



03086
6
24

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES
Y DE POSGRADO**

CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

**PARTICIPACION DEL NERVIIO OVARICO SUPERIOR
EN LA REGULACION DE LA FUNCION DEL OVARIO
DE LA RATA PREPUBER. EL MODELO DEL ANIMAL
ESTIMULADO CON GONADOTROPINAS Y SUS
EFECTOS SOBRE LA OVULACION Y EL
CRECIMIENTO FOLICULAR.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
P R E S E N T A :
LETICIA MORALES LEDESMA**

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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

**Colegio de Ciencias y Humanidades
Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado**

**PARTICIPACIÓN DEL NERVIO OVÁRICO SUPERIOR EN LA
REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN DEL OVARIO DE LA RATA PREPÚBER.
EL MODELO DEL ANIMAL ESTIMULADO CON GONADOTROPINAS Y
SUS EFECTOS SOBRE LA OVULACIÓN Y EL CRECIMIENTO
FOLICULAR**

Autor: LETICIA MORALES LEDESMA

Directora: Dra. REBECA CHÁVEZ GENARO

**La tesis fue desarrollada en la Unidad de Investigación en Biología de
la Reproducción de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.**

**Durante la realización de esta tesis se tuvieron los siguientes apoyos
económicos: DGAPA, proyecto IN 210893; CONACyT, proyecto IN 1719;
PUIS UNAM y PADEP, proyectos DCCH9239, 030369, 030378 y 030318.**

Feliz el hombre que ha hallado la sabiduría, dichoso el que adquiere la inteligencia. Mejor es poseerla que tener plata; el oro no procura tantos beneficios. No existe perla más valiosa y nada de lo que codicias se le puede comprar.

Prov. 3.13-15

A mis padres

*Gracias por enseñarme el valor que tiene
la vida familiar.*

A mis hermanos

Porque siempre nos encontremos unidos

Agradecimientos

A Rebe mi agradecimiento por la ayuda brindada para poder alcanzar una meta más.

Al Dr. Roberto Domínguez por lo que significa el apoyo otorgado.

A los miembros del jurado:

Dr. Manuel Salas Alvarado

Dr. Carlos Manuel Valverde Rodríguez

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera

Dr. Horacio Merchant Laríos

Dr. Enrique Pedernera Astegiano

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Dra. Rebeca Chávez Genaro

Porque me obsequiaron parte de su valioso tiempo y acertadas sugerencias sobre este trabajo

A cada uno de mis compañeros del laboratorio de Biología de la Reproducción, porque saben lo importante que son en nuestra convivencia diaria.

A Ma. Luisa por su invaluable cooperación técnica y a todo el personal del bioterio de la Facultad por su contribución en la realización de ésta tesis.

A mis grandes amigas

Angélica y Elena porque comprendamos que la amistad es más que unas horas de trabajo.

Chuy, Claudia y Emma por todos los grandes momentos que hemos vivido.

Esta tesis se basa en los siguientes trabajos:

Morales, L., Chávez, R. y Domínguez, R. (1993). Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve. **Medical Science Research** 21: 15-17.

Chávez, R., Morales, L., González, Ma. E. y Domínguez, R. (1994). Ovarian norepinephrine content in prepubertal rats with superior ovarian nerve section. Temporal studies. **Medical Science Research** 22: 789-790.

Morales, L y Chávez, R. (1994). El nervio ovárico superior como modulador de la acción de las gonadotropinas. **XVIII Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas**, Montevideo, Uruguay.

I N D I C E

| | Pág. |
|--|------|
| RESUMEN | i |
| SUMMARY | III |
| INTRODUCCION | 1 |
| Pubertad..... | 1 |
| Factores hormonales que regulan la función del ovario..... | 3 |
| Factores neurales que regulan la función del ovario..... | 9 |
| • Participación de la innervación catecolaminérgica y peptidérgica en la ovulación..... | 12 |
| • Participación de la innervación catecolaminérgica y peptidérgica en el proceso del crecimiento folicular..... | 18 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 21 |
| HIPOTESIS | 23 |
| OBJETIVOS | 23 |
| METAS | 24 |
| MATERIAL Y METODOS | 25 |
| RESUTADOS | |
| • Variaciones en el contenido y la concentración de catecolaminas ováricas en animales intactos..... | 30 |
| • Efectos de la sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior, sobre el contenido y la concentración de catecolaminas ováricas..... | 33 |
| • Efectos de la administración de PMSG en animales prepúberes con sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior..... | 49 |
| • Efectos de la estimulación por la administración de hCG en animales prepúberes con sección unilateral o bilateral del nervio ovárico..... | 65 |

| | |
|---|------------|
| • Efectos de la estimulación del crecimiento y maduración folicular por la administración secuencial de PMSG-hCG..... | 77 |
| • Efectos de la sección unilateral del nervio ovárico, sobre la respuesta ovulatoria ante la estimulación inmediata con PMSG o hCG..... | 94 |
| DISCUSION..... | 100 |
| CONCLUSIONES..... | 114 |
| PERSPECTIVAS..... | 115 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 116 |
| APENDICE..... | 124 |
| PUBLICACIONES..... | 127 |

RESUMEN

El nervio ovárico superior es el principal aporte catecolaminérgico que recibe el ovario. La sección unilateral de éste nervio provoca disminución del número de ovocitos liberados por el ovario desnervado, acompañado por un aumento compensador por la gónada inervada. En el presente trabajo se analizó si la diferencia en la respuesta ovulatoria entre el ovario intacto y el desnervado se relaciona con cambios en el contenido de noradrenalina ovárica y si estos dependen de la edad del animal en la que se realiza la desnervación. Para ello a ratas hembras de 16 ó 32 días de edad se les practicó la sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior y se sacrificaron 24 ó 72 horas post-cirugía o bien en el día del primer estro vaginal.

Cuando se realizó la sección bilateral del nervio ovárico, el contenido de noradrenalina disminuyó drásticamente en ambos ovarios, independientemente del tiempo de evolución y de la edad en la que se realizó la desnervación. Los animales sacrificados en el día del primer estro vaginal ovularon normalmente.

La sección unilateral del nervio ovárico, realizada en la etapa infantil o juvenil, provocó disminución del contenido del neurotransmisor en el ovario desnervado. El número de ovocitos liberados por el ovario desnervado fue menor comparado con el grupo de operación simulada.

Dado que en este estudio no se observó correlación entre el contenido de noradrenalina en el ovario y la presencia o ausencia de ovulación, podemos proponer que en la regulación del crecimiento y diferenciación del folículo que culmina con la ovulación, participa la información catecolaminérgica que llega por el nervio ovárico superior y otras señales nerviosas.

En la rata prepúber la sección uni o bilateral del nervio ovárico superior se acompaña de la disminución en la población de folículos en crecimiento. Para analizar si esta disminución es el producto de una modificación en la sensibilidad del folículo a las gonadotropinas, se estudió el crecimiento y diferenciación del folículo y la respuesta ovulatoria del animal desnervado al estímulo gonadotrópico con PMSG, hCG o la combinación de ambas, en el día 36 de vida.

En los animales con desnervación uni o bilateral del nervio ovárico, realizada en la etapa infantil o juvenil, el estímulo con PMSG o hCG no restableció la ovulación en la gónada desnervada. La administración secuencial de PMSG+hCG en los animales con sección del nervio ovárico derecho, realizada a los 32 días, indujo superovulación en el ovario inervado (6.6 ± 1.2 vs

14.3 ± 2.6, P<0.05) respecto al grupo desnervado sin tratamiento hormonal, sin que la gónada desnervada respondiera.

La administración de PMSG en las ratas con sección del nervio ovárico no aceleró el crecimiento del folículo ni el rescate de la atresia, ya que en ninguno de los grupos experimentales se observó aumento de la población de folículos ni disminuyó el índice de atresia. Con la sección del nervio ovárico derecho, el tratamiento con hCG provocó en el ovario intacto aumento en el número total de folículos, respecto al grupo sin tratamiento hormonal (69.5 ± 5.5 vs. 47.6 ± 8.3, P<0.05). Mientras que con la sección del nervio ovárico izquierdo el ovario desnervado presentó disminución en total de folículos medibles (25.0 ± 7.0 vs. 44.3 ± 5.5, P<0.05).

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten sugerir que en la rata prepúber la información neural que transcurre por el nervio ovárico superior, modula de manera estimuladora la ovulación. Que la información catecolaminérgica y peptidérgica que llega al ovario por éste nervio, modula la reactividad del folículo a la FSH y LH de manera diferente para el ovario izquierdo y el derecho.

SUMMARY

The rat ovary receives sympathetic innervation from the superior ovarian nerve, which travels along the suspensory ligament. The nerve is predominantly adrenergic and innervates mainly the parenchyma tissue of the ovary, and regulates spontaneous ovulation since the unilateral section of the superior ovarian nerve results in a significant decrease of the number of ova shed by the denervated ovary, meanwhile the intact gland shows compensatory ovulation. In present study the possibility that the difference in the ovulatory ability by innervated and denervated ovary is related with ovarian norepinephrine content, was analyzed. Sixteen and 32-day old rats were submitted to unilateral or bilateral section of the superior ovarian nerve and the animals were killed 24 or 72 h after surgery or at the day of the first vaginal estrous.

Bilateral transection of the superior ovarian nerve resulted in a significant decrease in the ovarian norepinephrine content of both ovaries, independently of the postsurgery evolution and the age when surgery was performed. On the day of first vaginal estrous, the number of ova shed by the rats with bilateral section was similar to control animals. In comparison with sham-operated animals, the unilateral section of the superior ovarian nerve in infantile or juvenile rats resulted in the decrease of norepinephrine content and the number of ova shed by the denervated ovary.

Because a correlation between the ovarian norepinephrine content and the presence or absence of ovulation, was not observed, we can propose that the catecholaminergic information arriving to the ovary through the superior ovarian nerve and other neural signals, participate in the regulation of follicular growth and differentiation ending in ovulation.

The unilateral or bilateral section of the superior ovarian nerve in the prepubertal rat, resulted in a diminution of the number of follicles measured. To analyze whether such diminution is related to a modification in the sensibility of the follicle to gonadotrophins, the response of the denervated ovary of the immature rat to the gonadotrophin stimulation when the animals were 36 days old, was analyzed.

The stimulation with PMSG or hCG did not restore ovulation in the denervated ovary, except in those rats with a section of the right superior nerve performed on day 32, when the sequential injection of PMSG+hCG induced superovulation by intact ovary (6.6 ± 1.2 vs. 14.3 ± 2.6 , $P < 0.05$, in comparison with denervated ovary without gonadotrophin stimulation). In this animals, the denervated gland did not respond to hormonal stimulation.

Follicular growth and atresia were not modify by PMSG administration to denervated animals. In comparison with the non stimulated animals, in those rats with a section of the right superior ovarian, the treatment with hCG increased the number of follicles measured in the intact ovary (69.5 ± 5.5 vs. 47.6 ± 8.3 , $P < 0.05$). Meanwhile, in those rats with section of the left superior ovarian nerve, the number of follicles measured in the denervated ovary diminished (25.0 ± 7.0 vs. 44.3 ± 5.5 , $P < 0.05$).

Present results suggest that in the prepubertal rat the neural information arriving by the superior ovarian nerve, modulates ovulation in a stimulatory way. That catecholaminergic and peptidergic information arriving to the ovary through this nerve, modulates the reactivity of the follicles in the left or right ovary to FSH and LH, in a different way.

INTRODUCCION

Pubertad

La pubertad se define como la fase biológica que une a la inmadurez con la madurez sexual y se caracteriza por cambios neuroendócrinos en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, muchos de los cuales se inician desde el nacimiento o incluso desde la etapa embrionaria (Ojeda y Urbanski, 1986; 1994; Ramaley, 1980; Ramírez, 1973).

La edad en la que se presenta la pubertad depende de la especie en estudio. En el ratón se presenta entre los 32 y 35 días de edad, mientras que en la rata es alrededor de los 40-45 días. Una de las señales externas utilizada como indicador del inicio de esta etapa del desarrollo, es la canalización de la vagina, la cual se produce en respuesta a la estimulación estrogénica. Al día de la canalización de la vagina en el frotis vaginal predominan las células anucleadas, lo que indica que el animal se encuentra en la etapa de estro, en éste primer estro vaginal se puede o no presentar la primera ovulación (Goldman, 1981; Ramírez, 1973).

Ramírez en 1973 con base al estudio de los perfiles hormonales de las gonadotropinas y de las hormonas esteroideas propuso una clasificación de las etapas del desarrollo de la rata, que abarca desde el nacimiento hasta el inicio de la pubertad. Posteriormente el grupo de Ojeda (1986;1994) replantea esta clasificación, tomando además en consideración criterios morfológicos como son el peso del útero y la presencia o ausencia de líquido en el lumen del útero y la divide en cuatro etapas: 1) la etapa neonatal que va desde el nacimiento hasta el día 7 de vida, 2) la etapa infantil que abarca del día 8 al 21 de edad, 3) la etapa juvenil que inicia en el día 22 y termina alrededor de los días 30-32 y 4) la etapa

peripuberal que tiene una duración variable y culmina con la primera ovulación (Ojeda y col, 1983; 1986; 1994).

Día a día se suman las evidencias experimentales que permiten mostrar que en cada una de estas etapas se llevan a cabo mecanismos de regulación a nivel del hipotálamo, la hipófisis y las gónadas que culminan con la actividad reproductora de los animales.

El hipotálamo sintetiza un decapeptido llamado factor liberador de las gonadotropinas (GnRH), que estimula la liberación de la hormona estimulante del folículo (FSH) y de la luteinizante (LH) por parte de los gonadotropos de la adenohipófisis. A su vez, las gonadotropinas actúan en el folículo ovárico promoviendo su crecimiento y más adelante la ovulación. El folículo en crecimiento sintetiza estrógenos los cuales a través de la circulación sistémica llegan a la vagina y estimulan la canalización de la misma y por otro lado, parte de estos estrógenos llegan al hipotálamo y a la hipófisis y establecen así un mecanismo de regulación inhibitorio o estimulatorio (Ojeda y col, 1983; 1986; 1994; Ramaley, 1980).

En la Fig.1 se puede apreciar que las funciones del ovario son moduladas tanto por elementos hormonales como neurales. El hipotálamo se encarga de sintetizar los factores de liberación que van a actuar sobre la adenohipófisis estimulando la liberación de sus hormonas, las que a su vez actúan sobre el ovario facilitando algunas de las funciones indicadas en el esquema. Así mismo, el sistema nervioso central establece una conexión con el ovario a través de los nervios ováricos que arriban a la gónada y éstos participan modulando eventos como el desarrollo folicular y la esteroidogénesis entre otras.

