructuras foliculares (Tresguerres., 2005).

Al igual que los producidos en los testículos, en las glándulas suprarrenales o en la placenta, todas las hormonas esteroides se derivan del colesterol. El colesterol posee una estructura formada por tres anillos ciclohexano y un anillo ciclopentano, que fusionados se denomina núcleo ciclopentano perhidrofenantreno. Tal estructura posee grupos metilo en el C-10 y C-13, un grupo hidroxilo en el C-3 del anillo A, una cadena alifática ramificada de 8 carbonos en la posición C-17 del anillo D y una insaturación entre el C-5 y C-6 (Figura 4) (Baynes y Dominiczak., 2006)

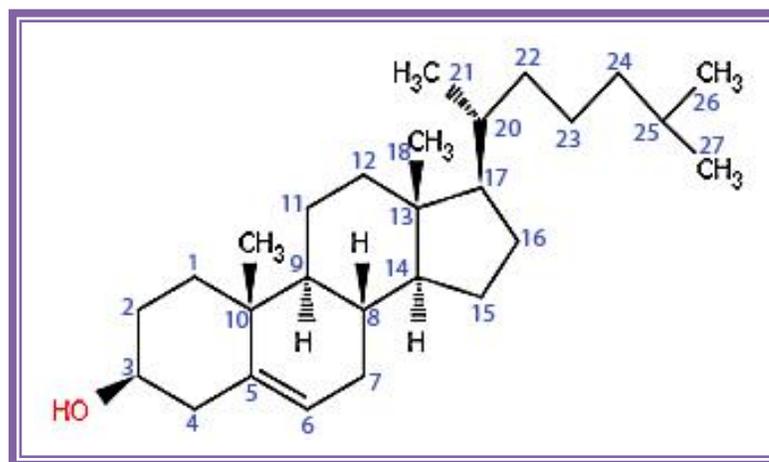


Figura 4. Estructura química del colesterol (Tomado y modificado de Van Voorhis.,1999)

El colesterol se obtiene a partir de tres fuentes principales:

- a) Del que circula en la sangre en forma de lipoproteínas de baja densidad (LDL)
- b) El que se sintetiza *de novo* dentro del ovario a partir de acetilcoenzima A
- c) El que se libera de los ésteres del colesterol almacenados en las gotas lipídicas (Tresguerres., 2005).

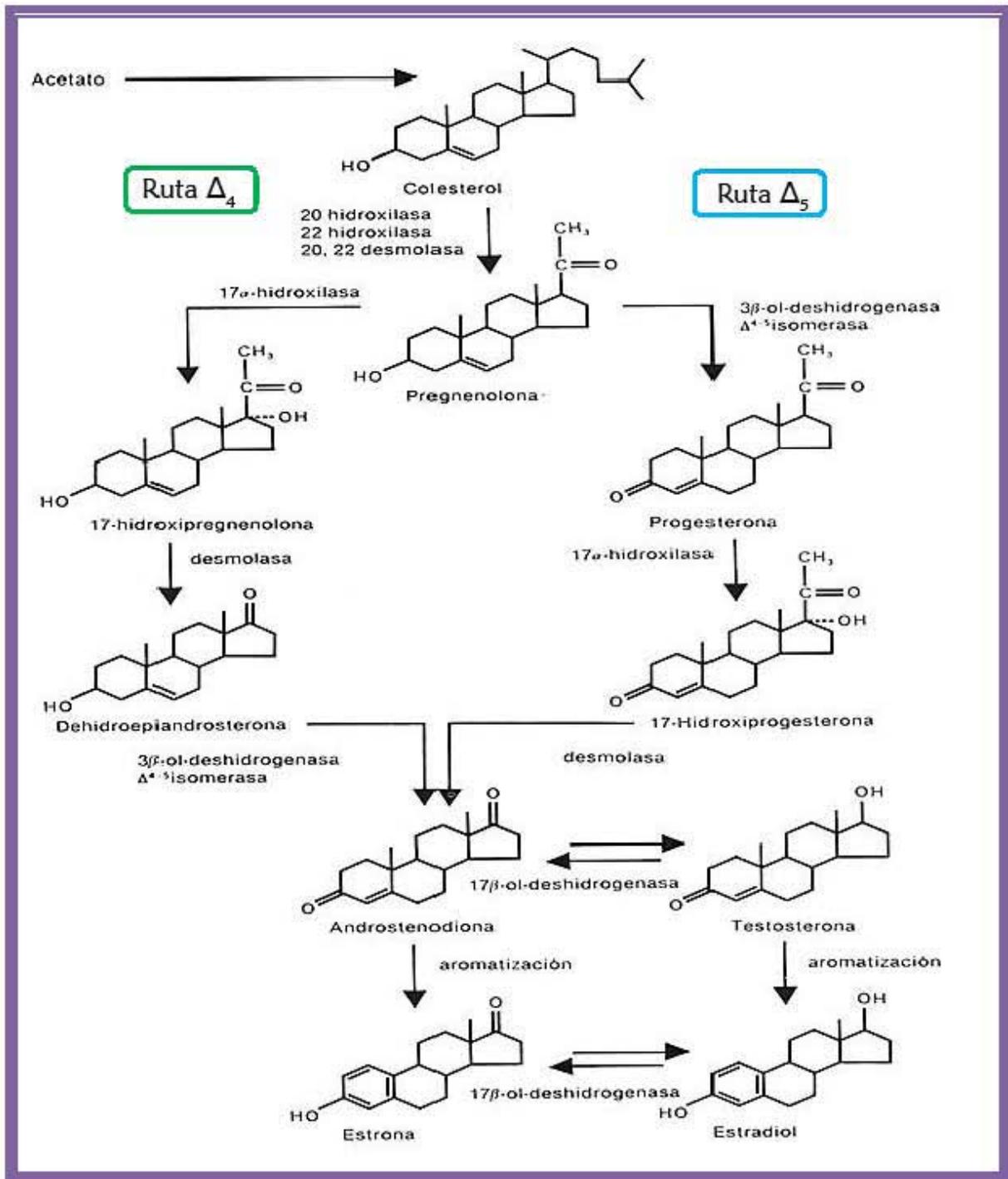
La fuente principal de colesterol utilizado por el ovario deriva de la captación del colesterol lipoproteico, concretamente de las LDL. Existen receptores específicos para las LDL en membrana de las células ováricas y también hay sistemas enzimáticos capaces de sintetizar el colesterol. El colesterol, se transporta después a las membranas mitocondriales, donde comienza la biosíntesis esteroidea (Figura 5). La proteína implicada en el transporte de colesterol al interior de la mitocondria es la proteína transportadora o reguladora de la esteroidogénesis (StAR) (Yoshinaga., 1999).

El primer paso en la esteroidogénesis es la conversión de colesterol a pregnenolona la cual comienza en la membrana interna de las mitocondrias. La reducción del número de carbonos se produce por oxidaciones catalizadas por enzimas de la familia del citocromo P450 (Van Voorhis., 1999). La enzima que actúa en primer lugar es la P450<sub>scc</sub> (desmolasa) la cual corta la cadena lateral de 6 carbonos del colesterol produciendo ácido isocaproico y pregnenolona (Brown., 1999; Van Voorhis., 1999). Una vez sintetizada la pregnenolona en las células de la teca interna del ovario, su metabolismo puede seguir dos rutas diferentes:

**1) La ruta  $\Delta 4$  o de las cetonas**, en donde 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 tecales, granulosa y teca, por lo general esta ruta se realiza en el cuerpo lúteo. Esta vía la toman aquellas moléculas esteroides que tienen el enlace de insaturación en el C-4 y un grupo ceto en el C-3 (Van Voorhis., 1999).

La pregnenolona se convierte en progesterona por acción de la  $3\beta$ -HSD la cual produce una deshidrogenación del grupo hidroxilo convirtiéndolo en cetona (carbono-3), también es producida una isomerización del doble enlace presente en la pregnenolona cambiándolo de posición del carbono 5 al 4. La pregnenolona formada viaja al torrente sanguíneo para cumplir con sus funciones o por medio del complejo enzimático P450c17, es convertida a 17-hidroxiprogesterona (Van Voorhis., 1999).

**2) La ruta  $\Delta 5$** . 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 deshidroepiandrosterona (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. Esta ruta la toman aquellas moléculas esteroides que tienen el doble enlace en la posición C-5 y un grupo hidroxilo en el C-3 (Van Voorhis., 1999).



**FIGURA 5.** Esquemización de las rutas para la biosíntesis de las hormonas esteroideas donde 1) 20, 22 desmolasa, 2) 17-hidroxilasa, 3) 17, 20-desmolasa, 4) 17 $\beta$ OH-esteroide-deshidrogenasa, 5) 3 $\beta$ - $\alpha$ -deshidrogenasa y  $\delta$ 4-5 isomerasa, 6) 5 $\alpha$  reductasa, 7) 3 $\alpha$  reductasa, 8) aromatasasa (Van Voorhis.,1999).

## TEORIA DE LA DOBLE CÉLULA

En la esteroidogénesis es necesaria la participación de las células de la teca y la granulosa, debido a que las células de la teca carecen del complejo aromatasas que convierte andrógenos a estrógenos, mientras que las células de la granulosa producen progesterona ( $P_4$ ) pero carecen de la enzima  $17\alpha$ -HSD, que es esencial en la conversión a andrógenos. Por consiguiente las células de la teca producen los andrógenos que se mueven a través de la membrana basal a las células de la granulosa, donde éstos son convertidos a estrógenos por la aromatasas (Yoshinaga., 1999).

La FSH y LH, estimulan en conjunto la síntesis de estrógenos. La teoría de la “doble célula-doble hormona” en la biosíntesis de estrógenos implica la unión de LH a su receptor en células de la teca interna, donde la acción de LH es mediada por el sistema adenilato ciclasa-AMPCíclico o fosfolipasas, estimula la entrada del colesterol en las mitocondrias y su conversión en pregnenolona (Berne y col., 1999) y el metabolismo de la  $P_4$  a androstenediona. Esta última es transportada a células de la granulosa, en donde la FSH se une a su receptor a través de la actividad mediada por el segundo mensajero AMPcíclico, aumenta la transcripción del gen de la aromatasas, la enzima específica en la síntesis de  $E_2$ , de modo que la conversión de androstenediona a estrona y testosterona (T) a estradiol ( $E_2$ ) se acelera (Berne y col., 1999; Yoshinaga., 1999).

## CICLO ESTRAL

La duración del ciclo ovárico, depende del tiempo requerido para que el folículo madure hasta el estadio “ovulatorio” y de la duración de la secreción de progesterona por el folículo postovulatorio. Los ciclos se pueden clasificar en largos (perro), cortos (mujer) y ultracortos (rata). Frecuentemente se emplea también otra clasificación basada en el número de ciclos exhibidos al año (monoestro, poliestro) (Tresguerres., 1999).

No obstante, la clasificación, más habitual se basa en la característica rítmica (conductual o fisiológica) más sobresaliente. Así los ciclos se clasifican en ciclo estral y ciclo menstrual (Tresguerres., 1999). Sin embargo, es el ciclo estral el que se presenta en todos los mamíferos a excepción de la especie humana. En los mamíferos, se presenta como una secuencia de procesos reproductivos, se produce una cascada de eventos hormonales y conductuales que son progresivos, altamente sincronizados y repetitivos (Kilen y Schwartz., 1999).

La palabra *estro* se deriva del griego *oistros*, tábano, y se utiliza para describir el comportamiento de la hembra por su reacción hacia los machos y su atracción de estos hacia ella (Sadler., 1982). Durante el ciclo estral se lleva a un grupo de folículos ováricos a la maduración y ovulación y, al mismo tiempo, induce la conducta sexual que provoca el apareamiento y la fertilización de los huevos ovulados (Hoar., 1978).

El ciclo estral de la rata dura entre 4 y 5 días y es influenciado por factores extereoreceptivos como la luz, la temperatura y las sustancias químicas percibidas por el sentido del olfato (Tresguerres., 2003). Se divide en cuatro fases cada una con una distinta duración (Figura 6).

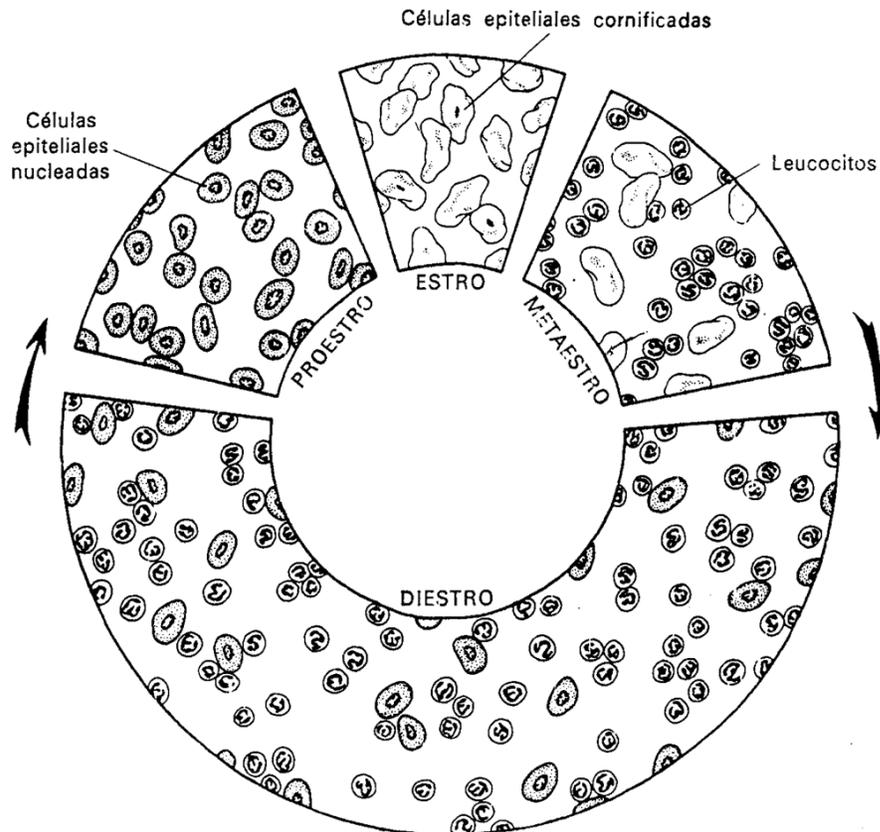
**Estro:** Dura de 9 a 15 horas. En este periodo el acercamiento, la monta y la cópula por el macho aún es permitida. Como la ovulación ha sucedido pocas horas antes, los óvulos se encuentran en el oviducto. El folículo postovulatorio comienza a estructurarse como cuerpo lúteo mientras una nueva serie de folículos primarios comienza a desarrollarse. En la mucosa vaginal se encuentran numerosas mitosis que desplazan a las capas más superficiales (epitelio escamoso y cornificado) que son exfoliadas a la luz de la vagina (Tresguerres., 1999).

**Metaestro:** Dura 15 horas. La monta y la cópula ya no son permitidas. La secreción de progesterona por el cuerpo lúteo y la de estradiol por los folículos inhiben la secreción de gonadotropinas. La vascularización y la motilidad del útero están disminuidas. En el frotis vaginal se aprecia infiltración leucocitaria junto con algunas células cornificadas (Tresguerres., 1999).

