



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE VALERATO DE
ESTRADIOL A RATAS INFANTILES CON SECCION DEL
NERVIO OVARICO SUPERIOR.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

BRIBIESCA CRUZ IÒSIF IVÀN

DIRECTORA DE LA TESIS: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA

MÉXICO, D. F.

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

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE VALERATO DE
ESTRADIOL A RATAS INFANTILES CON SECCION DEL
NERVIO OVARICO SUPERIOR.**

Tesis presentada por:

Bribiesca Cruz Iósif Iván

Directora de Tesis:

Dra. Leticia Morales Ledesma

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

Agradezco a cada uno de los miembros del jurado:

Biólogo Carlos Martínez Montoya

Dra. Leticia Morales Ledesma

M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dra. Juana Monroy Moreno

Por el tiempo brindado en la revisión de la tesis, a si como por sus comentarios y sugerencias.

A mi asesora: Dra. Leticia Morales Ledesma.

Gracias por ayudarme en la elaboración del presente estudio, por su apoyo, comprensión e infinita paciencia.

A mis compañeros de laboratorio:

Gracias a las maestras Ely, Rosa, Gaby y Deyra por hacer honor a su grado y brindarme su tiempo, apoyo e instrucción, gracias por resolver tantas dudas y cuestionamientos, siempre con un grato trato y amable sonrisa. Gracias Azucena y Juan por su apoyo en la realización de esta tesis.

A la Dra. Adriana, al Dr. Román y a todo el personal del bioterio de la FES Zaragoza, por el cuidado a los animales utilizados en este estudio.

Al Biólogo Roberto Chavira por su colaboración en la medición hormonal del presente estudio.

DEDICATORIAS

A mi esposa y a mi hija: Lucia Yazmin Torres Chavero y Kaira Yamile Bribiesca Torres

Amor, te agradezco el brindarme todo tu apoyo y paciencia por mejorar en muchos aspectos mi vida y por el hermoso regalo que me has brindado “el ser padre”, tu y mi hija son la fuerza que hacen que siga adelante y jamás he tenido un propósito tan fuerte que el verlas felices “las amo”.

A mis padres: Dolores Cruz Márquez y Juan David Bribiesca Carranza.

Gracias mis queridos padres por brindarme la mejor herencia que puede recibir un hijo “educación”, ustedes junto conmigo han gozado en mis logros y sufrido en mis tropiezos y sin embargo jamás perdieron la fe en mi, soy muy afortunado por contar con su apoyo, consejo e infinito amor y ahora que concluyo con una etapa más de mi vida y emprendo otra, es un privilegio contar con ustedes “los amo”.

A mis hermanos: Bribiesca Cruz Jesús Omar y Juan David Bribiesca Cruz.

“Chuy” gracias por enseñarme que a pesar de la adversidad uno puede salir adelante por sí mismo, te admiro hermano.

“Juanito” gracias por brindarme tu alegría y esa gran gracia que te caracteriza contigo la vida es multicolor, te quiero mucho.

A la Dra. Leticia Morales Ledesma

A la Dra. Lety, por ayudarme en mi desarrollo académico, por su apoyo y comprensión “Gracias”.

A mis amigos:

Uriostegui, Israel, Mauricio, Gustavo, Samuel y Arthur, por ser mis camaradas durante la carrera, por cada uno de esos momentos chéveres y por brindarme su amistad.

Jacobo, Sixto, Noé, Brayan, Beto, Abraham, Raúl, Jefe, Dr. Saúl, Edgar y Javiersillos, por su amistad y esas “Work out” que no solo fortalecen el cuerpo si no el espíritu, gracias por todo y por enseñarme a nunca rendirme.

Ismael, a usted mi querido **Mike** hay tantas que cosas que agradecerle que solo mencionare un gran consejo, “Si tu deseas algo puedes tenerlo, pero siempre trabajando en ello y de la forma difícil por que cuando lo consigas en verdad lo disfrutaras”. Que Dios lo bendiga y que aproveche el gran ser humano que ahora se encuentra con él “descanse en paz”.

Iván, porque si buscara en el diccionario la palabra “amigo” estaría tu foto camarada, es un privilegio el conocer una persona tan emprendedora y responsable como tú, agradezco tu amistad.

Tzayaka, por tu ayuda, espontaneidad y amistad te doy las gracias, y que sigas adelante con esa gran fe que solo a ti te caracteriza.

Rocío, por tu gran alegría tan llena de vida y por todo tu apoyo brindado te deseo
至福の偉大な人生.

ÍNDICE

	Páginas
RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO	2
- Eje hipotálamo – hipófisis – gónada	2
- Organización de los núcleos y áreas del hipotálamo	3
-Ovario	7
-Compartimentos del ovario	8
-Atresia folicular	15
-Ovulación	16
-Esteroidogénesis	18
-Teoría de la doble célula, doble hormona	22
-Etapas del desarrollo postnatal en la rata	23
-Ciclo estral	26
-Síndrome de ovario poliquístico	28
-Origen de la inervación simpática y su distribución en el ovario.....	29
-Participación de la inervación simpática en el funcionamiento del ovario.....	31

-Participación de la inervación simpática en el modelo de la rata con SOPQ	32
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
HIPÓTESIS	34
OBJETIVO GENERAL	35
OBJETIVOS PARTICULARES	35
MATERIAL Y MÉTODO	36
RESULTADOS	40
-Experimento 1. Efectos de la sección del nervio ovárico superior sobre el inicio de la pubertad y las funciones ováricas	40
-Experimento 2. Efectos del valerato de estradiol en animales con operación simulada sobre el inicio de la pubertad y las funciones ováricas.....	47
-Experimento 3. Efectos del valerato de estradiol, sobre el inicio de la pubertad y las funciones ováricas	54
-Histología del ovario.....	61
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	65
MODELO	71
CONCLUSIONES.....	73
REFERENCIAS	74

RESUMEN

El síndrome de ovario poliquístico (SOPQ) es considerado por algunos autores como la principal causa de infertilidad a nivel mundial, para poder descifrar el origen de esta patología se han planteado varios modelos, uno de ellos es el animal tratado con VE, en donde se ha observado que la previa administración del fármaco resulta en una hiperactividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario por medio del NOS, este fenómeno ocasiona una etiología similar al SOPQ presente en la mujer. Este hecho a llevado a varios investigadores a sugerir que el inicio de el SOPQ se debe a un aumento en el tono simpático. Esta hipótesis ha tomado gran aceptación debido a que la sección bilateral del NOS en animales tratados con VE normaliza la morfología ovárica y restablece la función ovulatoria.

Con base en lo anterior desarrollamos un modelo que pretendía conocer el papel del VE en animales sin su principal aporte simpático. Por lo cual en el presente estudio en primera instancia se seccionó de forma unilateral o bilateral el NOS en ratas de 4 días de edad y 6 días después se inyectó de forma intraperitoneal una dosis de 2.0 mg de VE disuelto en 0.1 mL de aceite de maíz como vehículo, como grupos de comparación se realizo la sección uni o biateral del NOS en animales de 4 días de edad y se inyectó o no una dosis de 0.1 mL de aceite de maíz 6 días después de la cirugía. En otro grupo de animales se inyectó VE a los 10 días de edad y se incluyó un grupo testigo absoluto el cual no recibió ningún tratamiento o cirugía. Todos los animales fueron sacrificados al presentar el primer estro vaginal. La edad de apertura vaginal, el primer estro vaginal, la tasa de animales ovulantes, la ovulación y la concentración sérica de progesterona (P4), y estradiol (E2) fueron evaluadas.

En la rata neonata la sección bilateral del nervio ovárico superior resultó en un retraso de la edad de apertura vaginal acompañado por una disminución en las concentraciones de P4.

Con la sección del nervio ovárico superior izquierdo o derecho no se observaron cambios en la edad de apertura vaginal, mientras que la concentración de E2 aumentó y solo con la sección derecha se observó una disminución en la concentración de P4.

El nervio ovárico superior en el animal con sección unilateral modula de manera estimulante la respuesta ovulatoria debido a que la ovulación disminuyó por parte del ovario denervado.

En el modelo de la rata neonata la administración de VE en ratas con previa sección unilateral o bilateral del NOS resultó en un adelanto de la edad de apertura vaginal mientras que las concentraciones de E2 y P4 aumentaron y disminuyeron respectivamente si se comparan con su respectivo grupo control con sección del NOS.

En el animal tratado con VE y previamente seccionado resultó en un bloqueo total de la ovulación acompañado por el desarrollo de quistes foliculares.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de ovario poliquístico (SOPQ), es una patología que afecta entre el 6 y 10% de las mujeres en edad reproductiva y es considerado como la principal causa de infertilidad a nivel mundial **(Stener-Victorin, 2004)**.

La etiología del SOPQ es multifactorial y se ha considerado que esta patología es el resultado de una alteración en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada **(Brawer y col., 1986; Schulster y col., 1984; Shirwalkar y col., 2007)**, sin embargo, recientemente el desarrollo de esta patología se ha asociado con una mayor actividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario, por medio del nervio ovárico superior (NOS) **(Lara y col., 1993; 2000)**. Esta afirmación es apoyada por el hecho de que en el animal con SOPQ la sección bilateral del NOS, restablece la capacidad ovulatoria y los quistes foliculares desaparecen **(Rosa-E-Silva y col., 2003)**.

Si consideramos que el SOPQ depende exclusivamente del aumento en la actividad de las fibras simpáticas, entonces, al eliminar esta fuente de información, previo a la administración del valerato de estradiol, esperamos que no se presente el síndrome.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El SOPQ es una patología que afecta del 6 al 10% de mujeres en edad reproductiva y es caracterizado por anovulación, concentración variable de gonadotropinas, hiperandrogenismo y alteraciones en el ciclo reproductivo. En la rata se ha logrado inducir un cuadro clínico similar al SOPQ de la mujer con la inyección de una dosis de 2 mg de VE.

Se ha sugerido que en la rata el SOPQ es el resultado de una hiperactividad de las fibras simpáticas, esta aseveración se apoya en el hecho que la denervación bilateral del NOS, principal aporte noradrenérgico del ovario, trae consigo el restablecimiento de la función ovulatoria, ciclo reproductivo, y la normalización en la concentración de hormonas esteroides.

Para analizar si la aparición del SOPQ es el resultado único de la hiperactividad de las fibras simpáticas, en el presente estudio se analizó el efecto realizar la sección del NOS, previo a la administración del VE. Con base a lo anterior, hemos propuesto que la denervación simpática en ratas neonatas, antes del tratamiento con VE, evitará el desarrollo del SOPQ.

HIPÓTESIS

Dado a que se ha atribuido el desarrollo del SOPQ a una hiperactividad de las fibras simpáticas provenientes del NOS, la eliminación de éstas durante la etapa neonatal, antes de la inducción del síndrome, evitará que se presente la patología.

OBJETIVO

Analizar si la formación del ovario poliquístico y la falta de ovulación es precedida por una mayor actividad de las fibras simpáticas que transcurren por el NOS.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar los efectos de la administración de valerato de estradiol en animales infantiles con sección uni o bilateral del NOS, sobre el inicio de la pubertad.
2. Estudiar los efectos de la administración de valerato de estradiol en animales infantiles con sección uni o bilateral del NOS, sobre la respuesta ovulatoria espontánea.
3. Analizar los efectos de la administración de valerato de estradiol en animales con sección uni o bilateral del NOS en la etapa neonata, sobre la concentración de P4 y E2.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron ratas hembra de la cepa CIIZ-V del bioterio de la FES Zaragoza, mantenidas en jaulas bajo condiciones controladas de iluminación 14 h de luz por 10 h de oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h) y temperatura (22 ± 2 °C). Al nacimiento, las crías fueron colocadas en camadas de 7 individuos por caja, seis hembras y un macho, con agua y alimento *ad libitum* y con libre acceso a la madre hasta el momento del destete (24 días). Al cumplir los 4 días de edad las hembras se asignaron al azar a alguno de los siguientes grupos experimentales con una n de 9 a 10 animales por grupo. Todas las cirugías se realizaron entre las 10:00 y 12:00 a.m.

- **Operación simulada izquierda, derecha o bilateral**

Ratas hembra neonatas de 4 días de edad fueron anestesiadas con éter etílico, se les realizó una incisión dorso-lateral de aproximadamente 4 mm que abarcó piel y músculo y sin tocar ningún órgano se suturó la herida.

- **Sección unilateral o bilateral del NOS**

Ratas hembras neonatas de 4 días de edad fueron anestesiadas como se describió anteriormente. Una vez realizada la incisión se identificó el ligamento suspensorio y se procedió a seccionar el nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD). Cuando se realizó la sección de ambos nervios (SBNO), la incisión dorso-lateral se practicó del lado izquierdo y derecho. Terminada la denervación, los ovarios se regresaron de nuevo a la cavidad abdominal y se suturó la herida.

- **Administración de valerato de estradiol (VE)**

Seis días después de la denervación o de la operación simulada se administraron por vía intraperitoneal 2.0 mg de VE disuelto en 0.1 mL de aceite de maíz.

- **Administración del Vehículo (Vh)**

Seis días después de la denervación o de la operación simulada se inyectó por vía intraperitoneal 0.1 mL aceite de maíz.

- **Animales sin tratamiento**

Otros grupos de animales sometidos a la sección uni o bilateral del NOS o a su respectiva operación simulada y sin ningún tratamiento farmacológico, fueron sacrificados al presentar su primer estro vaginal.

Monitoreo de la apertura vaginal.

Un día después de la inyección de VE o Vh se procedió a revisar diariamente la vagina, en el momento en el que se observó su canalización se inició la toma de frotis vaginales.

Autopsia de animales

Al presentar su primer estro vaginal, los animales fueron pesados y sacrificados por decapitación entre las 10:00 y las 12:00 hrs. Se colectó la sangre del tronco, la cual se dejó coagular a temperatura ambiente por 20 minutos y se procedió a centrifugar a 3500 rpm durante 15 minutos. Se separó el suero y se dividió en alícuotas de 150 µl, colocadas en tubos eppendorf los cuales fueron almacenados a -20 °C, hasta el momento de la cuantificación de hormonas esteroides (progesterona y estradiol) por radioinmunoanálisis (RIA).