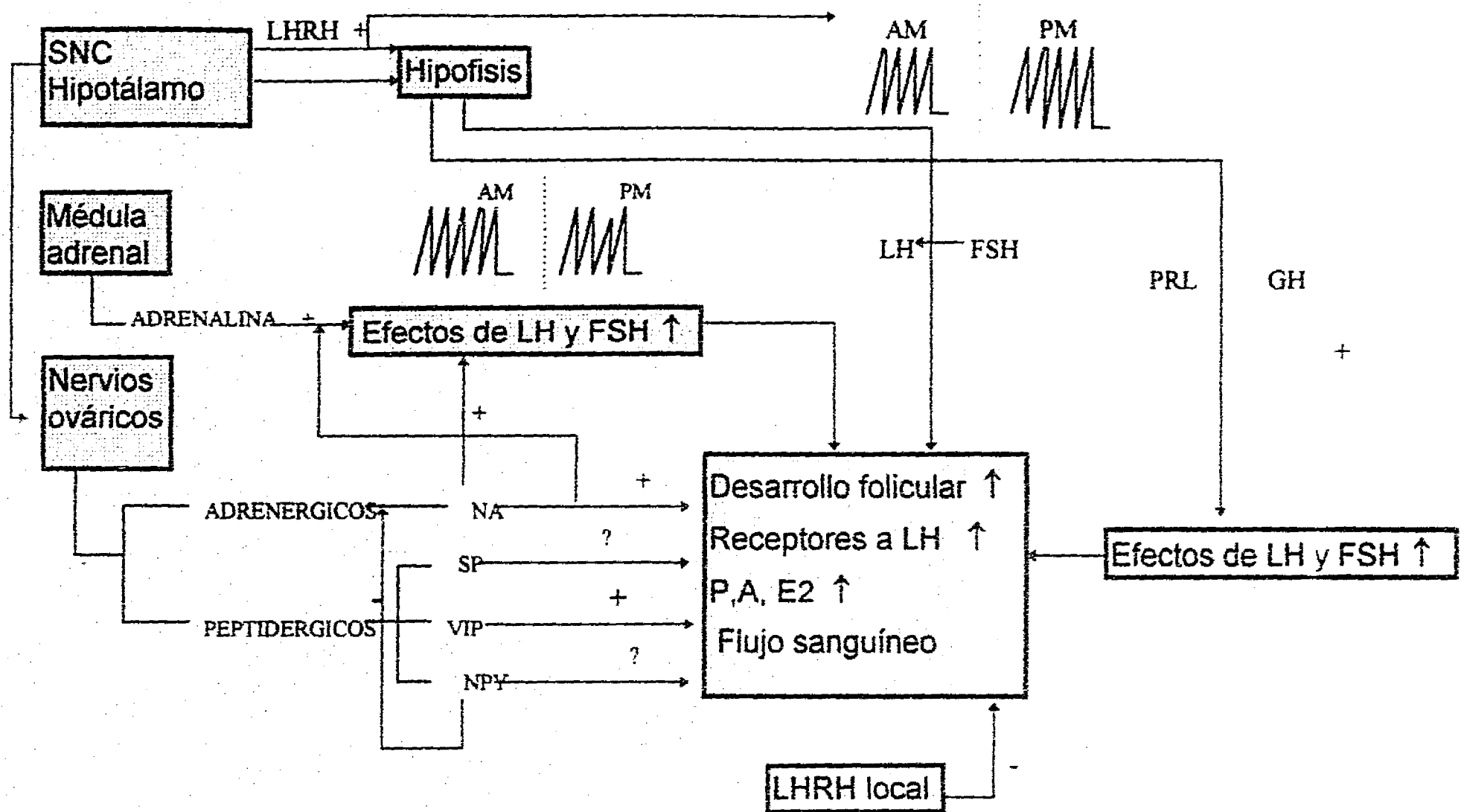


Fig. 1. Factores hormonales y neurogénicos que modulan el desarrollo del ovario en la rata prepúber.
Tomado de Ojeda y Urbansky, 1994

A continuación se mencionan algunos de los factores hormonales y neurales que son considerados como relevantes en el proceso de pubertad.

FACTORES HORMONALES QUE REGULAN LA FUNCIÓN DEL OVARIO

Durante el período neonatal se afirma que la interrelación neuroendócrina entre el hipotálamo, la hipófisis y el ovario no es completamente funcional (Funkenstein y col, 1980), ya que el crecimiento de los folículos ováricos, durante la primera semana del desarrollo no se altera ni por la estimulación con FSH ni por la inmunoneutralización de las gonadotropinas endógenas. En esta etapa aún no se presenta el efecto inhibitorio ejercido por los estrógenos sobre el hipotálamo, debido probablemente a que la mayor parte de estos esteroides se encuentran unidos a la alfa-fetoproteína, lo que impide que se cierre el circuito de retroalimentación inhibitoria (Frawley y Henricks, 1979; Ojeda y Urbanski, 1994).

La FSH plasmática que comienza a elevarse desde el nacimiento, alcanza concentraciones elevadas durante el período infantil (2 veces más altas a las registradas al nacimiento) y posteriormente van disminuyendo y al llegar a la etapa juvenil se alcanzan valores semejantes a los del nacimiento. Es aproximadamente hasta los 35 días de edad, cuando en la hipófisis se produce una liberación brusca de la hormona, lo que conocemos como el primer "pico" preovulatorio de la FSH (Dohler y Wuttke, 1974; Ramaley, 1980).

La concentración de LH en plasma permanece baja y constante en los primeros siete días de vida. Durante la etapa juvenil el modelo de secreción de la LH es de tipo pulsátil, la que se hace más evidente hacia el final de esta etapa. Es durante la fase peripuberal que se produce un incremento en la amplitud de los pulsos y se establece un ritmo de secreción circádico, que es dependiente de los

estrógenos, como lo muestra el hecho de que la administración de un antisuero a estrógenos suprime la liberación circádica de la LH (Ojeda y Urbanski, 1994; Ramaley, 1980).

Recientemente se ha mostrado que la administración de la gonadotropina coriónica humana (hCG por sus siglas en inglés) resulta en la disminución de la concentración de la LH plasmática, sólo cuando se inicia el tratamiento a partir del día 7 de vida, hecho que sugiere la aparición de los receptores a la LH en el ovario desde esta edad (Sokka y Huhtaniemi, 1995), mientras que los receptores a la FSH se encuentran presentes desde los 4 días de vida (Ojeda y Urbanski, 1994).

Durante la etapa juvenil, en el ovario se observa aumento en el número de receptores a la LH, que más tarde se traduce en aumento de la esteroidogénesis (Ojeda y col 1986; 1994; Richards, 1980).

La FSH tiene efecto mitogénico sobre las células de la granulosa y estimula la síntesis de estrógenos al activar la aromatización de los andrógenos por un complejo enzimático, conocido como aromatasa. Los estrógenos junto con la FSH favorecen la síntesis o la expresión de los receptores a la FSH y la LH (Richards, 1980; Greenwald y Roy, 1994).

En la rata adulta el incremento sostenido de la LH, pero no de la FSH, estimula el crecimiento progresivo del folículo, estimulando que el folículo con antrio pequeño alcance el estado preovulatorio. El incremento sostenido de la LH desencadena varias respuestas: aumenta la producción de estradiol, la biosíntesis de andrógenos por la teca y el contenido de receptores a la LH, tanto en las células de la teca como en las de la granulosa (Richards y Bogovich, 1982). Sin embargo, el ovario de la rata prepúber presenta folículos

preovulatorios, en ausencia de altas y constantes concentraciones de LH, lo que hace pensar que el crecimiento del folículo no depende exclusivamente del ambiente hormonal (Ojeda y Urbanski, 1994).

Se ha observado que durante las diferentes fases del desarrollo del folículo, su capacidad de respuesta a las gonadotropinas varía conforme el folículo se va desarrollando e incrementa su capacidad de síntesis (Richards, 1960).

Según se ha postulado, el proceso de foliculogénesis se inicia independientemente de las gonadotropinas (Malamed y col, 1990; 1992), sin embargo, la concentración plasmática de la FSH presente en la etapa infantil, es fundamental para estimular el reclutamiento y crecimiento de los folículos que van a ovular a la pubertad. Según algunos autores, en la etapa infantil los folículos no alcanzan el estado preovulatorio (Ojeda y col 1986), mientras que otros describen su presencia desde los 18 días de edad (Morales y col, 1988).

En la rata adulta cíclica, se requiere de aproximadamente 19 días para que un folículo primordial alcance el estado preovulatorio. Durante este período de tiempo el folículo se encuentra expuesto al menos a cuatro picos preovulatorios de las gonadotropinas y a los esteroides. Si la selección de los folículos en reposo dependiera exclusivamente de las concentraciones plasmáticas de las gonadotropinas, sería casi imposible que existiera ovulación o atresia en la tasa que caracteriza a cada especie. Por lo que al parecer, la regulación del crecimiento y la diferenciación folicular parecen depender fundamentalmente de las condiciones internas de cada ovario, más que de las concentraciones plasmáticas de las gonadotropinas (Dominguez y col, 1991).

Es bien conocido que de la población total de folículos presentes en el ovario, un gran porcentaje de ellos sufren un proceso de degeneración conocido como atresia folicular. La atresia es un fenómeno universal, característico de mamíferos y de vertebrados no mamíferos, y aunque son muchos los estudios enfocados a describir este fenómeno, a la fecha se desconoce las causas exactas que la desencadenan. La atresia se puede observar en cualquiera de los estados de desarrollo de los folículos, de manera que aquellos folículos que logran "escapar" de la atresia van a llegar a ovular (Greenwald y Roy, 1994).

La atresia parece estar primeramente relacionada con alteraciones en el ovocito y posteriormente con la pérdida de receptores a la FSH y LH en las células de la granulosa, lo que se traduce en la disminución de la capacidad de aromatización de los andrógenos y como consecuencia una menor síntesis de estrógenos. Es conocido que un aumento en la síntesis de andrógenos ocasiona un índice mayor de atresia (Erickson, 1982).

Para explicar el fenómeno de atresia folicular, recientemente se ha retomado la hipótesis de que existen dos subpoblaciones de células de la granulosa (Hirshfield, 1992).

Se han descrito folículos cuya población de células de la granulosa no son capaces de marcarse al hacer una infusión con timidina tritiada, lo que indica que no habría división celular. Al parecer estos folículos están destinados a la atresia y formarían el tejido intersticial presente en el ovario de la rata prepúber. Aquellos folículos que tienen células capaces de incorporar la timidina o aquellos que presentan la combinación de los dos tipos de células, podrían llegar a ovular durante la vida fértil del individuo (Hirshfield, 1992).

También se plantea que la presencia de células atípicas con núcleo oblongo (AGCs por sus siglas en inglés) indica que ese folículo va a ir a la atresia (Hurk, y col. 1992).

Hsueh y col. (1994) demostraron que la apoptosis, muerte celular, es un mecanismo de atresia folicular. El tratamiento con gonadotropinas o estrógenos previene la apoptosis en las células de la granulosa, mientras que la administración de andrógenos o GnRH la inducen. Por estudios *in vitro* se ha observado que los folículos preovulatorios pueden presentar apoptosis espontánea y, que ésta puede ser prevenida si se adiciona al medio gonadotropinas, hormona del crecimiento (GH), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I), de interleucina-1 β (IL-1 β), óxido nítrico, factor de crecimiento epidermal (EGF) o el factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF).

En el estudio de los mecanismos hormonales que regulan el crecimiento y la diferenciación del folículo se ha utilizado el modelo del animal prepúber estimulado con gonadotropinas.

En la rata de 21 a 27 días de edad, la administración de 3 u.i de la gonadotropina del suero de yegüa preñada (PMSG), aumenta el peso del ovario 72 h después de su administración, sin cambios en el número total de folículos medidos. Sólo en el animal de 27 días y sacrificado 48 ó 72h después del tratamiento, disminuye la incidencia de atresia de los folículos preovulatorios (>350 μ m de diámetro). Los autores no observaron una correlación entre el número de folículos preovulatorios sanos y el incremento en el peso del útero, lo que probablemente indica que todos los folículos en crecimiento contribuyen a la secreción de estrógenos. Por otra parte, los resultados indican que el crecimiento

folicular en respuesta al estímulo gonadotrópico, y la atresia, dependen de la edad del animal en estudio (Villavicencio y Domínguez, 1993).

Braw y Tsafiri (1980) muestran que en la rata de 26 días, la administración de 15 u.i de PMSG provoca disminución en la atresia de los folículos cuyos diámetros están entre 170-370 μm y disminuye más en los de tamaño preovulatorio (370-500 μm), sin que se observen cambios en los folículos pequeños (120-170 μm). Para que se presenten estos efectos se requiere que hayan transcurrido por lo menos 12h después de la administración de la PMSG. Los autores sugieren que la PMSG puede rescatar al folículo de la atresia al inducir la fagocitosis de las células muertas, permitiendo el rescate de aquellos folículos que se encuentran en las primeras fases de atresia. Así mismo, se postula que 24h después de la administración de la PMSG se puede inducir la proliferación de las células de la granulosa de aquellos folículos medianos en donde se observa aumento del índice mitótico.

Bajo condiciones normales, además de las gonadotropinas existen múltiples factores que contribuyen en la regulación y maduración del ovario.

El desarrollo del ovario de la rata en la etapa neonatal-infantil parece ser modulado por una sustancia que se encuentra en la leche materna y que es semejante al LHRH hipotalámico. En la rata adulta la exposición crónica de altas concentraciones de LHRH disminuye la función del ovario. Por otra parte, se ha mostrado que en la rata neonata-infantil la "LHRH- like" proporcionada por la leche materna juega un papel fisiológico restringiendo el desarrollo de la gónada (Ojeda y Urbanski, 1994).

En la rata prepúber hipofisectomizada la estimulación con FSH induce en el ovario la formación de receptores a LH y la secreción de progesterona. Estos

efectos de la FSH son facilitados por la GH. Aunque algunas de las acciones de la GH sobre el ovario pueden ser directas, hay evidencias de que estas pueden estar mediadas por el IGF-I, éste factor producido por las células de la granulosa, parece amplificar los efectos de la FSH para aumentar la actividad de las aromatasas y la formación de receptores a la LH (Ojeda y Urbanski, 1994).

También se ha postulado que el crecimiento folicular puede depender de la angiogénesis, formación de nuevos vasos sanguíneos. Existen varios factores que poseen actividad angiogénica, pero en el caso del ovario uno de los candidatos parece ser el FGF, éste factor de crecimiento se ha localizado en las células de la teca e induce la migración de las células endoteliales y la formación de plasminógeno.

FACTORES NEURALES QUE REGULAN LAS FUNCIONES DEL OVARIO

Distribución anatómica de la inervación catecolaminérgica y peptidérgica del ovario

El ovario de los mamíferos recibe inervación catecolaminérgica y peptidérgica por medio del plexo ovárico y el nervio ovárico superior, mientras que la inervación parasimpática es aportada por el nervio vago y, según algunos autores, por el plexo hipogástrico a partir de S2-S4 (Burden, 1978; 1985; Klein y Burden, 1988a; Lawrence y Burden, 1980).

El plexo ovárico es rama de los plexos aórtico y renal, cuyos cuerpos celulares preganglionares se localizan en los segmentos T10 y T11 de la médula espinal. El plexo penetra al ovario acompañando a la arteria y a la vena ováricas (Burden, 1985; Lawrence y Burden, 1980).

El nervio ovárico superior es rama del plexo celiaco y sus cuerpos celulares están presentes de los segmentos T7 a L2 del ganglio de la raíz dorsal y

de los segmentos T10 a L3 del ganglio paravertebral (Klein y Burden, 1988a; Lawrence y Burden, 1980).

El nervio ovárico superior, estructura que transcurre en el borde libre del ligamento suspensorio, penetra al ovario junto con la arteria ovárica (Fig. 2) y es considerada como la vía de mayor aporte de fibras noradrenérgicas al ovario (Baljet y Drukker, 1979; Burden, 1985; Klein y Burden, 1988a). La cantidad de fibras que llegan al ovario derecho por el nervio ovárico superior, es mayor que para el izquierdo, aunque la diferencia no llega a ser estadísticamente significativa (Klein y Burden, 1988a).

El uso de técnicas inmunohistoquímicas ha revelado la presencia de fibras catecolaminérgicas en el ovario fetal de rata de 19 días o en la recién nacida (con menos de 15 horas de vida) identificadas por su contenido de tirosina-hidroxilasa, enzima limitante en la biosíntesis de catecolaminas (Malamed y col, 1990; 1992).