**Diestro:** Dura de 60 a 70 horas. Durante esta fase tiene lugar la regresión del cuerpo lúteo (luteólisis) siempre y cuando no haya habido cópula, que en algunos roedores estimula la liberación de prolactina (hormona luteotrófica). Mientras tanto la secreción de estradiol por los folículos en crecimiento sigue aumentando. Al igual que en la fase de metaestro, los esteroides ováricos inhiben la secreción basal de gonadotropinas que, a su vez, mantienen el crecimiento del folículo (Tresguerres., 1999).

**Proestro:** Dura aproximadamente de 12 a 14 horas. Los folículos han adquirido el estadio de folículos preovulatorios y secretan grandes cantidades de estradiol. Esta hormona ejerce ahora un efecto estimulante (retroalimentación positiva) sobre la secreción de gonadotropinas. La LH produce la ovulación y la luteinización del folículo postovulatorio. El útero por acción del estradiol, se hace extremadamente contráctil y en la vagina aparecen células epiteliales

nucleadas. La cópula solo es permitida con el comienzo de la fase de oscuridad. La secreción de FSH en la mañana del día del estro estimula el crecimiento folicular y se produce en respuesta a la disminución de la secreción ovárica de inhibina (Tresguerres., 1999).



**FIGURA 6.** Representación de las fases del ciclo estral: Proestro, Estro, Metaestro y Diestro y células características del frotis vaginal recogidas durante diferentes etapas del ciclo del estro de la rata. (Tomado de Hoar., 1978).

## INERVACIÓN OVÁRICA

Los ovarios de los mamíferos están inervados por fibras simpáticas y sensoriales además de un pequeño componente parasimpático (Burden., 1978). La inervación simpática está compuesta por fibras que transportan neuropéptido Y (NPY), fibras que transportan VIP y por aquellas que contienen catecolaminas (principalmente noradrenalina). En la inervación sensorial participan fibras que contienen el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y sustancia P (SP) así como VIP (Lawrence y Burden., 1980; Dissen y Ojeda., 1999).

Son dos los nervios simpáticos que inervan los ovarios: el plexo ovárico (PO) que deriva del ganglio nodoso y del ganglio de la raíz dorsal, entran al cordón espinal en el segmento torácico T-10 y el segmento lumbar L2-L4. En la rata corre a lo largo de la arteria ovárica e inerva principalmente la vasculatura del ovario. Por sus fibras viajan la SP, CGRP (neurotransmisores de naturaleza sensorial), NA y NPY (neurotransmisores de naturaleza simpática) (Burden., 1978; Dissen y Ojeda.. 1999).

La otra vía es aportada por el NOS que se origina en el segmento torácico T-11 y llega al lumbar L-4, está asociado al ligamento suspensorio que sujeta al ovario, al oviducto y continúa hacia la musculatura longitudinal del útero (Lawrence y Burden., 1980). El NOS hace conexión en el ganglio celíaco, el mesentérico y los nervios espláncnicos lumbares, inerva principalmente células del tejido intersticial y la teca interna de los folículos. Por sus fibras viajan NA y VIP (Aguado y Ojeda., 1984; Dissen y Ojeda.. 1999).

NA y VIP estimulan la secreción de progesterona y andrógenos; VIP estimula la producción de estradiol y NA facilita el efecto estimulante de las gonadotropinas en la esteroidogénesis del ovario (Ojeda y col., 1999).

Diversos trabajos han sugerido que la inervación simpática puede participar en los mecanismos que regulan los procesos reproductivos como la ovulación, el desarrollo folicular y el crecimiento ovárico (Gerendai y col., 1978, Lawrence y Burden., 1980).

## **SINDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO**

El síndrome de ovario poliquístico (SOPQ) es sin duda, la causa más frecuente de esterilidad anovulatoria hiperandrogénica que afecta al 7% de las mujeres en edad fértil. Fue descrito en el año de 1935 por Stein y Leventhal (Builes y col., 2006) como una patología que se manifiesta clínicamente por una combinación de hiperandrogenismo con anovulación crónica y un aumento de la relación de LH:FSH (Yen., 2001). En la sangre incrementa la concentración de estrógenos y de hormonas androgénicas y sus precursores (Barria y col., 1993; Lara y col., 2000). El síndrome frecuentemente es acompañado de obesidad, hirsutismo y en la mayoría de los casos infertilidad (Barria y col., 1993); con ovarios de mayor tamaño y con la presencia de numerosos quistes foliculares, actualmente se le reconoce como parte del síndrome metabólico el que puede incluir hiperinsulinemia, hiperlipidemia, diabetes mellitus tipo II y riesgo cardiovascular. (Greiner., 2006).

Aunque el patrón de la secreción basal de gonadotropinas esta alterado, es improbable que el SOPQ resulte de un defecto hipotalámico, puesto que, por un lado, están los patrones de liberación de LH y la proporción de la secreción de LH/FHS que son inconsistentes entre pacientes con el SOPQ; y por el otro lado, el eje hipotálamo-hipófisis que mantiene su respuesta a la retroalimentación positiva y negativa del estradiol y puede reiniciar su función cíclica después de una manipulación terapéutica apropiada. Ambas observaciones sugieren que las alteraciones neuroendocrinas en la función hipotalámica en el síndrome son secundarias a un defecto localizado en otra parte (Barria y col. 1993).

La activación del sistema nervioso simpático ha sido reconocido como uno de los factores que forman parte de la etiología del SOPQ en humanos y en la rata (Greiner., 2006).

Diversos estudios postulan que el desarrollo o aparición del SOPQ está estrechamente relacionado con una activación anormal del sistema nervioso simpático. Esta posibilidad ha sido confirmada en la rata, debido a que realizar una sección bilateral del nervio ovárico superior, hay un restablecimiento en la ciclicidad de los animales, se normaliza la concentración de LH, además de que hay evidencia de la desaparición de quistes y la aparición de cuerpos lúteos, indicadores de que se produjo la ovulación (Barria y col., 1993; Lara y col., 2002; Rosa-E-Silva y col., 2003).

## **SOPQ INDUCIDO CON VALERATO DE ESTRADIOL**

En la rata el SOPQ es inducido por la administración de una dosis de VE, un estrógeno sintético de larga actividad, es un polvo cristalino, blanco, generalmente inodoro pero puede tener ligero olor a grasa; es soluble en aceite de ricino, metanol, benzoato de benzilo, dioxano, aceite de ajonjolí y de cacahuate, prácticamente insoluble en agua. Se absorbe lentamente en suspensión oleosa inyectada por vía intramuscular (Remington., 2006), tiene una vida media de 15 días (Rosa-E-Silva y col., 2003) y se obtiene concentración máxima entre el tercer y quinto día después de la administración.

Los efectos del VE cuando se administra en la etapa juvenil de la rata induce patologías similares a las que se presentan en la mujer con SOPQ (Hemmings y col., 1983; Schulster y col., 1984; Brawer y col., 1986) como son: anovulación crónica, formación de ovarios poliquísticos, alteración del ciclo ovárico, caracterizado por ausencia de cuerpos lúteos (Brawer y col., 1978, Rosa E-Silva y col., 2003). Además la rata presenta persistencia de estro vaginal (Brawer y col., 1978) y la disminución en las concentraciones de LH y FSH; que se acompañan por un incremento en la concentración de NA ovárica y estradiol (Rosa E-Silva y col., 2003).

Se ha sugerido que el SOPQ inducido por la administración de VE, está asociado a la hiperactividad de las fibras simpáticas que arriban al ovario, vía el NOS (Barria y col., 1993; Lara y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003). Esto es evidenciado por un aumento en la capacidad de las terminales nerviosas para incorporar y liberar NA, por incremento en el contenido de NA ovárica y por la disminución en el número de receptores libres  $\beta$ -adrenérgicos en células de la teca interna y de la glándula intersticial (Lara y col., 1993).

## BURSA OVÁRICA

En los roedores, el mesenterio ovárico se conecta al ovario con un amplio ligamento el cual forma una cápsula que encierra al ovario que recibe el nombre de bursa ovárica (Li y col., 2007). La bursa ovárica se encuentra conformada por tres capas:

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

La cavidad que se forma entre el ovario y la bursa recibe el nombre de cavidad bursal (Li y col., 2007). Esta cavidad contiene líquido y su volumen es regulado por paquetes de células musculares lisas. En estudios realizados con trazadores se observó que la bursa ovárica 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).

La bursa ovárica se caracteriza por la presencia de estomas linfáticos, que son pequeñas aberturas del revestimiento mesotelial, que representa una vía rápida de drenaje y permite la libre circulación del líquido desde la cavidad bursal hasta el sistema vascular (Shinohara y col., 1987; Li y Yu., 1991; Li y Li., 2003).

Una vez que ocurre la ovulación, la bursa ovárica se hincha con líquido liberado de los folículos postovulatorios, sin embargo es capaz de mantener el microambiente del ovario normal (Li y col., 2007). Ha sido propuesto que los haces de células musculares lisas de la bursa ovárica puede servir para regular el volumen del líquido y la presión dentro de la cavidad bursal (Martin y col., 1981).

En los roedores, la bursa del ovario juega un papel importante en el proceso de ovulación en donde los fluidos que se encuentran en la cavidad bursal proveen a los ovocitos de un microambiente adecuado; también se ha observado que la bursa ovárica aumenta la probabilidad de que los ovocitos liberado entren al oviducto ya que la remoción de la bursa ovárica disminuye el número de ovocitos observados en el oviducto (Vanderhyden y col., 1986).

## PÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP)

El VIP contiene 28 aminoácidos, es caracterizado por sus propiedades vasodilatadoras y su actividad en el sistema nervioso periférico. El VIP relaja los pulmones, la tráquea y musculatura gástrica. Inhibe la secreción de enzimas gástricas y estimula la secreción de glucagón, insulina y somatostatina, aumenta la adenilciclasa, así como la secreción biliar en el hígado (Kruk., 1991). Estimula en el ovario la producción de estradiol y progesterona (Ahmhed y col., 1986).

En varias regiones del sistema nervioso existe gran cantidad de VIP: en la corteza cerebral, hipocampo, núcleo amigdaloides, y en cantidades menores en el hipotálamo y en las células amacrinas de la retina. En el ovario, VIP es aportado por las fibras nerviosas que inervan los vasos sanguíneos, el tejido intersticial y ocasionalmente alrededor de folículos antrales (Ahmed y col., 1986; Dess y col., 1986).

El VIP promueve la esteroidogénesis ovárica aumentando la actividad enzimática. En modelos experimentales como en la rata y gallina se ha demostrado que en células de la granulosa, VIP estimula:

- ☞ La producción 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).
- ☞ Mayor actividad enzimática de la 3 $\beta$ -HSD (Davoren y Hsueh., 1985) y de las aromatasas (George y Ojeda., 1987).
- ☞ El incremento de la expresión en el ARNm de la enzima 17 $\alpha$ -OH (Johnson y col., 1994).
- ☞ Inhibe la actividad de la 20 $\alpha$ -HSD (Davoren y Hsueh., 1985).

Además se ha mostrado que VIP participa en el desarrollo folicular. En la rata, la formación de los folículos ocurre después de las primeras 24 horas de vida postnatal, como parte de un proceso de diferenciación durante el cual ocurre la formación masiva de los folículos durante un periodo de menos de 36 horas (Rajah y col., 1992; Malamed y col., 1992). Los folículos primordiales recién formados comienzan a crecer y experimentan un segundo proceso de diferenciación que resulta en la adquisición de receptores a gonadotropinas y su capacidad de responder a las mismas (Smith-White y Ojeda., 1981; Richards y col., 1987; Hirshfield., 1991), dichos eventos ocurren de manera independiente al estímulo gonadotrópico (Smith-White y Ojeda., 1981). El grupo de Mayerhofer en 1997 mostró que en ovarios de ratas neonatas de dos días de edad, el VIP y NA contribuyen en la diferenciación bioquímica de los folículos primordiales al inducir la formación de receptores a FSH biológicamente activos, que son capaces de estimular la producción de AMPc ante la FSH.

En el ovario VIP participa en la regulación del proceso de esteroidogénesis así como en el crecimiento y diferenciación folicular que es semejante a los que activa la FSH al unirse a su receptor. Se ha mostrado que el VIP, al igual que la FSH, actúa principalmente a través de la activación del AMPc (George y Ojeda., 1987; Johnson y col., 1994; Mayerhofer y col., 1997) en donde la adición de un inhibidor de la actividad de la fosfodiesterasa (enzima que degrada el AMPc) potencializa el efecto del VIP en la esteroidogénesis de células de la granulosa, sin embargo, sus efectos son menos potentes que los ejercidos por la FSH (Davoren y Hsueh., 1985).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El ovario recibe información neural de tipo simpática vía NOS, por donde llegan al ovario VIP y NA, involucrados en la esteroidogénesis ovárica. El estudio de la participación de la inervación neural sobre las funciones ováricas ha sido dilucidado utilizando modelos de denervación quirúrgica o farmacológica.

En estudios previos de nuestro laboratorio a ratas infantiles, la administración de una dosis de VE más la sección unilateral del NOS en la etapa juvenil restableció la ovulación por parte del ovario inervado, aún cuando en éste la concentración de NA ovárica se mantiene alta (Linares., 2006). Estos resultados indican que el SOPQ no es resultado únicamente de una mayor actividad de las fibras catecolaminérgicas, sino que también pudieran estar involucradas otras fibras nerviosas como las que contienen VIP, que estarían regulando la respuesta esteroidogénica y la ovulación.

En otro modelo fue eliminada la información catecolaminérgica que llega al ovario por la administración de guanetidina, un neurotóxico de las neuronas simpáticas, y posteriormente se indujo el SOPQ. En estos animales se observó que al eliminar la inervación catecolaminérgica que llega al ovario, dejando sólo la información peptidérgica, permanecieron las características del síndrome (Ruiz., 2009), lo cual nos indica que es probable que VIP ejerza un papel estimulante en la secreción de estradiol y progesterona y participe en el desarrollo del SOPQ.

Para probar lo anterior se diseñó un modelo en el que se realizó la denervación unilateral del NOS y el ovario denervado fue estimulado por la administración intrabursal de VIP, con el fin de evaluar el papel del péptido sobre el desarrollo del SOPQ.

## HIPÓTESIS

Si en la rata con SOPQ la respuesta ovulatoria del ovario inervado es regulada por el VIP y no sólo por NA, entonces la eliminación de las fibras simpáticas por la sección unilateral del NOS, restablecerá la respuesta ovulatoria en el ovario denervado por la estimulación intrabursal de VIP.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar en el modelo del animal con SOPQ la respuesta del ovario denervado al estímulo con VIP.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- ☞ Analizar el efecto de la inyección de VIP en la bursa ovárica en animales con SOPQ sobre la respuesta ovulatoria.
- ☞ Analizar el efecto de la inyección de VIP en la bursa ovárica en animales con SOPQ sobre la secreción de hormonas esteroides.
- ☞ Analizar en el modelo del animal con SOPQ la respuesta del ovario denervado y estimulado con VIP sobre la histología ovárica.

## **METODOLOGÍA**

Se utilizaron ratas hembras recién nacidas de la cepa CII-ZV que fueron mantenidas desde el nacimiento bajo condiciones controladas de luz/oscuridad , con 14 horas de luz por 10 horas de oscuridad (luces encendidas de las 05:00 a las 19:00 horas) y temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . En el día del nacimiento (día cero) fueron sexadas y colocadas en camadas de 6 individuos por caja (5 hembras y un macho), con un libre acceso a la madre hasta el día del destete (día 24). A partir de entonces mantuvieron libre acceso al alimento y agua hasta el día de la autopsia.