Se disecaron los oviductos y se buscó la presencia de ovocitos, los cuales fueron contados con la ayuda de un microscopio estereoscopio, según la metodología habitual del laboratorio (**Morales 1993**). Se disecaron y pesaron los ovarios, de los cuales 3 de cada grupo experimental fueron fijados en Bouin para su posterior análisis histológico. El útero, adrenales, bazo y timo fueron disecados y pesados.

Cuantificación de hormonas esteroides

Las concentraciones de progesterona (P4) y estradiol (E2) fueron cuantificadas por radioinmunoanálisis (RIA) de fase sólida, mediante reactivos comerciales (Coat-A-Count). En tubos de polipropileno (que ya contienen el anticuerpo específico: anti-progesterona o anti-estradiol), se adicionó 100 µl de la muestra problema y un mL de hormona radioactiva (I^{125}). Para facilitar la reacción, la mezcla se agitó en un vortex durante un minuto y se incubó tres horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo, la muestra se decantó, se removió el exceso de líquido y se determinó la concentración de hormona en la muestra problema con la ayuda de un contador de rayos gama modelo Cobra 5005, Pckard™, en función de las cuentas por minuto y de una curva de calibración.

La cuantificación de hormonas se realizó en el Laboratorio de Hormonas Esteroides del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zuribán”, y se realizó con la asesoría del Biol. Roberto Chavira.

Histología Ovárica

Los ovarios previamente colocados en Bouin por 24 h fueron deshidratados en alcohol (al 70 y 96%) y cloroformo e incluidos en parafina. Posteriormente se realizaron los cortes histológicos de manera seriada a 10 μm de grosor y teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina. En los cortes se buscó con la ayuda de un microscopio, la presencia de quiste foliculares y de cuerpos lúteos.

Análisis estadístico

La tasa de animales ovulantes fue analizada por la prueba exacta de Fisher para proporciones. La edad de apertura vaginal (EAV), Primer estro vaginal (PEV), número de ovocitos liberados fue analizada por la prueba de Kruskal Wallis seguido de la U de Mann-Whitney. Los pesos de órganos y la concentración de hormonas esteroides fueron analizados por la prueba de Análisis de Varianza (ANDEVA), seguida de la prueba de Tuckey. En los casos en donde se compararon dos grupos se utilizó la prueba de “t” de Student.

En todos los casos se consideró como diferencia estadísticamente significativa aquellas cuya probabilidad fue menor o igual a 0.05.

RESULTADOS

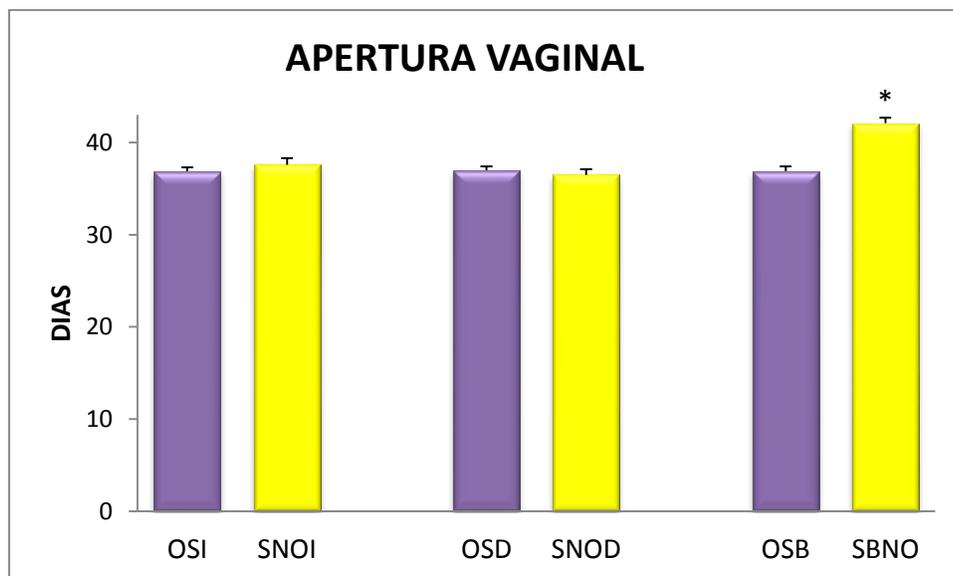
EFFECTOS DE LA SECCIÓN DEL NERVIJO OVÁRICO SUPERIOR SOBRE EL INICIO DE LA PUBERTAD Y LAS FUNCIONES OVÁRICAS

EXPERIMENTO 1

EDAD DE APERTURA VAGINAL Y PRIMER ESTRO VAGINAL

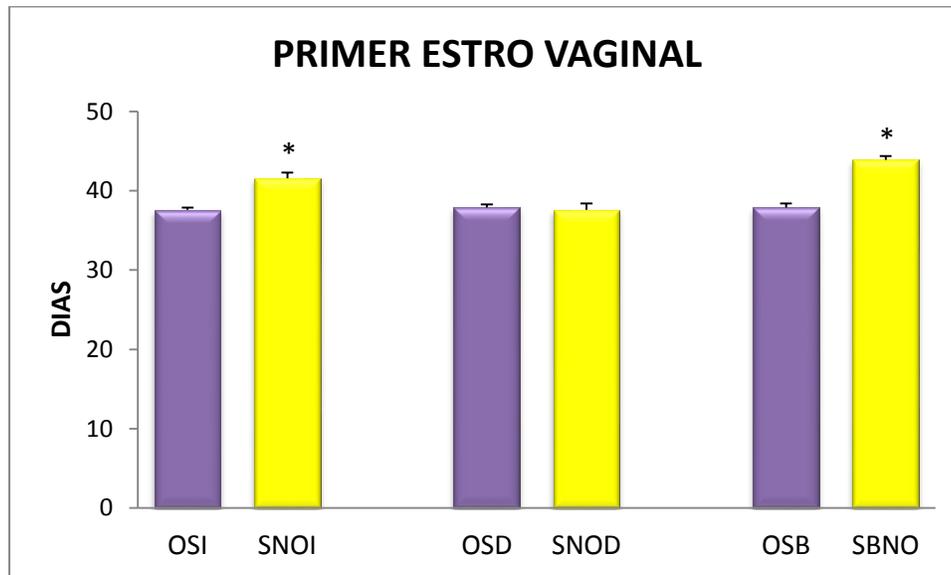
La sección unilateral, realizada a los 4 días de edad, no modificó la edad de la apertura vaginal, mientras que la sección bilateral resultó en un retraso, respecto al grupo con operación simulada (Gráfica 1). En las hembras con sección del NOS izquierdo o de ambos nervios, se retrasó la edad del primer estro, respecto a su grupo con operación simulada (Gráfica 2).

Gráfica 1. Media \pm e.e.m de días transcurridos desde el nacimiento hasta la edad de la apertura vaginal en animales con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD), bilateral (OSB) o sección de nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO), realizada a los 4 días de edad. Todos los grupos fueron sacrificados al primer estro vaginal.



*p < 0.05 vs. su grupo con OSB (Prueba U de Mann Whitney).

Gráfica 2. Media \pm e.e.m de días transcurridos desde el nacimiento hasta la edad del primer estro vaginal en animales con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD), bilateral (OSB) o sección de nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO), realizada a los 4 días de edad. Todos los grupos fueron sacrificados al primer estro vaginal.

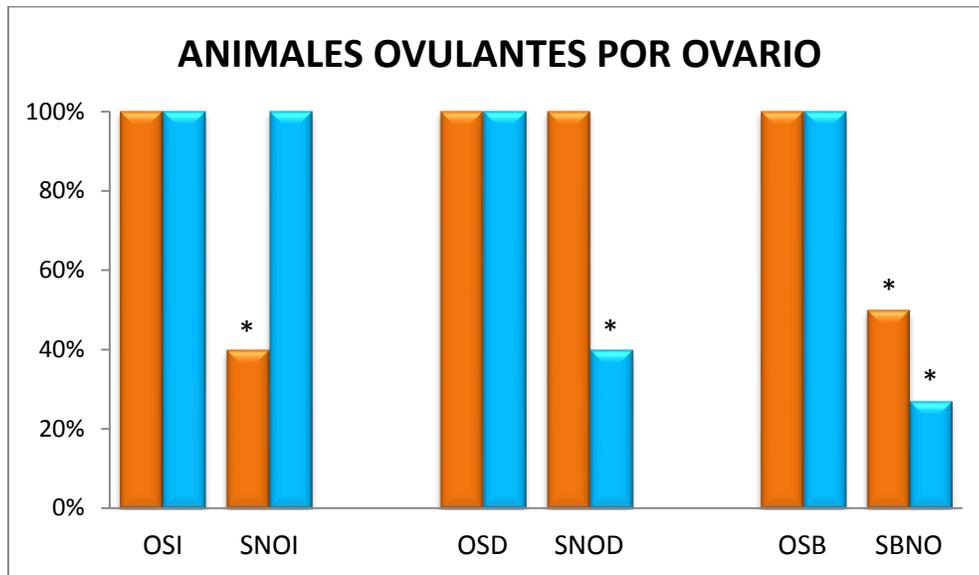


* $p < 0.05$ vs. su grupo con OSI u OSB (Prueba U de Mann Whitney).

TASA DE ANIMALES OVULANTES

En las ratas con sección uni o bilateral del NOS se observó reducción en la tasa de animales ovulantes por parte del ovario denervado, al compararse con su grupo con operación simulada (Gráfica 3).

Gráfica 3. Tasa Ovulatoria de animales con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD), bilateral (OSB) o sección de nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO), realizada a los 4 días de edad. Todos los grupos fueron sacrificados al primer estro vaginal.



* $p < 0.05$ vs. su respectivo ovario con operación simulada (Prueba de Fisher).



OVARIO IZQUIERDO

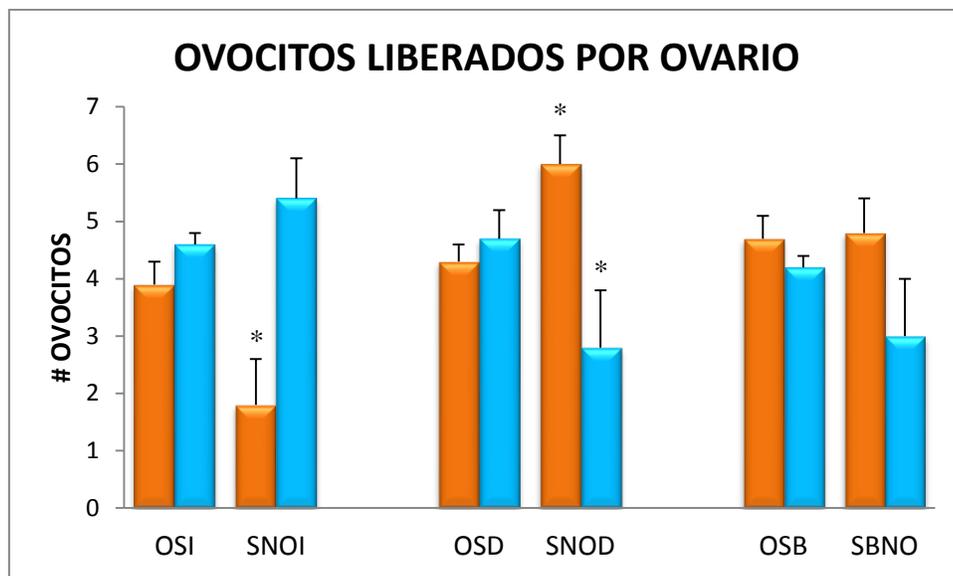


OVARIO DERECHO

NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS

La sección unilateral resultó en una disminución del número de ovocitos liberados por parte del ovario denervado, respecto al grupo con operación simulada (Gráfica 4). En el grupo con sección del NOS derecho el número de ovocitos liberados por la gónada intacta fue mayor respecto al denervado (6.0 ± 0.5 vs. 4.3 ± 0.3 , $p < 0.05$)

Gráfica 4. Media \pm e.e.m del número de ovocitos liberados de animales con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD), bilateral (OSB) o sección de nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO), realizada a los 4 días de edad. Todos los grupos fueron sacrificados al primer estro vaginal.



* $p < 0.05$ vs. su respectivo ovario con operación simulada (Prueba U de Mann Whitney).

OVARIO IZQUIERDO

OVARIO DERECHO

PESOS DE ÓRGANOS

La sección unilateral del NOS resultó en un menor peso del ovario denervado, sin cambios en la gónada que mantuvo intacta su inervación. El peso del útero fue mayor en el grupo de animales con sección derecha o bilateral (Cuadro 1).

Cuadro 1. Media \pm e.e.m de pesos relativos (mg/100g) del ovario izquierdo, ovario derecho, masa ovárica y útero, de animales con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD), bilateral (OSB) o sección de nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO), realizada a los 4 días de edad. Todos los grupos fueron sacrificados al primer estro vaginal.

Grupo	mg/100 g p.c			
	Ovario Izquierdo	Ovario Derecho	Masa Ovárica	Útero
OSI	16.5 \pm 0.7	16.3 \pm 0.6	32.8 \pm 1.2	121.3 \pm 2.7
SNOI	9.1 \pm 1.4*	15.2 \pm 1	24.3 \pm 1.7*	120.3 \pm 7.5
OSD	17.5 \pm 1.4	16.3 \pm 0.6	34.3 \pm 0.9	124.7 \pm 4.1
SNOD	17.2 \pm 1.6	11.2 \pm 1.1*	27.2 \pm 2.3*	158 \pm 8.0*
OSB	17.1 \pm 0.6	17.3 \pm 0.7	34.4 \pm 1.3	120.7 \pm 5.0
SBNO	15.1 \pm 1.4	14.4 \pm 3.2	29.5 \pm 3.3*	136.8 \pm 6.6*

*p < 0.05 vs. su grupo con operación simulada (Prueba "t" Student).

En el grupo con sección del NOS derecho aumentó la masa del bazo. Por efecto de la sección del nervio derecho o de ambos nervios ováricos disminuyó el peso del timo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Media \pm e.e.m de pesos relativos (mg/100g) de adrenal izquierda, adrenal derecha, masa adrenal, bazo y timo, de animales con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD), bilateral (OSB) o sección de nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO), realizada a los 4 días de edad. Todos los grupos fueron sacrificados al primer estro vaginal.