Dentro del ovario, los nervios catecolaminérgicos se asocian a los vasos sanguíneos e inervan al estroma ovárico, al tejido intersticial y a la teca folicular, sin llegar hacer contacto directo con las células de la granulosa ni con las del cuerpo lúteo. La densidad de la inervación catecolaminérgica varía en las diversas especies; el ovario de la vaca, la borrega, gata y cobaya está ricamente abastecido por fibras adrenérgicas, las cuales forman un denso plexo en el estroma cortical. Otras especies presentan una densidad menor, tal es el caso del humano, la cerda, la perra y la rata. Por estudios de fluorometría se ha observado que existe una buena correlación entre la densidad de fibras y el contenido de noradrenalina (Bahr y col, 1974; Burden, 1978; 1985; Schulte y col, 1992; Stefenson y col, 1981).

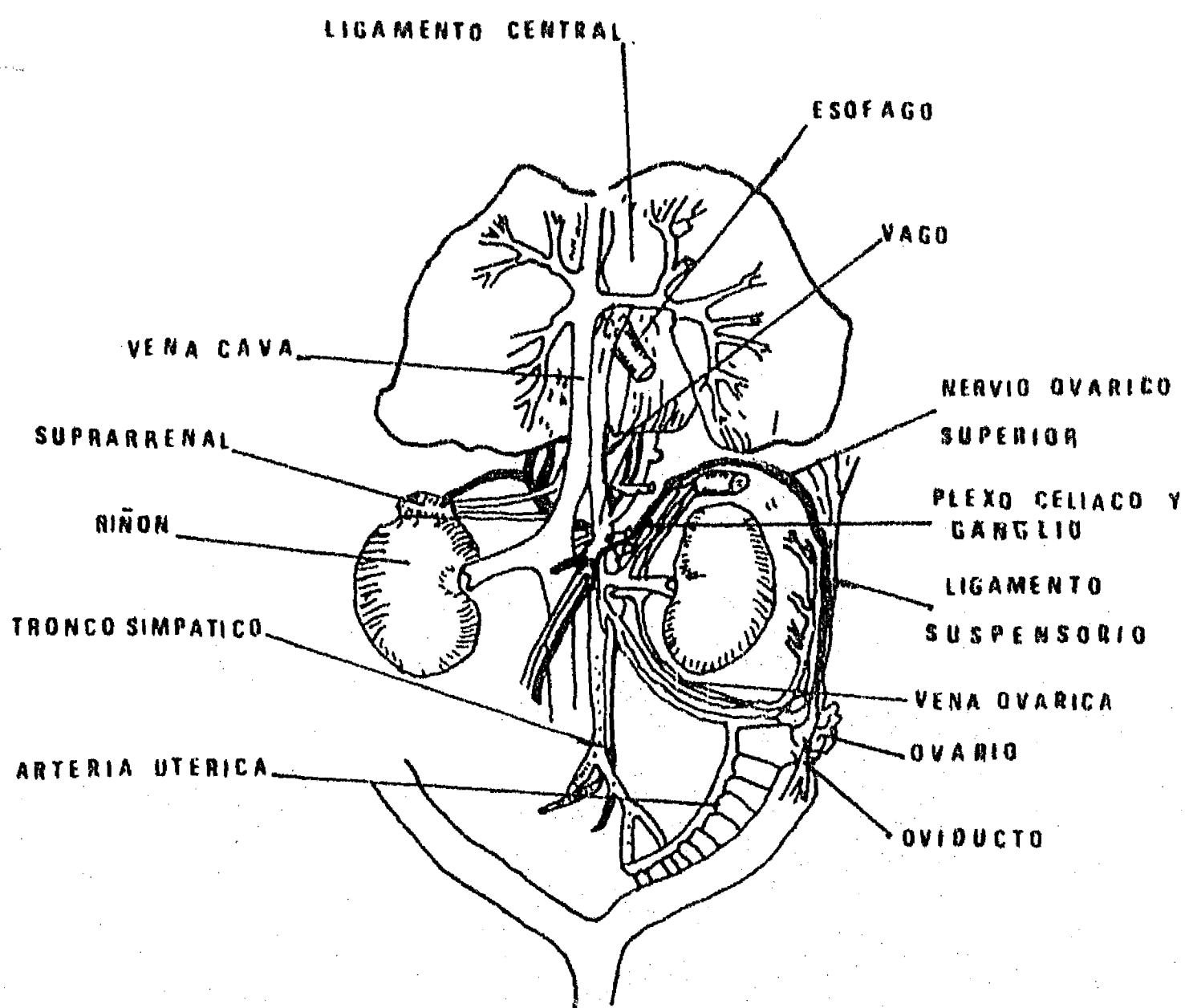


Fig. 2. Representación del curso del nervio ovárico superior en el ligamento suspensorio. Tamado de Lawrence y Burden (1980).

El uso combinado de la técnica de trazadores retrógrados y de inmunocitoquímica ha permitido mostrar que el nervio ovárico superior y el plexo ovárico poseen, además de las fibras catecolaminérgicas, otras de naturaleza peptidérgica. El 20% de los cuerpos neuronales del ganglio de la raíz dorsal que se proyectan al ovario, son inmunoreactivos al péptido intestinal vasoactivo (VIP) y el 23% lo son a la sustancia P (SP) (Klein y Burden, 1988b). Las fibras SP y VIP llegan al ovario por dos vías diferentes. Las VIP lo hacen por el nervio ovárico superior, mientras que las que contienen SP lo hacen por el plexo ovárico (Dees y col, 1986; Klein y Burden 1988b).

En el ovario de la rata las fibras inmunoreactivas a la SP se encuentran asociadas principalmente con los vasos sanguíneos (Kannisto y col, 1986), mientras que las VIPérgicas se distribuyen en el tejido intersticial y en las tecas de los folículos en desarrollo (Ahmed y col, 1986; Dees y col, 1985; 1986; Ojeda y col, 1986). Al igual que para las fibras catecolaminérgicas, la frecuencia relativa de fibras peptidérgicas presentes en el ovario y en el oviducto dependen de la especie en estudio (Stefenson y col, 1981).

En la mona la densidad de fibras Vipérgicas en el ovario varía durante el desarrollo postnatal y al parecer esta inervación participa en la diferenciación inicial de los folículos, facilitando el paso de un folículo primordial a uno primario (Schultea y col, 1992).

En el ovario de la cobaya se ha observado que en los nervios adrenérgicos coexisten la adrenalina con el neuropéptido Y (NPY). La desnervación catecolaminérgica por la administración de 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) provoca desaparición completa de la enzima dopamina- beta-hidroxilasa y la inmunoreactividad al NPY, resultados que apoyan la idea de que ambos

neurotransmisores coexisten en la misma terminal nerviosa (Kannisto y col, 1986).

Además de los péptidos ya mencionados, en el ovario de la rata prepúber, se describe la presencia del gen que codifica al factor del crecimiento neural (NGF). Al parecer, el contenido de este factor se correlaciona con la densidad de la inervación simpática (Lara y col, 1990a), ya que con técnicas de inmunocitoquímica se observa que el NGF estimula el desarrollo de las fibras catecolaminérgicas (Lara y col, 1990c).

Participación de la inervación catecolaminérgica y peptidérgica en la ovulación.

La participación de la inervación ovárica en la regulación de su función, se ha estudiado tanto *in vivo* como *in vitro* utilizando el modelo del animal desnervado, por la eliminación de fibras nerviosas; o bien analizando los efectos de la estimulación de las terminales noradrenérgicas o de sus receptores. Estos estudios han mostrado que la inervación catecolaminérgica participa en la modulación de las funciones del ovario durante la etapa prepuberal (Aguado y Ojeda, 1984b; Bahr y Ben-Jonathan, 1981; 1985; Lara y col, 1990b), en el proceso de esteroidogénesis (Weiss y col, 1982), en el crecimiento folicular (Burden, 1978; 1985; Lara y col, 1990c; 1991), en la ciclicidad vaginal y la ovulación (Domínguez y col, 1989). Por esta razón se ha sugerido que las catecolaminas pueden estar participando en una variedad de procesos, atribuidos tradicionalmente sólo a la interacción directa entre las gonadotropinas y las hormonas gonadales.

Las catecolaminas, específicamente la noradrenalina, ejercen sus efectos actuando sobre sus receptores localizados en las células de la teca y la granulosa

(Aguado y col, 1982; Ferruz y col, 1992). En homogenados de ovarios de gata tratada con gonadotropinas, se observó disminución en el contenido de noradrenalina y de la actividad de la beta-hidroxilasa (enzima que cataliza la conversión de dopamina a noradrenalina) después de que se ha producido la ovulación. Estos eventos son interpretados por los autores, como el resultado de la activación de los nervios simpáticos (Lara y Belmar, 1991). A principio de esta década Ferruz y col. (1991) sugirieron la siguiente hipótesis: "las gonadotropinas (FSH y LH) pueden actuar localmente sobre la terminal nerviosa presináptica y regular la liberación de la noradrenalina" la que al llegar a su receptor en las células de la teca y la granulosa, estimula la aromatización de los andrógenos.

Ferruz (1991) y Jordan (1981) muestran que el ovario de la rata adulta posee receptores adrenérgicos del subtipo β_2 , cuya afinidad es similar durante el ciclo estral. La concentración del receptor es más alta durante el proestro, disminuye al 50% de este valor en la mañana del estro y aumenta nuevamente a concentraciones semejantes a las del proestro en las etapas de metaestro y diestro, lo que sugiere que los cambios en la concentración de receptores puede deberse a modificaciones en la concentración plasmáticas de noradrenalina, al contenido intraovárico de las catecolaminas o a ambos:

En el ovario de la rata prepúber, el contenido de receptores β -adrenérgicos varía en los días cercanos a la primera ovulación. Sus valores más altos se encuentran en el día del anaestro y en la mañana del proestro tardío y disminuyen bruscamente al momento del "pico" preovulatorio de la LH, permanecen bajos al estro e incrementan de nuevo en el día del diestro (Aguado y col, 1982). La presencia de estos receptores en las células de la granulosa permite sugerir que las catecolaminas están involucradas en la regulación de la maduración de la

función de las células de la granulosa (Aguado y col, 1982; Ojeda y col, 1986). Durante los días cercanos a la primera ovulación, las variaciones en el contenido de los receptores β - adrenérgicos, se acompañan de modificaciones en la concentración de noradrenalina ovárica (Aguado y Ojeda, 1986; Bahr y Ben-Jonathan, 1981; 1985; Ben-Jonathan y col, 1984).

Al parecer, la actividad de los receptores β - adrenérgicos está relacionada con la regulación del proceso de esteroidogénesis. La estimulación de estos receptores con adrenalina o isoproterenol, activa al sistema adenilato ciclasa y aumenta la producción de progesterona en el medio (Ratner y col, 1980). El bloqueo de los receptores β -adrenérgicos con propranolol inhibe la secreción de progesterona y de oxitocina por el cuerpo lúteo (Skarzynski y Kotwica, 1993).

En la rata adulta el bloqueo de los receptores catecolaminérgicos β_1 y β_2 por la administración de propanolol en el segundo día de diestro o el proestro, provoca disminución en el número de ovocitos liberados sin que se modifique la tasa de animales ovulantes (Domínguez y col, 1987). De igual manera, la administración sistémica de guanetidina (GTD), fármaco que parece reemplazar a la noradrenalina en la terminal nerviosa (Boullin y col, 1966) o bien destruye selectivamente a las terminales noradrenérgicas (Ojeda y Urbanski, 1994), reduce la cuota ovulatoria (Ayala y Domínguez, 1988). Estos resultados le ha permitido a los autores sugerir que en el animal adulto, el sistema catecolaminérgico del ovario, podría estimular la sensibilidad del folículo a las gonadotropinas (Ayala y Domínguez, 1988; Domínguez y col, 1987).

Por otra parte, el bloqueo de los receptores β - adrenérgicos seguido de la administración de la LH, provoca disminución en el número de ovocitos liberados,

mientras que, cuando se estimula con la FSH, no se producen modificaciones en este parámetro. Estos resultados permiten sugerir que en la rata prepúber, a diferencia de lo que se observa en el animal adulto, el estímulo de los receptores β -adrenérgicos disminuye la respuesta del compartimiento folicular a la FSH y a la LH. Para el caso de la FSH sus efectos serían inhibidores, mientras que para la LH estimuladores (Domínguez y col, 1983).

En la rata de 30-34 días de edad, la administración de VIP estimula la producción de estrógenos, progesterona y andrógenos por el ovario (Ahmed y col, 1986). La liberación de estrógenos, inducida por la administración del VIP, aumenta en el período que precede a la primera liberación preovulatoria de las gonadotropinas (proestro temprano y tardío) y disminuye después de la primera ovulación (estro y primer diestro). El hecho que el efecto estimulador del VIP sobre la esteroidogénesis varíe en relación a la fase de maduración del animal, se interpreta como indicador de que el VIP participa también en la regulación de los últimos estados de desarrollo del folículo, facilitando la ovulación y el desarrollo de los cuerpos lúteos recién formados (Ahmed y col, 1986).

En el proceso de esteroidogénesis también parece participar el NGF. Ovarios de ratas de 29 a 30 días de edad, que fueron tratadas al nacimiento con el anticuerpo al NGF (ab-NGF) al ser colocados en cultivo la producción de esteroides en respuesta al estímulo con hCG es menor que la de los testigo. Es decir, que la inmunosimpatectomía provoca disminución en la concentración de estrógenos, testosterona y dihidrotestosterona y no se modifica la concentración de progesterona y androstenediona (Lara y col, 1990c).

Existen evidencias que muestran que en la rata adulta, la sección bilateral del nervio ovárico superior provoca disminución en un 50% en el contenido de

noradrenalina ovárica (Lawrence y Burden, 1980), pero no modifica el número de ovocitos liberados ni el patrón del ciclo estral (Gibson y col, 1984; Wylie y col, 1985). Sin embargo, existen otras evidencias que muestran que la falta de la inervación que llega por este nervio afecta la ciclicidad del animal. Así la sección uni o bilateral del nervio ovárico realizada en cada uno de los días del ciclo estral, provocan modificaciones en la ciclicidad vaginal y en la ovulación (Chávez y col, 1991), debido quizá a alteraciones en la secreción de estrógenos (Weiss y col, 1982).

Weiss y col (1982) han mostrado que la estimulación eléctrica del nervio ovárico superior provoca disminución en el contenido de progesterona en el ovario estimulado, efecto que se revierte cuando se administra fentolamina (antagonista alfa- adrenérgico) 30 min. antes de la estimulación. Estos resultados han sido interpretados como que la caída de progesterona es mediada por un efecto directo, que puede ser excitatorio a través de la activación de los receptores beta o inhibitorio por la estimulación de los receptores alfa.

En el animal de 24 días de edad, la sección bilateral del nervio ovárico superior no modifica la edad de la apertura vaginal, la primera ovulación, ni la concentración sérica de las gonadotropinas y de la hormona del crecimiento, incluso siete días después de realizada la desnervación. Con base en estos resultados los autores niegan la participación de la información que transcurre por este nervio en la regulación de la primera ovulación espontánea (Aguado y Ojeda, 1984b). En otro estudio similar, en el que utilizan ratas de 25 días de edad, la sección bilateral del ligamento suspensorio seguida por el tratamiento con PMSG, provoca disminución del contenido de noradrenalina ovárica, sin cambios en la tasa de animales ovulantes, ni el número de cuerpos lúteos observados en

animales sacrificados entre 5 y 8 horas o 3 días después de haberse producido la ovulación. En este caso, los autores concluyen que los nervios que transcurren en el ligamento suspensorio no son indispensables en el proceso ovulatorio, aunque no descartan la participación de las catecolaminas en la regulación de la ovulación, ya que mediante esta manipulación no se logra una depleción completa del neurotransmisor (Selstam y col, 1985).