## **DISEÑO EXPERIMENTAL**

Los animales fueron divididos al azar en diferentes grupos experimentales, cada uno de los cuales está conformado por 10 animales.

La solución utilizada de VIP (Sigma Chemical Co., St Louis Mo. USA) se preparó en una concentración de  $10^{-6}$  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 sobreestimulación del ovario.

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).

En los animales tratados con VE se realizó la revisión de la apertura vaginal a partir del día en que estos fueron inyectados. En los tratados con Vh se inició a partir del día 30 de vida. El día de la canalización vaginal se consideró como el día de inicio de la pubertad.

## **TRATAMIENTOS QUIRÚRGICOS**

Animales de 60 días de edad y que presentaron estro vaginal, fueron anestesiados con éter entre las 10:00 y las 12:00h y se asignaron al azar a alguno de los siguientes grupos:

### **Denervación unilateral del NOS derecho o izquierdo**

Los animales anestesiados fueron sometidos a una incisión dorso-lateral de piel, músculo y peritoneo del lado derecho o izquierdo, de aproximadamente 1cm de largo, se exteriorizó el ovario unido al útero, se identificó el ligamento suspensorio por el cual transcurre el NOS y se procedió a seccionarlo. El ovario fue regresado a la cavidad peritoneal y la herida fue suturada.

### **Denervación unilateral del NOS derecho o izquierdo mas estimulación VIPérgica del ovario denervado**

En los animales sometidos a la sección del NOS izquierdo o derecho, en el mismo acto quirúrgico se realizó la estimulación del ovario denervado con VIP, para ello, se administró intrabursalmente 20  $\mu$ l de una solución de VIP a una concentración de  $10^{-6}$ M o 20  $\mu$ l de SS. 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 fue regresado a la cavidad peritoneal y la herida fue suturada.

## PROCEDIMIENTO DE LA AUTOPSIA

Los animales fueron pesados al cumplir los 60 días de edad y presentar un estro vaginal y se sacrificaron por decapitación. La sangre del tronco se colectó en tubos de ensaye y se dejó coagular durante 30 min a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 3500 r.p.m durante 15 min. Posteriormente el suero fue separado del botón celular y se dividió en alícuotas de 150 $\mu$ l en tubos eppendorf, y almacenados a -20°C hasta el momento de la cuantificación de estradiol y progesterona por radioinmunoanálisis (RIA).

Los ovarios, el útero, las glándulas adrenales, bazo y timo, fueron disecados y pesados en balanza analítica, los oviductos se observaron en un microscopio estereoscópico para realizar el conteo de ovocitos.

## REVISIÓN HISTOLÓGICA

En el momento de la autopsia los ovarios de tres animales de cada grupo experimental se fijaron en solución de Bouin durante 6 horas, deshidratados en alcohol (80%, 96% y absoluto) y cloroformo y se incluyeron en parafina. Posteriormente se realizaron cortes histológicos de 10  $\mu\text{m}$  de grosor y fueron teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina.

En todos los cortes histológicos se observó la presencia de cuerpos lúteos, folículos atrésicos, prequistes y quistes foliculares. Los folículos atrésicos se consideraron como aquellos que presentaron alguna 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 que presentaron 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 que presentaron 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

La concentración de estradiol y progesterona, se cuantificó por RIA de fase sólida, con un kit de reactivos comerciales Coat-A-Count, USA. Los cuales consisten en tubos de polipropileno que contienen anticuerpo específico (anti-estradiol, anti-progesterona), en cada tubo se adicionaron 100  $\mu$ l de suero problema más 1 ml de hormona radioactiva (I125). Se agitaron en vortex durante un minuto y se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente; se decantó y los tubos se colocaron en un contador de centello (modelo Cobra 5005, PackardTM). La concentración de la hormona en la muestra problema se cuantificó en función de las cuentas por minuto y de una curva de calibración. La concentración de estradiol se expresó en pg/ml de suero, en tanto que la de progesterona fue expresada en ng/ml de suero.

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

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El peso corporal y de los órganos (ovarios, útero y adrenales, bazo y timo) así como la concentración de estradiol y progesterona fueron analizadas por la prueba de análisis de varianza multifactorial (ANDEVA) seguida de la prueba de Tukey-Kramer.

El número de ovocitos liberados se analizó por la prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de U de Mann-Whitney.

La tasa de animales ovulantes (número de animales que ovulan / número total de animales) se analizaron por medio de la prueba de Fisher o de Chi-cuadrada.

En los casos donde fue requerido efectuar una comparación entre dos grupos se utilizó la prueba “t” de Student.

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

## EXPERIMENTO 1

### EFFECTO DE LA SECCIÓN UNILATERAL DEL NERVIO OVÁRICO SUPERIOR EN ANIMALES TRATADOS CON VALERATO DE ESTRADIOL

#### *Respuesta ovulatoria*

En los animales inyectados con VE, se observó disminución en la proporción de animales que ovulan de ambos ovarios, con una cuota ovulatoria muy baja, comparados con su grupo inyectado con Vh (Cuadro 1).

En animales tratados a los 10 días de edad con Vh a los que se le realizó sección izquierda o derecha del NOS a los 60 días de edad, disminuyó el número de ovocitos liberados por el ovario derecho, lo que se refleja en el número total de ovocitos liberados (Cuadro 1).

**CUADRO 1.** Proporción de animales ovulantes y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados de ratas tratadas a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), sometidas a los 60 días de edad a la sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) y autopsiadas al segundo estro vaginal.

Grupo	n	Animales Ovulantes por Ovario			Ovocitos Liberados por Ovario		
		Izquierdo	Derecho	Total	Izquierdo	Derecho	Total
Vh	10	10/10	9/10	10/10	3.7 $\pm$ 0.6	4.3 $\pm$ 0.7	7.6 $\pm$ 0.9
Vh + SNOI	10	6/10	6/10	8/10	3.8 $\pm$ 0.6	2.0 $\pm$ 0.3♦	4.3 $\pm$ 1.0♦
Vh + SNOD	10	8/10	9/10	9/10	3.0 $\pm$ 0.5	2.1 $\pm$ 0.4♦	4.7 $\pm$ 0.9♦
VE	10	1/10★	1/10★	2/10★	1	2	1,2
VE + SNOI	10	6/10	8/10	8/10	2.3 $\pm$ 0.4	2.4 $\pm$ 0.5	3.8 $\pm$ 0.6
VE + SNOD	9	6/9	6/9	8/10	2.1 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.4	3.0 $\pm$ 0.6

★p<0.05 vs Vh (Prueba de Fisher).

♦p<0.05 vs Vh (Prueba U de Mann-Whitney)

### *Peso corporal y Peso Relativo de Órganos*

En animales que recibieron VE, la sección del NOS derecho, resultó en un aumento del peso del útero, cuando es comparado con el grupo tratado con VE más sección izquierda del NOS (Cuadro 2).

En los grupos tratados con Vh no se observa ningún cambio significativo (Cuadro 2).

**CUADRO 2.** Media  $\pm$  e.e.m del peso corporal (g) y peso relativo (mg/100g pc) del ovario izquierdo, ovario derecho, masa ovárica y peso del útero (g) de ratas tratadas a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) sometidas a los 60 días de edad a la sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) y autopsiadas al segundo estro vaginal pos-cirugía.

Grupo	n	Peso (g) corporal	Ovario		Masa ovárica	Peso Útero
			Izquierdo	Derecho		
Vh	10	225.7 $\pm$ 5.9	13.4 $\pm$ 1.1	15.0 $\pm$ 1.2	28.4 $\pm$ 2.3	131.0 $\pm$ 6.0
Vh + SNOI	10	229.7. $\pm$ 5.7	15.0 $\pm$ 0.5	12.9 $\pm$ 1.4	25.2 $\pm$ 2.5	125.5 $\pm$ 6.1
Vh + SNOD	10	224.5 $\pm$ 4.9	14.1 $\pm$ 0.7	16.5 $\pm$ 0.8	30.7 $\pm$ 1.5	135.3 $\pm$ 8.7
VE	10	213.9 $\pm$ 8.9	12.78 $\pm$ 2.1	12.8 $\pm$ 0.8	23.4 $\pm$ 1.3	146.3 $\pm$ 5.4
VE + SNOI	10	204.2 $\pm$ 11.4	15.0 $\pm$ 1.1	15.0 $\pm$ 1.1	28.8 $\pm$ 1.7	119.6 $\pm$ 8.5
VE + SNOD	9	211.1 $\pm$ 4.6	14.5 $\pm$ 0.8	14.9 $\pm$ 1.1	29.5 $\pm$ 1.6	160.7 $\pm$ 12.3 $\blacklozenge$

$\blacklozenge$  p<0.05 vs VE+SNOI (Prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Turkey-Kramer).

En animales tratados con VE la sección del NOS derecho, aumentó el peso de ambas adrenales en relación a los animales que recibieron Vh más sección del NOS derecho (Cuadro 3).

**CUADRO 3.** Media  $\pm$  e.e.m del peso relativo (mg/100g pc) de adrenal izquierda, derecha, masa adrenal, bazo y timo de ratas tratadas a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), sometidas a los 60 días de edad a la sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) y autopsiadas al segundo estro vaginal pos-cirugía.

Grupo	Adrenal		Masa	Bazo	Timo
	Izquierda	Derecha	Adrenal		
Vh	11.4 $\pm$ 0.8	11.6 $\pm$ 0.5	21.7 $\pm$ 0.8	226.1 $\pm$ 8.9	133.7 $\pm$ 6.2
Vh + SNOI	12.0 $\pm$ 0.4	9.7 $\pm$ 0.5	21.5 $\pm$ 0.8	239.1 $\pm$ 8.3	147.6 $\pm$ 6.8
Vh + SNOD	11.6 $\pm$ 0.2	11.5 $\pm$ 0.4	21.8 $\pm$ 1.3	227.6 $\pm$ 4.2	159.8 $\pm$ 6.1
VE	12.1 $\pm$ 0.4	12.3 $\pm$ 0.5	23.1 $\pm$ 0.7	234.5 $\pm$ 9.6	142.2 $\pm$ 6.9
VE + SNOI	11.8 $\pm$ 0.5	10.5 $\pm$ 0.54	22.8 $\pm$ 0.9	264.8 $\pm$ 9.6	146.8 $\pm$ 9.9
VE + SNOD	14.1 $\pm$ 0.7 <sup>▲</sup>	12.7 $\pm$ 0.7 <sup>▲</sup>	28.8 $\pm$ 1.1 <sup>▲</sup>	256.4 $\pm$ 8.6	162.2 $\pm$ 6.2

▲  $p < 0.05$  vs Vh+SNOD (Prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Turkey-Kramer).

### *Concentración de Hormonas en Suero*

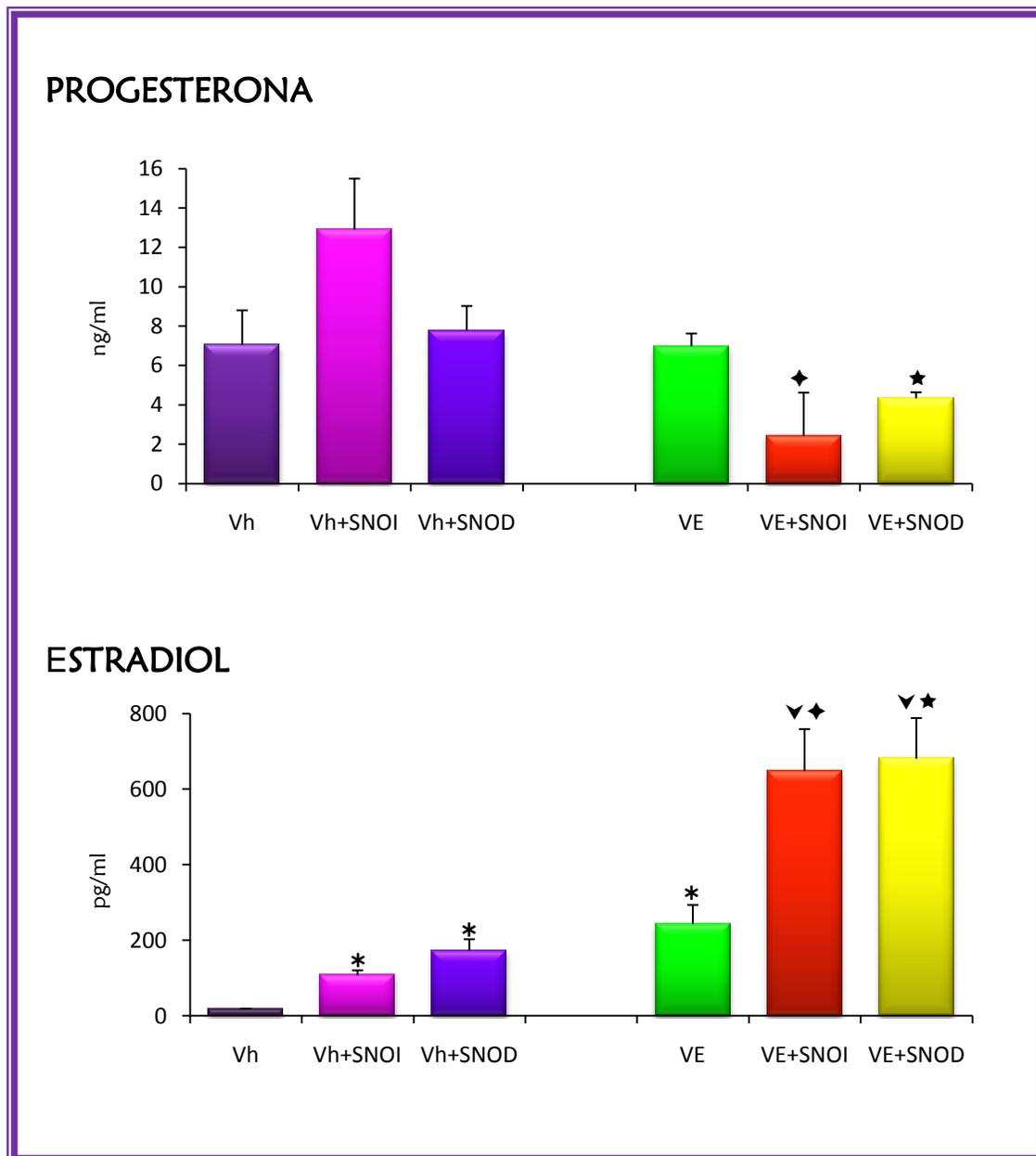
En los animales que recibieron VE y se les realizó la sección del NOS izquierdo o derecho, resultó en una menor concentración sérica de progesterona en comparación con su grupo de animales que recibieron Vh mas sección unilateral del NOS (Figura 7).

En animales tratados con Vh con sección izquierda o derecha del NOS se observó mayor concentración de estradiol, en comparación con los animales tratados únicamente con Vh (Figura 7).

Los animales con VE presentaron un incremento en la concentración de estradiol en comparación con los animales tratados con Vh (Figura 7).

Con la sección del NOS izquierdo o derecho en animales con VE, fue mayor la concentración de estradiol en comparación con el grupo con VE o Vh más sección del NOS (Figura 7).