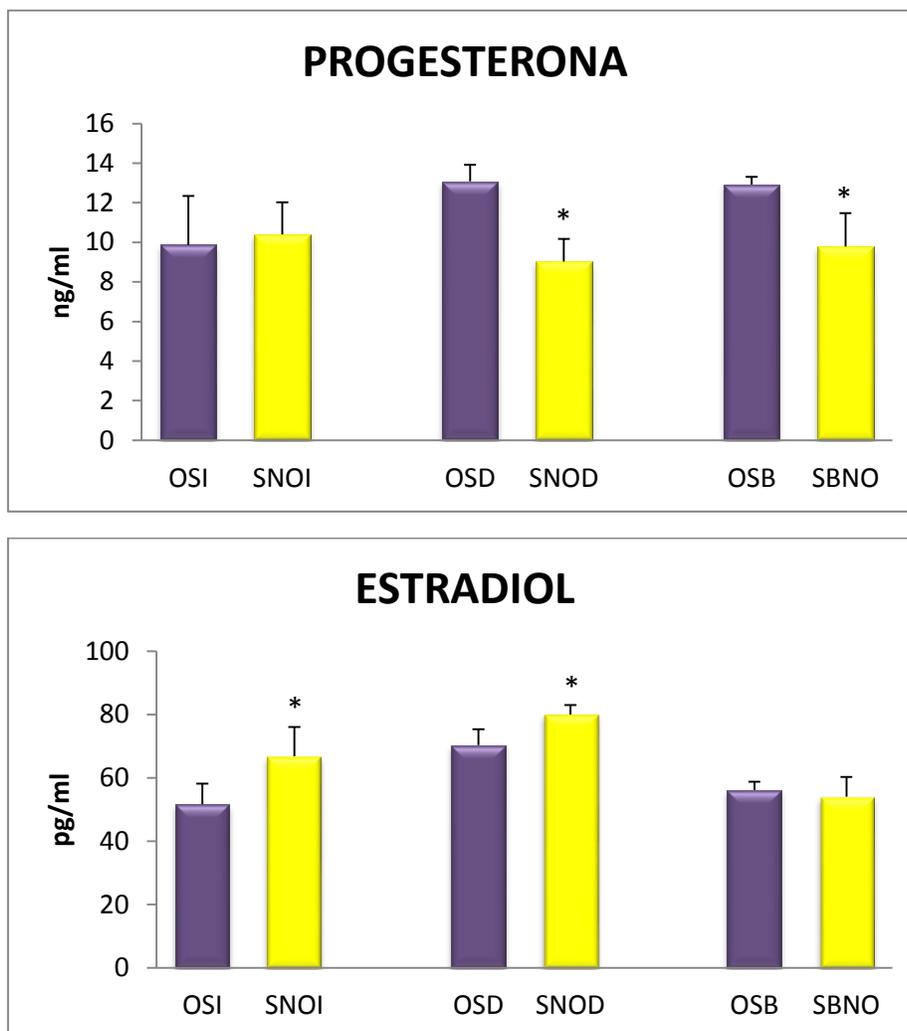
Grupo	mg/100 g p.c				
	Adrenal Izquierdo	Adrenal Derecho	Masa Adrenal	Bazo	Timo
OSI	11.3 \pm 0.4	11.4 \pm 0.4	22.7 \pm 0.6	285.7 \pm 5.4	252.7 \pm 8.6
SNOI	12.8 \pm 0.8	11.8 \pm 0.5	24.6 \pm 1.2	286.4 \pm 19.8	248.5 \pm 15.5
OSD	12 \pm 0.7	12 \pm 0.6	23.9 \pm 1.3	281.3 \pm 9.7	248.8 \pm 10.8
SNOD	13.7 \pm 0.8	13.7 \pm 0.6	27.4 \pm 1.4	329.3 \pm 13.5*	219.6 \pm 15.4*
OSB	12.7 \pm 0.4	12.8 \pm 0.4	25.5 \pm 0.7	298.4 \pm 13.3	271.7 \pm 12.1
SBNO	15.1 \pm 1.4	14.4 \pm 3.2	28 \pm 3.3	317.2 \pm 17.4	239.7 \pm 7.2*

*p < 0.05 vs. su grupo con operación simulada (Prueba "t" Student).

HORMONAS ESTEROIDES

La sección del nervio derecho o de ambos nervios disminuye la concentración sérica de P4. Mientras que, con la sección izquierda o derecha del nervio la concentración de E2 fue mayor, respecto a su grupo de comparación (Gráficas 5 y 6).

Gráfica 5. Media \pm e.e.m de la concentración sérica de P4 y E2 de animales con operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD), bilateral (OSB) o sección de nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO), realizada a los 4 días de edad. Todos los grupos fueron sacrificados al primer estro vaginal.



* $p < 0.05$ vs. su grupo con operación simulada (Prueba "t" Student).

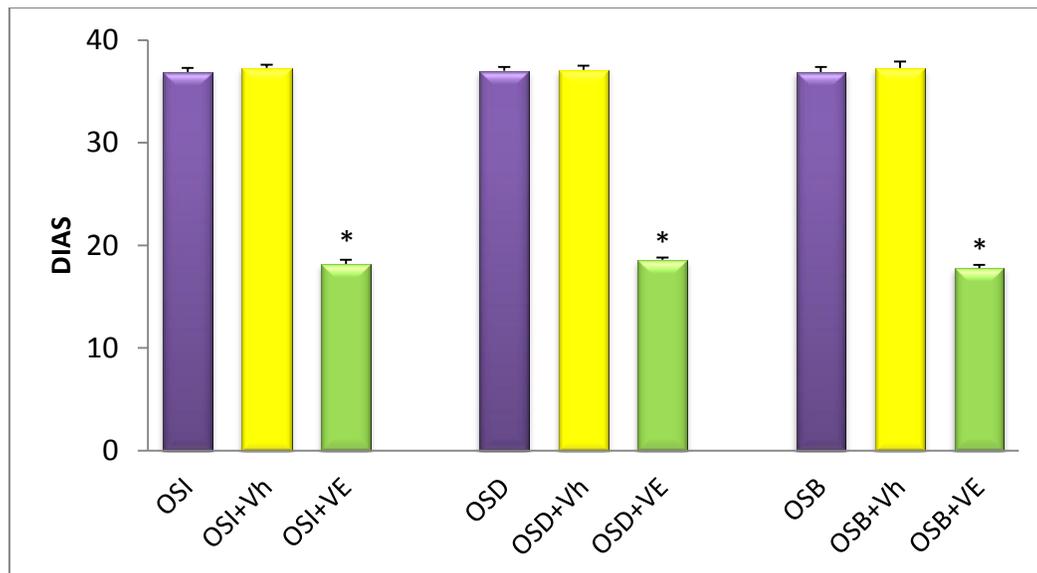
EFFECTOS DEL VALERATO DE ESTRADIOL EN ANIMALES CON OPERACIÓN SIMULADA SOBRE EL INICIO DE LA PUBERTAD Y LAS FUNCIONES OVÁRICAS

EXPERIMENTO 2

EDAD DE APERTURA VAGINAL Y PRIMER ESTRO VAGINAL

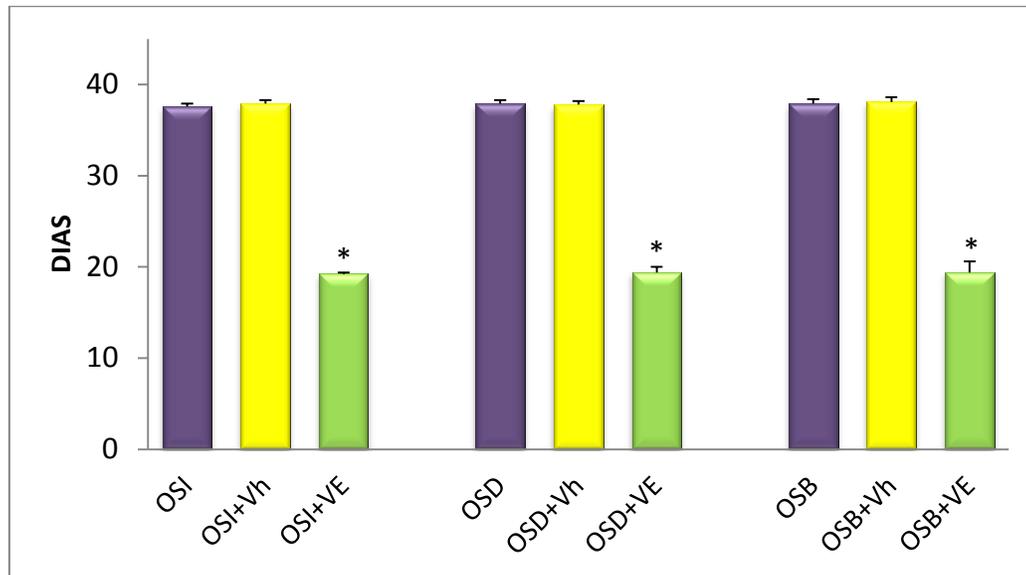
La administración del VE en hembras con operación simulada uni o bilateral resultó en un adelanto de la edad de apertura vaginal y del primer estro, respecto a su grupo tratado con el Vh (Gráficas 6 y 7).

Gráfica 6. Media \pm e.e.m de días transcurridos desde del nacimiento hasta la edad de apertura vaginal, en animales sometidos a los 4 días de edad a la operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB). Seis días después de la cirugía, las hembras fueron tratadas o no con aceite de maíz (Vh) o valerato de estradiol (VE). Todos los grupos fueron sacrificados al primer estro vaginal.



*p < 0.05 vs. su respectivo grupo con Vh (Prueba U de Mann Whitney).

Gráfica 7. Media \pm e.e.m de días transcurridos desde del nacimiento al primer estro, de animales sometidos a los 4 días de edad a la operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB). Seis días después de la cirugía, las hembras fueron tratadas o no con aceite de maíz (Vh) o valerato de estradiol (VE). Todos los grupos fueron sacrificados al primer estro vaginal.

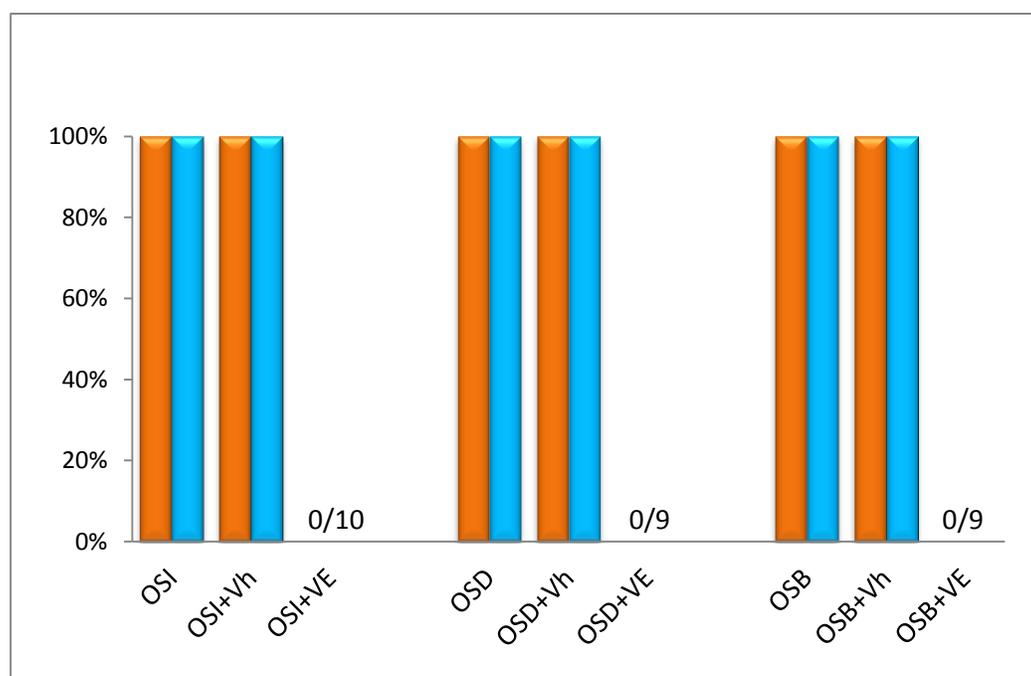


* $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo con Vh (Prueba U de Mann Whitney).

TASA DE ANIMALES OVULANTES Y NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS

La administración del VE en animales con operación simulada bloqueó la ovulación en el 100% de los animales (Gráfica 8). El número de ovocitos liberados al primer estro vaginal en los animales con operación simulada e inyectados con el vehículo fue semejante al grupo únicamente laparotomizado (Gráfica 9).

Gráfica 8. Porcentaje de hembras ovulantes sometidas a los 4 días de edad a la operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB). Seis días después de la cirugía, las hembras fueron tratadas o no con aceite de maíz (Vh) o valerato de estradiol (VE). Todos los grupos fueron sacrificados al primer estro vaginal.