Se ha sugerido que en aquellos animales en donde se eliminan ambos nervios ováricos, las gónadas desarrollan una hipersensibilidad a las catecolaminas residuales y a las que le llegan por sangre, lo que le permitiría una respuesta equivalente a la observada en animales con inervación intacta (Aguado y Ojeda, 1984b).

Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que la sección unilateral del nervio ovárico superior a los 16, 20, 24, 28 ó 32 días de edad, no modifica la edad de apertura vaginal, pero se observa disminución en el número de ovocitos liberados por el ovario desnervado y aumento compensador por el ovario que mantiene intacta su inervación (Morales y col, 1993). En estos grupos experimentales, el número de folículos mayores de 70 μm diámetro fue la mitad del observado en el grupo testigo, efecto que se observa tanto en el ovario desnervado como en el intacto. De la misma manera, en el animal hemicastrado, la sección del nervio ovárico superior reduce el porcentaje de animales que ovulan al estro vaginal. Estos resultados permiten sugerir que la información que transcurre por el nervio ovárico superior modula de manera estimuladora y lateralizada la primera ovulación y la reactividad del compartimiento folicular a las gonadotropinas, en especial a la FSH (Chávez y col, 1989; Morales y col, 1990; 1991; 1993).

Participación de la inervación catecolaminérgica y peptidérgica en el proceso de crecimiento folicular

Se ha postulado que el inicio del crecimiento folicular no depende de las gonadotropinas. En apoyo a esta hipótesis, Peters y col. en 1973 (citado por Greenwald y Roy, 1994) mostraron que en el ratón de dos días de edad la hemicastración no modifica el número de folículos en crecimiento 12 días después de la hemicastración. Otras evidencias han mostrado que durante las primeras 24 horas de vida, el ovario de la rata no presenta folículos, estos empiezan a observarse a partir de las 48 horas. En contraste a la falta de folículos, se detecta la presencia de fibras nerviosas de naturaleza adrenérgica en la gónada fetal de 19 días o en la recién nacida, con menos de 15 horas de vida (Malamed y col, 1992). Estos hechos han sido utilizados como indicadores de que el inicio del crecimiento folicular esta regulado más por la información neural que por la hormonal.

Existen varias evidencias en los que se muestra a la inervación como un regulador en el proceso de crecimiento y diferenciación del folículo ovárico.

La inmunosimpatectomía neonatal inducida por la administración del anticuerpo al factor del crecimiento neural (ab-NGF), resulta en aumento en el número total de folículos, que se da por el incremento de los preantrales. Se sugiere que estas alteraciones son producidas a nivel del propio ovario, ya que el tratamiento con el anticuerpo provoca la eliminación de las fibras inmunoreactivas a la tirosina hidroxilasa y las del neuropéptido Y (Lara y col, 1990c).

En cambio, la eliminación de la información catecolaminérgica por la administración de GTD provoca efectos diferentes, es decir, se observa

disminución en el número total de folículos, principalmente por la caída en el número de folículos preantrales. Las diferencias entre la inmunosimpatectomía y la desnervación por la GTD se pueden deber a que el ab-NGF actúa sobre las terminales simpáticas y las neuronas sensoriales, mientras que la GTD actuaría sólo sobre la inervación simpática (Lara y col, 1990b).

En la cobaya prepúber, la eliminación de las fibras catecolaminérgicas por la administración local de 6-OHDA, resulta en la disminución del número de folículos preantrales e incremento de la atresia de los folículos medianos y promovió la formación de los folículos grandes (>700 μm de diámetro). Estos resultados han sido interpretados como un índice de que la inervación adrenérgica puede inhibir de manera tónica el desarrollo del folículo (Curry y col, 1984).

El grupo de Lara y col. (1991) mostraron que en la rata el injerto de ovario presenta folículos en desarrollo, sólo si se encuentran presentes las fibras adrenérgicas. Estas fibras se pueden visualizar siete días después de realizado el injerto.

Todas las evidencias mostradas apoyan la idea de que la inervación noradrenérgica participa en la regulación del crecimiento folicular (Flores y col, 1990; Lara y col, 1990b).

Evidencias de la existencia de lateralización en el sistema nervioso central y en las gónadas.

Existen numerosos hechos experimentales que permiten suponer la existencia de lateralización en los mecanismos centrales y periféricos que regulan la función de las gónadas.

Así, de las evidencias mostradas se desprende que en la rata adulta y prepúber el nervio ovárico superior regula de manera estimuladora y lateralizada el proceso ovulatorio (Chávez y col, 1991; Morales y col, 1993).

De igual manera se ha mostrado que en la rata adulta la sección del nervio vago modifica la respuesta ovulatoria, la que depende del nervio que se secciona (Cruz y col, 1986).

En los reptiles, los ovarios funcionan de manera alternada durante la etapa de reproducción y al parecer esta función alternada depende de una comunicación interovárica, ya que al eliminar la gónada activa, la otra presenta una hipertrofia compensadora. En este estudio analizaron en el diencéfalo izquierdo y derecho las concentraciones de los metabolitos a las catecolaminas y a serotonina y, observaron que éstos se incrementan del lado contralateral al ovario funcional. Los autores sugieren que la asimetría funcional se presenta tanto en el sistema nervioso central como en las gónadas (Jones, y col, 1990).

Otra evidencia de que existe lateralización en el sistema nervioso central, fue mostrada por el grupo de Gerendai quienes señalan que en la rata adulta intacta, el contenido de GnRH en el hipotálamo medio basal es mayor en el lado derecho que en el izquierdo. La ovariectomía unilateral induce aumento en el contenido de GnRH en el hipotálamo medio basal, ipsilateral al ovario extirpado (Gerendai y Halasz, 1981). Por otra parte se ha mostrado que en la rata adulta cíclica el ovario izquierdo libera una cuota ovulatoria mayor a la del derecho (Domínguez y col, 1989). Todo este conjunto de evidencias apoyan la existencia de lateralización en los mecanismos que controlan la función del ovario.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Mientras que algunos estudios parecen indicar que la inervación catecolaminérgica del ovario modula los mecanismos que con llevan a la ovulación, el crecimiento folicular, la esteroidogénesis y la preñez, existen otros que niegan su participación. Esta controversia puede ser explicada por los diferentes modelos utilizados, a la edad en la que se realiza la manipulación y por el lapso entre el tratamiento y la evaluación de las modificaciones inducidas.

En la rata prepúber la sección bilateral del nervio ovárico superior (principal fuente de inervación noradrenérgica) no modifica la edad de apertura vaginal, del primer estro y la ovulación espontánea o inducida por la administración de PMSG (Aguado y Ojeda 1984b). Estos resultados se interpretaron como evidencias de que la inervación catecolaminérgica no sería "esencial" en los mecanismos que desencadenan la ovulación. Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que si bien la sección bilateral del nervio ovárico no modifica la respuesta ovulatoria, los efectos son diferentes cuando se realiza una desnervación unilateral, ya que en este caso hay aumento compensador en la cuota ovulatoria por el ovario inervado y disminución por el desnervado. Estos resultados nos llevaron a plantear las siguientes interrogantes:

- ¿La respuesta del ovario a una desnervación se debe a una caída de la concentración de noradrenalina en el ovario?
- ¿La disminución es temporal o permanente?
- ¿El efecto de la sección depende de la edad del animal y del nervio que se corta?

Para dar una respuesta a estas preguntas, en éste trabajo se cuantificó el contenido y la concentración de noradrenalina ovárica en animales con sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior, realizada en las etapas infantil o juvenil, y evaluado 24 ó 72 horas post-cirugía o al día del primer estro vaginal.

Otro hecho es que tanto en los animales con sección unilateral como bilateral del nervio ovárico superior, los dos ovarios presentan descenso en la población de folículos con diámetro $< 350 \mu\text{m}$, es decir de aquellos que podrían llegar a un estado preovulatorio y ovular en respuesta a la LH. Estos resultados se podrían deber a:

- ¿Que al eliminar la principal fuente de información catecolaminérgica, el ovario disminuye su capacidad de respuesta a las gonadotropinas?
- ¿Los cambios están más asociados a la FSH, a la LH o a ambas?
- ¿Estos cambios dependen de la edad del animal?
- ¿La respuesta del ovario es igual si se secciona el nervio ovárico izquierdo, el derecho o ambos nervios?

Para analizar los posibles mecanismos implicados en estos eventos, se realizó la sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior, en la etapa infantil o juvenil, y efectuamos la estimulación con PMSG, hCG o combinadas en la etapa peripuberal.

Por último se analizó si la sola desnervación no provoca una sobrestimulación o inhibición de la respuesta del ovario a las gonadotropinas, para ello en animales con sección unilateral del nervio ovárico superior se les estimuló con PMSG o hCG inmediatamente después de la desnervación.

Hipótesis

Con base en los antecedentes de que en la rata la sección unilateral del nervio ovárico superior disminuye la cuota ovulatoria y el número total de folículos medidos al primer estro vaginal, se postula que en la rata prepúber la información neural que transcurre por el nervio ovárico superior modula de forma estimuladora y lateralizada los procesos de crecimiento folicular y ovulación y que su participación varía con la etapa de desarrollo del animal, por lo que la desnervación del ovario por la sección uni o bilateral del nervio ovárico superior afecta de manera inhibitoria la respuesta del ovario a la administración de las gonadotropinas.

Objetivos

- Estudiar los efectos de la sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior, realizada en la etapa infantil o juvenil, sobre el contenido de las catecolaminas ováricas
- Estudiar la respuesta del ovario desnervado por la sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior, al estímulo gonadotrópico, sobre la ovulación y el crecimiento folicular.

Metas

- Analizar las variaciones en el contenido de noradrenalina ovárica, en animales con sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior, realizada a los **16 días de edad** (etapa infantil), sacrificados a las 24, 72 horas o al primer estro vaginal.
- Analizar las variaciones en el contenido de noradrenalina ovárica, en animales con sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior, realizada a los **32 días de edad** (etapa juvenil), sacrificados a las 24, 72 horas o al primer estro vaginal.
- Estudiar los efectos de la estimulación con PMSG, hCG o PMSG-hCG en la etapa peripuberal, en animales con sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior, realizada en la **etapa infantil o juvenil**, sobre la ovulación y el crecimiento folicular.
- Estudiar, en los animales con sección unilateral del nervio ovárico superior, la respuesta al estímulo inmediato con PMSG o hCG, sobre la respuesta ovulatoria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimientos generales

Se utilizaron ratas hembra prepúberes de la cepa CII-ZV, mantenidas en fotoperíodo controlado de 14h-luz 10h-obscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h). Los animales se destetaron a los 21 días de edad y a partir de este momento tuvieron libre acceso al agua y al alimento (Nutricubos, Ralston Rations USA).

Procedimiento Quirúrgico.

Las intervenciones quirúrgicas se realizaron bajo anestesia con éter entre las 09:00 y las 11:00 h. Una vez anestesiados a los animales se les practicó una incisión ventral que abarcó piel y músculo, se exteriorizaron el ovario izquierdo o derecho, se identificó el ligamento suspensorio correspondiente y se cortó el nervio ovárico superior izquierdo, el derecho o ambos nervios. Como índice de comparación, también se incluyeron grupos con operación simulada, en los que se les practicó una incisión de piel y músculo y sin tocar ningún órgano se suturó la herida. Al terminar la manipulación quirúrgica los animales fueron marcados en las orejas.

Procedimiento de Autopsia.

Todos los animales fueron sacrificados por sangría entre las 09:00 y las 11:00 h, según los protocolos descritos en cada experimento.

A la autopsia, en los grupos con desnervación quirúrgica se verificó que el ovario unido al útero se encontrara libre en la cavidad abdominal. Se disecaron las trompas ováricas, se buscó la presencia de ovocitos, los que fueron contados con la ayuda de un microscopio estereoscópico, siguiendo la metodología habitual del laboratorio (Morales y col, 1993). Se disecaron y pesaron los ovarios

y el útero. Los ovarios fueron fijados en líquido de Bouin, incluidos en parafina, cortados en forma seriada a 10 μm de grosor y teñidos con hematoxilina-eosina para su posterior estudio morfométrico. En otros grupos experimentales los ovarios fueron guardados inmediatamente a -70°C hasta el momento de la determinación de catecolaminas por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), según el procedimiento de Hadfield y col, (1985).

Análisis morfométrico de la población folicular.

El análisis de la población folicular se realizó en los ovarios izquierdo y derecho de los animales desnervados a los 32 días de edad. Los cortes se revisaron cada 10 μm y se midieron, con ayuda de un ocular micrométrico, los diámetros de todos aquellos folículos en los que el ovocito presentó núcleo y nucleolo bien definido. De acuerdo al diámetro se clasificaron en folículos pequeños ($< 350\mu\text{m}$) o grandes ($>350\mu\text{m}$), según la clasificación propuesta por Hirshfield y Midgley (1978).

Además de la clasificación del folículo por su diámetro, éstos fueron divididos en sanos o atrésicos. Se consideró a un folículo atrésico aquel que presentó por lo menos una de las siguientes características, de acuerdo a la clasificación de Hsueh y col, (1994):

- * descamación de las células de la granulosa, siempre y cuando sean más de cinco células descamadas
- * engrosamiento de las capas de las tecas
- * picnosis nuclear
- * alteración del ovocito

Cuantificación de catecolaminas.

La cuantificación de las catecolaminas ováricas se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). En las corridas cromatográficas se utilizó dihidroxi-benzil-amina (DHBA) como estándar interno (Apéndice A).

La cuantificación de las catecolaminas se realizó en todo el ovario, ya que previamente se ha mostrado que el medirlas en todo el ovario es equivalente a determinarlas sólo en el compartimiento folicular (Bahr y Ben-Jonathan, 1981;1985).

Los ovarios de los animales con desnervación quirúrgica y sus grupos testigo fueron pesados en una balanza de precisión al 0.1. Se homogeneizaron en ácido perclórico helado al 0.1M a 50 ciclos por minuto y se centrifugaron a -4°C durante 10 min. a 8,000 rpm. Al sobrenadante se le agregó TRIS al 0.05M a un pH de 8.6 y alúmina y se agitó por 10 min. A la pastilla que se formó se le adicionó nuevamente ácido perclórico, se centrifugó por 1 min. a 1000 rpm y se procedió a inyectar en el cromatógrafo. Los datos de contenido de catecolaminas fueron expresados en nanogramos y su concentración en nanogramos por miligramo de peso del órgano.

Análisis Estadístico.

Los resultados del número de ovocitos liberados, la edad de apertura vaginal y del primer estro, fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis, seguido por la prueba de U de Mann-Whitney.

El peso de los ovarios, del útero y la concentración de catecolaminas se analizaron por la prueba de Análisis de Varianza multifactorial (ANDEVA),

seguida por la prueba de Tukey, en el caso donde se realizaron comparaciones entre dos grupos se utilizó la prueba de "t" de Student.

La tasa ovulatoria definida como el número de animales ovulantes/número total de animales, se analizó por la prueba de probabilidad exacta de Fisher o de J^2 .

En todos los casos se consideró que las diferencias fueron estadísticamente significativas cuando la probabilidad fue igual o menor al 5%

Experimento 1.

Efectos de la sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior, sobre las concentraciones de catecolaminas en el ovario de ratas prepúberes.