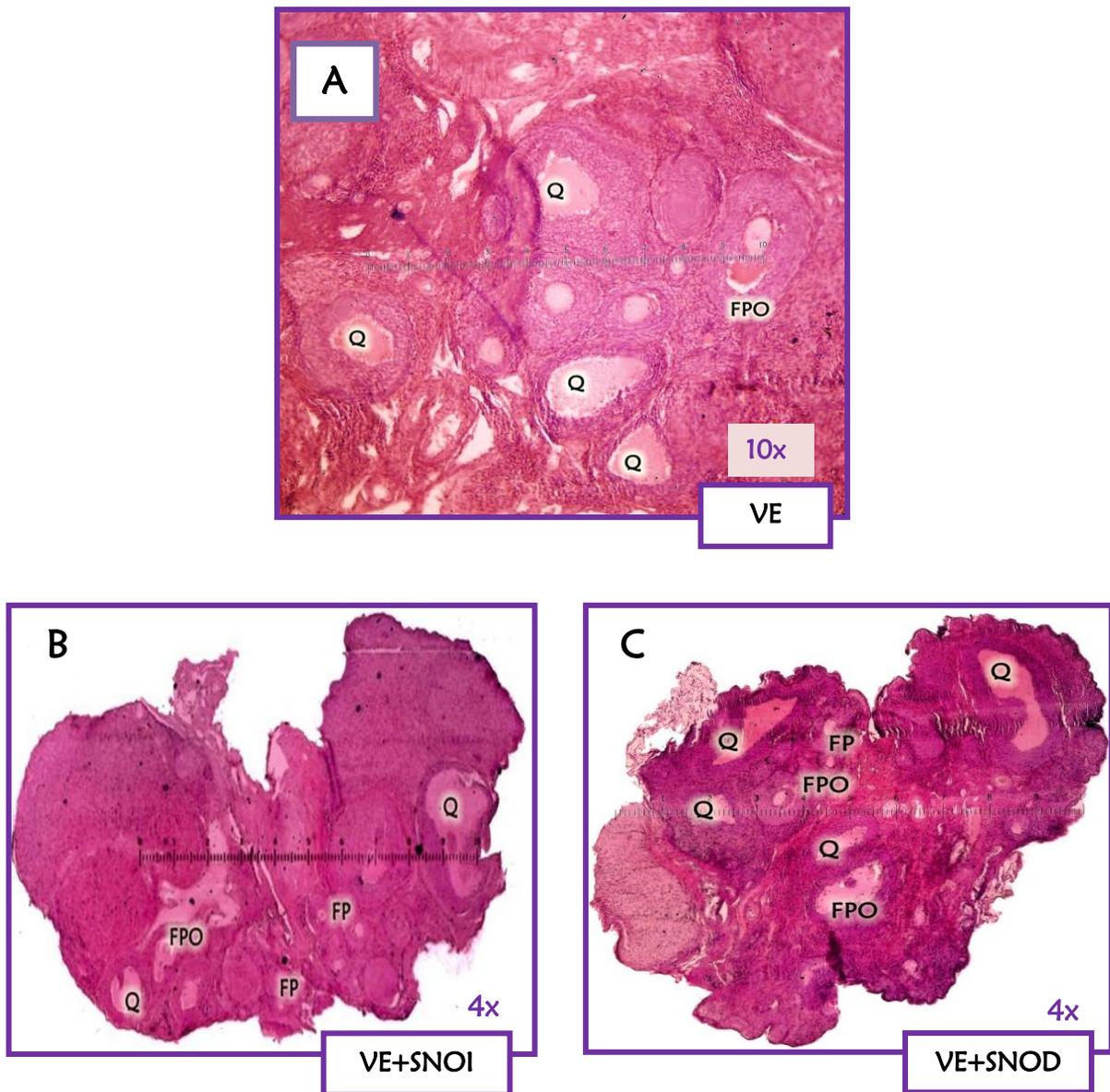
**Figura 7.** Media  $\pm$  e.e.m de la concentración en suero de progesterona y estradiol de ratas tratadas a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), sometidas a los 60 días de edad a la sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) y autopsiadas al segundo estro vaginal pos-cirugía.



- \*  $p < 0.05$  vs Vh (Prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Turkey-Kramer).
- ▼  $p < 0.05$  vs VE (Prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Turkey-Kramer).
- ◆  $p < 0.05$  vs Vh+SNOI (Prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Turkey-Kramer).
- ★  $p < 0.05$  vs Vh+SNOD (Prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Turkey-Kramer).

## REVISION HISTOLÓGICA

En los ovarios de animales tratados con VE se observa la presencia de quistes foliculares (Fig. 8-A). Los cuales disminuyen (observación del corte) en respuesta a la sección unilateral del NOS (Fig. 8-B,C).



**Figura 8.** Fotografía del ovario de un animal tratado a los 10 días de edad con VE (A) y del ovario izquierdo (B) o derecho (C) de ratas tratadas a los 10 días de edad con valerato de estradiol (VE) y sometidas a los 60 días de edad a la sección unilateral del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) y autopsiadas al segundo estro vaginal pos-cirugía. Folículos primarios (FP), folículos secundarios (FS) folículos preovulatorios (FPO) cuerpos lúteos (CL) y quistes foliculares (Q).

## EXPERIMENTO 2

### EFFECTO DE LA INYECCIÓN DE VIP EN LA BURSA OVÁRICA EN RATAS CON DENERVACIÓN UNILATERAL DEL NERVIJO OVÁRICO SUPERIOR

#### *Respuesta ovulatoria*

La administración de VIP en la bursa del ovario denervado de los animales con sección del NOS izquierdo no modificó la respuesta ovulatoria, respecto al grupo tratado con la solución salina (Cuadro 4).

En animales con sección del NOS derecho mas VIP en la bursa del ovario denervado se observó un mayor número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo, que se refleja en el aumento en el número total de ovocitos liberados, cuando se compara con su respectivo grupo tratado con SS (Cuadro 4).

**CUADRO 4.** Proporción de animales ovulantes y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados en de ratas adultas sometidas en el día del estro a la sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) e inmediatamente inyectadas con solución salina (SS) o péptido intestinal vasoactivo (VIP) en la bursa del ovario denervado y autopsiadas al segundo estro vaginal pos-cirugía.

Grupo	n	Animales Ovulantes por Ovario			Ovocitos Liberados por Ovario		
		Izquierdo	Derecho	Total	Izquierdo	Derecho	Total
SNOI + SS	10	8/10	6/10	8/10	4.8 $\pm$ 0.7	5.8 $\pm$ 1.1	9.2 $\pm$ 1.3
SNOI + VIP	10	7/10	8/10	9/10	6.3 $\pm$ 0.9	5.1 $\pm$ 0.6	9.4 $\pm$ 1.3
SNOI + SS	10	7/10	6/10	7/10	2.5 $\pm$ 0.3	4.6 $\pm$ 0.9	6.5 $\pm$ 1.0
SNOD + VIP	10	10/10	10/10	10/10	6.3 $\pm$ 0.4 $\blacklozenge$	4.2 $\pm$ 0.4	10.5 $\pm$ 0.5 $\blacklozenge$

$\blacklozenge$  p<0.05 vs SNOD+SS (Prueba U de Mann-Whitney).

## *Peso corporal y Peso Relativo de Órganos*

En animales con sección del NOS izquierdo o derecho más VIP en la bursa del ovario denervado no se modificó el peso corporal, de los ovarios, útero, adrenales, bazo y timo en comparación con su respectivo grupo tratado con SS (Cuadro 5 y 6).

**CUADRO 5.** Media  $\pm$  e.e.m del peso corporal (g) y del peso relativo (mg/100g pc) del ovario izquierdo, ovario derecho, masa ovárica y peso del útero de ratas sometidas a los 60 días de edad a la sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) e inmediatamente inyectadas con solución salina (SS) o péptido intestinal vasoactivo (VIP) en la bursa del ovario denervado y autopsiadas al segundo estro vaginal pos-cirugía.

Grupo	n	Peso (g) corporal	Ovario		Masa ovárica	Peso Útero
			Izquierdo	Derecho		
SNOI+SS	10	219.3 $\pm$ 5.7	14.9 $\pm$ 0.4	14.0 $\pm$ 0.4	27.4 $\pm$ 1.9	153.7 $\pm$ 4.1
SNOI+VIP	10	210.4 $\pm$ 2.4	14.9 $\pm$ 0.8	14.1 $\pm$ 0.6	29.0 $\pm$ 1.1	148.0 $\pm$ 9.7
SNOI+SS	10	211.2 $\pm$ 3.0	15.4 $\pm$ 1.0	14.7 $\pm$ 0.6	28.8 $\pm$ 1.4	149.0 $\pm$ 13.3
SNOD+VIP	10	201.7 $\pm$ 8.4	15.0 $\pm$ 0.4	14.8 $\pm$ 0.7	31.2 $\pm$ 1.2	154.0 $\pm$ 7.5

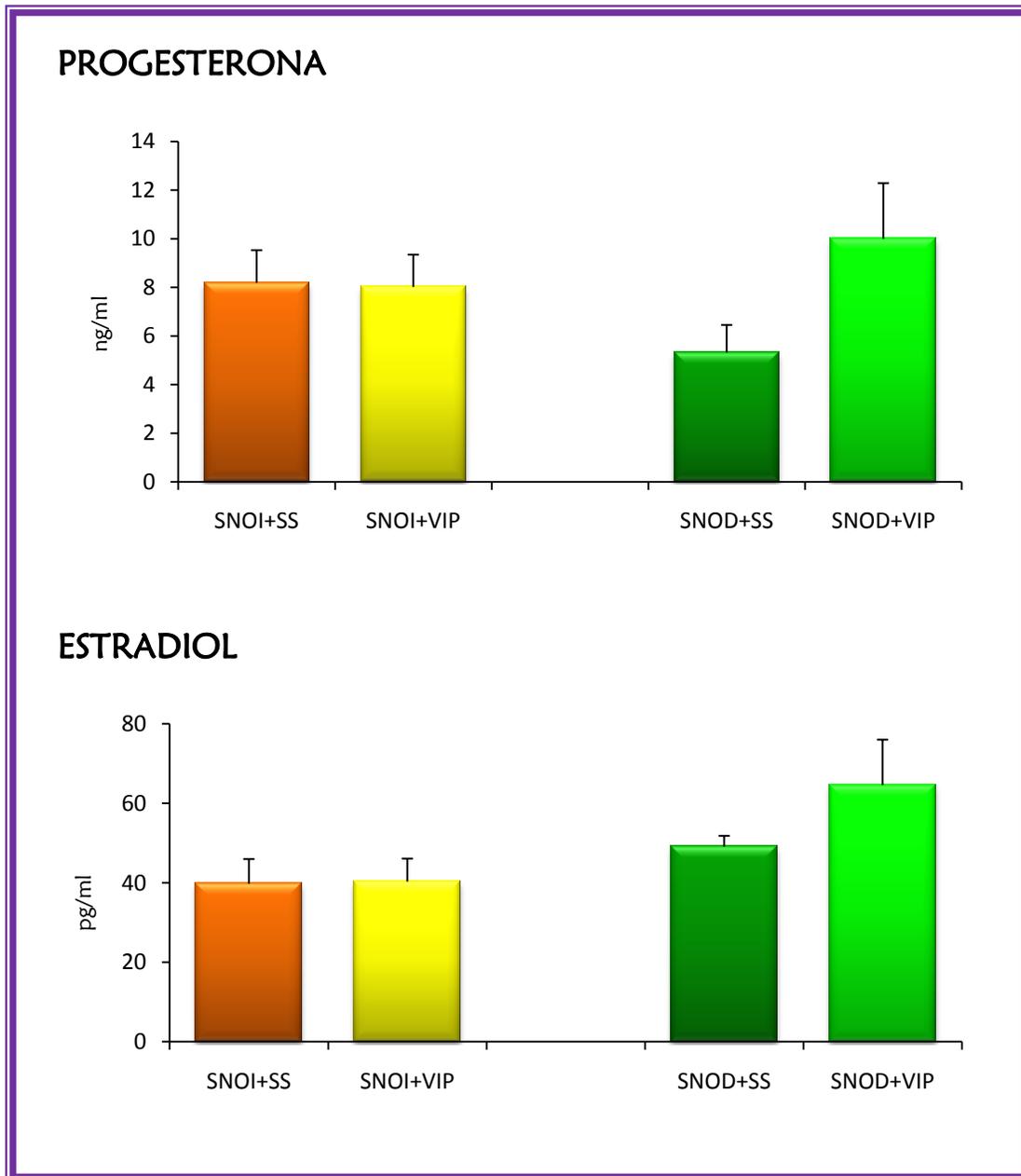
**CUADRO 6.** Media  $\pm$  e.e.m del peso relativo (mg/100g pc) de adrenal izquierda, adrenal derecha, masa adrenal, bazo y timo de ratas sometidas a los 60 días de edad a la sección unilateral del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) e inmediatamente inyectadas con solución salina (SS) ó péptido intestinal vasoactivo (VIP) en la bursa del ovario denervado y autopsiadas al segundo estro vaginal pos-cirugía.

Grupo	Adrenal		Masa Adrenal	Peso Bazo	Peso Timo
	Izquierda	Derecha			
SNOI+SS	11.7 $\pm$ 0.5	12.0 $\pm$ 0.5	23.8 $\pm$ 1.2	273.3 $\pm$ 9.2	146.7 $\pm$ 6.0
SNOI+VIP	13.2 $\pm$ 0.6	11.1 $\pm$ 0.5	24.5 $\pm$ 0.9	252.7 $\pm$ 7.6	150.9 $\pm$ 7.6
SNOD+SS	12.9 $\pm$ 0.3	11.8 $\pm$ 0.5	24.4 $\pm$ 0.8	255.7 $\pm$ 10.9	183.3 $\pm$ 10.8
SNOD+VIP	13.3 $\pm$ 0.6	13.0 $\pm$ 0.5	25.8 $\pm$ 1.1	245.2 $\pm$ 9.6	148.9 $\pm$ 15.8

## *Concentración de Hormonas en Suero*

La sección del nervio ovárico superior izquierdo o derecho seguida de estimulación con VIP en la bursa del ovario denervado no modificó la concentración de progesterona y estradiol en relación al grupo estimulado con SS (Figura 9).

**Figura 9.** Media  $\pm$  e.e.m de la concentración en suero de progesterona y estradiol de ratas sometidas a los 60 días de edad a la sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) e inmediatamente inyectadas con solución salina (SS) o péptido intestinal vasoactivo (VIP) en la bursa del ovario denervado y autopsiadas al segundo estro vaginal post-cirugía.



## EXPERIMENTO 3

### EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE VIP EN LA BURSA OVÁRICA EN RATAS CON VE Y DENERVACIÓN UNILATERAL DEL NERVIO OVÁRICO SUPERIOR

#### *Respuesta ovulatoria*

En los animales tratados con VE más sección del NOS izquierdo y estimulado con VIP, aumentó el número de animales ovulantes por parte del ovario denervado cuando se compara con el grupo tratado con VE más SNOI y estimulado con SS (Cuadro 7).

En ratas tratadas con Vh con sección del NOS derecho más inyección de VIP en la bursa del ovario denervado, aumentó el número de animales ovulantes por el ovario denervado y el número total de ovocitos liberados cuando se compara con el grupo tratado con Vh mas SNOD y estimulado con SS (Cuadro 7).

En los animales inyectados con VE y sección del NOS-derecho la estimulación VIPérgica en la bursa del ovario denervado, aumentó la tasa de animales ovulantes y el número de ovocitos liberados por el ovario denervado en comparación con el grupo tratado con VE más SNOD y estimulado con SS (Cuadro 7).