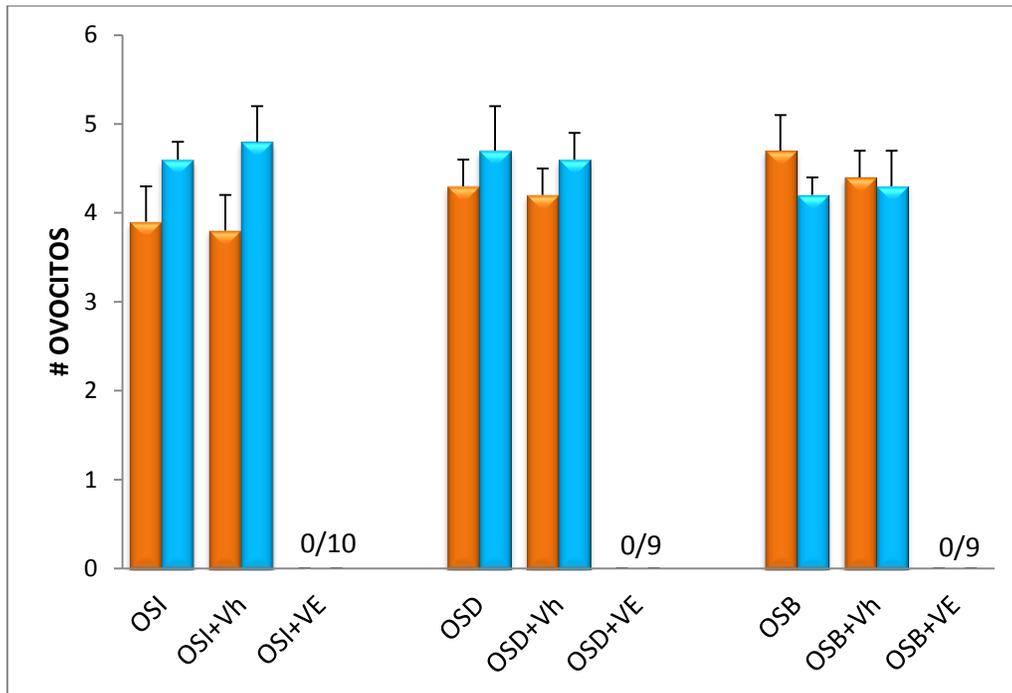


OVARIO IZQUIERDO



OVARIO DERECHO

Gráfica 9. Media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados por ovario, en animales sometidos a los 4 días de edad a la operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB). Seis días después de la cirugía, las hembras fueron tratadas o no con aceite de maíz (Vh) o valerato de estradiol (VE). Todos los grupos fueron sacrificados al primer estro vaginal.

**OVARIO IZQUIERDO****OVARIO DERECHO**

PESOS DE ÓRGANOS

La administración del VE en las ratas sometidas a la operación simulada uni o bilateral resultó en un menor peso de los ovarios y del útero (Cuadro 3).

Cuadro 3. Media \pm e.e.m del peso relativo (mg/100g) del ovario izquierdo, ovario derecho, masa ovárica y útero, de animales sometidos a los 4 días de edad a la operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB). Seis días después de la cirugía, las hembras fueron tratadas o no con aceite de maíz (Vh) o valerato de estradiol (VE). Todos los grupos fueron sacrificados al primer estro vaginal.

Grupo	mg/100 g p.c			
	Ovario Izquierdo	Ovario Derecho	Masa Ovárica	Útero
OSI	16.5 \pm 0.7	16.3 \pm 0.6	32.8 \pm 1.2	121.3 \pm 2.7
OSI+Vh	16.8 \pm 0.7	17.2 \pm 0.7	34 \pm 1.4	120.5 \pm 4.4
OSI+VE	9.2 \pm 1.0*	9.7 \pm 1.0*	18.9 \pm 2.0*	80.1 \pm 7.1*
OSD	17.5 \pm 1.4	16.3 \pm 0.6	34.3 \pm 0.9	124.7 \pm 4.1
OSD+Vh	16.8 \pm 0.5	16.9 \pm 0.4	33.7 \pm 0.9	124.1 \pm 4.7
OSD+VE	7.1 \pm 0.6*	7.2 \pm 0.6*	14.2 \pm 1.2*	63.9 \pm 4.7*
OSB	17.1 \pm 0.6	17.3 \pm 0.7	34.4 \pm 1.3	120.7 \pm 5.0
OSB+Vh	16.1 \pm 0.5	15.8 \pm 0.6	31.9 \pm 1.1	116.9 \pm 3.5
OSB+VE	8.3 \pm 0.3*	8.3 \pm 0.4*	16.6 \pm 0.7*	83.2 \pm 8.7*

*p < 0.05 vs. su respectivo grupo con operación simula + Vh, (Prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

El VE en hembras con operación simulada unilateral no modificó el peso de las adrenales, bazo y timo, mientras que en hembras con operación simulada bilateral el peso del bazo y timo fue mayor, al ser comparados con su grupo testigo (Cuadro 4).

Cuadro 4. Media \pm e.e.m del peso relativo (mg/100g) de adrenal izquierda, adrenal derecha, masa adrenal, bazo y timo, de animales sometidos a los 4 días de edad a la operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB). Seis días después de la cirugía, las hembras fueron tratadas o no con aceite de maíz (Vh) o valerato de estradiol (VE). Todos los grupos fueron sacrificados al primer estro vaginal.

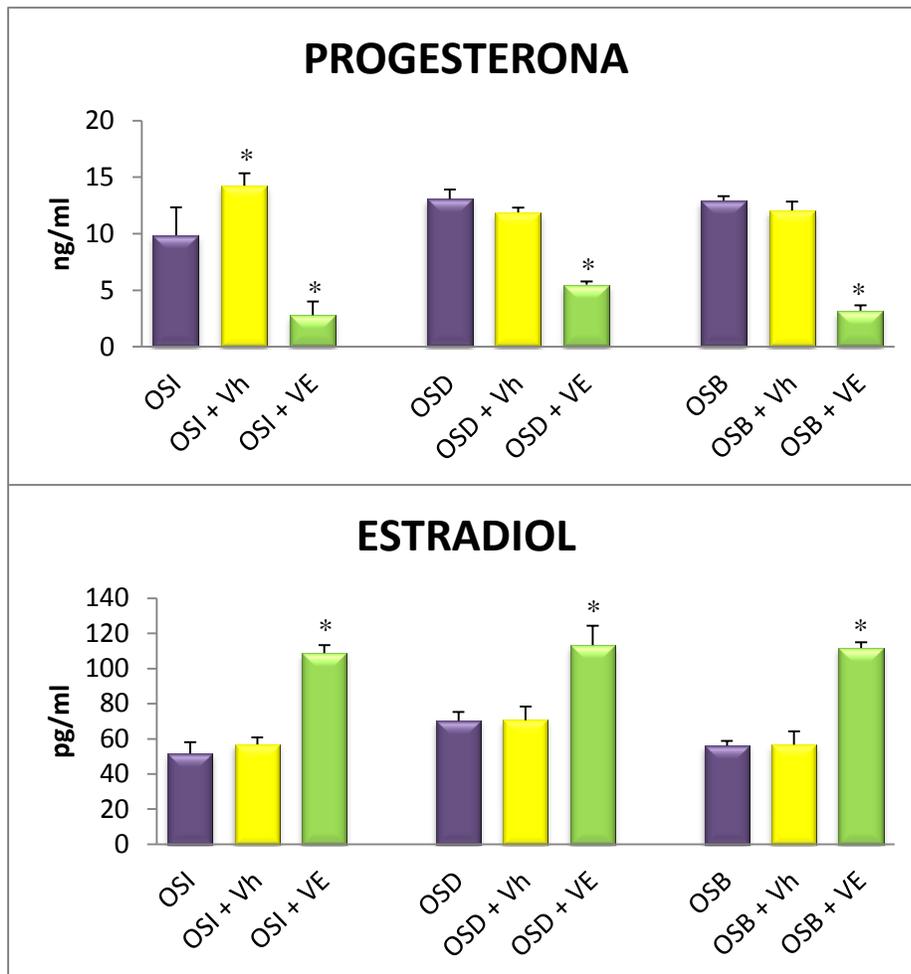
Grupo	mg/100 g p.c				
	Adrenal Izquierdo	Adrenal Derecho	Masa Adrenal	Bazo	Timo
OSI	11.3 \pm 0.4	11.4 \pm 0.4	22.7 \pm 0.6	285.7 \pm 5.4	252.7 \pm 8.6
OSI+Vh	11.6 \pm 0.5	11.8 \pm 0.3	23.4 \pm 0.8	271.0 \pm 18.5	254.2 \pm 19.6
OSI+VE	10.6 \pm 1.1	10.1 \pm 1.2	20.7 \pm 2.3	352.1 \pm 52	295.0 \pm 20.6
OSD	12 \pm 0.7	12 \pm 0.6	23.9 \pm 1.3	281.3 \pm 9.7	248.8 \pm 10.8
OSD+Vh	11.9 \pm 0.8	11.9 \pm 0.7	23.8 \pm 0.6	279.1 \pm 14.2	248.1 \pm 10
OSD+VE	11 \pm 1.0	10.5 \pm 1.1	21.6 \pm 1.9	309.6 \pm 32.7	262.5 \pm 34.7
OSB	12.7 \pm 0.4	12.8 \pm 0.4	25.5 \pm 0.7	298.4 \pm 13.3	271.7 \pm 12.1
OSB+Vh	11.7 \pm 0.5	11.8 \pm 0.5	23.5 \pm 1.0	279 \pm 21.5	261.1 \pm 18.1
OSB+VE	10.4 \pm 0.7	10.9 \pm 0.8	21.2 \pm 1.4	367.6 \pm 17.4*	318.8 \pm 15.2*

*p < 0.05 vs. su grupo con operación simulada + Vh, (Prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

HORMONAS ESTEROIDES

En el grupo al que se le inyectó el Vh incrementó la concentración de P4, respecto a su grupo control. Por efecto de la administración del VE se observó una disminución en la concentración sérica de P4 y aumento en la de E2, independientemente del lado en el que se realizó la operación simulada (Gráfica 10).

Gráfica 10. Media \pm e.e.m de la concentración de P4 y E2 de animales sometidos a los 4 días de edad a la operación simulada izquierda (OSI), derecha (OSD) o bilateral (OSB). Seis días después de la cirugía, las hembras fueron tratadas o no con aceite de maíz (Vh) o valerato de estradiol (VE). Todos los grupos fueron sacrificados al primer estro vaginal.



* $p < 0.05$ vs. su grupo con operación simulada + Vh o con operación simulada (Prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey)

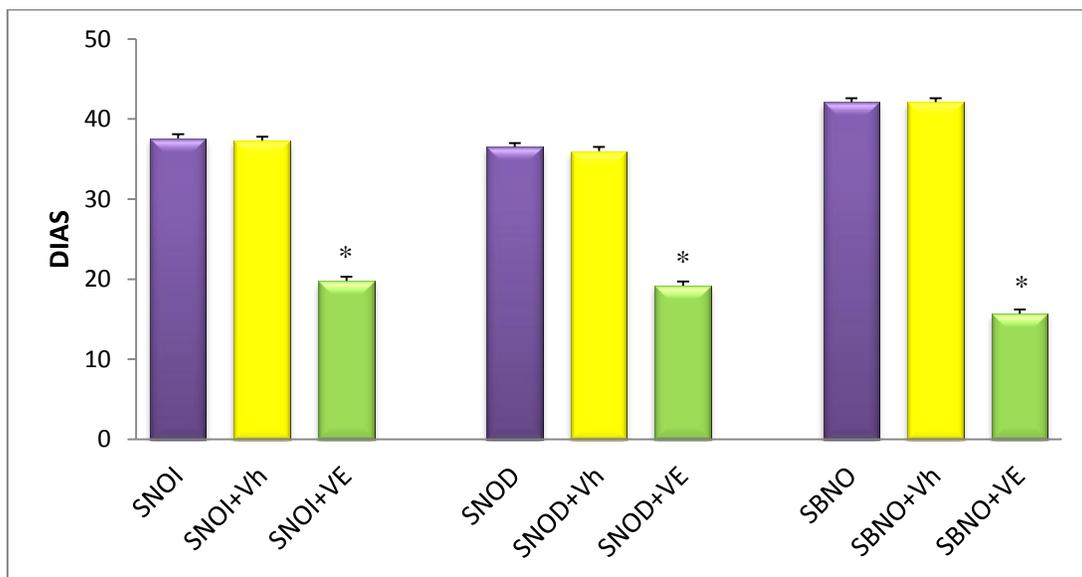
EFFECTOS DEL VALERATO DE ESTRADIOL SOBRE EL INICIO DE LA PUBERTAD Y LAS FUNCIONES OVÁRICAS EN ANIMALES CON SECCIÓN DEL NOS

EXPERIMENTO 3

EDAD DE APERTURA VAGINAL Y PRIMER ESTRO VAGINAL

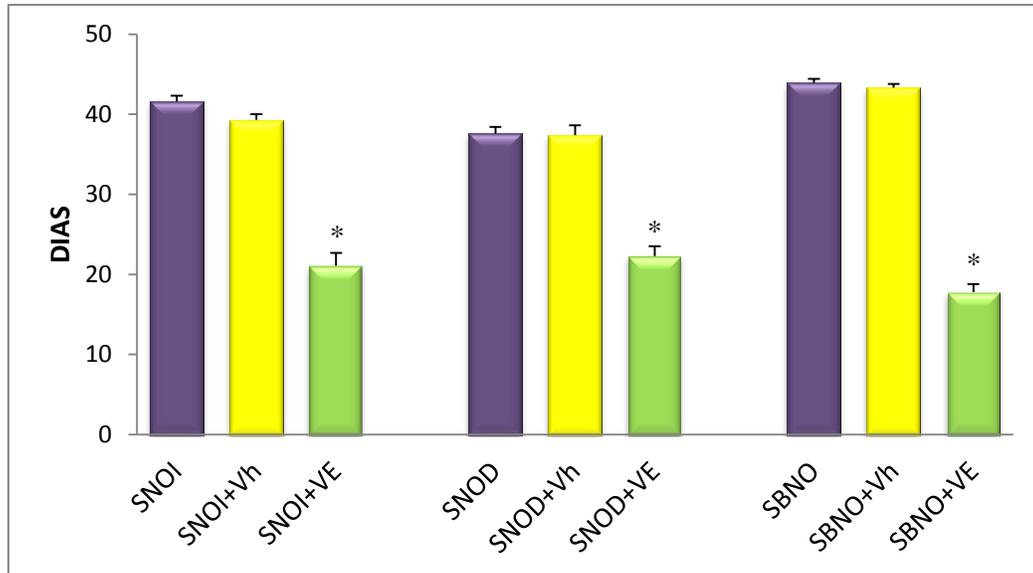
Independientemente de la previa denervación realizada, la administración del valerato de estradiol resultó en adelanto de la apertura vaginal y primer estro, al ser comparados con su respectivo grupo inyectado con vehículo (Gráficas 11 y 12).

Gráfica 11. Media \pm e.e.m de días transcurridos desde el nacimiento hasta la edad de apertura vaginal, en animales con sección de nervio ovárico izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO), realizada a los 4 días de edad. Seis días después de la cirugía, las hembras fueron tratadas o no con aceite de maíz (Vh) o valerato de estradiol (VE). Todos los grupos fueron sacrificados al primer estro vaginal.