Con base en los antecedentes citados en el marco teórico se sabe que:

- a) La principal catecolamina que se detecta en el ovario de la rata prepúber es la noradrenalina (Aguado y Ojeda 1984b; Selstam y col, 1985).
- b) Que el contenido de la amina incrementa con la edad del animal (Ben-Jonathan y col, 1984).
- c) Que el ovario recibe el mayor aporte catecolaminérgico por el nervio ovárico superior (Lawrence y Burden, 1980), y que la sección bilateral de este nervio provoca depleción drástica del contenido de la amina, siete días después de la desnervación (Aguado y Ojeda, 1984b; Lawrence y Burden, 1980).
- d) Que en la rata adulta la cantidad de fibras que llegan al ovario derecho por el nervio ovárico superior, es mayor que para el izquierdo aunque la diferencia no llega a ser estadísticamente diferente (Klein y Burden, 1988a).

e) Algunos autores postulan que al parecer el nervio ovárico superior no participa en la regulación de los mecanismos de la apertura vaginal y la primera ovulación, ya que en la rata de 24 días de edad la sección bilateral del nervio no provoca cambios en los parámetros indicados (Aguado y Ojeda, 1984b).

Sin embargo los resultados obtenidos en nuestro laboratorio (Morales y col, 1990; 1993) indican que:

- Si bien la sección bilateral del nervio ovárico superior no modifica la respuesta ovulatoria, los efectos son diferentes a cuando se realiza una desnervación unilateral, ya que en este caso hay incremento en el número de ovocitos liberados por el ovario innervado y disminución por el desnervado. Estas evidencias nos llevan a plantear las siguientes interrogantes:

- 1.- ¿En los animales con sección unilateral del nervio ovárico, la diferente respuesta entre el ovario innervado y el desnervado se relaciona con cambios en el contenido de noradrenalina ovárica?
- 2.- ¿Al seccionar el nervio se provoca una depleción rápida de la amina, o es éste un proceso de eliminación gradual?
- 3.- ¿Qué sucede con las otras fuentes que abastecen al ovario de noradrenalina, se activan y restablecen a largo tiempo el contenido del neurotransmisor?
- 4.- ¿Los efectos de la desnervación dependen de la etapa de desarrollo en la que se encuentra el animal?

Para contestar estas interrogantes se midió el contenido de catecolaminas en el ovario de ratas intactas sacrificadas a intervalos de 4 días desde los 16 días de edad hasta los 36 y un grupo más al primer estro vaginal. En otros grupos se realizó la sección del nervio ovárico superior izquierdo, derecho o

de ambos nervios ováricos en la etapa infantil (16 días de edad) o juvenil (32 días de edad). Después de la intervención quirúrgica, los animales se dejaron en reposo y se sacrificaron 24 ó 72 horas post-cirugía o bien hasta el día del primer estro vaginal. Como grupo testigo se utilizaron animales con operación simulada, realizada a las mismas edades.

RESULTADOS

Efectos de la sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior, sobre las concentraciones de catecolaminas ováricas en ratas prepúberes

En nuestra cepa de animales y con el método de extracción utilizado, sólo se pudo detectar noradrenalina, con un tiempo de retención de 4.27 ± 0.02 min.

Variaciones en el contenido y en la concentración de catecolaminas ováricas en animales intactos

En la Fig. 3 se muestran las variaciones en el contenido total de noradrenalina ovárica respecto a la edad del animal. Como se puede observar, el contenido de la amina incrementó conforme crece el animal. En cada una de las edades estudiadas, el contenido del neurotransmisor fue semejante entre el ovario izquierdo y el derecho.

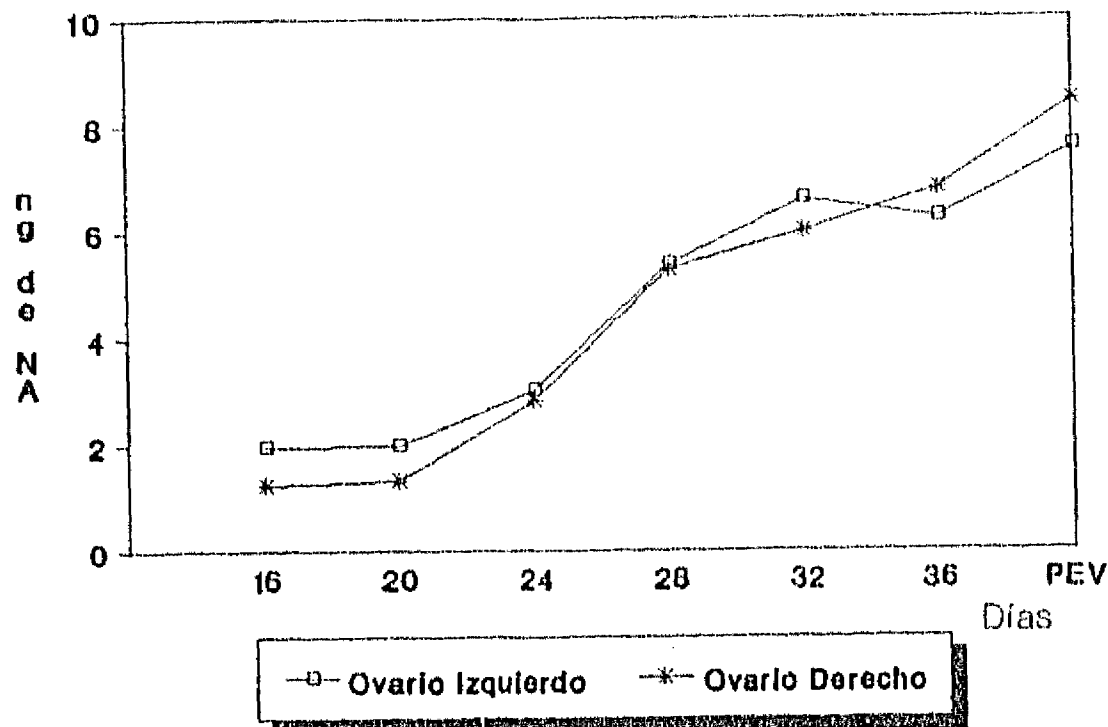


Fig. 3. Media del contenido total de noradrenalina en el ovario izquierdo o derecho de animales intactos a diferentes edades.

En la tabla I se presenta el peso de los ovarios y la concentración de noradrenalina en el ovario de animales intactos sacrificados a diferentes edades. El peso de las gónadas incrementó con la edad del animal, mientras que la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina del ovario izquierdo fue semejante a la de la gónada derecha en cada una de las edades evaluadas, excepto en el grupo de animales sacrificados al primer estro vaginal, en donde el ovario derecho presentó una concentración mayor respecto al del izquierdo, dada por la diferencia de peso de los ovarios, ya que el izquierdo presentó un peso mayor al día del primer estro (Tabla I).

Tabla I: Media \pm eem del peso del ovario y de la concentración de noradrenalina en el ovario izquierdo o derecho de animales control, sacrificados a diferentes edades.

| Edad | n | Ovario | Peso(mg) | Concentración (ng/mg tejido) |
|----------------------|----|-----------|------------------|------------------------------|
| 16 días | 8 | Izquierdo | 5.10 \pm 0.52 | 0.37 \pm 0.05 |
| | 6 | Derecho | 4.03 \pm 0.35 | 0.31 \pm 0.06 |
| 20 días | 5 | Izquierdo | 6.93 \pm 0.56 | 0.28 \pm 0.08 |
| | 5 | Derecho | 6.80 \pm 0.70 | 0.18 \pm 0.05 |
| 24 días | 10 | Izquierdo | 7.64 \pm 0.56 | 0.39 \pm 0.03 |
| | 10 | Derecho | 7.63 \pm 0.52 | 0.36 \pm 0.03 |
| 28 días | 8 | Izquierdo | 10.21 \pm 0.64 | 0.53 \pm 0.05 |
| | 7 | Derecho | 9.54 \pm 0.78 | 0.56 \pm 0.06 |
| 32 días | 8 | Izquierdo | 1.02 \pm 0.70 | 0.59 \pm 0.05 |
| | 6 | Derecho | 9.30 \pm 0.28 | 0.64 \pm 0.11 |
| 36 días | 5 | Izquierdo | 11.77 \pm 1.51 | 0.55 \pm 0.07 |
| | 5 | Derecho | 11.33 \pm 0.70 | 0.60 \pm 0.06 |
| Primer estro vaginal | 4 | Izquierdo | 16.42 \pm 2.34 | 0.44 \pm 0.05 |
| | 6 | Derecho | 11.39 \pm 1.74 | 0.83 \pm 0.15* |

*, P<0.05 vs. su ovario izquierdo (Prueba de t "Student").

En este grupo de animales el coeficiente de correlación entre el peso y la concentración de noradrenalina en el ovario, fue bajo. Para el ovario izquierdo fue del 52%, y del 82% para el derecho.

Efectos de la sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior, sobre el contenido y la concentración de catecolaminas ováricas

Desnervación en la etapa infantil

En los animales con operación simulada el contenido de noradrenalina ovárica incrementó con el tiempo de evolución, sin que se observaran diferencias entre el ovario izquierdo y el derecho (Tabla II).

En las ratas con sección del nervio ovárico izquierdo, el contenido de noradrenalina disminuyó de manera significativa en el ovario desnervado, 24 ó 72 horas post-cirugía comparado con el grupo con operación simulada, mientras que el ovario intacto (derecho) presentó un incremento significativo sólo a las 24 horas. En el día del primer estro vaginal el contenido de la amina en ambos ovarios fue semejante a los del grupo con operación simulada (Tabla II).

En el grupo con sección del nervio ovárico derecho, no se detectó la noradrenalina en el ovario desnervado 24 horas después de la operación, mientras que en la gónada intacta el contenido fue semejante al grupo con operación simulada. A las 72 horas post-cirugía y al día del primer estro vaginal el contenido del neurotransmisor no se modificó en ninguno de los dos ovarios (Tabla II).

Después de la sección bilateral del nervio ovárico superior, no se detectó noradrenalina en los ovarios de ninguno de los grupos, excepto en los animales sacrificados en el día del primer estro vaginal, en donde se pudo detectar el neurotransmisor en la gónada derecha, aunque el contenido es aproximadamente cuatro veces menor que en el grupo con operación simulada (Tabla II).

Tabla II: Media \pm eem del contenido (ng) de noradrenalina en el ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) de animales con operación simulada (OS) o con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa infantil (16 días de edad) y sacrificados a las 24 ó 72 horas post-cirugía o al día del primer estro vaginal (PEV).

T i e m p o p o s t - c i r u g í a

| Grupo | | n | 24h | n | 72h | n | PEV |
|-------|----|---|-------------------|---|------------------|---|------------------|
| OS | OI | 5 | 1.63 \pm 0.22 | 4 | 2.29 \pm 0.11 | 3 | 9.79 \pm 1.82 |
| | OD | 3 | 1.30 \pm 0.71 | 4 | 2.09 \pm 0.35 | 3 | 7.89 \pm 1.09 |
| SNOI | OI | 7 | 0.23 \pm 0.11* | 6 | n.d * | 5 | 4.19 \pm 1.56 |
| | OD | 8 | 3.63 \pm 0.46*a | 6 | 1.65 \pm 0.13a | 7 | 6.89 \pm 1.56 |
| SNOD | OI | 7 | 2.82 \pm 0.89 | 9 | 1.95 \pm 0.26 | 5 | 6.66 \pm 1.07 |
| | OD | 5 | n.d *a | 7 | 0.97 \pm 0.47 | 4 | 3.38 \pm 0.73 |
| SBNO | OI | 4 | n.d. * | 4 | n.d * | 5 | n.d * |
| | OD | 6 | n.d * | 4 | n.d * | 5 | 1.60 \pm 1.22* |

n.d. valores no detectables

* P < 0.05 vs. OS mismo ovario (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey).

a P < 0.05 vs. ovario izquierdo, mismo grupo (Prueba de "t" Student).

En el grupo con operación simulada el peso de los ovarios incrementó con el tiempo de evolución (Tabla III).

En los animales en los se seccionó el nervio ovárico superior izquierdo, el ovario desnervado incrementó de peso cuando el tiempo pos-cirugía fue corto, 24 ó 72 horas, en tanto que el peso de la gónada intacta fue semejante a los de operación simulada. En los que se eliminó el nervio ovárico derecho, sólo a las 72 horas se presentó incremento de peso en ambos ovarios. En cambio, con

la sección de ambos nervios, el peso del ovario derecho incrementó en los animales sacrificados a las 24 horas o al día del primer estro vaginal (Tabla III).

Tabla III: Media \pm eem del peso (mg) de los ovarios de animales con operación simulada (OS) o con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa infantil (16 días de edad) y sacrificados a las 24 ó 72 horas post-cirugía o al día del primer estro vaginal (PEV).

Tiempo post-cirugía

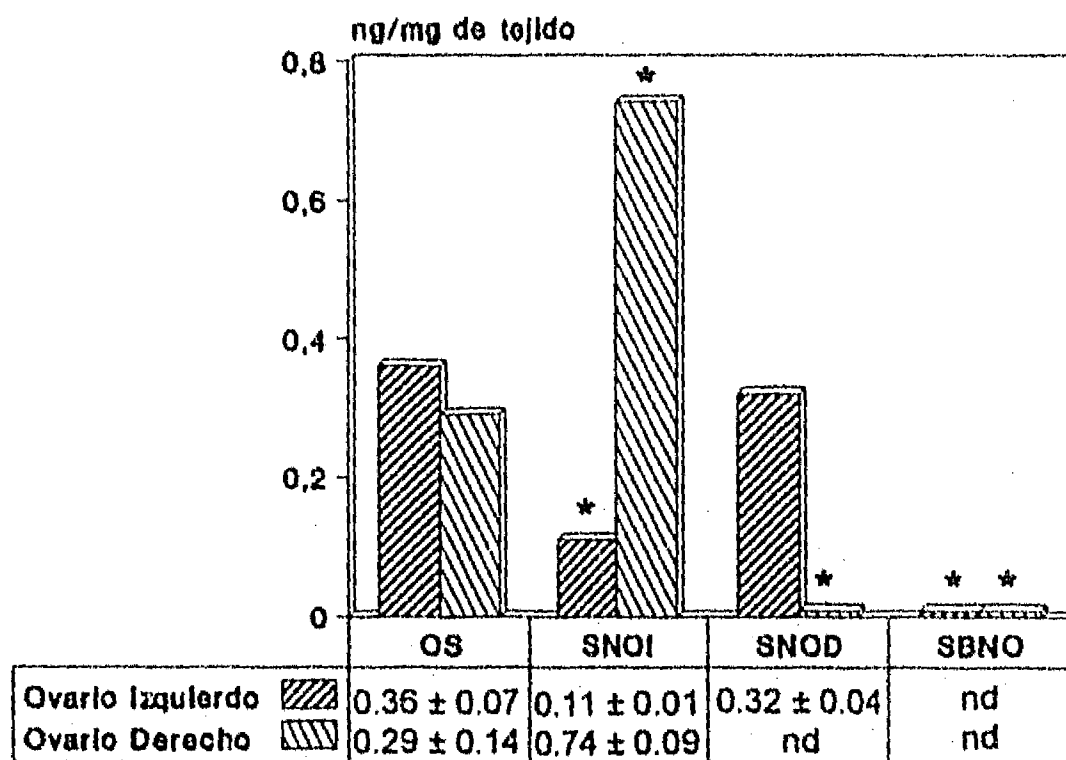
| Grupo | Ovario | 24h | 72h | PEV |
|-------|-----------|----------------|-----------------|-----------------|
| OS | Izquierdo | 4.9 \pm 0.5 | 6.5 \pm 0.5 | 14.4 \pm 1.4 |
| | Derecho | 4.6 \pm 0.6 | 6.5 \pm 0.9 | 11.9 \pm 1.9 |
| SNOI | Izquierdo | 7.4 \pm 0.5* | 10.0 \pm 0.8* | 12.9 \pm 1.5 |
| | Derecho | 5.0 \pm 0.4a | 7.7 \pm 0.5a | 14.7 \pm 1.9 |
| SNOD | Izquierdo | 5.6 \pm 0.4 | 9.2 \pm 0.9* | 16.7 \pm 2.7 |
| | Derecho | 5.8 \pm 0.6 | 11.4 \pm 1.7* | 8.3 \pm 1.7a |
| SBNO | Izquierdo | 6.6 \pm 0.7 | 8.1 \pm 1.0 | 18.3 \pm 2.2 |
| | Derecho | 7.5 \pm 0.3* | 8.8 \pm 1.2 | 16.3 \pm 1.3* |

*, P < 0.05 vs. OS mismo ovario (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey).

a, P < 0.05 vs. ovario izquierdo, mismo grupo (Prueba de "t" Student).