**CUADRO 7.** Proporción de animales ovulantes y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados en ratas tratadas a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) y sometidas a los 60 días de edad a la sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) e inmediatamente inyectadas con solución salina (SS) o péptido intestinal vasoactivo (VIP) en la bursa del ovario denervado y autopsiadas al segundo estro vaginal pos-cirugía.

Grupo	n	Animales Ovulantes por Ovario			Ovocitos Liberados por Ovario		
		Izquierdo	Derecho	Total	Izquierdo	Derecho	Total
Vh + SNOI + SS	10	4/10	7/10	8/10	2.2 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.1	3.1 $\pm$ 0.4
Vh + SNOI + VIP	10	5/10	6/10	9/10	2.6 $\pm$ 0.4	2.3 $\pm$ 0.6	3.0 $\pm$ 0.5
VE + SNOI + SS	10	4/10	5/10	7/10	2.2 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.3	2.7 $\pm$ 0.4
VE + SNOI + VIP	10	8/10★	6/10	9/10	2.6 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.2	3.8 $\pm$ 0.6
Vh + SNOD + SS	10	6/10	6/10	8/10	2.1 $\pm$ 0.6	2.8 $\pm$ 0.3	3.7 $\pm$ 0.5
Vh + SNOD + VIP	10	8/10	10/10♦	10/10	2.1 $\pm$ 0.4	3.9 $\pm$ 0.6	5.6 $\pm$ 0.7◀
VE + SNOD + SS	10	4/10	4/10	7/10	1.5 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.3
VE + SNOD + VIP	10	6/10	7/10*	9/10	1.8 $\pm$ 0.3	2.7 $\pm$ 0.1*	3.0 $\pm$ 0.5*

- ♦  $p < 0.05$  vs Vh+SNOD+SS (Prueba de Fisher).
- ◀  $p < 0.05$  vs Vh+SNOD+SS (Prueba U de Mann-Whitney).
- ★  $p < 0.05$  vs VE+SNOI+SS (Prueba U de Mann-Whitney).
- \*  $p < 0.05$  vs VE+SNOD+SS (Prueba U de Mann-Whitney).

### *Peso corporal y Peso Relativo de Órganos*

En el grupo Vh+SNOI+VIP fue menor el peso del útero en comparación a su respectivo grupo inyectado con SS (Cuadro 8).

En las ratas tratadas con VE y con sección del NOS Izquierdo la administración de VIP en la bursa del ovario denervado, fue menor el peso del ovario izquierdo y la masa ovárica en comparación con el grupo VE+SNOI+SS (Cuadro 8).

En el grupo VE+SNOI+SS aumentó el peso corporal en comparación con el grupo Vh+SNOI+SS (Cuadro 8).

En el grupo con Vh y sección del NOS derecho más VIP en la bursa del ovario denervado, fue mayor el peso corporal y disminuyó el peso de los ovarios y la masa ovárica, en comparación con el grupo tratado con Vh+SNOD y estimulado con SS (Cuadro 8).

En las ratas con VE +SNOD+SS se observó un mayor peso corporal y disminución en la masa ovárica, en comparación con su grupo con Vh + SNOD y estimulado con SS (Cuadro 8).

En el grupo VE+SNOD+VIP es menor el peso corporal de los animales en comparación con el grupo Vh+SNOD+VIP (Cuadro 8).

**CUADRO 8.** Media  $\pm$  e.e.m del peso corporal (g) y peso relativo (mg/100g pc) de ovario izquierdo, ovario derecho, masa ovárica y peso del útero en ratas tratadas a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) y sometidas a los 60 días de edad a la sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) e inmediatamente inyectadas con solución salina (SS) o péptido intestinal vasoactivo (VIP) en la bursa del ovario denervado y autopsiadas al segundo estro vaginal pos-cirugía.

Grupo	n	Peso (g) corporal	Ovario		Masa ovárica	Peso Útero
			Izquierdo	Derecho		
Vh + SNOI + SS	10	209.8 $\pm$ 6.0	15.9 $\pm$ 0.9	15.2 $\pm$ 0.5	29.4 $\pm$ 1.5	152.7 $\pm$ 5.6
Vh + SNOI + VIP	10	215.0 $\pm$ 6.0	13.3 $\pm$ 0.8	14.0 $\pm$ 0.7	28.6 $\pm$ 1.4	129.2 $\pm$ 6.3◀
VE + SNOI + SS	10	231.7 $\pm$ 7.7◀	17.3 $\pm$ 1.1	13.9 $\pm$ 0.7	33.5 $\pm$ 2.1	153.5 $\pm$ 9.1
VE + SNOI + VIP	10	216.9 $\pm$ 4.3	12.7 $\pm$ 1.1★	11.9 $\pm$ 1.2	25.1 $\pm$ 1.8★	133.2 $\pm$ 9.6
Vh + SNOD + SS	10	210.4 $\pm$ 4.8	17.4 $\pm$ 1.1	17.4 $\pm$ 1.2	34.5 $\pm$ 1.6	142.1 $\pm$ 7.3
Vh + SNOD + VIP	10	256.5 $\pm$ 6.8◆	13.2 $\pm$ 0.6◆	13.3 $\pm$ 0.7◆	24.4 $\pm$ 1.9◆	127.8 $\pm$ 9.1
VE + SNOD + SS	10	228.5 $\pm$ 5.9◆	15.2 $\pm$ 0.9	15.3 $\pm$ 1.5	27.5 $\pm$ 2.0◆	138.8 $\pm$ 9.5
VE + SNOD + VIP	10	224.9 $\pm$ 5.0▲	14.0 $\pm$ 0.5	13.3 $\pm$ 0.6	27.4 $\pm$ 0.9	136.8 $\pm$ 8.3

◀p<0.05 vs Vh+SNOI+SS (Prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Turkey-Kramer)

◆p<0.05 vs Vh+SNOD+SS (Prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Turkey-Kramer)

▲p<0.05 vs Vh+SNOD+VIP (Prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Turkey-Kramer)

★p<0.05 vs VE+SNOI+SS (Prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Turkey-Kramer)

En ratas tratadas con Vh o VE la sección del NOS izquierdo o derecho más SS o VIP en la bursa del ovario denervado no se modificó el peso de las adrenales, bazo y timo en comparación con su respectivo con sección del NOS (Cuadro 9).

**CUADRO 9.** Media  $\pm$  e.e.m del peso relativo (mg/100g pc) de adrenal izquierda, derecha, masa adrenal, bazo y timo en ratas tratadas a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) y sometidas a los 60 días de edad a la sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) e inmediatamente inyectadas con solución salina (SS) o péptido intestinal vasoactivo (VIP) en la bursa del ovario denervado y autopsiadas al segundo estro vaginal pos-cirugía.

Grupo	Adrenal		Masa Adrenal	Peso Bazo	Peso Timo
	Izquierda	Derecha			
Vh + SNOI + SS	12.0 $\pm$ 0.4	11.0 $\pm$ 0.9	21.1 $\pm$ 0.8	266.6 $\pm$ 13.2	161.6 $\pm$ 8.9
Vh + SNOI + VIP	12.0 $\pm$ 0.5	11.7 $\pm$ 0.4	22.4 $\pm$ 1.2	255.8 $\pm$ 13.0	164.5 $\pm$ 15.2
VE + SNOI + SS	13.8 $\pm$ 0.8	12.4 $\pm$ 1.0	22.3 $\pm$ 1.0	260.2 $\pm$ 15.8	133.1 $\pm$ 22.5
VE + SNOI + VIP	12.0 $\pm$ 0.6	11.2 $\pm$ 0.3	23.2 $\pm$ 0.8	281.5 $\pm$ 13.0	139.3 $\pm$ 8.7
Vh + SNOD + SS	12.6 $\pm$ 0.4	11.7 $\pm$ 0.6	24.5 $\pm$ 0.7	234.4 $\pm$ 11.4	134.1 $\pm$ 9.4
Vh + SNOD + VIP	12.0 $\pm$ 0.3	10.9 $\pm$ 0.2	22.3 $\pm$ 0.5	228.1 $\pm$ 6.1	132.8 $\pm$ 9.4
VE + SNOD + SS	12.3 $\pm$ 0.8	11.3 $\pm$ 0.6	23.7 $\pm$ 1.3	255.4 $\pm$ 7.1	142.8 $\pm$ 7.0
VE + SNOD + VIP	11.8 $\pm$ 0.3	12.1 $\pm$ 0.5	23.4 $\pm$ 0.9	251.5 $\pm$ 10.2	136.9 $\pm$ 11.4

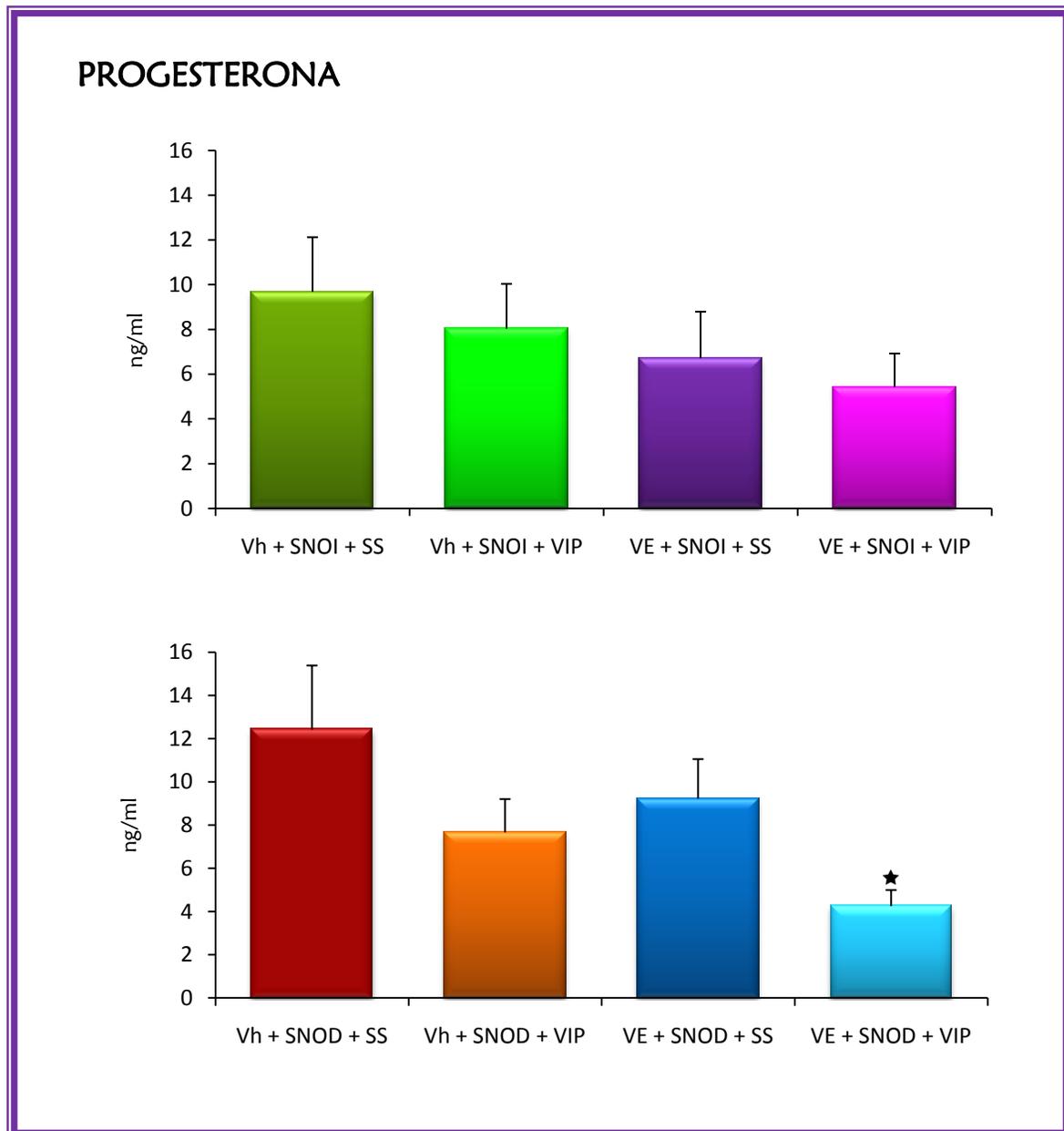
### *Concentración de Hormonas en Suero*

En las hembras con Vh más la sección del NOS izquierdo o derecho la inyección de VIP no modificó la concentración de progesterona, en comparación con el grupo tratado con SS (Figura 10).

La estimulación con VIP en las ratas tratadas con VE y con sección del NOS izquierdo no se modificó de manera significativa la concentración sérica de progesterona (Figura 10).

En ratas con VE+SNOD+VIP, la concentración de progesterona fue menor en comparación con el grupo de animales con VE más SNOD y SS (Figura 10).

**Figura 10.** Media  $\pm$  e.e.m de la concentración en suero de progesterona ratas tratadas a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) y sometidas a los 60 días de edad a la sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) e inmediatamente inyectadas con solución salina (SS) o péptido intestinal vasoactivo (VIP) en la bursa del ovario denervado y autopsiadas al segundo estro vaginal pos-cirugía.



★  $p < 0.05$  vs VE+SNOD+SS (Prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Turkey-Kramer).

En las hembras con Vh más sección del NOS izquierdo la estimulación con VIP no modificó la concentración de estradiol (Figura 11).

En animales con VE+SNOI+SS en la bursa del ovario denervado, la concentración de estradiol fue menor en comparación con el grupo tratado con Vh mas SNOI y SS (Figura 11).

En las ratas con VE+SNOI+VIP la concentración de estradiol fue mayor respecto al grupo VE+SNOI+SS (Figura 11).