* $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo con Vh (Prueba U de Mann Whitney)

Gráfica 12. Media \pm e.e.m de días transcurridos desde el nacimiento hasta la edad del primer estro vaginal, en animales con sección de nervio ovárico izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO), realizada a los 4 días de edad. Seis días después de la cirugía, las hembras fueron tratadas o no con aceite de maíz (Vh) o valerato de estradiol (VE). Todos los grupos fueron sacrificados al primer estro vaginal.

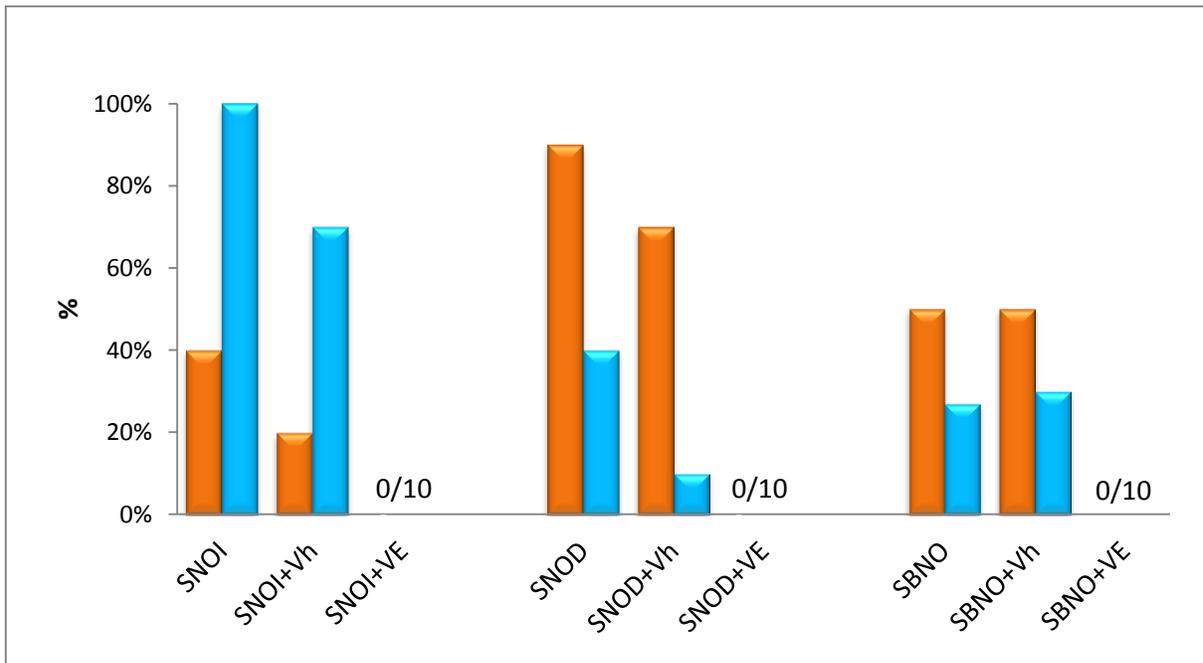


* $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo con Vh (Prueba U de Mann Whitney)

TASA DE ANIMALES OVULANTES

La sección del NOS resultó en una disminución del porcentaje de animales ovulantes por parte del ovario denervado, y de un bloqueo de la ovulación cuando son tratados con VE (Gráfica 13).

Gráfica 13. Tasa Ovulatoria de animales con en animales con sección de nervio ovárico izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO), realizada a los 4 días de edad. Seis días después de la cirugía, las hembras fueron tratadas o no con aceite de maíz (Vh) o valerato de estradiol (VE). Todos los grupos fueron sacrificados al primer estro vaginal.



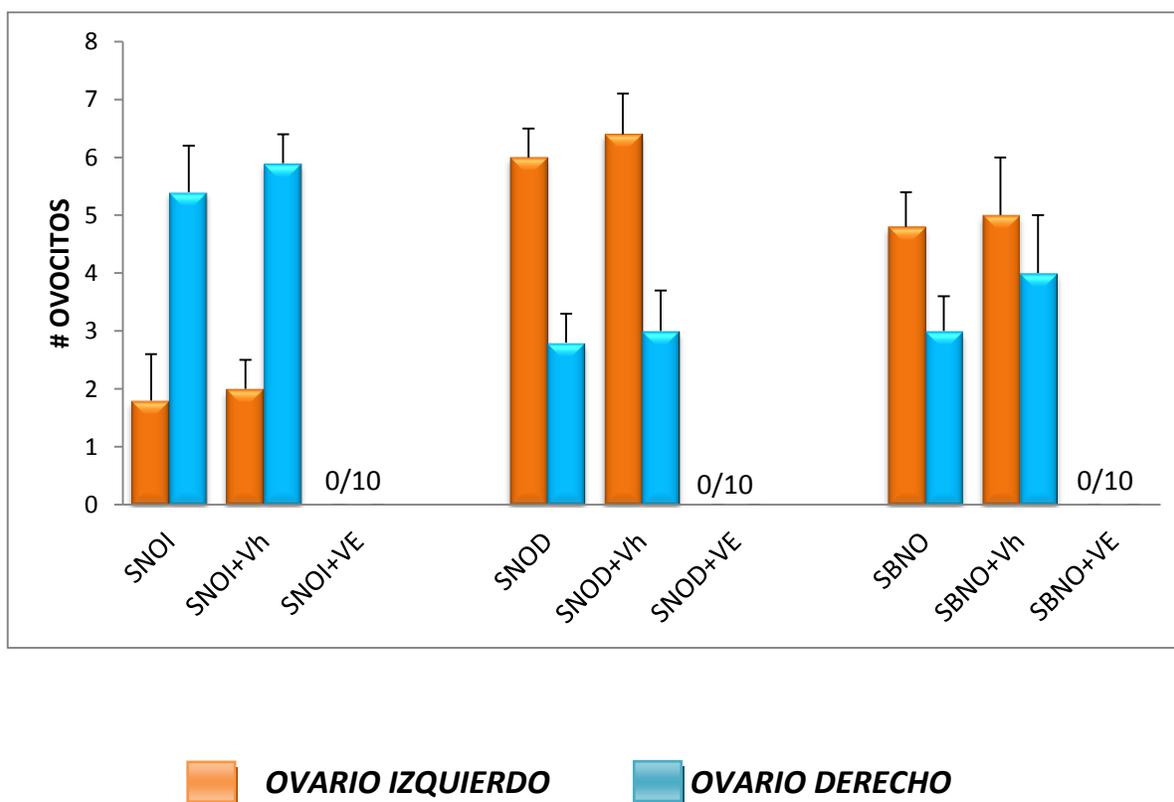
 **OVARIO IZQUIERDO**

 **OVARIO DERECHO**

NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS

La administración del VE resultó en un bloqueo de la ovulación independientemente de la cirugía realizada, al ser comparados con su respectivo grupo control con vehículo (Gráfica 14).

Gráfica 14. Media \pm e.e.m del número de ovocitos liberados de animales con sección de nervio ovárico izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO), realizada a los 4 días de edad. Seis días después de la cirugía, las hembras fueron tratadas o no con aceite de maíz (Vh) o valerato de estradiol (VE). Todos los grupos fueron sacrificados al primer estro vaginal.



PESOS DE ÓRGANOS

El tratamiento con VE en animales con sección izquierda resultó en una disminución del peso del ovario derecho y masa ovárica, mientras que animales con sección derecha mostraron una reducción en ovario izquierdo, masa ovárica y útero. En cuanto a hembras con sección bilateral se observa un decremento en el peso del útero, al compararse con su grupo testigo con Vh (Cuadro 5).

Cuadro 5. Media \pm e.e.m del peso relativo (mg/100g) del ovario izquierdo, ovario derecho, masa ovárica y útero, de animales con sección de nervio ovárico izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO), realizada a los 4 días de edad. Seis días después de la cirugía, las hembras fueron tratadas o no con aceite de maíz (Vh) o valerato de estradiol (VE). Todos los grupos fueron sacrificados al primer estro vaginal.

Grupo	mg/100 g p.c			
	Ovario Izquierdo	Ovario Derecho	Masa Ovárica	Útero
SNOI	9.1 \pm 1.4	15.2 \pm 1	24.3 \pm 1.7	120.3 \pm 7.5
SNOI+Vh	11.3 \pm 1.7	19.1 \pm 1.6*	30.3 \pm 3*	124.6 \pm 4.5
SNOI+VE	9.0 \pm 1.3	6 \pm 1.2*	13.6 \pm 1.2*	102.3 \pm 14.7*
SNOD	17.2 \pm 1.6	11.2 \pm 1.1	27.2 \pm 2.3	158 \pm 8.0
SNOD+Vh	18.6 \pm 1.7	7.5 \pm 1.6	26.1 \pm 2.1	124.2 \pm 6.8
SNOD+VE	9.7 \pm 1.1*	9.1 \pm 1	18.8 \pm 1.7*	61.5 \pm 9.1*
SBNO	15.1 \pm 1.4	14.4 \pm 3.2	29.5 \pm 3.3	136.8 \pm 6.6*
SBNO+Vh	14.6 \pm 1.4	11.6 \pm 1.5	26.2 \pm 2.1	137.6 \pm 2.9
SBNO+VE	11.5 \pm 1.4	13.8 \pm 2	19.8 \pm 3.5	92.3 \pm 15*

*p < 0.05 vs. su respectivo grupo con sección del NOS + Vh o con sección (Prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey)

La administración del VE resultó en aumento del peso del bazo independientemente de la cirugía realizada. En cuanto a hembras con sección bilateral se observó aumento en el peso de la adrenal derecha y masa adrenal (Cuadro 6).

Cuadro 6. Media \pm e.e.m del peso relativo (mg/100g) de la adrenal izquierda, adrenal derecha, masa adrenal, bazo y timo, de animales con sección de nervio ovárico izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO), realizada a los 4 días de edad. Seis días después de la cirugía, las hembras fueron tratadas o no con aceite de maíz (Vh) o valerato de estradiol (VE). Todos los grupos fueron sacrificados al primer estro vaginal.

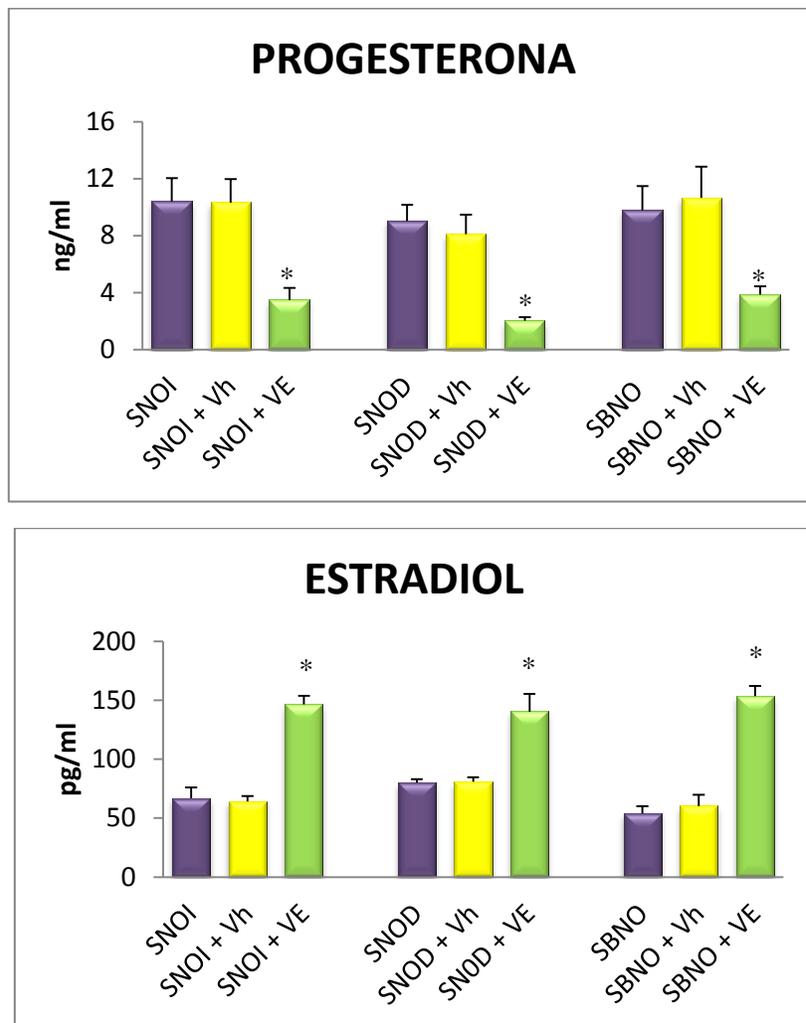
Grupo	mg/100 g p.c				
	Adrenal Izquierda	Adrenal Derecha	Masa Adrenal	Bazo	Timo
SNOI	12.8 \pm 0.8	11.8 \pm 0.5	24.6 \pm 1.2	286.4 \pm 19.8	248.5 \pm 15.5
SNOI+Vh	12.5 \pm 0.5	12.8 \pm 0.5	25.3 \pm 0.9	297.5 \pm 19.1	249.2 \pm 16.2
SNOI+VE	14.1 \pm 1.2	14.2 \pm 1.4	28.3 \pm 2.3	413.3 \pm 33.6*	285.6 \pm 22.1
SNOD	13.7 \pm 0.8	13.7 \pm 0.6	27.4 \pm 1.4	329.3 \pm 13.5	219.6 \pm 15.4
SNOD+Vh	10.9 \pm 0.4	10.4 \pm 0.3	21.4 \pm 0.7	279.7 \pm 15.9	207.8 \pm 14.1
SNOD+VE	12.5 \pm 0.9	11.1 \pm 0.9	23.6 \pm 1.7	389.9 \pm 29.4*	256.5 \pm 26.2*
SBNO	15.1 \pm 1.4	14.4 \pm 3.2	28 \pm 3.3	317.2 \pm 17.4	239.7 \pm 7.2
SBNO+Vh	11.5 \pm 0.3	11.6 \pm 0.4	23.1 \pm 0.7	353.1 \pm 28	256.6 \pm 13.5
SBNO+VE	13.1 \pm 0.7	14.2 \pm 0.9*	27.2 \pm 1.4*	685.3 \pm 46.4*	230 \pm 16.3

*p < 0.05 vs. Su respectivo grupo su respectivo grupo con sección del NOS + Vh o con sección (Prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey)

HORMONAS ESTEROIDES

La administración del VE dio como resultado una disminución en la concentración sérica de P₄ y aumento en la de E₂, independientemente de la denervación realizada (Gráficas 15).