En la Fig. 4 aparecen los resultados de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina ovárica en animales a los que se les practicó la sección del nervio ovárico superior en la etapa infantil y se sacrificaron 24 horas después de la cirugía.

En los grupos con sección unilateral del nervio, en el ovario desnervado disminuyó la concentración de noradrenalina. En el grupo con sección del nervio izquierdo, el ovario intacto presentó incremento compensador en la concentración de la amina. Cuando se cortaron ambos nervios, la disminución fue más drástica, llegando a ser no detectables las concentraciones de noradrenalina (Fig. 4).



* P<0.05 vs grupo con OS, mismo ovario

nd= Valor no detectable

Fig. 4. Media \pm sem de la concentración de noradrenalina, en el ovario izquierdo o derecho de animales con operación simulada (OS) o con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO), realizada en la etapa infantil y sacrificados a las 24 horas post-cirugía.

De igual manera, cuando los animales fueron sacrificados a las 72 horas post-cirugía, el ovario desnervado presentó disminución en la concentración de la noradrenalina y en los de sección bilateral no se llegó a detectar el neurotransmisor (Fig. 5).

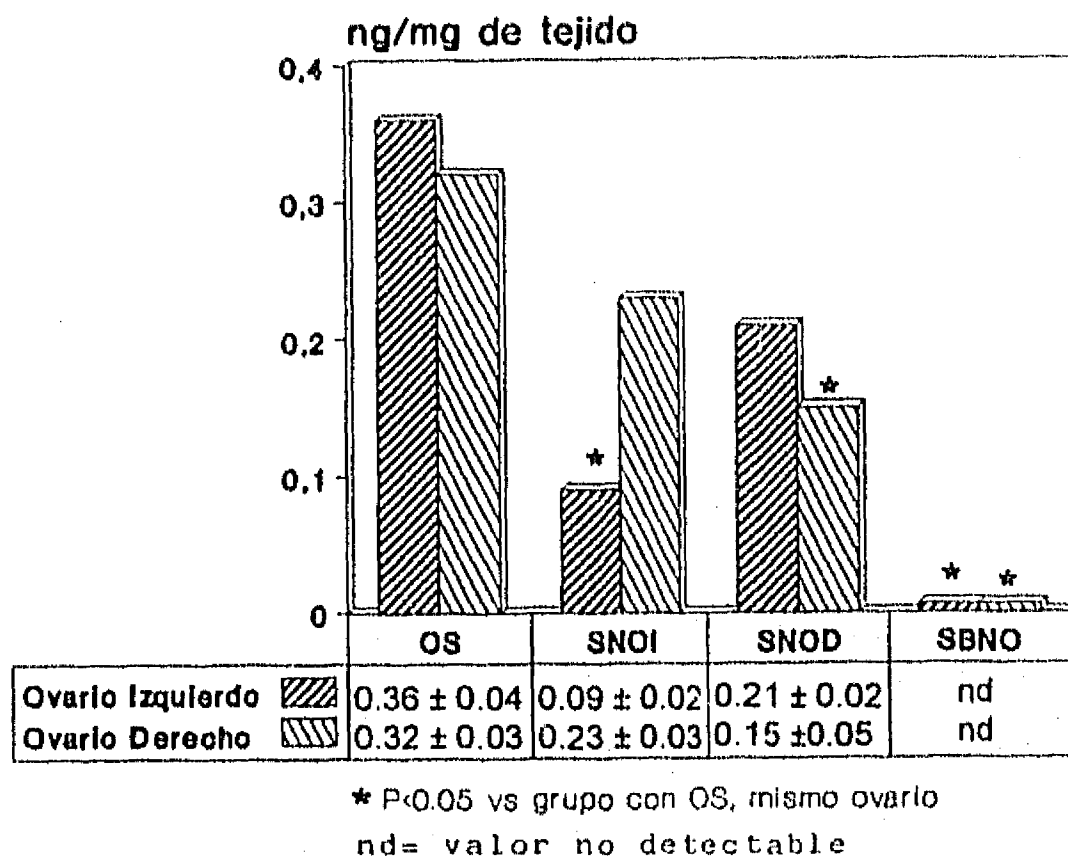


Fig. 5. Media \pm em de la concentración de noradrenalina, en el ovario izquierdo o derecho de animales con operación simulada (OS) o con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho o de ambos nervios (SBNO), realizada en la etapa infantil y sacrificados a las 72 horas post-cirugía.

En los animales que fueron sacrificados hasta el día del primer estro vaginal, la sección del nervio ovárico izquierdo fue seguida por la disminución de

la concentración de la noradrenalina en el ovario desnervado, respecto al grupo con operación simulada, sin que se observaran cambios en la gónada intacta. La sección del nervio ovárico derecho no modificó la concentración de la amina en ninguno de los dos ovarios. En el grupo con sección de ambos nervios, en el ovario izquierdo no se detectó la amina, en tanto que en el derecho se detectó aunque en menor concentración a la del grupo con operación simulada (Fig. 6).

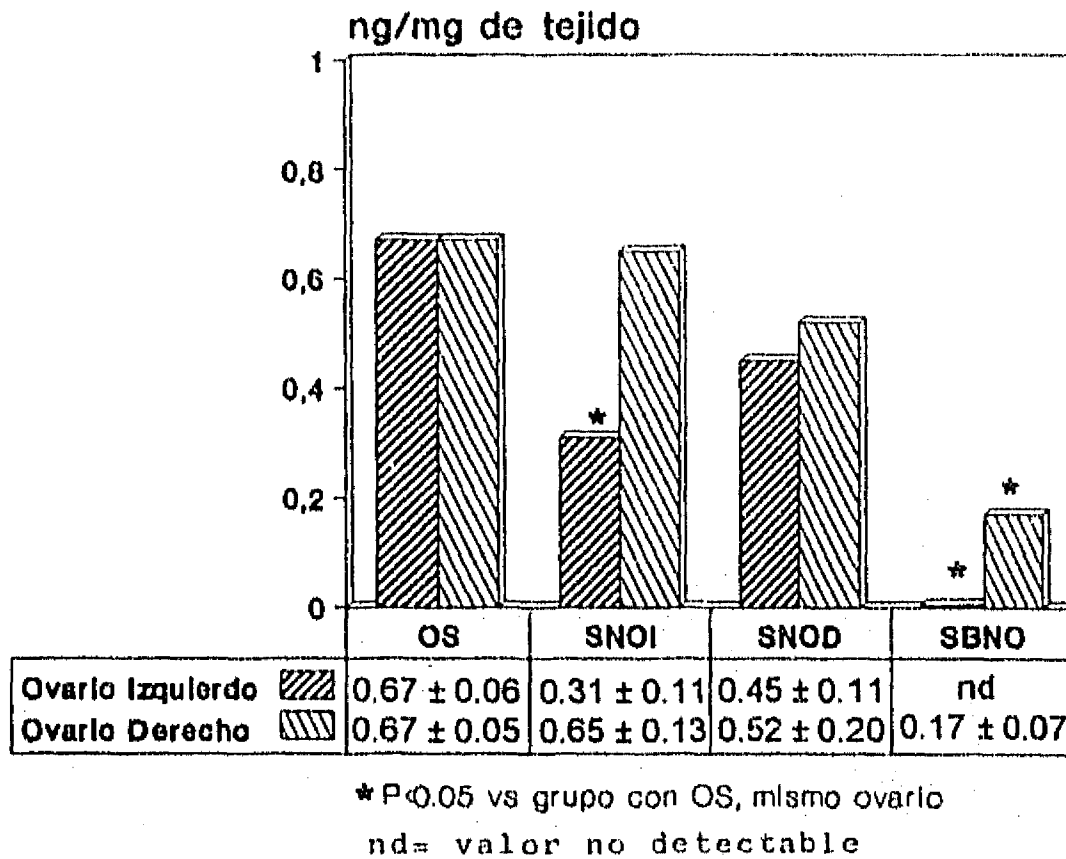


Fig.6. Media \pm em de la concentración de noradrenalina, en el ovario izquierdo o derecho, de animales con operación simulada (OS) o con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO), realizada en la etapa infantil y sacrificados al día del primer estro vaginal.

En los animales con sección unilateral se observó disminución en la tasa de animales ovulantes y en el número de ovocitos liberados por el ovario desnervado, respecto al grupo con operación simulada, mientras que aquellos con sección bilateral no presentaron modificaciones en estos parámetros. En ninguno de los grupos de animales desnervados se observó modificaciones en el peso de útero, respecto al grupo con operación simulada (Tabla IV).

Tabla IV: Tasa de animales ovulantes, media \pm sem del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo o derecho y peso del útero de animales con operación simulada (OS) o con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa infantil (16 días de edad) y sacrificados al día del primer estro vaginal.

| Grupo | Tasa de ovulantes por el ovario | | Ovocitos liberados por el ovario | | Útero (mg) |
|-------|---------------------------------|-------------------|----------------------------------|----------------------------|-----------------|
| | Izquierdo | Derecho | Izquierdo | Derecho | |
| OS | 4/5 | 4/5 | 4.0 \pm 0.7 | 2.8 \pm 0.6 | 152.1 \pm 0.5 |
| SNOI | 3/13 ^a | 9/13 | 3.3 \pm 1.3 | 6.9 \pm 0.5 ^b | 162.2 \pm 6.5 |
| SNOD | 8/10 | 2/10 ^a | 7.0 \pm 0.6 ^b | 2,10 | 163.0 \pm 8.4 |
| SBNO | 5/6 | 5/6 | 3.6 \pm 0.2 | 3.2 \pm 0.2 | 137.9 \pm 8.5 |

a, P<0.05 vs. grupo con OS, mismo ovario (prueba de Fisher)

b, P<0.05 vs. grupo con OS, mismo ovario (prueba de Kruskal-Wallis seguida por la U de Mann-Whitney).

En estos grupos de animales sacrificados al primer estro vaginal no se observaron cambios en el peso corporal (OS= 105.8 \pm 3.7; SNOI= 112.6 \pm 3.2; SNOD=115.3 \pm 4.0; SBNO= 96.8 \pm 3.5).

Desnervación en la etapa juvenil

En la tabla V se presentan los valores del contenido de noradrenalina en el ovario de los animales con operación simulada o con sección del nervio ovárico superior, realizada a los 32 días de edad y sacrificadas en diferentes períodos.

En el grupo con operación simulada el contenido de noradrenalina incrementó de las 24 a las 72 horas post-cirugía, y se mantuvo más o menos constante hasta el día del primer estro vaginal.

Cuando se seccionó el nervio ovárico izquierdo, el contenido de noradrenalina disminuyó drásticamente en el ovario desnervado, llegando a ser no detectable en los animales sacrificados a las 24 horas post-cirugía o al día del primer estro vaginal, en tanto que en la gónada intacta el contenido fue semejante a los de operación simulada, independientemente del tiempo de evolución.

En las hembras en las que se seccionó el nervio ovárico derecho, el ovario desnervado presentó disminución en el contenido del neurotransmisor en los tres periodos evaluados, sin modificaciones en el ovario innervado.

Con la sección de ambos nervios, en ambas gónadas se observó disminución en el contenido de noradrenalina respecto al grupo con operación simulada, independientemente del período post-cirugía (Tabla V).

Tabla V: Media \pm eem del contenido (ng) de noradrenalina en el ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) de animales con operación simulada (OS) o con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa juvenil (32 días de edad) y sacrificados a las 24 ó 72 horas post-cirugía o al día del primer estro vaginal (PEV).

T i e m p o p o s t c i r u g í a

| Grupo | | n | 24h | n | 72h | n | PEV |
|-------|----|---|-------------------|---|-------------------|---|-------------------|
| OS | OI | 6 | 5.53 \pm 0.52 | 8 | 8.69 \pm 0.97 | 4 | 9.47 \pm 1.30 |
| | OD | 6 | 5.56 \pm 0.60 | 9 | 7.44 \pm 0.50 | 4 | 8.13 \pm 1.69 |
| SNOI | OI | 5 | n.d * | 6 | 3.30 \pm 1.53* | 4 | n.d * |
| | OD | 6 | 3.98 \pm 0.42a | 6 | 6.40 \pm 1.28 | 3 | 9.53 \pm 1.48a |
| SNOD | OI | 3 | 6.15 \pm 2.72 | 7 | 8.00 \pm 0.91 | 5 | 6.41 \pm 0.24 |
| | OD | 3 | 2.09 \pm 0.27*a | 8 | 1.08 \pm 0.69*a | 7 | 0.75 \pm 0.42*a |
| SBNO | OI | 5 | 0.39 \pm 0.29* | 6 | 3.00 \pm 1.50* | 5 | 0.50 \pm 0.40* |
| | OD | 5 | 0.58 \pm 0.49* | 6 | 1.43 \pm 1.19* | 5 | n.d * |

n.d valores no detectables

* P < 0.05 vs. OS mismo ovario (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey).

a P < 0.05 vs. ovario izquierdo, mismo grupo (Prueba de "t" Student)

El peso de los ovarios de los animales con operación simulada en el período juvenil incrementó conforme al tiempo de evolución, sin diferencias en el crecimiento entre la gónada izquierda y derecha (Tabla VI).

La sección del nervio ovárico izquierdo no modificó el peso de los ovarios de los animales sacrificados 24 ó 72 horas después de la intervención, mientras que cuando se dejaron llegar al día del primer estro vaginal, se presentó ganancia en peso del ovario tanto desnervado como en el intacto (Tabla VI).

La sección del nervio ovárico derecho no modificó el peso de ambos ovarios en los grupos evaluados. En los grupos en los que se seccionaron ambos nervios ováricos, se observó incremento en el peso de ambos ovarios a las 24 horas post- cirugía y sólo en el ovario derecho a las 72 horas. Al día del primer estro vaginal el peso de los ovarios de los animales desnervados fue semejante al del grupo con operación simulada (Tabla VI).

Tabla VI: Media \pm eem del peso de los ovarios (mg) de animales con operación simulada (OS) o con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa juvenil (32 días de edad) y sacrificados a las 24 ó 72 horas post-cirugía o al día del primer estro vaginal (PEV).

T i e m p o p o s t - c i r u g í a

| Grupo | Ovario | 24h | 72h | PEV |
|-------|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| OS | Izquierdo | 9.8 \pm 0.6 | 12.3 \pm 1.3 | 15.4 \pm 2.7 |
| | Derecho | 9.2 \pm 0.8 | 12.3 \pm 1.4 | 13.1 \pm 1.7 |
| SNOI | Izquierdo | 11.1 \pm 1.3 | 13.5 \pm 1.5 | 22.7 \pm 1.9* |
| | Derecho | 9.6 \pm 1.1 | 8.3 \pm 0.7a | 21.0 \pm 1.8* |
| SNOD | Izquierdo | 11.7 \pm 1.6 | 12.6 \pm 1.0 | 16.1 \pm 1.0 |
| | Derecho | 10.2 \pm 0.7 | 14.6 \pm 1.2 | 13.0 \pm 1.7 |
| SBNO | Izquierdo | 21.2 \pm 3.0* | 16.6 \pm 2.1 | 21.0 \pm 1.6 |
| | Derecho | 18.4 \pm 1.9* | 18.7 \pm 2.0* | 15.8 \pm 1.4a |

* P<0.05 vs. OS mismo ovario (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey)

a P<0.05 vs. Ovario izquierdo mismo grupo (Prueba de "t" Student)

En las figuras 7,8 y 9 se presenta de manera gráfica las variaciones en la concentración de noradrenalina, en el ovario de animales con operación

simulada o con deservación realizada a los 32 días de edad y sacrificados a las 24 ó 72 horas post-cirugía o bien al día del primer estro vaginal.