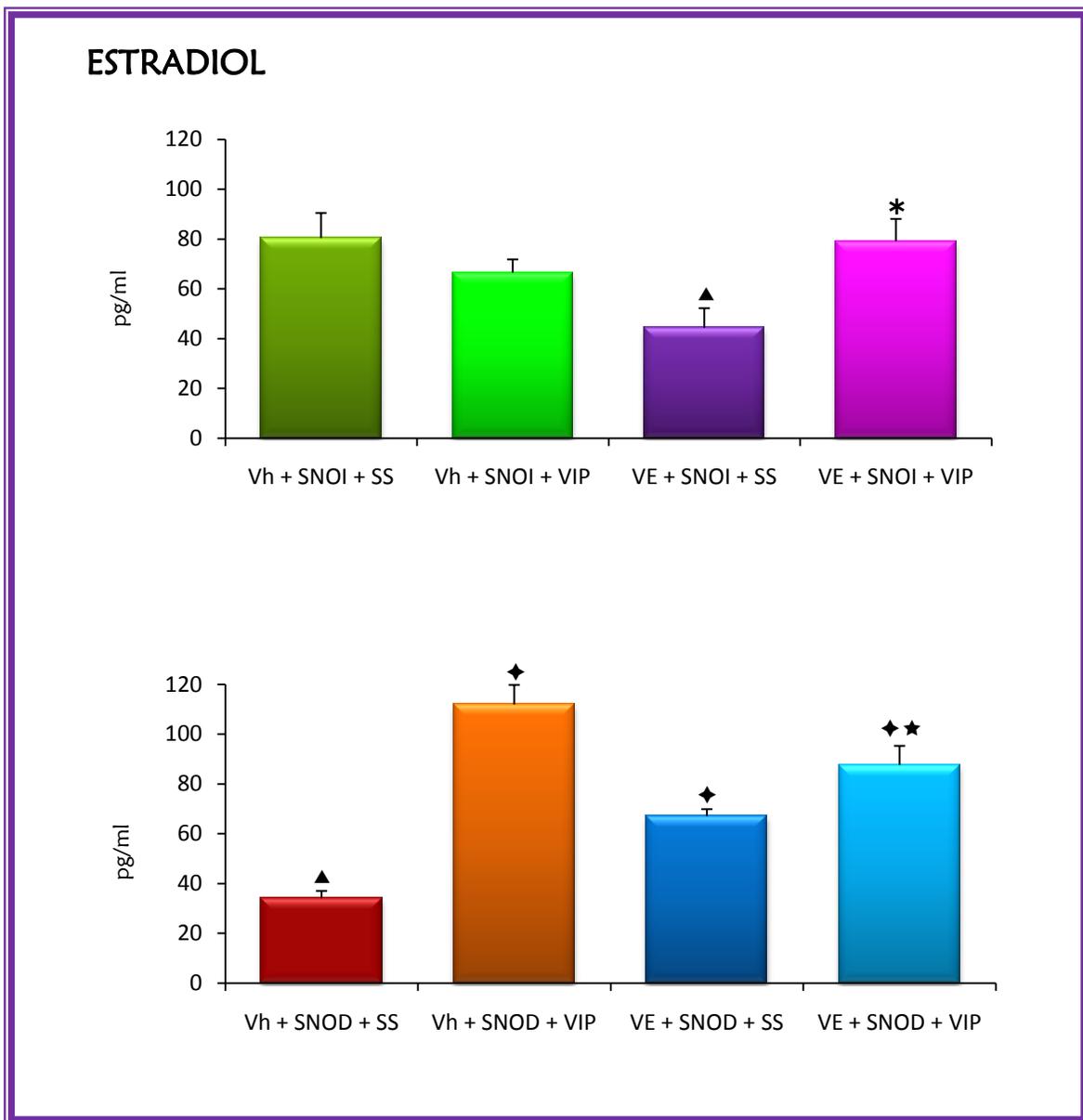
En animales con Vh+SNOD+SS en la bursa del ovario denervado, resultó en una menor concentración de estradiol en comparación con el grupo Vh+SNOI+SS (Figura 11).

En el grupo Vh+SNOD+VIP en la bursa del ovario denervado la concentración de estradiol fue mayor comparado con el grupo Vh+SNOD+SS (Figura 11).

En animales VE+SNOD+SS resultó en una mayor concentración de estradiol respecto al grupo tratado con Vh mas SNOD y SS (Figura 11).

En ratas con VE+SNOD+VIP, aumentó la concentración de estradiol cuando estas son comparadas con el grupo tratado con VE+SNOD + SS o con Vh+SNOD+SS (Figura 11).

**Figura 11.** Media  $\pm$  e.e.m de la concentración en suero de estradiol ratas tratadas a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) y sometidas a los 60 días de edad a la sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) e inmediatamente inyectadas con solución salina (SS) o péptido intestinal vasoactivo (VIP) en la bursa del ovario denervado y autopsiadas al segundo estro vaginal pos-cirugía.

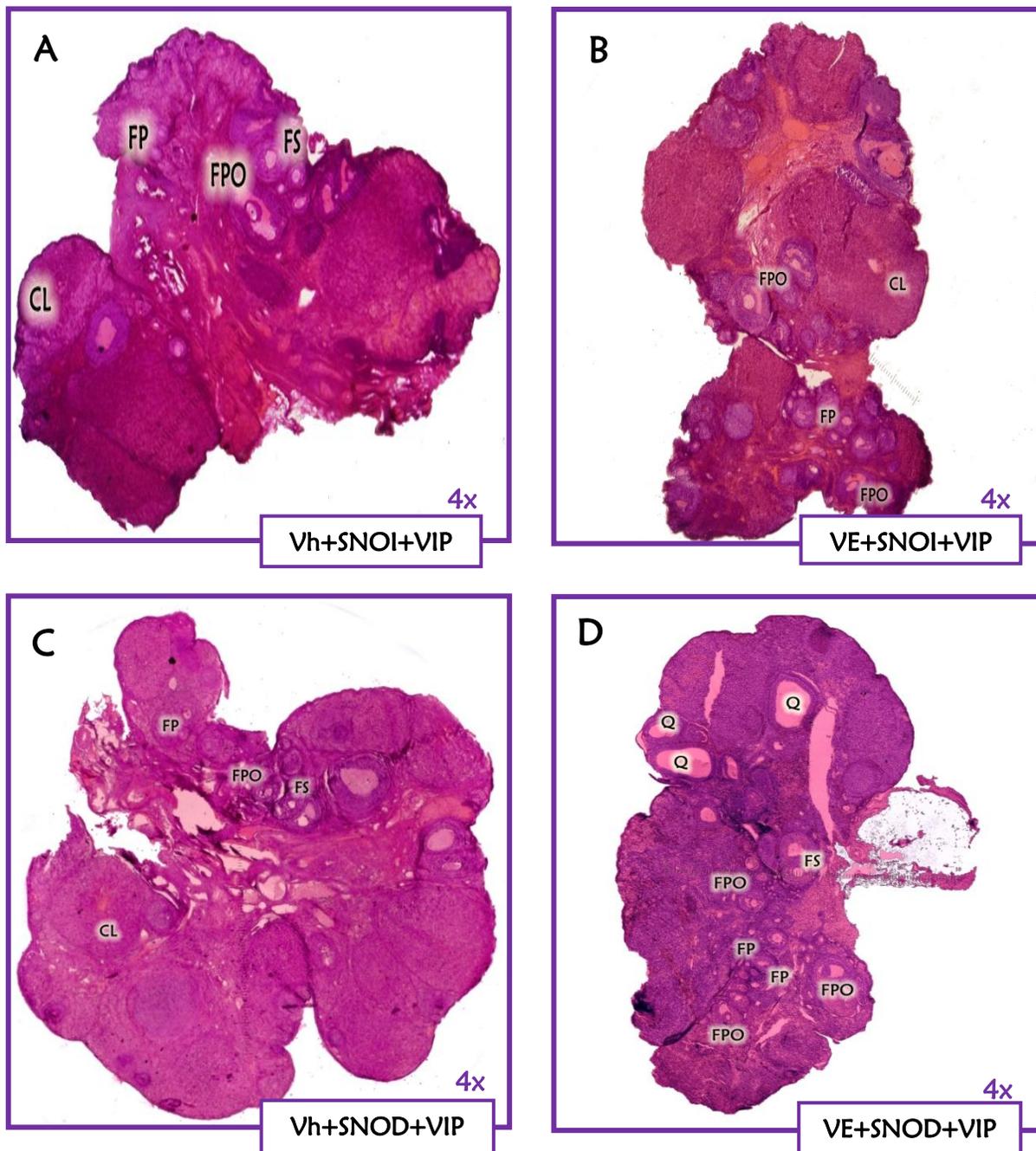


- ▲  $p < 0.05$  vs Vh+SNOI+SS (Prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Turkey-Kramer).
- \*  $p < 0.05$  vs VE+SNOI+SS (Prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Turkey-Kramer).
- ◆  $p < 0.05$  vs Vh+SNOD+SS (Prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Turkey-Kramer).
- ★  $p < 0.05$  vs VE+SNOD+SS (Prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Turkey-Kramer).

## REVISIÓN HISTOLÓGICA

En animales tratados con Vh o VE sometidos a la sección del NOS-Izquierdo y estimulados con VIP se observa la morfología de un ovario normal, con la presencia de folículos en desarrollo y de cuerpos lúteos (Fig. 12 A,B).

En los animales con VE+SNOD+VIP se observa la presencia de varios folículos en desarrollo y de un cuerpo lúteo. El corte muestra una histología semejante a la de su grupo tratado con Vh en donde carecen de quistes foliculares (Fig. 12 C,D).



**Figura 12.** Fotografía del ovario izquierdo (A, B) y derecho (C,D) de animales tratados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) y sometidos a los 60 días de edad en estro a la sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD), e inmediatamente inyectadas con péptido intestinal vasoactivo (VIP) en la bursa del ovario denervado y autopsiadas al segundo estro vaginal pos-cirugía. Folículos primarios (FP), folículos secundarios (FS) folículos preovulatorios (FPO) cuerpos lúteos (CL), quistes foliculares (Q).

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio nos permiten sugerir que en la rata adulta con SOPQ y con denervación simpática la estimulación VIPérgica se traduce en una mayor secreción de estradiol.

En ratas infantiles o adultas con SOPQ, inducido por la administración intraperitoneal de valerato de estradiol, bloquea la ovulación (Lara y col., 1993; Stener-Victorin y col., 2000; Rosa-E-Silva y col., 2003), fenómeno que se ha explicado por la disminución en la concentración de gonadotropinas (Brawer y col., 1986). Sin embargo, previamente mostramos que en la rata con SOPQ el bloqueo de la ovulación no obedece a cambios en la concentración de éstas (Morales y col., 2010). Al igual a lo ya reportado en el presente estudio se observó bloqueo de la ovulación, que podría ser atribuido al escaso desarrollo folicular y a la presencia de quistes foliculares.

Otros autores han explicado que en la rata con SOPQ, la formación de quistes foliculares y la falta de ovulación es el resultado del aumento en la actividad de las neuronas simpáticas periféricas que inervan al ovario, lo que contribuye a un incremento en el contenido de NA ovárica y disminución en el número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Lara y col., 1993). De esta manera, cuando se elimina el aporte simpático, por la sección bilateral del NOS, se observa un restablecimiento en la ovulación y la secreción de hormonas ováricas (Barria y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003).

Recientemente nuestro grupo de trabajo sugirió que el SOPQ no se debe exclusivamente a un mayor tono noradrenérgico, esto con base al hecho de que al realizar en la rata juvenil la sección unilateral del NOS, el restablecimiento de la ovulación únicamente se presenta en la gónada que mantiene intacta su inervación, aún cuando la concentración de NA ovárica es alta (Morales y col., 2010). Estos resultados difieren a los reportados en el presente estudio, donde se observa que la respuesta ovulatoria es semejante entre el ovario intacto y el denervado. Esta discrepancia en nuestros resultados puede ser explicado por dos posibilidades: 1) en el presente estudio se realizó la denervación en la rata adulta, mientras que en el reporte anterior se realizó en la etapa juvenil. 2) el tiempo transcurrido entre la denervación y la autopsia, donde en el primer trabajo transcurrieron aproximadamente 65 días y, en el presente estudio transcurrieron alrededor de 8 días.

El útero tiene receptores a estrógenos y experimenta cambios fisiológicos en respuesta a las variaciones en la concentración de hormonas sexuales (Zoubina y col., 1998). Spratto y Miller en 1968 mostraron que en la rata adulta la administración de diferentes estrógenos trae como resultado el incremento en el peso del útero. Dado que el útero recibe inervación simpática, es probable que module la respuesta del órgano a los esteroides. Esto explicaría el porqué en la rata con SOPQ y sección del NOS-derecho disminuye el peso del útero, acompañado de una caída en la concentración de estradiol, que no ocurre con la sección del NOS-izquierdo (Linares., 2006). El hecho de que este evento no se produzca cuando el nervio que se secciona es el izquierdo, hace pensar que el aporte neural al útero por cada nervio es diferente. En el presente estudio,

observamos que en respuesta a la sección del NOS-derecho se incrementa la concentración de estradiol y se acompaña de un mayor peso del útero. Como se puede apreciar, al igual que en el estudio anterior, el NOS modula la respuesta del útero a los estrógenos, pero es probable que la modulación que ejerce el NOS-izquierdo y derecho varíe en función de la edad en la que se realiza la denervación.

Se ha descrito que en el ganglio celiaco se originan fibras de naturaleza simpática que son proyectadas hacia los ovarios así como, fibras de origen vagal que alcanzan las adrenales (Berthoud y Powley., 1993; Dissen y Ojeda., 1999), de esta manera, el ganglio celiaco actúa como un centro de comunicación entre el ovario y las adrenales enviando inervación simpática hacia ambas glándulas. En el año 2008 el grupo de Tóth mostró que al inyectar tanto la glándula adrenal izquierda como el ovario izquierdo, con dos trazadores virales retrógrados, se observa un doble marcaje en varias estructuras del cerebro. Con estos resultados, los autores sugieren que existe comunicación neural entre los ovarios y las adrenales. Dado que nosotros observamos que al seccionar el NOS derecho en ratas con SOPQ el peso de las adrenales aumenta, apoyamos la idea de que existe una comunicación entre estas dos glándulas, que podría estar mediada por el ganglio celiaco.

En el animal con SOPQ la sección del NOS en la edad adulta incrementó la concentración de estradiol, de una manera más evidente que la observada en la rata sin la patología. Estos resultados nos llevan a sugerir que el papel

inhibitorio que ejerce el NOS en la secreción de estradiol, se ve amplificado por la patología del SOPQ.

En ratas con SOPQ la sección derecha o izquierda del NOS resulta en una menor concentración de progesterona, lo que nos lleva a pensar que la información que llega al ovario por el NOS regula de manera estimulante la secreción de progesterona. Weiss y colaboradores (1982) mostraron que ante la estimulación eléctrica del NOS incrementa la concentración sérica de progesterona y, señalan que la secreción de la hormona puede ser regulada de manera estimulante mediante la activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos o inhibitoria por medio de la estimulación de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos.

En la rata adulta, sin ninguna patología, la sección bilateral del NOS disminuye la concentración de estradiol, lo que llevó a sugerir que el NOS modula de manera estimulante la secreción de estradiol (Aguado y Ojeda., 1984). Sin embargo, recientemente mostramos que el papel del NOS en la secreción de estradiol es asimétrico, ya que con la sección del NOS-izquierdo disminuye la concentración de la hormona y, no se modifica por la sección del nervio derecho (Ramírez., 2011). En el presente estudio se observó que ambos nervios regulan de manera inhibitoria la secreción de estradiol, hechos que nos hacen sugerir que el papel de la inervación va a depender además del tiempo transcurrido entre la cirugía y la autopsia.

Se ha sugerido que VIP estimula la maduración del ovocito *in vitro* (Törnell y col., 1988) e induce la actividad de las aromatasas antes de que se produzca la foliculogénesis y la adquisición de respuesta a la FSH en el ovario

(George y Ojeda, 1987). En ovarios de ratas neonatas de dos días de edad, el VIP y la NA contribuyen en la diferenciación bioquímica de los folículos primordiales, al inducir la formación de receptores a FSH biológicamente activos, que son capaces de activar la producción de AMPc ante un estímulo con FSH (Mayerhofer y col., 1997). En el presente estudio, observamos que en la rata sin ninguna patología, con sección del NOS-derecho, el ovario izquierdo tiene una mayor respuesta a la estimulación con VIP. Estos resultados nos permiten sugerir que los ovarios responden de manera diferente ante un mismo estímulo, en apoyo a esta idea se sabe que la inervación que recibe cada gónada es diferente. El grupo de Tóth en 2007 mostró por medio de marcadores retrógrados que existe una vía de comunicación multisináptica entre el ovario y el cerebro, la que es más abundante hacia el ovario izquierdo. También se ha demostrado que en ratas hipofisectomizadas de 28 días de edad la lesión en el lado izquierdo, derecho o de ambos lados del área preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA) la concentración de VIP se incrementa más en el ovario izquierdo que por el derecho. Si bien, los autores plantean que es difícil concluir cual es el mecanismo que conlleva al incremento en el péptido, sugieren que es resultado de la activación de las vías eferentes que conectan al cerebro con la gónada izquierda (Advis y col., 1989). Tomando en cuenta estas evidencias sugerimos que el ovario izquierdo tiene una mayor sensibilidad al efecto del VIP en donde estaría promoviendo el desarrollo folicular.