Gráfica 15. Media \pm e.e.m de la concentración de P₄ y E₂ de animales con sección de nervio ovárico izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO), realizada a los 4 días de edad. Seis días después de la cirugía, las hembras fueron tratadas o no con aceite de maíz (Vh) o valerato de estradiol (VE). Todos los grupos fueron sacrificados al primer estro vaginal.



*p < 0.05 vs. Su su respectivo grupo con sección del NOS + Vh (Prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey)

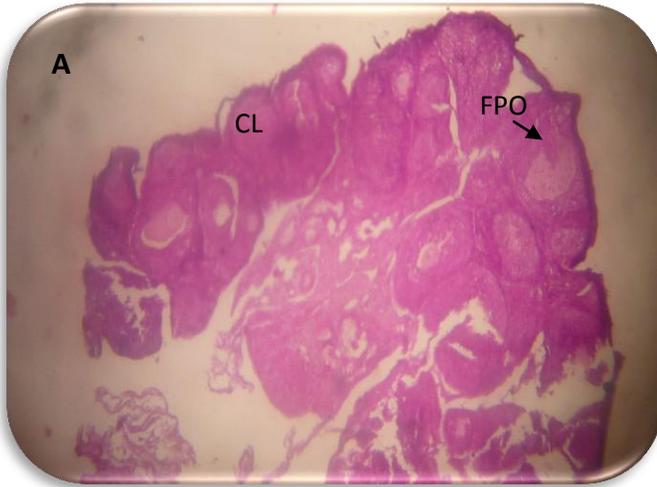
RESULTADOS DE HISTOLOGÍA

Los ovarios de los animales con sección unilateral del NOS presentan una disminución en el número de folículos, si son comparados con el ovario que mantiene su inervación intacta (**Fig. 15**).

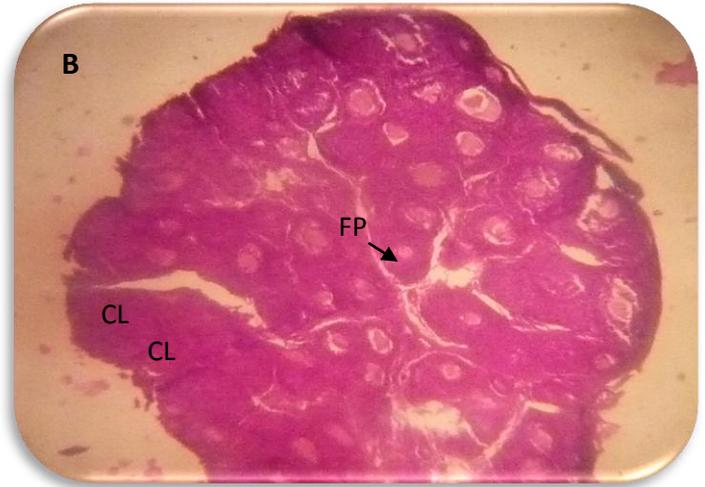
La administración de VE en los animales con sección uni o bilateral del NOS, resultó en la presencia de quistes foliculares y ausencia de cuerpos lúteos (**Fig. 15 y 16**)

ANIMALES CON SECCIÓN DEL NERVI OVARICO SUPERIOR IZQUIERDO

OVARIO IZQUIERDO

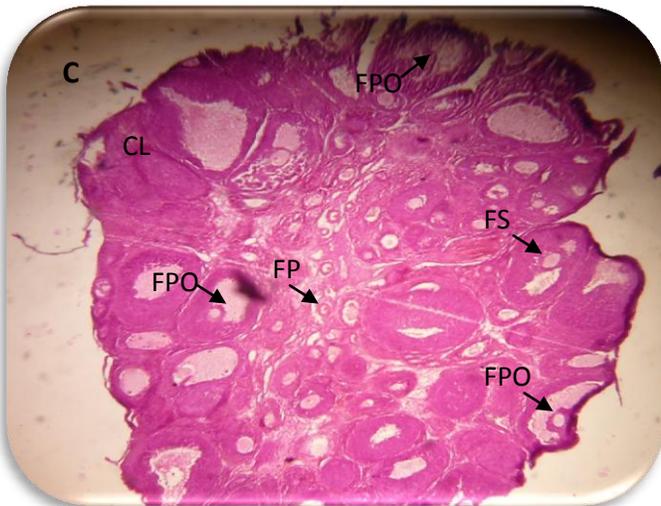


OVARIO DERECHO



ANIMALES CON SECCIÓN DEL NERVI OVARICO SUPERIOR DERECHO

OVARIO IZQUIERDO



OVARIO DERECHO

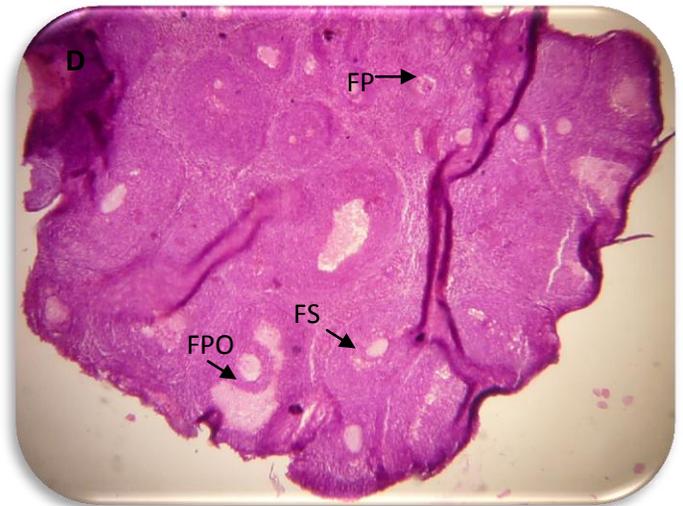


Figura 15. Fotomicrografía del ovario izquierdo (A, C) o derecho (B, D) de animales con sección del NOS izquierdo o derecho (tinción hematoxilina-eosina) realizada a los 4 días de edad y sacrificados al presentar el PEV. Folículos primarios (FP), folículos secundarios (FS), folículos preovulatorios (FPO) y cuerpos lúteos (CL). Aumento 40 X.

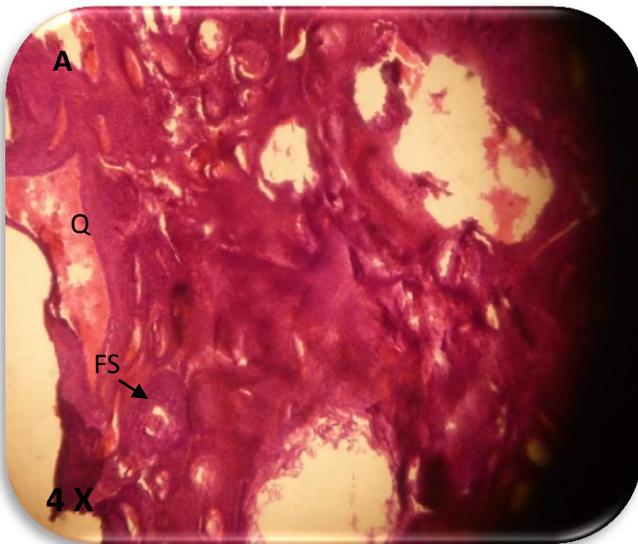
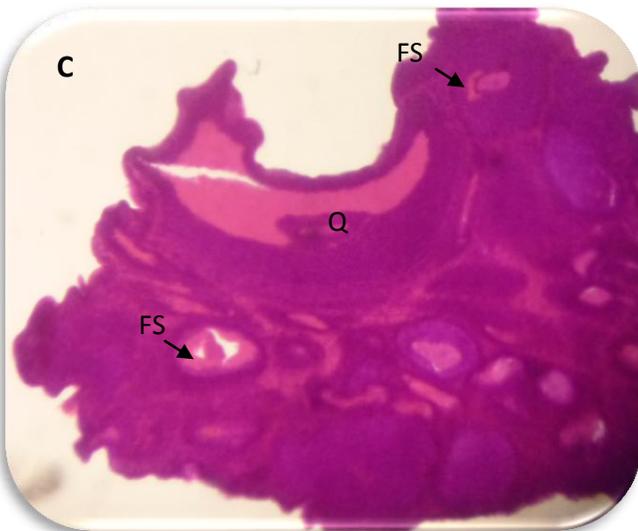
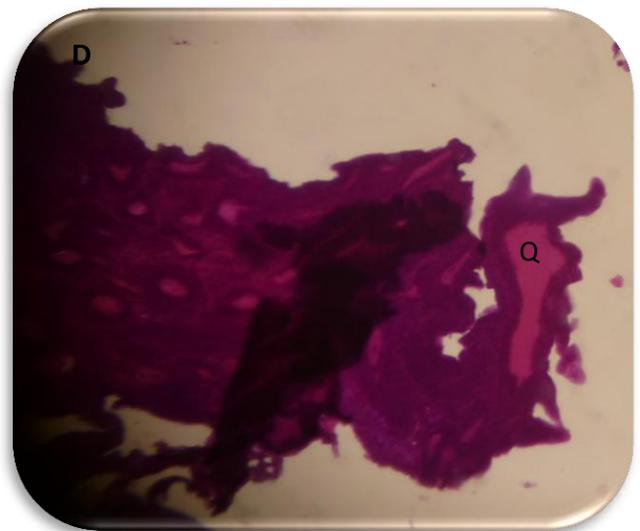
ANIMALES CON SECCIÓN DEL NERVIIO OVÁRICO SUPERIOR IZQUIERDO + VE**OVARIO IZQUIERDO****OVARIO DERECHO****ANIMALES CON SECCIÓN DEL NERVIIO OVÁRICO SUPERIOR IZQUIERDO + VE****OVARIO IZQUIERDO****OVARIO DERECHO**

Figura 16. Fotomicrografía del ovario izquierdo (A, C) o derecho (B, D) de animales con sección del NOS izquierdo o derecho, realizada a los 4 días de edad y tratados seis días después con VE (tinción hematoxilina-eosina). Sacrificados al presentar el PEV. Folículos primarios (FP), folículos secundarios (FS), folículos preovulatorios (FPO), cuerpos lúteos (CL) y quistes foliculares (Q). Aumento 40 X.

ANIMALES CON SECCIÓN BILATERAL DEL NERVIO OVÁRICO SUPERIOR + VE

OVARIO DERECHO

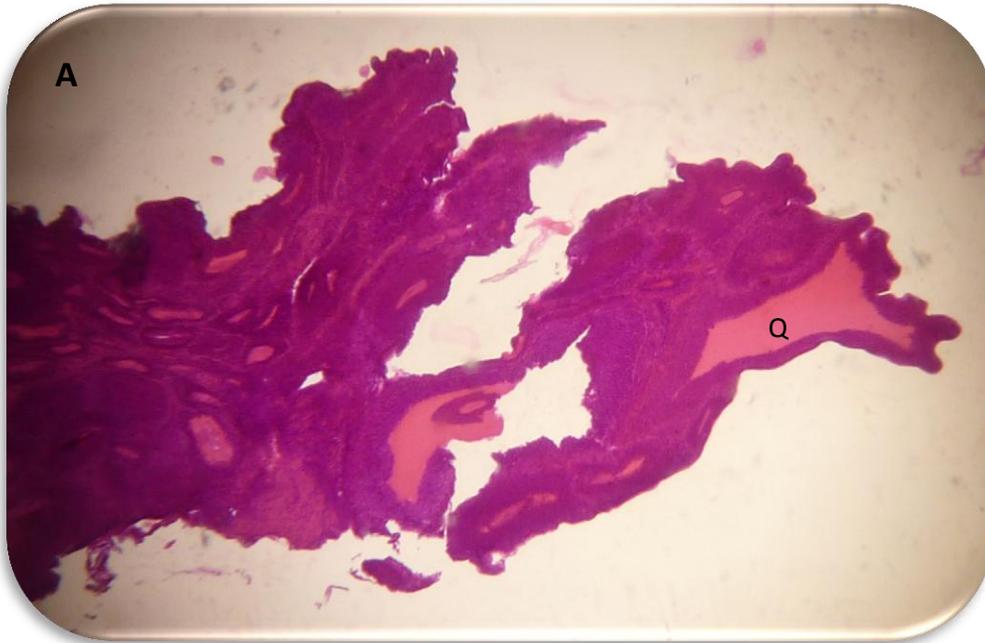


Figura 17. Fotomicrografía del ovario derecho (A) de animales con sección bilateral del NOS realizada a los 4 días de edad y tratados seis días después con VE (tinción hematoxilina-eosina). Sacrificados al presentar el PEV. Folículos primarios (FP), folículos secundarios (FS), folículos preovulatorios (FPO), cuerpos lúteos (CL) y quistes foliculares (Q). Aumento 40 X.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados del presente estudio nos permiten postular que el SOPQ no se debe exclusivamente a una mayor actividad de las fibras simpáticas como se ha postulado **(Lara y col., 1993; 2000., Rosa-E-Silva y col., 2003)**, ya que si abatimos la actividad simpática por la sección del NOS, antes de inducir el SOPQ, no se restablece la ovulación, lo que nos permite rechazar nuestra hipótesis planteada. Sugerimos que hay otra vía neural que se encuentre asociada a la persistencia de esta patología.

En la rata el estradiol es una de las hormonas implicadas en la canalización de la vagina **(Rosa-E-Silva y col., 2003)**, junto con la testosterona **(Becu-Villalobos y Lacau-Mengido., 1990)**. El grupo de **Forneris y col., (2002)** mostraron que en la rata neonata la sección bilateral del NOS resultó en el retraso en la edad de apertura vaginal, aún cuando la concentración de estradiol es alta y la de andrógenos es baja. Con estos resultados los autores sugieren que la canalización de la vagina depende en mayor medida de la concentración circulante de andrógenos. En el presente estudio la sección bilateral del NOS, resultó en el retraso de la edad de apertura vaginal posiblemente por una menor concentración de testosterona ya que no se modificó la concentración de estradiol.