En el grupo con sección del nervio ovárico superior izquierdo la concentración del neurotransmisor disminuyó en ambos ovarios, incluso llega a ser no detectable en el ovario deservado. Con la sección del nervio derecho, la concentración de noradrenalina disminuyó sólo en la gónada deservada. Mientras que con la sección bilateral, disminuyó en ambos ovarios, comparada con la registrada en el grupo con operación simulada (Fig. 7).

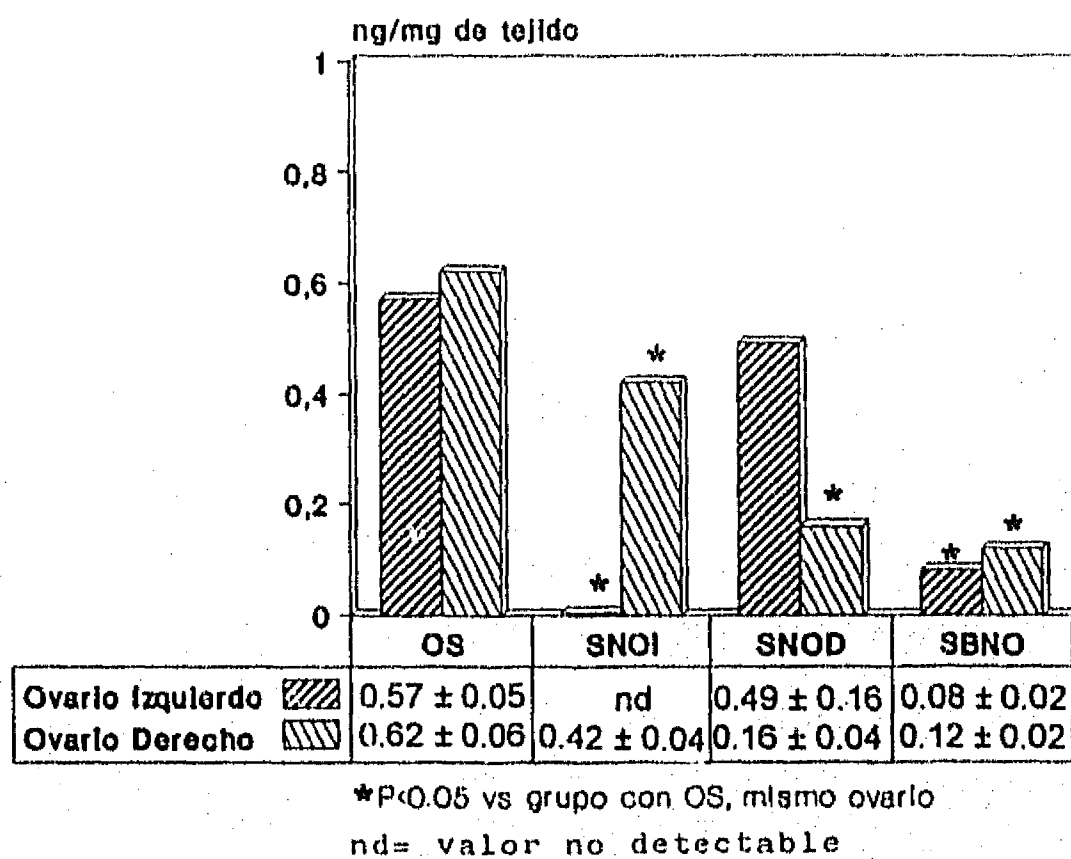
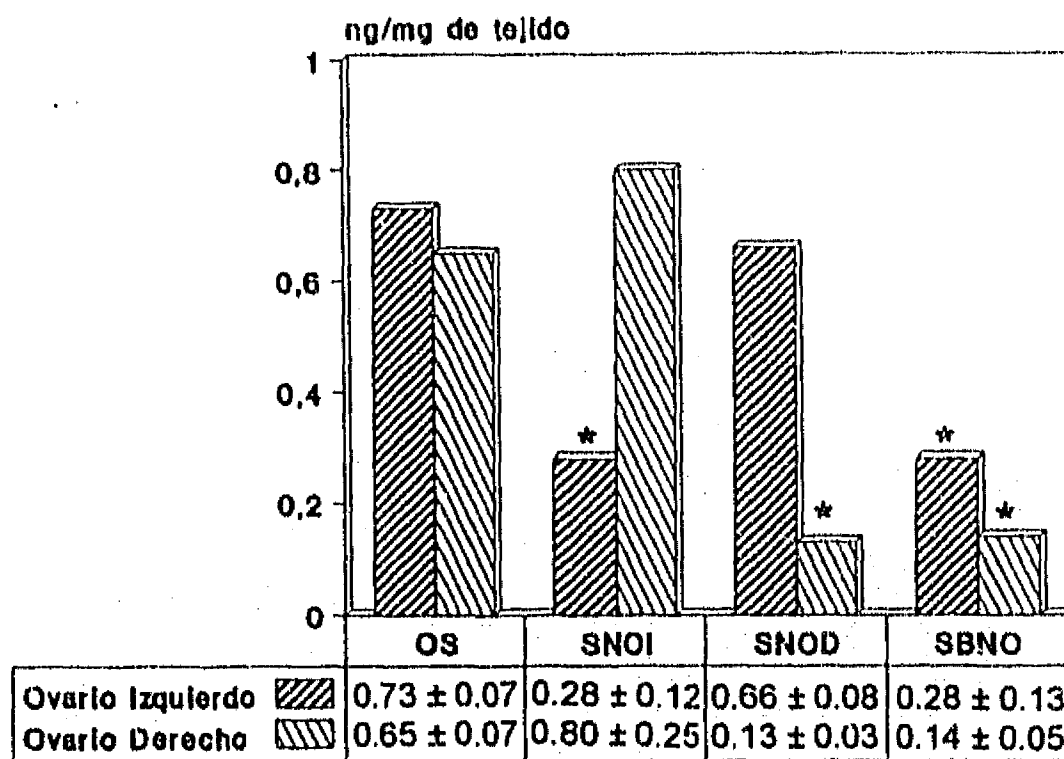


Fig. 7. Media \pm em de la concentración de noradrenalina, en el ovario izquierdo o derecho, de animales con operación simulada (OS) o con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO), realizada en la etapa juvenil y sacrificados a las 24 horas post-cirugía.

Setenta y dos horas después de la desnervación unilateral, la concentración del neurotransmisor disminuyó sólo en la gónada desnervada. En tanto que con la sección de ambos nervios, la concentración de la noradrenalina disminuyó significativamente en los dos ovarios (Fig 8).



*P<0.05 vs grupo con OS, mismo ovario

Fig. 8. Media \pm em de la concentración de noradrenalina, en el ovario izquierdo o derecho, de animales con operación simulada (OS) o con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO), realizada en la etapa juvenil y sacrificados a las 72 horas post-cirugía.

En los animales con sección unilateral y sacrificados al día del primer estro vaginal, la concentración de noradrenalina ovárica disminuyó en el ovario desnervado, en tanto que la gónada intacta no mostró variaciones respecto al grupo con operación simulada. En los que se seccionó ambos nervios, se presentó disminución sólo en el ovario izquierdo (Fig. 9).

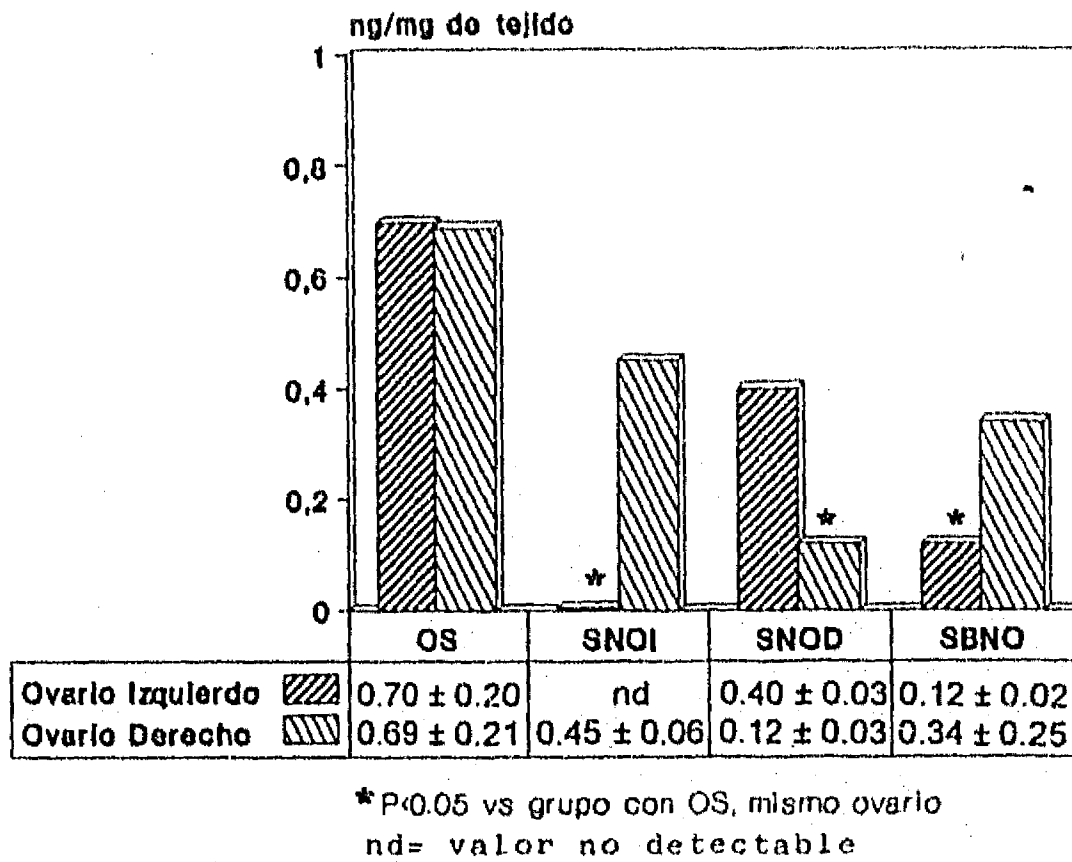


Fig. 9. Media \pm em de la concentración de noradrenalina, en el ovario izquierdo o derecho, de animales con operación simulada o con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO), realizada en la etapa juvenil y sacrificados al día del primer estro vaginal.

La desnervación uni o bilateral, realizada en la etapa juvenil no modificó la proporción de animales que ovularon al día del primer estro vaginal. En los animales con sección unilateral del nervio ovárico superior se observó aumento en la cuota ovulatoria por parte del ovario inervado, sin cambios en la gónada desnervada respecto al grupo con operación simulada. Mientras que, con la sección bilateral éste no se modificó. En ninguno de los grupos experimentales se modificó el peso del útero (Tabla VII).

Tabla VII: Tasa de animales ovulantes, media \pm sem del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo o derecho y peso del útero de animales con operación simulada (OS) o con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa juvenil (32 días de edad) y sacrificados al día del primer estro vaginal.

| Grupo | tasa de ovulantes por el ovario | | ovocitos liberados por el ovario | | Útero (mg) |
|-------|---------------------------------|---------|----------------------------------|----------------|------------------|
| | Izquierdo | Derecho | Izquierdo | Derecho | |
| OS | 4/5 | 4/5 | 3.3 \pm 0.3 | 3.5 \pm 0.3 | 163.5 \pm 5.2 |
| SNOI | 4/12 | 11/12 | 3.3 \pm 0.3 | 6.4 \pm 0.4a | 152.2 \pm 8.5 |
| SNOD | 10/11 | 5/11 | 5.1 \pm 0.6a | 3.4 \pm 1.1 | 156.2 \pm 7.6 |
| SBNO | 4/5 | 4/5 | 3.4 \pm 0.9 | 3.8 \pm 0.8 | 146.3 \pm 17.2 |

a, P<0.05 vs. grupo con OS, mismo ovario (prueba de Kruskal-Wallis seguida por U de Mann-Whitney).

En estos grupos experimentales no se modificó el peso corporal (OS= 115.6 ± 3.7 ; SNOI= 114.4 ± 4.0 ; SNOD= 118.8 ± 2.8 ; SBNO= 110.5 ± 5.0)

El aumento en el contenido de noradrenalina en el ovario de ratas intactas durante el desarrollo del animal, es semejante a lo descrito por otros autores (Ben-Jonathan y col, 1984). Dado que la sección unilateral del nervio ovárico superior en la etapa infantil, provocó disminución temporal en el contenido de la noradrenalina en el ovario desnervado, mientras que en los animales sacrificados al día del primer estro vaginal se produjo recuperación del contenido del neurotransmisor, podemos sugerir:

- 1.- que en los animales operados en la etapa infantil (con mayor tiempo post-cirugía), el ovario desnervado es capaz de "restablecer" el contenido de noradrenalina por la síntesis de novo (Ben-Jonathan y col, 1984).
- 2.- o que el plexo ovárico pudiera "compensar" la falta de información neural, proveniente del nervio ovárico superior.

A diferencia de lo que se observa con la sección unilateral, en los grupos con sección de ambos nervios ováricos no se restableció el contenido de la amina, independientemente del tiempo post-cirugía. Aunque no tenemos una explicación para este hecho, sugerimos que la respuesta ovulatoria normal en los animales con sección de ambos nervios puede estar dada porque otros sistemas de neurotransmisores ¿colinérgico, peptidérgico, entre otros? toman el "comando" en la modulación de los mecanismos que resultan en la ovulación.

Los resultados de este estudio muestran que es más drástico realizar la desnervación en la etapa juvenil que en la infantil, ya que el contenido de la amina disminuye aún más en los animales intervenidos a los 32 días de edad, lo que nos permite sugerir que conforme el animal se acerca a la edad en la que se produce la canalización de la vagina, le resulta más difícil restablecer el contenido del neurotransmisor ya que el sistema estaría más diferenciado. Resultados semejante han sido observados por Marchetti y col, (1987), quienes evaluaron el efecto de la sección del plexo ovárico y del nervio ovárico sobre el contenido de receptores adrenérgicos y observaron que en el animal que se encuentra más cercano a la edad en la que se produce la canalización de la vagina, se produjo una caída mayor en el contenido de receptores comparado con animales más jóvenes.

Experimento 2.

Efectos de la administración de PMSG en animales prepúberes con sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior

La FSH actúa sobre los folículos que se encuentran en "reposo" estimulando su crecimiento y maduración (Richards, 1980). A la fecha existen numerosas evidencias que muestran que el crecimiento folicular no sólo depende de la acción de las gonadotropinas, sino también de la inervación noradrenérgica que llega al compartimiento folicular (Ayala y col, 1988; Malamed y col, 1990, 1992).

Previamente mostramos que en la rata prepúber la sección unilateral del nervio ovárico superior provoca disminución hasta en un 50% en el número total de folículos medidos, tanto en la gónada inervada como en la desnervada y que esta disminución se da principalmente en aquellos folículos que se encuentran en la etapa de crecimiento (diámetro promedio menor de 350 μm). Estos resultados nos llevan a sugerir que la información catecolaminérgica que transcurre por el nervio ovárico superior actúa como modulador de los procesos de crecimiento folicular y la ovulación y, que al parecer existe una vía de comunicación entre los ovarios que permite que el ovario que mantiene intacta su inervación se "entere" y responda también con modificaciones en la población folicular (Morales, 1991).