En estudios *in vitro*, se ha observado que la NA y el VIP ejercen un efecto inhibitorio en la secreción de progesterona en ovarios provenientes de ratas en diestro 1, efecto que se ve amplificado si al medio se adicionan ambos

neurotransmisores. El papel de la NA y del VIP se invierte si los ovarios provienen de ratas en diestro 2 (Garraza y col., 2004). El VIP induce mayor actividad de las enzimas P450<sub>scc</sub> y 17 $\alpha$ -OH en cultivos de células de la granulosa de gallina promoviendo una mayor síntesis de progesterona (Johnson y col., 1994) y a su vez aumenta la actividad de las aromatasas, responsables de una mayor producción de estradiol (Malamed y col., 1992).

Tanto NA como VIP son aportados principalmente por el NOS y, con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, sugerimos que el tipo de información que llega a cada ovario por esta vía neural es diferente, dado que cuando se elimina la NA aportada por el NOS-derecho y se estimula con VIP la concentración de progesterona se incrementa, este efecto estimulador del VIP no se observa si quitamos el NOS-izquierdo. Estos resultados podrían ser explicados por el hecho de que a nivel del ganglio celíaco se originan un número mayor de fibras que se dirigen al ovario derecho que las que van a la gónada izquierda (Klein y Burden., 1988).

En estudios *in vitro* se ha mostrado que VIP participa en los procesos que conllevan a la ruptura del folículo y por ende a la expulsión del ovocito. Los ovarios provenientes de ratas prepúberes estimulados con LH son capaces de ovular, respuesta que se mantiene si además de la LH se adiciona VIP. La sola adición de VIP induce la liberación de un menor número de ovocitos, respuesta que además depende de la dosis empleada. Cuando la estimulación se realiza con la máxima concentración ( $10^{-6}$ M) de VIP, todos los ovarios ovulan, si la concentración del péptido es menor, se reduce en un 50% el número de

ovarios que ovuló, siendo aún más bajo el número de ovocitos (Schmidt y col., 1990). Esta respuesta fue similar a la observada en nuestro modelo de la rata con SOPQ, donde incrementa la tasa ovulatoria en el ovario privado de la información proveniente del NOS y estimulado con VIP aunque la cuota ovulatoria sigue siendo baja.

El tratamiento con VE resulta en la disminución de la masa ovárica, lo que es explicado por la disminución en el número de cuerpos lúteos, acompañado por una menor área que debía ser ocupada por estas estructuras (Rosa-E-Silva y col., 2003). Otros han sugerido que el menor peso resulta por la caída en la concentración de gonadotropinas (Lara y col., 1993). La histología ovárica se restablece después de la sección bilateral del NOS (Rosa-E-Silva y col., 2003). En el presente trabajo se observó que cuando se realiza la sección del NOS izquierdo a hembras con SOPQ y se estimulan con VIP en la bursa del ovario denervado, disminuye el peso del ovario estimulado. Dado que en estos animales no hubo cambios en la respuesta ovulatoria, podríamos descartar que la disminución se deba a un menor número de cuerpos lúteos, por lo que apoyaríamos la idea del grupo de Lara (1993) de que se produce en respuesta a una menor secreción de gonadotropinas, hecho que se necesita corroborar en nuestros animales.

Como ya ha sido mencionado en diestro 1, VIP ejerce un efecto estimulante en la secreción de progesterona (Johnson y col., 1994; Garraza y col., 2004). En la rata con SOPQ la sección unilateral del NOS, seguida de la estimulación con VIP en el ovario denervado y sacrificadas 24 horas después de

la cirugía, la concentración de progesterona disminuye (Rosas., 2011). En el presente estudio se observa que se mantiene la disminución en la concentración de la hormona, después de haber transcurrido aproximadamente 8 días de la estimulación VIPérgica. Donde además vimos que cuando el ovario denervado y estimulado es el derecho, la disminución es aún más marcada. Estos resultados nos permiten sugerir que en el animal con SOPQ, no se produce el efecto estimulante del VIP en la secreción de progesterona.

En animales con SOPQ la denervación unilateral o bilateral del NOS induce disminución en la concentración de estradiol (Rosa-E-Silva, 2003; Morales y col., 2010). Efecto contrario se observa al eliminar la información simpática que llega al ovario por medio de la denervación catecolaminérgica con GTD, dejando intactas las fibras que transportan VIP (Ruíz., 2009). El VIP estimula la actividad enzimática del ovario lo que permite una mayor síntesis de estradiol en el ovario (Ahmed y col, 1986). El grupo de Parra (2007) mostró que los ovarios de animales con SOPQ cultivados en presencia de VIP, la concentración ovárica de estradiol se incrementa en un 466%, por lo que se postula que VIP es el responsable del incremento de estradiol y de andrógenos. En el presente estudio, en animales con SOPQ y sometidos en la etapa adulta a la denervación del NOS más la estimulación in vivo con VIP, las concentraciones de estradiol son mayores que en aquellos animales que no fueron estimulados con el péptido. Este aumento podría ser explicado por el papel estimulador que juega VIP en la esteroidogénesis ovárica, en donde en estudios recientes se ha mostrado que VIP tiene dos receptores específicos en el ovario del tipo VIPAC-1 y VIPAC-2, y junto con estos receptores incrementa de

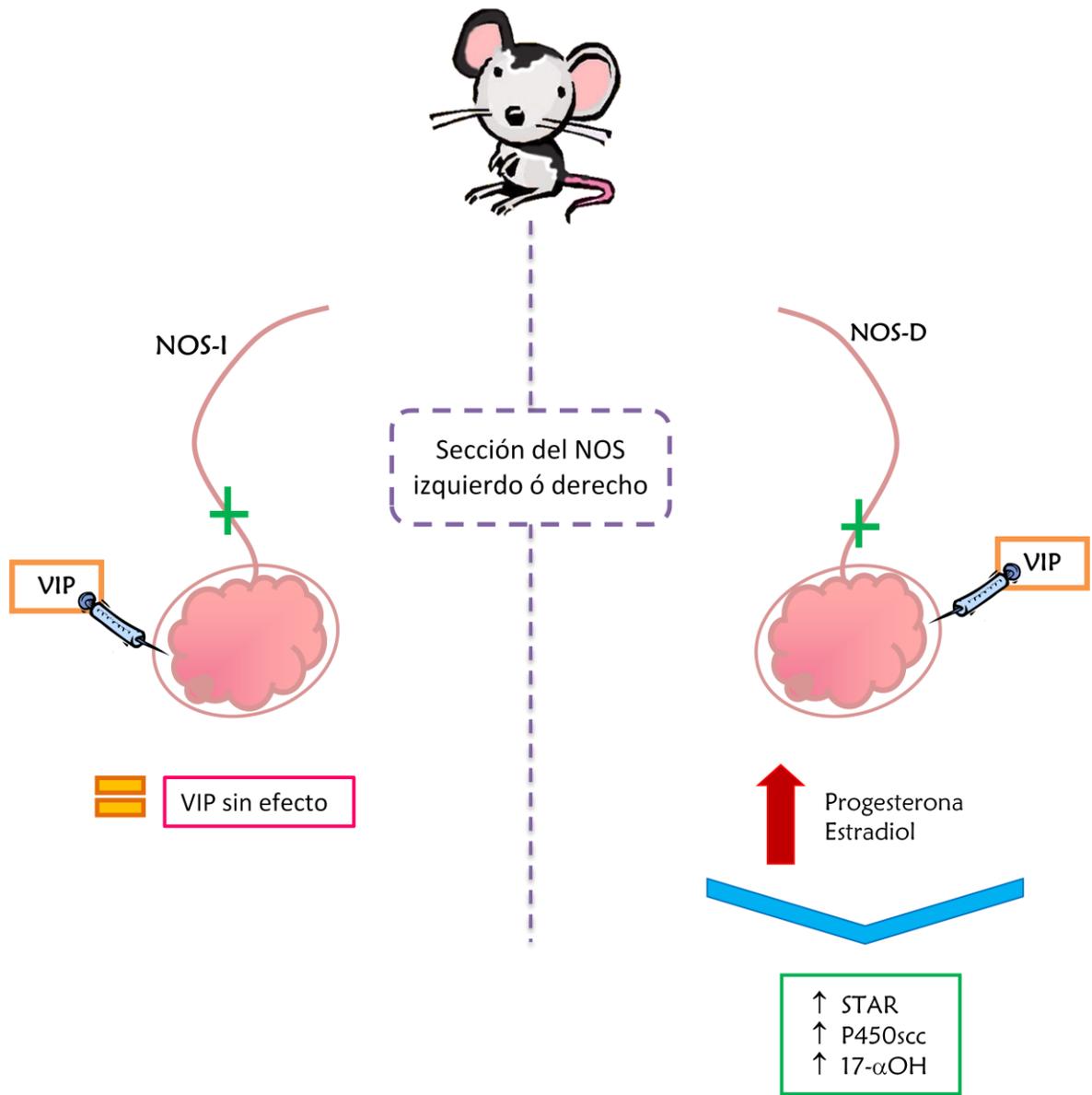
forma dosis-dependiente el contenido intracelular de AMPc (Kowalewski y col., 2010) y la actividad de las aromatasas (George y Ojeda., 1987; Mayerhofer y col., 1997), responsables de una mayor producción de estradiol. Así podríamos decir que, la baja concentración de progesterona que observamos es el resultado del metabolismo de ésta hasta estradiol.

Los resultados observados en el presente estudio muestran que en el animal con SOPQ el NOS en la rata adulta modula de manera estimulante la secreción de progesterona e inhibitoria la de estradiol. En este modelo experimental el NOS modula de manera inhibitoria la tasa ovulatoria. En la rata con SOPQ y sección unilateral del NOS, el VIP estimula la secreción de estradiol.

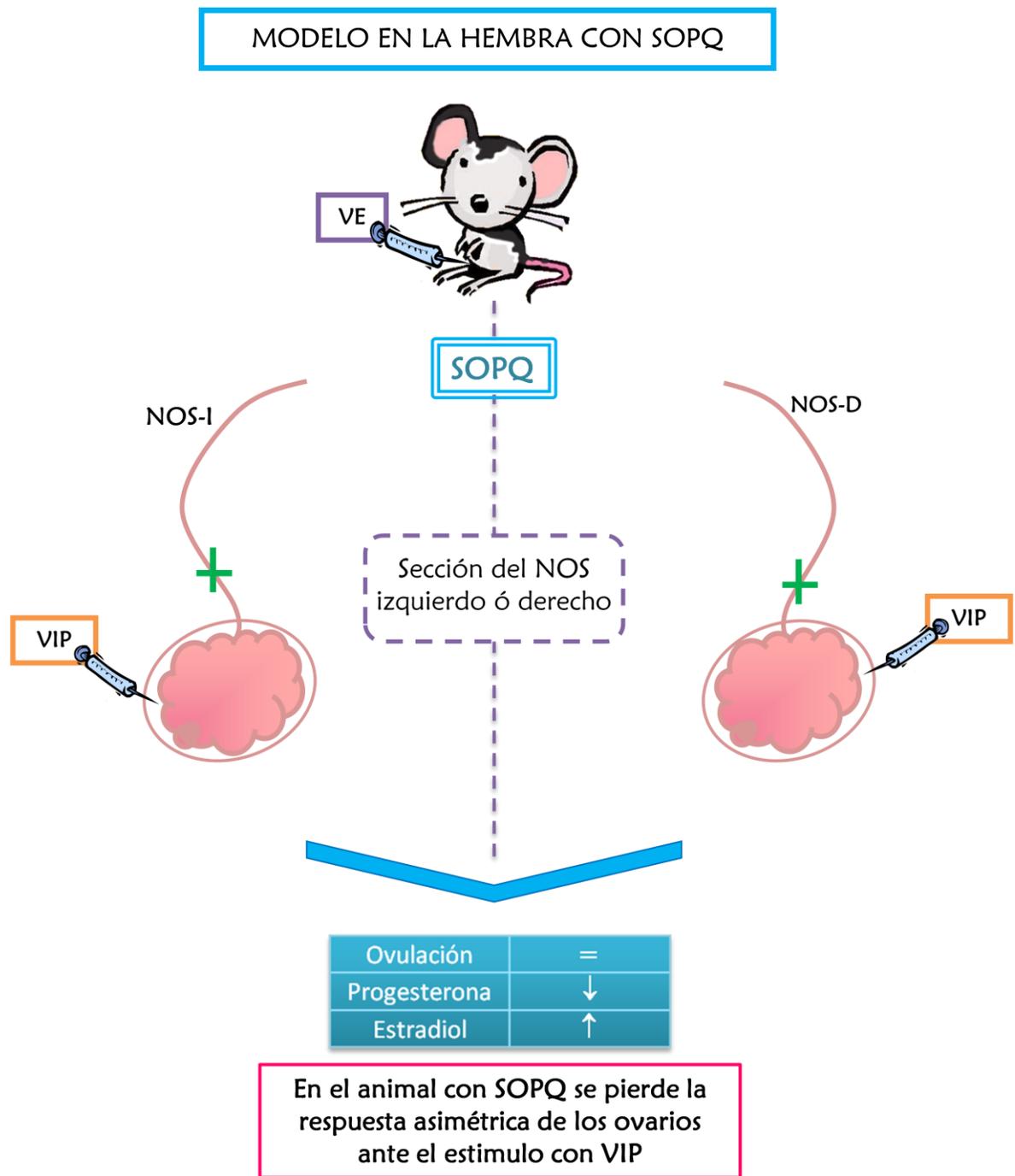
## CONCLUSIONES

- ☞ En el animal con SOPQ al que se le realiza en la etapa adulta la denervación unilateral del NOS, restablece la respuesta ovulatoria por ambas gónadas.
- ☞ En el animal con SOPQ el NOS modula de manera estimulante la secreción de progesterona y de forma inhibitoria la de estradiol.
- ☞ En la rata con sección unilateral del NOS, el VIP promueve la ovulación en la rata adulta en donde el ovario izquierdo tiene una mayor sensibilidad al efecto estimulante del péptido.
- ☞ El efecto estimulante que ejerce VIP sobre la ovulación es menor en el animal con SOPQ
- ☞ VIP estimula en el ovario la liberación de progesterona, que es mucho más evidente cuando el ovario estimulado es el derecho. Este efecto se inhibe en el animal con SOPQ
- ☞ en el animal con SOPQ y sección unilateral del NOS, el VIP tiene un efecto estimulante en la activación de las aromatasas que participan en la síntesis de estradiol.

MODELO EN LA HEMBRA SIN PATOLOGÍA



**Figura 13.** Modelo de los efectos del estímulo con VIP del ovario denervado de animales sin patología, sobre la ovulación y la síntesis de hormonas esteroides. Los efectos que se observan son al comparar con su respectivo grupo denervado y estimulado con solución salina. **NOS-I**; nervio ovárico superior izquierdo; **NOS-D**: nervio ovárico superior derecho; **VIP**; péptido intestinal vasoactivo.