La sección bilateral del NOS realizada en la rata neonata, juvenil o adulta no modificó la respuesta ovulatoria **(Chávez y col., 1991; Morales y col., 1993; Forneris y col., 2002)**. Igual a lo ya reportado, en el presente estudio la sección bilateral del NOS no modificó la ovulación. Estos resultados nos han permitido sugerir que al eliminar la principal fuente de inervación simpática, por la sección bilateral del NOS, participa otro tipo de información neural en la regulación del proceso ovulatorio. Es bien sabido que en algunos sistemas a la falta de algún tipo de información neural existe otra que compensa la respuesta, tal es el caso del uréter de la rata donde al eliminar

la inervación sensorial con capsaicina, se presenta un mayor número de fibras inmunoreactivas a la tirosina hidroxilasa (**Schicho, 1998**).

En el presente estudio se observó que en la rata neonata, la sección izquierda o derecha del NOS, resulta en una disminución en el número de ovocitos liberados por el ovario denervado, como ya se ha mostrado (**Chávez y col., 1991; Morales y col., 1993; Ramírez, 2011**). Dos de los neurotransmisores que transcurren por el NOS: NA y VIP, se encuentran asociados con la formación de receptores a LH y FSH en células de la teca y granulosa respectivamente, es posible que al seccionar uno de los nervios, se produzca una caída en el número de receptores a gonadotropinas (**Barria y col., 1993; Mayerhofer y col., 1997**), lo que posiblemente ocasione una alteración del crecimiento y diferenciación de los folículos que debían ovular, razón por la cual el ovario denervado presenta una menor cuota ovulatoria. En apoyo a esta interpretación los grupos de **Lara (1993)** y **Morán (2000)** han reportado un incremento en la atresia folicular y disminución en el número de folículos sanos en animales con sección uni o bilateral del NOS.

La participación del NOS en la regulación de la secreción de hormonas ováricas depende de la edad del animal cuando se realiza la denervación y del período post-cirugía. En la rata infantil o adulta la sección bilateral del NOS resulta en una menor concentración de P₄ (**Aguado y Ojeda 1984; Morán y col., 2000**), mientras que si la denervación se realiza en la rata peripúber no se modifica la concentración de la hormona (**Vieyra, 2007**). Cuando realizamos la sección bilateral a los cuatro días de edad, se observa que disminuye la concentración de P₄ al primer estro vaginal. Esta disminución podría ser explicada por un decremento en la actividad de la *3β-HSD*, tal y como se ha mostrado que ocurre a nivel del estroma y del cuerpo lúteo en respuesta a la sección bilateral del NOS (**Rosa-E-Silva y col., 2003**). Sin embargo, otros

autores han reportado que la concentración de P₄ y la actividad de la 3 β -HSD no se modifica (**Forneris y col., 2002**).

La sección del NOS derecho en el animal peripúber o adulto no modifica la concentración de P₄ (**Vieyra, 2007; Ramírez, 2011**), cuando realizamos en la rata neonata la sección del NOS derecho se observa disminución en la concentración de P₄, mientras que con la sección izquierda no se altera la concentración de la hormona. Estos resultados indican que el NOS regula de manera asimétrica la secreción de progesterona, lo que podría ser en parte explicado por la existencia de un aporte neural diferente entre los ovarios. En apoyo a esta interpretación, se sabe que la inyección en la bursa ovárica izquierda con True Blue (TB), marcador retrógrado, tiñe los somas de las neuronas que conforman el NOS, localizadas en el ganglio izquierdo, mientras que, cuando se inyecta el trazador en la bursa ovárica derecha, la marca aparece tanto en el ganglio izquierdo como en el derecho (**Morán y col., 2009**).

En la rata la sección izquierda o derecha del NOS resultó en una disminución de peso por parte del ovario denervado. Esta respuesta es similar a lo reportado por nuestro grupo de trabajo (**Morales y col., 1993**). Este decremento en peso posiblemente pueda ser atribuido a un menor crecimiento de los folículos, ya que la NA que viaja por el NOS actúa como agente mitogénico en las células de la granulosa, favoreciendo el desarrollo de los folículos (**Zhang y col., 2010**).

En la rata infantil o adulta la administración de VE resultó en una mayor concentración de estradiol y testosterona (**Barria y col., 1993; Morales y col., 2010**). Al igual que lo reportado, en nuestros animales, a los que previamente se les realizó la operación simulada, incrementó la concentración de estradiol en respuesta a la administración del VE. Es posible que estos estrógenos hayan tornado más sensible a la vagina lo que explicaría el adelanto en la pubertad, tal y como ya se ha mostrado (**Sotomayor y col., 2008**).

En la rata infantil la administración intraperitoneal de VE resulta en el bloqueo total de la ovulación cuando los animales llegan a la etapa adulta (**Rosa E-Silva y col., 2003; Morales y col., 2010**). El bloqueo de la ovulación puede ser atribuido al incremento en la atresia folicular y a la formación de los quistes foliculares, tal y como lo señala **Brawer y col., (1986)**. Este bloqueo se observó aún cuando nosotros realizamos una laparotomía en la etapa neonata, previa a la administración del fármaco.

En el presente estudio la administración de VE en ratas sometidas previamente a la operación simulada izquierda, derecha o bilateral resultó en un decremento en las concentraciones de P₄, similar a lo que ocurre cuando no se realiza la operación simulada (**Morales y col., 2010**). Pensamos que esta disminución podría ser el reflejo de la ausencia de los cuerpos lúteos, los cuales son la principal fuente de progesterona en el ovario (**Levy y col., 2006**).

En animales sometidos a la operación simulada uni o bilateral y posteriormente tratados con VE fue menor el peso de ambos ovarios. Es posible que el decremento esté dado por una disminución en el compartimiento folicular, ya que previamente se ha mostrado que en el ovario de un animal con síndrome hay escaso crecimiento folicular y ausencia del compartimiento luteal (**Barria y col., 1993; Lara y col., 1993**).

En la rata neonata sin la patología, el NOS regula de manera inhibitoria la secreción de estradiol (**Forneris y col., 2002**), mientras que en el animal con SOPQ el NOS modula de manera estimulante la secreción de estradiol, ya que la sección unilateral o bilateral del NOS, disminuye la concentración de la hormona (**Barria y col., 1993; Morales y col., 2010**). El efecto estimulante del NOS no se observa si antes de inducir el SOPQ se realiza la sección del nervio, ya que en este caso aumentó la concentración sérica de estradiol. Con estos resultados sugerimos que en el animal con SOPQ, el papel del NOS en la respuesta esteroideogénica del ovario, va a depender si la patología se induce antes o después de la sección del nervio.

La mayor secreción de estradiol que se observa en la rata con SOPQ ha servido para explicar el adelanto en la pubertad (**Barria y col., 1993; Morales y col., 2010**). Este adelanto se sigue observando aún cuando el animal se denervó seis días antes de inducir el SOPQ.

Una de las hipótesis para explicar el origen del SOPQ es la hiperactividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario por el NOS (**Lara y col., 1993; 2000**). Esto se apoya en el hecho que en animales tratados con VE, al eliminar de manera bilateral el NOS se restablece la ovulación espontánea (**Rosa E-Silva y col., 2003; Morales y col., 2010**). Sin embargo, en animales con sección bilateral del NOS previo a la inducción del síndrome, por la administración del VE, no se recupera la función ovulatoria, es decir permanece el bloqueo. Estas evidencias apuntan a que el síndrome no es debido sólo a una mayor actividad simpática.

En la rata con SOPQ la sección unilateral del NOS, resulta en el restablecimiento de la ovulación por parte del ovario innervado y no así por el denervado (**Morales y col., 2010**). Hecho que nos llevó a plantear que la patología puede ser atribuida a otros factores hormonales o neurales. Esta idea se ve apoyada por el restablecimiento de la función ovulatoria en el animal con SOPQ, en respuesta a la sección del nervio vago (**Linares, 2011**).

En el presente estudio, observamos que la denervación unilateral del NOS, realizada previa a la inducción del síndrome, no restablece la ovulación en ninguno de los dos ovarios. Es posible que la falta de ovulación se deba a las altas concentraciones de estradiol presentes, ya que se ha mostrado que éstas aumentan la síntesis del NGF y de su receptor de baja afinidad el p75. Así, la unión del NGF a su receptor que se encuentra en la terminal de las neuronas, provoca una cascada de señalización que viaja de forma retrograda por el NOS, hacia el soma de las neuronas simpáticas localizadas en el ganglio celiaco, donde aumenta la síntesis de NA que va a llegar al

ovario por el NOS y que será responsable de la formación de quistes foliculares (**Lara y col., 1993; 2000**). No podemos descartar que en nuestro modelo se haya producido una actividad por parte de las fibras simpáticas aportadas por el plexo ovárico.

En la rata infantil tratada con VE y sometida a la sección del NOS-derecho o de ambos nervios, disminuye la concentración de P4 (**Morales y col., 2010**). Cuando realizamos la denervación previa a la inducción del síndrome la concentración de P4 es menor, independiente del nervio seccionado. Esto podría ser atribuido a que al no haber ovulación no hay cuerpos lúteos, principal fuente de P4 a nivel ovárico (**Levy y col., 2006**).

La sección unilateral del NOS más la inyección de VE resultó en disminución del peso del ovario denervado. Es posible que el decremento esté dado por una disminución en el número de folículos sanos y aumento en la atresia folicular que se produce en respuesta a la falta de información neural que transcurre por el NOS (**Morán y col., 2000**).

Los resultados del presente estudio sugieren que el SOPQ no se debe exclusivamente a una hiperactividad de las fibras simpáticas que transcurren por el NOS, ya que su eliminación previa a la inducción del síndrome no evita su aparición. Con nuestros resultados es posible sugerir que a la falta del NOS, tanto el PO como el NV participen en el mantenimiento de la patología, ya que no podemos descartar que las fibras de estos nervios hayan aumentado la secreción de catecolaminas en la ausencia de la vía principal que llega al ovario.

MODELO

En la figura 18. Se puede observar que la previa denervación simpática, por medio de la sección de nervio ovárico superior, realizada a los 4 días de edad, no evita el desarrollo del SOPQ si este es inducido 6 días después de la cirugía. Lo que nos permite plantear que probablemente existen otras vías neurales que se encuentren implicadas en el desarrollo de la patología, como lo son el PO y NV ya que por estas vías también viajan catecolaminas.

1. Sección izquierda, derecha o bilateral realizada en ratas neonatas de 4 días de edad.
2. Inyección de 2.0 mg de VE en ratas infantiles de 10 días de edad.
3. Nervio vago (NV), el cual llega al ganglio nodoso (GN). Algunas de las fibras del NV llegan al ganglio celiaco (GC), a partir del cual se proyectan fibras que llegan al ovario y posiblemente estén relacionadas con el desarrollo del SOPQ.
4. Plexo ovárico (PO), sus somas se localizan en el GC y envía sus fibras hacia el ovario. Es posible que este nervio se encuentre implicado en el desarrollo del SOPQ.

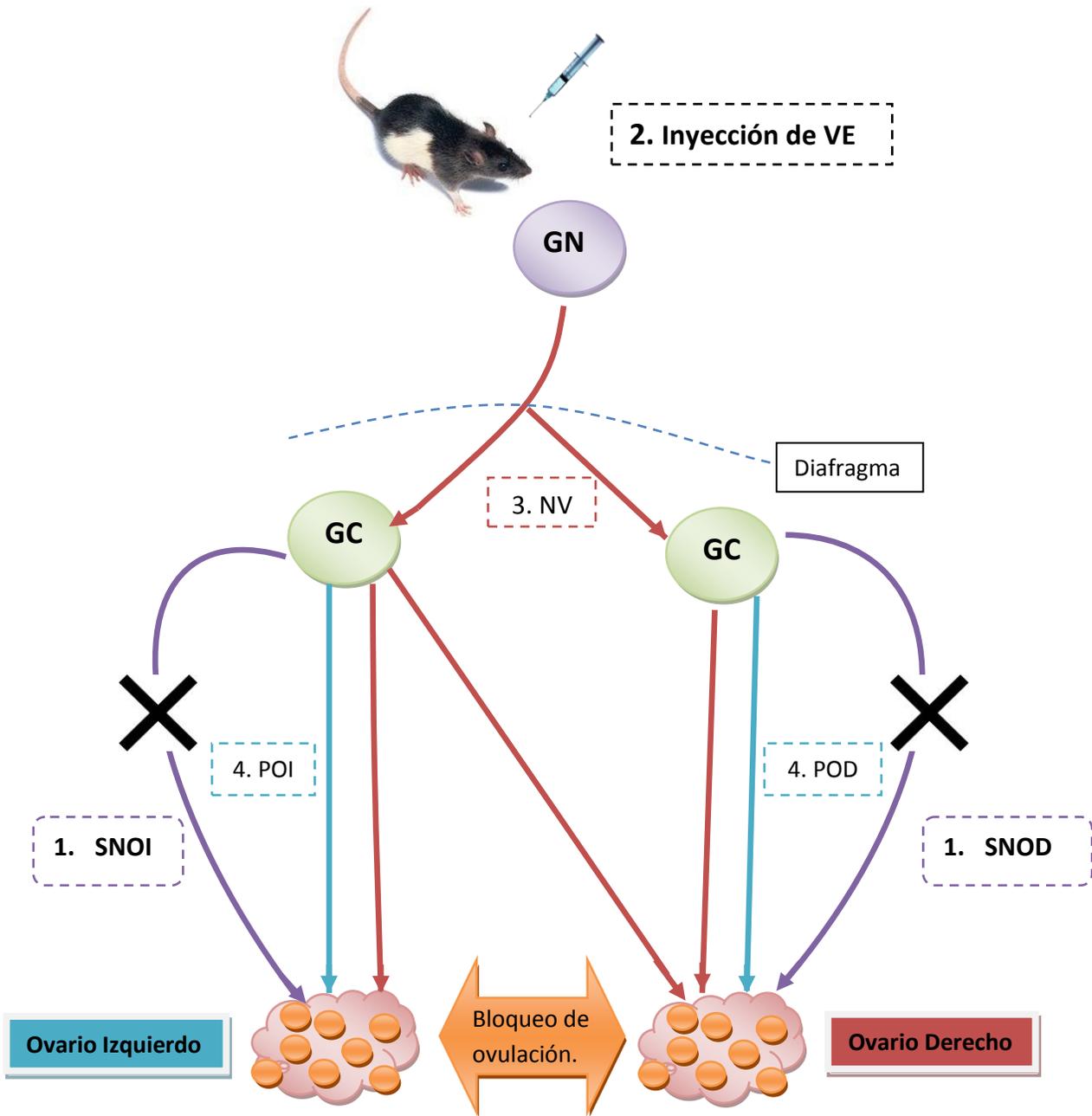


Figura 18. En este modelo se resume el probable mecanismo por el cual se desarrolla el SOPQ previo a la denervación simpática proveniente del NOS. — Línea roja nervio vago (NV); — Línea azul plexo ovárico izquierdo (POI), o plexo ovárico derecho (POD); X denervación del nervio ovárico superior izquierdo (NOSI) o derecho (NOSD); ganglio celiaco (GC); ganglio nodoso (GN);  inyección de valerato de estradiol.

CONCLUSIONES

- La información simpática que transcurre por el NOS modula de manera estimulante los eventos que conllevan a la canalización de la vagina y por consiguiente la maduración sexual.
- En el animal neonato sin el SOPQ, la inervación simpática regula de manera estimulante la ovulación espontánea.
- En el animal sin la patología el NOS derecho regula de manera estimulante la secreción de progesterona.
- En el animal sin la patología el NOS izquierdo y derecho regulan de manera inhibitoria la secreción de estradiol.
- En el animal con SOPQ con su inervación intacta, se regula de manera inhibitoria la secreción de progesterona, efecto que se mantiene si se realiza la sección del NOS previo a la inducción del síndrome.
- En el animal con SOPQ con su inervación intacta, se regula de manera estimulante la secreción de estradiol, efecto que se mantiene si se realiza la sección del NOS previo a la inducción del síndrome.
- El SOPQ, no es únicamente el resultado de una hiperactividad de las fibras simpáticas.

REFERENCIAS

- ☞ Aguado LI, Ojeda SR. (1984) "Prepubertal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. Role of noradrenergic innervations". *Endocrinology* 114 1845–1853.
- ☞ Bahr JM, Ben-Jonathan N. (1985) "Elevated catecholamines in porcine follicular fluid before ovulation". *Endocrinology*. 117:620–623.
- ☞ Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE. (1993) "Ovarian steroidal response to gonadotropins and adrenergic stimulation is enhanced polycystic ovary syndrome: Role of sympathetic innervations". *Endocrinology*. 133:2696–2703.
- ☞ Becu-Villalobos D, Lacau-Mengido M. (1990) "Control Hormonal del Desarrollo Puberal en la Rata Hembra". *Acta Physiology Pharmacology Latinoamerican*. 40: 1-17.
- ☞ Blake C.A. (1998) "Gonadotropin Secretion, Control of" En: *The physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill JD. (Eds.). Raven Press. Vol. 2 Pp. 539.
- ☞ 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.
- ☞ Burden HW. (1985) "The adrenergic innervation of mammalian ovaries". In: Ben-Jonathan N, Bahr JM, Weiner RI, editors. *Catecholamines as Hormone Regulators*. New York: Serono Simposia Publications from Raven Press; Pp. 261–278.
- ☞ Chávez R, Carrizosa L, Domínguez R. (1991) "Effects of superior ovarian nerve section on spontaneous and induced ovulation in adult rat". *Medical Science Research*. 19: 41-42.
- ☞ Conn M. P, Jennes L, Janovick J. A. (1998) "GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone)". En: *The physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill JD. (Eds.). Raven Press. Vol. 2 Pp. 464.
- ☞ Conn M. P, Freeman M. E. (2000) "The hypothalamus as an endocrine organ: the science of neuroendocrinology". En *neuroendocrinology in physiology and medicine* (Edits) M. P. Conn and M. E. Freeman. Humana Press Pp. 8.

- ☞ Dohler K. D. y Wuttke W. (1974) "Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats". *Endocrinology*. 94:1003-1008.

- ☞ Domínguez R. (1997) "Endocrinología de las gónadas". En: Actualización en Fisiología. UNAM Pp. 271.

- ☞ Dyer CA, Erickson GF. (1985) "Norepinephrine amplifies human chorionic gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by ovarian theca-interstitial cells". *Endocrinology*. 116:1645-1652.

- ☞ Fawcett D. W. (1995). *Tratado de Histología*. Ed. McGraw-Hill Interamericana. 12ª edición. Pp. 886.

- ☞ Ferin M. (1998) "Ovarian Cycle, Mammals". En: *Encyclopedia of Reproduction* Knobil E, Neill JD. (Eds.). Academic Press. Vol. 3 Pp. 549,550.

- ☞ Forneris M.L, Aguado L.I. (2002) "Neonatal superior ovarian nerve transection disturbs the cyclic activity of the female rats". *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 82: 75-82.

- ☞ Freeman M. (1994) "The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat". En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill JD. (Eds.). Raven Press. Vol. 2 Pp. 615,620.

- ☞ Gartner LP. (1995) "Aparato Reprodutor Femenino". En: *Atlas de color de Histología*. 2ª. Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Cap. 17. Pp. 316.

- ☞ Geneser F. (2000) "Órganos de la Reproducción. En: *Histología sobre Bases Biomoleculares*. 3ª. Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Cap. 22. Pp: 616.

- ☞ Gennaro A.R. (1998) *Remington. Farmacia*. 19ª. Edición Tomo 2. Editorial Médica Panamericana. Argentina. pp. 1647.

- ☞ Guyton A. C. (2001) "Fisiología femenina antes de la gestación y hormonas femeninas". En: *Tratado de Fisiología Médica*. 10ª. Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México. Cap. 81. Pp. 1120-1122.

- ☞ Halasz B. (1998) "Pituitary gland, overview" En: Encyclopedia of Reproduction Knobil E, Neill JD. (Eds.). Academic Press. Vol. 3 Pp. 824-826.
- ☞ Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Azhar S. (2010) "Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones". Nutrition and Metabolism. 1;7:47.
- ☞ Hoar W, (1978) "Fisiología General y Comparada" Ediciones Omega, S.A., Barcelona, pp. 765.
- ☞ Jubiz W. (1988) "La Adenohipófisis" En: Endocrinología Clínica 2ª. Edición. Editorial. El Manual Moderno. México. Cap. 2. Pp. 11-12.
- ☞ Juengel J.L, Mcintosh E.W, Niswender G.D. (1998) "Corpus Luteum" En: Encyclopedia of Reproduction Knobil E, Neill JD. (Eds.). Academic Press. Vol. 1 Pp. 703,706,707.
- ☞ Kilen S. M, Schwartz N. B (1998) "Estrous Cycle". En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) Encyclopedia of Reproduction. Academic Press. Vol. 2 Pp. 127-131.
- ☞ Lara HE, Belmar J. (1991) "Release of norepinephrine from the cat ovary: Changes after ovulation". Biol. Reprod. 44:752–759.
- ☞ Lara HE, Ferruz J, Luza S, Bustamante DA, Borges, 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. 141: 1059 – 1071.
- ☞ 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 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.
- ☞ Levy N.M, Staton A.B, Koeppen M.B. (2006) "Reproducción Femenina". En: *Fisiología*. 4ª edición. Editorial Elsevier Mosley. México D.F. Cap. 51. Pp. 647, 654, 701, 725-731.
- ☞ Linares R. (2011) "Interacción entre los nervios ovárico superior y vago 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.
- ☞ Matalliotakis, A. Courtis, Ourania Kokura, Panidis D. (2006) "Polycystic ovary syndrome: etiology and pathogenesis". *Arch Gynecol Obstet*. 274: 187 - 197.
- ☞ 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*. 120: 1703 – 1710.
- ☞ Morales L, Chávez R, Domínguez R. (1993) "Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve". *Med. Sci. Res*. 21: 15 -17.
- ☞ Morales L, Chávez R, Ayala M.E, Domínguez R. (1998) "Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in prepubertal rats on the ovulatory response to gonadotrophin administration". *J. of Endocrinology*. 158: 213- 219.
- ☞ Morales L, Linares R, Rosas G, Morán C, Chavira R, Cárdenas M, Domínguez. (2010) "Unilateral sectioning of the superior ovarian nerve of rats with polycystic ovarian syndrome restores ovulation in the innervated ovary". *Reproductive Biology and Endocrinology* 8:99.
- ☞ Morán C, Morales L, Quiróz U, Domínguez R. (2000) "Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in infantile rats on follicular growth". *Journal of Endocrinology*. 166: 205-211
- ☞ Morán C, Zarate F, Morán J, Handal A, Domínguez R. (2009) "Lateralization of the connections of the ovary to the celiac ganglia in juvenile rats". *Reproductive Biology and Endocrinology*. 7: 50.

- ☞ Ojeda SR, Andrews WW, Advis JP, White SS (1980) “Recent advances in the endocrinology of puberty”. *Endocrine Rev.*, 1:228-257.
- ☞ Oliver R. H, Chen G. D, Yeh J. (1998) “Follicular atresia”. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press. Vol. 2 Pp. 373, 374.
- ☞ Ramírez D. (2011) “¿La participación del nervio ovárico superior en la regulación de la ovulación y la esterogénesis depende del ciclo circádico? La rata adulta como modelo de estudio”. Tesis de Licenciatura. UNAM. FES Zaragoza.
- ☞ Ross M.H, Gordon I.K, Wojciech P. (2004) *Histología: texto y atlas a color con biología celular y molecular*. 4ª ed. 1ª reimp. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- ☞ Rosa-E-Silva A, Guimaraes MA, Padmanabhan V, Lara HE. (2003) “Prepubertal administration of valerate disrupts cyclicity and leads to cystic ovarian morphology during adult life in the rat: role of sympathetic innervation”. *Endocrinology*. 44: 4289-4297.
- ☞ Sánchez Criado J.E. (1999) “Fisiología del ovario”. En: Tresguerres J.A. 1ra. Edición editorial Mc Graw-Hill. Interamericana Madrid Pp. 1024,1037
- ☞ Shirwalkar H, Modi DN, Maitra A. (2007) “Exposure of adult rats to estradiol valerate induces ovarian cyst with early senescence of follicles”. *Molecular and Cellular Endocrinology* 30;272(1-2):22-37
- ☞ Schicho R, Kanai Y, Ishikawa T, Skofitsh G, Donnerer J. (1998) “Involvement of NGF in the induction of increased noradrenergic innervation of the ureter in neonatally capsaicin-treated rats”. *Journal of the Anatomic Nerve System*. 27; 73(1): 46 - 53.
- ☞ Schulster A, Farookhi R, Brawer JR. (1984) “Polycystic ovarian condition in estradiol valerate- treated rats: spontaneous changes in characteristic endocrine features”. *Biology of reproduction* 31:587-593.
- ☞ Smith C.L. (1998) “Estrogens Overview”. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press. Vol. 2 Pp. 121.
- ☞ Sotomayor R, Dorfman R, Paredes A, Lara H. (2008) “Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervations and follicular development in the adult rat”. *Biology of Reproduction* 78, 673–680 (2008).

- ☞ Stener-Victorin E, Kobayashi R, Watanabe O, Lundeberg T, Kurosawa M. (2004) "Effect of electro-acupuncture stimulation of different frequencies and intensities on ovarian blood flow in anaesthetized rats with steroid-induced polycystic ovaries". *Reproductive Biology and Endocrinology* 2:16

- ☞ Strömstedt M, Byskov G. A. (1998) "Oocyte Mammalian". En: *Encyclopedia of Reproduction* Knobil E, Neill JD. (Eds.). Academic Press. Vol. 3 Pp. 473-475.

- ☞ Tresguerres J. A. (1999) "Fisiología Humana". Ed. McGraw-Hill Interamericana. 2° edición. Pp. 1036-1048.

- ☞ Tresguerres J. A. (2003). "Fisiología Humana". Ed. McGraw-Hill Interamericana. 2° edición. Pp. 1038.

- ☞ Tsutsumi R, and Webster J.G. (2009) "GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction". *Endocrine Journal* 56 (6), 729-737.

- ☞ Van Voorhis J. B. (1998) "Follicular Development". En: *Encyclopedia of Reproduction* Knobil E, Neill JD. (Eds.). Academic Press. Vol. 2 Pp. 388,391-394.

- ☞ Velasco. (1997) "Anatomía Funcional del Sistema Nervioso En: Actualización en Fisiología". Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. (Eds.). Pp:141-143.

- ☞ Vieyra E. (2007) "Efecto agudo de la sección uni o bilateral del nervio ovárico superior sobre la concentración de hormonas esteroides. la rata prepúber como modelo de estudio". Tesis de Licenciatura. UNAM. FES Zaragoza.

- ☞ Ying Y.S, Zhang Z. (1998) "Ovarian Hormones, Overview". En: *Encyclopedia of Reproduction* Knobil E, Neill JD. (Eds.). Academic Press. Vol. 3 Pp. 578,579.

- ☞ Yen SSC. (2001) "Neuroendocrinología de la reproducción" In: Yen SSC, Jaffe RB, editores. *Endocrinología de la reproducción fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. 4ta. Edición. Editorial. Médica Panamericana. Pp. 37, 38, 46.

- ☞ Yen SSC. (1999) "Polycystic ovary syndrome (hyperandrogenic chronic anovulation)". In: Yen SSC, Jaffe RB, editors. *Reproductive endocrinology*. Philadelphia: WB Saunders Co. 4th ed. Pp. 466,467.

- ☞ Yeh J. y Adashi E. Y. (2001) El ciclo ovárico. En: Endocrinología de la Reproducción, fisiología, fisiopatología y manejo clínico. 4ta. Edición. Editorial. Médica Panamericana. Pp. 168-202.

- ☞ Zhang X, Zhang L, Huo S, Wang J, Cui S. (2010) "Neonatal superior ovarian nerve transection inhibits follicle development by enhancing follicular atresia and suppressing granulosa cell proliferation in rats." *Reproduction, Fertility and Development*. 22: 1148–1158.