**Figura 14.** Modelo de los efectos del estímulo con VIP del ovario denervado de animales con patología, sobre la ovulación y la síntesis de hormonas esteroides. Los efectos que se observan son al comparar con su respectivo grupo denervado y estimulado con solución salina. **VE:** valerato de estradiol; **SOPQ:** síndrome de ovario poliquístico; **NOS-I:** nervio ovárico superior izquierdo; **NOS-D:** nervio ovárico superior derecho; **VIP:** péptido intestinal

En el modelo podemos observar que en animales sin patología, al realizar la sección unilateral del NOS derecho VIP estimula la secreción de progesterona y estradiol (Figura.13), esta respuesta asimétrica ya no se observa en el animal con SOPQ, en donde VIP no modifica la ovulación y modula de manera inhibitoria la secreción de progesterona y de manera estimulante la de estradiol (Figura.14).

Es posible que en nuestro modelo, VIP estimule la esteroidogénesis ovárica al incrementar por medio de sus dos receptores (VCAP<sub>1</sub> y VCAP<sub>2</sub>) la actividad de STAR, P450<sub>scc</sub>, 17- $\alpha$ OH y las aromatasas lo que conllevan a un rápido metabolismo de progesterona hasta estradiol.

## 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 SR. (1984)** “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(4): 1682-1689.
- ★ **Baker TG. (1982)** “Oogenesis y ovulación” En: Austin CR, Short RV. (1982) “Células germinales y fertilización”. Ediciones Científicas la Prensa Médica Mexicana, S.A. Cap.2. pp. 29-47.
- ★ **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(6): 2696-2703.
- ★ **Baynes JW, Dominiczak MH. (2006)** “Bioquímica médica” 2da ed. Elsevier. España. Pp. 213-224.
- ★ **Becú-Villalobos D, Lacau-Mengido M. (1990)** “Control hormonal del desarrollo puberal en la rata hembra”. *Acta Physiology Pharmacology Latinoamerican*. 40: 1-17.
- ★ **Bergman RA, Afifi AK, Heider PM. (1998)** “Sistema reproductor femenino”. En: *Histología*. Editorial McGraw-Hill interamericana. pp. 307-320
- ★ **Berne RM, Levy MN, Harcourt B. (1999)** “Fisiología” 2a edición. Editorial Elsevier Science. España. pp. 697-701.

- ★ **Berthoud HR, Powley TL. (1993)** “Characterization of vagal innervation to the rat celiac, suprarenal and mesenteric ganglia”. *J Auton Nerv Syst.* 42: 153-170.
- ★ **Billig H, Furuta I, Hsueh AJ. (1993)** “Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis”. *Endocrinology.* 133: 2204-2212.
- ★ **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
- ★ **Brawer J.R, Munoz M, Farookhi R. (1986)** “Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat”. *Biol. Reprod.* 35: 647-655
- ★ **Brown TR. (1999)** “Steroid Hormones. Overview” En: *Encyclopedia of Reproduction, Vol 4.* Academic Press. pp. 634-344.
- ★ **Builes C A, Díaz I, Castañeda J. (2006)** “Caracterización clínica y bioquímica de la mujer con síndrome de ovario poliquístico”. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología.* 57(1): 36-44.
- ★ **Burden HW. (1978)** “Ovarian innervations” En: Jones RE (ed) *The vertebrate ovary: comparative biology and evolution.* Plenum Press New York. pp. 615-638.
- ★ **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.
- ★ **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.

- ★ **Dess WL, Amhed CE, Ojeda SR. (1986)** “Sustance P- and vasoactive intestinal peptide-containing fibers reach the ovary by independent routes”. *Endocrinology*. 119(2): 638-641.
- ★ **Dissen G, Ojeda SR. (1999)** “Ovarian innervation” En: Knobil E, Neil J (Eds.) *Encyclopedia of reproduction*. Academic Press. USA. 3: 583-589.
- ★ **Domínguez R, Chávez R, Cruz ME. (1991)** “La regulación del crecimiento y del desarrollo de un folículo ovárico”. En: *Tópicos selectos de biología de la reproducción*. UNAM. Coordinación de la investigación científica. Programa Universitario de Investigación en Salud. pp.163-188.
- ★ **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.
- ★ **Garraza ML, Aguado LI, Bortoll MA. (2004)** “In vitro effect of neuropeptides on ovary or celiac ganglion affects the release of progesterone from ovaries in the rat”. *Med Sci Monit*. 10(12):BR440-446.
- ★ **Gerendai I, Halász B. (1978)** “Neural participation in ovarian control”. *Trends in Neurosciences*. 1(1): 87-88.
- ★ **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.
- ★ **Greenwald GS, Roy SK. (1994)** “Follicular development and its control”. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) *The physiology of reproduction*. 2<sup>nd</sup> edition. Editorial Raven Press. New York. Vol.2. Cap.12. pp. 629-724.
- ★ **Greiner GM. (2006)** "Sistema nervioso ovárico intrínseco y su activación durante la condición de ovario poliquístico". Tesis de doctorado. Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

- ★ **Gozes I, Tsafiriri A. (1986)** “Detection of vasoactive intestinal peptide-encoding messenger ribonucleic acid in the rat ovaries”. *Endocrinology*. 119(6): 2606-2610.
- ★ **Hemmings R, Farookhi R, Brawer JR. (1983)** “Pituitary and ovarian responses to luteinizing hormone releasing hormone in the rat with polycystic ovaries”. *Biol Reprod* 29: 239-248.
- ★ **Hirshfield AN. (1991)** “Development of follicles in the mammalian ovary”. *Int. Rev. Cytol.* 124: 43-101.
- ★ **Hoar WS, (1978)**, “Fisiología general y comparada”. Ediciones Omega, S. A. Barcelona, pp. 765.
- ★ **Johnson AL, Jean ZLI, Malamed S. (1994)** “Vasoactive intestinal peptide induced expression of cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage and 17 $\alpha$ -hidroxilase enzyme activity in hen granulosa cells”. *Biology of Reproduction*. 51: 327-333.
- ★ **Jubiz W. (1988)** “Endocrinología clínica” 2<sup>da</sup>. edición. Editorial El Manual Moderno. S.A de C.V. pp. 479.
- ★ **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.
- ★ **Kowalewski MP, Dyson MT, Boss A, Stocco DM. (2010)** “Vasoactive intestinal peptide (VIP)-mediated expression and function of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in granulosa cells”. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 328: 93-103.
- ★ **Klein CM, Burden HW. (1988)** “Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neuroscience Letters*. 85: 217-222.
- ★ **Kruk ZL, Pycock CJ. (1991)** “Neurotransmitters and drugs” 3<sup>ra</sup> edición. Chapman and Hall. pp. 191-192.
- ★ **Langman J, Sadler T W. (2001)** “Embriología médica con orientación clínica” 8<sup>va</sup> edición. Editorial Médica Panamericana. pp. 33.
- ★ **Lara HE, Ferruz JI, Lusa S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR. (1993)** “Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome”. *Endocrinology*. 133: 2690-2695.

- ★ 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*. 133: 2690-2695.
- ★ Lara HE, Dorfman M, Venegas M, Luza SM, Luna SL, Mayerhofer A, Guimaraes MA, Rosa-E-Silva AAM, Ramírez VD. (2002). “Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: studies on norepinephrine release”. *Microscopy Research and Technique*, 59: 495-502.
- ★ Lawrence IE, Burden HW. (1980) “The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary”. *Anatomical Record*, 196: 51-59.
- ★ Li YY, Li JC. (2003) “Ultrastructure and three-dimensional study of the lymphatic stomata in the costal pleura of the rabbit”. *Microsc Res Tech*. 62: 240-246.
- ★ 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.
- ★ Li JC, Yu SM. (1991) “Study on the ultrastructure of the peritoneal stomata in humans”. *Acta Anat*. 141: 26-30.
- ★ Linares CR. (2006) “Participación del nervio ovárico superior en el desarrollo del síndrome de ovario poliquístico. La rata como modelo de estudio”. Tesis de licenciatura. UNAM. FEZ Zaragoza.
- ★ Malamed S, Gibney JA, Ojeda SR. (1992). “Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat”. *Cell and Tissue Research*. 270: 87-93.
- ★ 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-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.
- ★ **Ojeda SR, Andrew WW, Advis JP, Smith-White S. (1980)** “Recent advances in the endocrinology of puberty”. *Endocrine Reviews*. 1: 228-257.
- ★ **Ojeda SR, Urbanski HF. (1988)** “Puberty in the rat” En: Knobil E, Neill J.M. (Eds.) *Encyclopedia of reproduction*. Academic Press. San Diego. Vol.2. pp. 373-375.
- ★ **Ojeda SR, Urbanski HF. (1994).** “Puberty in the rat”. En: Knobil E, Neil J.M. (Eds.) *The physiology of reproduction*, 2ª edición. Raven Press. New York. Vol.2. pp. 363-38.
- ★ **Ojeda SR, Hill DF, Costa ME, Tapia V, Cornea A, Ma YJ. (1999)** “The Oct-2 POU-domain gene in the neuroendocrine brain: A transcriptional regulator of mammalian puberty ”. *Endocrinology*. 140:3774-3789
- ★ **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”. *Society of reproduction and fertility*. 133: 147-154.
- ★ **Pocock G, Richards CD. (2005)** “Fisiología humana. La base de la medicina” 2ª edición. Masson, S.A. pp. 488-491.
- ★ **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.
- ★ **Rajah R, Glaser EM, Hirshfield AN. (1992)** “The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis”. *Dev Dyn*. 194: 177-192.
- ★ **Remington JP, Beringer P. (2006)** “The science and practice of pharmacy” 21ª edición Ed. Médica Panamericana.

- ★ **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.
- ★ **Rosa-E-Silva A, Guimaraes MA, Padmanabhan V, Lara HE. (2003)** “Prepuberal administration of valerate disrupts cyclicity and leads to cystic ovarian morphology during adult life in the rat: Role of sympathetic innervation” *Endocrinology.* 144:4289-429.
- ★ **Rosales AM. (1998)** “Atresia folicular”. En: *Biología de la reproducción.* Universidad Autónoma Metropolitana. pp.223-226.
- ★ **Rosas GG. (2006)** “Efecto de la inducción del síndrome del ovario poliquístico en la rata infantil, sobre la dinámica del crecimiento folicular y la secreción de hormonas esteroideas”. Tesis de licenciatura. UNAM, FES Zaragoza.
- ★ **Rosas GG. (2011)** “Participación del péptido intestinal vasoactivo en la regulación de la ovulación y la secreción hormonal. La rata con síndrome de ovario poliquístico como modelo de estudio”. Tesis de maestría. UNAM, FES Zaragoza.
- ★ **Ruíz KV. (2009)** "Efecto de la denervación catecolaminérgica del ovario, realizada desde la etapa infantil, sobre el desarrollo del síndrome de ovario poliquístico en la rata". Tesis de licenciatura. UNAM. FEZ Zaragoza.
- ★ **Sadler RM. (1982)** “Ciclos y temporadas” En: Austin CR, Short RV. (1982) “Células germinales y fertilización”. Ediciones Científicas la Prensa Médica Mexicana, S.A. Cap.4. pp. 89-98.
- ★ **Salas M, Torrero C, Pulido S, Pérez H. (1991)** “Acciones neurotrópicas de las hormonas tiroideas durante la ontogenia neural”. En: *Ontogenia neural. Aspectos comparativos y mecanismos de regulación.* pp.177-198.
- ★ **Sánchez-Criado JE. (1999)** “Fisiología del ovario”. En: Tresguerres J.A. (Ed.) *Fisiología humana* 2<sup>da</sup> edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid. Cap. 75. pp. 1020-1032.
- ★ **Schulster A, Farookhi R, Brawer JR. (1984)** “Polycystic ovarian condition in valerate-treated rats: spontaneous changes in characteristics endocrine features” *Biology of Reproduction.* 31: 587-593.

- ★ 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.
- ★ Shinohara H, Nakatani T, Matsuda T. (1987) “Postnatal development of the ovarian bursa of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*): its complete closure and morphogenesis of lymphatic stomata”. *The American Journal of Anatomy.* 179(4): 385-402.
- ★ 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.
- ★ Spratto GR, Miller JW. (1968) “The effect of various estrogens on the weight, catecholamine content and rate of contractions of rat uteri” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 161(1): 1-6.
- ★ Stener-Victorin E, Lundeberg T, Waldenström U, Manni L, Aloe L, Gunnarsson S, Janson PO. (2000) “Effects of electro-acupuntura on nerve growth factor and ovarian morphology in rats with experimentally induced polycystic ovaries” *Biology of Reproduction.* 63: 1497-1503.
- ★ 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 IE, Wiesel O, Boldogkői, Bálint K, Tapaszi Z, Gerendai I. (2007) “Predominance of supraespal innervation of the left ovary”. *Microscopy Research and Technique.* 70: 710-718.
- ★ Tóth IE, Banczerwski P, Boldogkői Z, Tóth JS, Szaabó A, Halász B, Gerendai I. (2008) “Cerebral neurons involved in the innervation of both the adrenal gland and the ovary: A double viral tracing study”. *Elsevier.* 77: 306-311.
- ★ Tresguerres JA, Aguilar BL, Cachofeiro MV, Cardinalli D, Gil LP, Lahera JV, Mora TF, Rodriguez RR, Romano PM, Tamargo MJ, Zarco GP. (1999) “Fisiología humana” 2<sup>da</sup> edición. Editorial Mc-Graw Hill. España.

- ★ **Tresguerres J.A. (2003).** “Fisiología humana”. Ed. McGraw-Hill Interamericana. 2<sup>da</sup> edición. pp: 1036-1048.
- ★ **Tresguerres JA. (2005)** “Fisiología humana” 3<sup>ra</sup> edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México, Cap.79. pp. 1008-1022
- ★ **Trzeciak WH, Ahmed CE, Simpson ER, Ojeda SR. (1986)** “Vasoactive intestinal peptide induces the synthesis of the cholesterol side-chain cleavage enzyme complex in cultures rat ovarian granulose cells” *Medical sciences.* 83: 7490-7494.
- ★ **Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS. (2004)** “The pathophysiology of polycystic ovary syndrome”. *Clinical endocrinology.* 60: 1-17.
- ★ **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.
- ★ **Van Voorhis BJ. (1999)** “Follicular steroidogenesis”. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) *Encyclopedia of reproduction.* Academic Press. San Diego. Vol.2. pp. 389-395.
- ★ **Weiss GK, Dail WG, Ratner A. (1982)** “Evidence for direct neural control of ovarian steroidogenesis in rats”. *J. Reprod. Fertil.* 65: 507-511.
- ★ **Yeh J, Adashi EY. (2001)** “El ciclo ovárico”. En: *Endocrinología de la reproducción, fisiología, fisiopatología y manejo clínico.* 4<sup>ta</sup> edición. Editorial medica panamericana. pp: 164-202.
- ★ **Yen SE. (2001)** “Endocrinología de la reproducción. fisiología, fisiopatología y manejo clínico” 4<sup>ta</sup> edición. Editorial médica panamericana. pp. 164-191.
- ★ **Yoshinaga K. (1999)** “Estrogen secretion, Regulation of.” En: *Encyclopedia of reproduction.* Knobil E y Neill JD (Eds.). Vol. 2. Academic press. USA. Pp.108-118.
- ★ **Zoubina EV, Fan Q, Smith PG. (1998)** “Variations in uterine innervation during the estrous cycle in rat”. *The journal of comparative neurology.* 397: 561-571.