Si el nervio ovárico superior modula la respuesta del ovario a las gonadotropinas entonces:

¿ La disminución del crecimiento folicular se debe a que el ovario desnervado disminuye su capacidad de respuesta a la FSH, a la LH o a ambas hormonas?

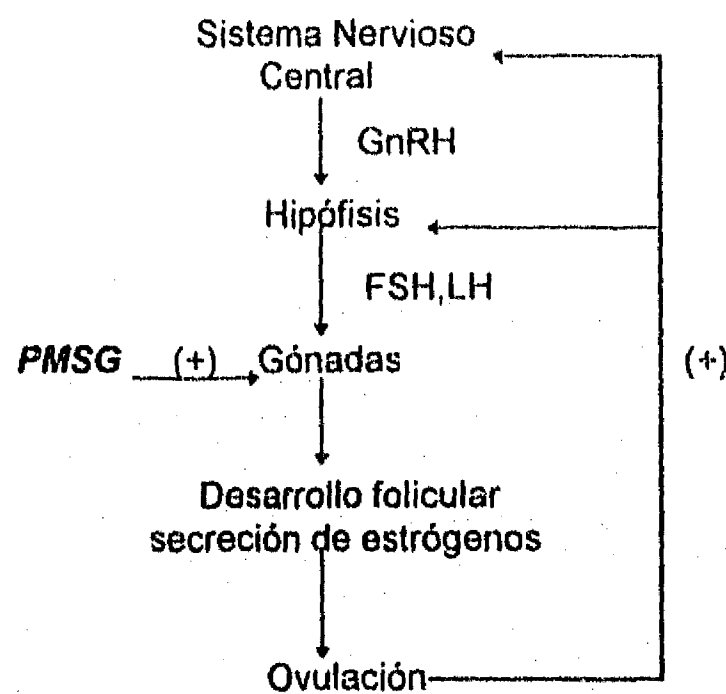
¿ Se modificó la actividad esteroidogénica del ovario, lo que impidió una correcta liberación de gonadotropinas por parte del eje hipotálamo-hipófisis?

¿ La respuesta del ovario desnervado depende de la etapa del crecimiento y maduración del animal en la que se realiza la manipulación quirúrgica?

¿ Los efectos dependen del nervio que se secciona?

Dado que en los roedores la gonadotropina del suero de yegua preñada (PMSG) estimula el crecimiento y la diferenciación de los folículos ováricos de manera semejante a lo que hace la FSH, en este experimento se analiza si la sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior afecta la capacidad de respuesta del ovario a un estímulo similar al de la FSH.

En el siguiente esquema se plantea el efecto que tiene la administración de la PMSG sobre el ovario para inducir la ovulación.



Para probar si en los animales con sección del nervio ovárico superior se modifica la respuesta a la FSH se realizó los siguientes experimentos.

Ratas en la etapa infantil (16 días de edad) o juvenil (32 días) fueron sometidas a la sección del nervio ovárico superior izquierdo, derecho o de ambos nervios. Entre las 09:00 y las 11:00 h del día 36 de edad, los animales de los diferentes tratamientos fueron inyectados o no con 8 ui de PMSG (Sigma Chemical Co, St Louis Mo., EEUU) y se sacrificaron en la mañana del día del primer estro vaginal (Fig 10). Los resultados obtenidos fueron los siguientes.

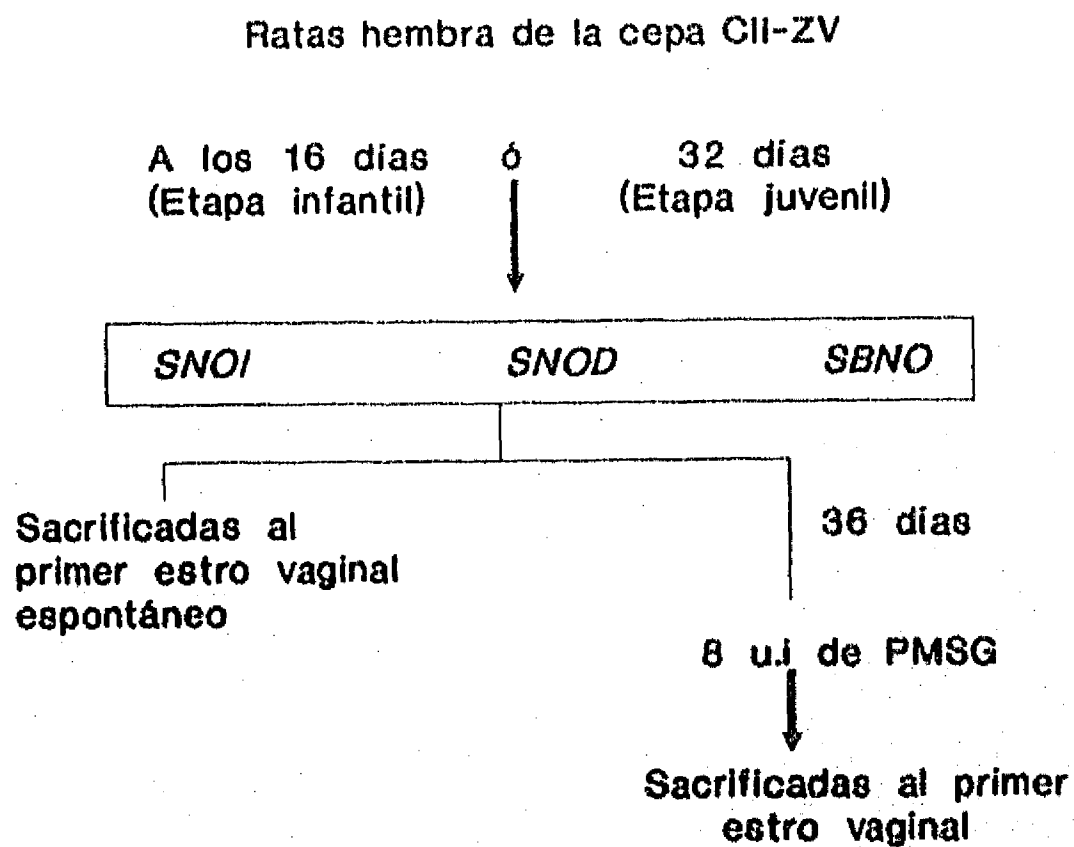


Fig. 10. Esquema del método utilizado para la estimulación con PMSG.

RESULTADOS

Efectos de la administración de PMSG en animales prepúberes con sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior.

En las hembras con operación simulada realizada a los 16 días de edad, la apertura vaginal se presentó alrededor de los 41 días de edad, semejante a los animales intactos (41.8 ± 1.6 vs 40.8 ± 0.4). En ambos grupos el primer estro se registró aproximadamente 48 h después de la canalización vaginal (OS= 43.4 ± 1.9 ; Intactas= 42.0 ± 0.5). De igual manera la operación simulada no modificó el número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo (OS= 3.8 ± 1.3 ; Intactos= 3.5 ± 0.4) ni por el derecho (OS= 2.8 ± 0.9 ; Intactas= 3.5 ± 0.5).

Respuesta del animal intacto a la estimulación con PMSG

En los animales intactos tratados con PMSG, el 100% de los animales ovuló al día del primer estro vaginal, 72 horas después del tratamiento hormonal. El número de ovocitos liberados y el peso de cada uno de los ovarios fue mayor que en el grupo testigo sin tratamiento hormonal (Tabla VIII). El peso del útero del grupo estimulado fue semejante al del grupo testigo (167.7 ± 4.1 vs 163.5 ± 5.2 NS).

Tabla VIII.- Tasa de animales ovulantes por el ovario izquierdo o derecho, media± eem del número de ovocitos liberados y del peso de los ovarios (mg/100 g) de animales sacrificados al día del primer estro vaginal espontáneo o tratados a los 36 días de edad con 8 ui de PMSG y sacrificados al día del primer estro vaginal.

| Grupo | Tasa de ovulantes | Ovocitos | Peso de ovarios |
|---------------------|-------------------|----------|-----------------|
| Sin hormonas | | | |
| Ovario izquierdo | 12/20 | 3.5±0.4 | 17.2±0.8 |
| Ovario derecho | 13/20 | 3.5±0.5 | 17.4±0.7 |
| +PMSG | | | |
| Ovario izquierdo | 11/11 | 6.6±0.9a | 35.3±4.8b |
| Ovario derecho | 11/11 | 6.5±1.2a | 29.7±2.6b |

a, P<0.05 vs. el grupo sin hormonas, mismo ovario (Prueba de Kruskal-Wallis, seguido por la U de Mann-Whitney).

b, P<0.05 vs. el grupo sin hormonas, mismo ovario (Prueba de "t" de Student).

La administración de PMSG en los animales intactos provocó un rescate de la atresia, sobre todo en aquellos folículos con diámetro menores a 350 µm (Tabla IX).

Tabla IX. Media \pm em del número de folículos sanos o atrésicos, de animales sin tratamiento hormonal o tratados a los 36 días de edad con 8 ui de PMSG y sacrificados al primer estro vaginal.

| Grupo | Ovario Izquierdo | | Ovario Derecho | |
|------------------------|------------------|-----------------|-----------------|----------------|
| | < 350 | >350 μ m | <350 | >350 μ m |
| Sin tratamiento | | | | |
| Sanos | 68.0 \pm 3.3 | 5.0 \pm 2.0 | 77.5 \pm 6.6 | 5.8 \pm 1.5 |
| Atrésicos | 36.5 \pm 5.0 | 11.0 \pm 2.4 | 35.0 \pm 4.1 | 12.8 \pm 4.2 |
| +PMSG | | | | |
| Sanos | 59.3 \pm 1.7 | 14.3 \pm 2.9* | 60.0 \pm 2.5 | 11.7 \pm 2.2 |
| Atrésicos | 19.3 \pm 4.1* | 7.0 \pm 1.5 | 14.0 \pm 1.0* | 14.3 \pm 2.3 |

*, P<0.05 vs. grupo intacto, mismo ovario y diámetro (prueba de "t" de Student).

Respuesta del animal desnervado en la etapa infantil, estimulado con PMSG en la etapa peripuberal.

En las hembras con sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior y estimuladas con PMSG, la proporción de animales ovulantes fue semejante al grupo desnervado sin tratamiento hormonal sacrificado al día del primer estro vaginal. De la misma manera, con la sección unilateral del nervio ovárico, el número de ovocitos liberados por el ovario desnervado fue menor y en la gónada intacta no hay aumento en la cuota ovulatoria por la administración de PMSG (Tabla X).

Tabla X : Tasa de animales ovulantes y media \pm eem del número de ovocitos liberados en ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa infantil (16 días), sacrificadas al estro vaginal espontáneo o tratadas a los 36 días con 8 ui de PMSG y sacrificadas al día del primer estro vaginal.

| Grupo | Tasa de ovulantes por el ovario | | Ovocitos liberados por el ovario | |
|-------|---------------------------------|---------|----------------------------------|----------------|
| | Izquierdo | Derecho | Izquierdo | Derecho |
| SNOI | 2/10 | 5/10 | 3, 4 | 6.0 \pm 1.4 |
| +PMSG | 0/8 | 6/8 a | cero | 6.5 \pm 0.3 |
| SNOD | 8/8 | 3/8 | 6.5 \pm 0.8 | 1.5 \pm 0.9b |
| +PMSG | 5/6 | 2/6 | 7.0 \pm 1.9 | 1, 1 |
| SBNO | 3/8 | 2/8 | 3.5 \pm 1.3 | 4, 6 |
| +PMSG | 4/5 | 2/5 | 4.3 \pm 0.3 | 2, 4 |

a, P<0.05 vs. ovario izquierdo mismo grupo (Prueba de Fisher)

b, P<0.05 vs. ovario izquierdo mismo grupo (Prueba de "t" Student)

En los animales con sección unilateral del nervio ovárico superior, el ovario desnervado presentó un peso menor comparado al innervado. Cuando se seccionaron ambos nervios ováricos, la disminución se presentó en el ovario derecho. Este comportamiento se mantuvo aún después de la estimulación con la PMSG y sólo en las hembras con sección del nervio derecho estimuladas con la gonadotropina, se presentó incremento en el peso del ovario intacto (izquierdo). Ante la estimulación con PMSG el peso del útero disminuyó en el grupo con sección del nervio ovárico izquierdo (Tabla XI).

Tabla XI: Media \pm eem del peso de los ovarios y del útero (mg/100 g) de ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO), realizada en la etapa infantil (16 días), sacrificadas al estro vaginal espontáneo o tratadas a los 36 días con 8 ui de PMSG y sacrificadas al día del primer estro vaginal.

| Grupo | O V A R I O S | | ÚTERO |
|-------|-----------------|-----------------|------------------|
| | Izquierdo | Derecho | |
| SNOI | 15.6 \pm 2.3 | 22.7 \pm 1.1b | 168.5 \pm 7.7 |
| +PMSG | 12.4 \pm 1.6 | 26.2 \pm 2.5b | 133.5 \pm 9.5a |
| SNOD | 19.4 \pm 2.1 | 11.1 \pm 1.6b | 142.5 \pm 4.0 |
| +PMSG | 32.1 \pm 2.1a | 13.8 \pm 0.7b | 124.3 \pm 8.4 |
| SBNO | 21.9 \pm 2.2 | 13.9 \pm 1.6b | 175.6 \pm 15.6 |
| +PMSG | 28.6 \pm 3.3 | 17.4 \pm 1.7b | 165.8 \pm 6.7 |

a, $P < 0.05$ vs. grupo desnervado sin gonadotropinas (Prueba de ANDEVA, seguida por Tukey).

b, $P < 0.05$ vs. ovario izquierdo mismo grupo (Prueba de "t" Student).

Respuesta del animal desnervado en la etapa juvenil y estimulado con PMSG en la etapa peripuberal.

En los animales con operación simulada realizada a los 32 días de edad, la apertura vaginal se presentó aproximadamente 10 días después (42.1 \pm 1.2 días de edad) y el primer estro vaginal se presentó a los 43.2 \pm 1.4 días. Al día del estro el 65% de los animales ovuló, de ellos el ovario izquierdo liberó 3.5 \pm 1.1 ovocitos y el derecho 3.6 \pm 1.2.

En las hembras con sección del nervio ovárico superior, la estimulación con PMSG no modificó la tasa de animales ovulantes ni el número de ovocitos liberados, comparado al grupo desnervado sin tratamiento hormonal. En los grupos en los que se administró la PMSG se siguió manteniendo que el ovario desnervado presentó una cuota ovulatoria menor que el ovario innervado (Tabla XII).

Tabla XII: Tasa de animales ovulantes y media \pm eem del número de ovocitos liberados en ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa juvenil (32 días), sacrificadas al estro vaginal espontáneo o tratadas a los 36 días con 8 ui de PMSG y sacrificadas al día del primer estro vaginal.

| Grupo | Tasa de ovulantes por el ovario | | Ovocitos liberados por el ovario | |
|-------|---------------------------------|------------------|----------------------------------|---------------|
| | Izquierdo | Derecho | Izquierdo | Derecho |
| SNOI | 4/9 | 5/9 | 3.2 \pm 1.2 | 4.8 \pm 0.7 |
| +PMSG | 2/6 | 6/6 ^a | 3, 5 | 5.7 \pm 0.8 |
| SNOD | 5/6 | 4/6 | 6.6 \pm 1.2 | 3.2 \pm 1.3 |
| +PMSG | 6/7 | 2/7 | 5.8 \pm 1.2 | 1, 2 |
| SBNO | 8/11 | 8/11 | 3.4 \pm 0.9 | 3.8 \pm 0.8 |
| +PMSG | 7/10 | 5/10 | 7.5 \pm 2.2 | 3.4 \pm 1.3 |

a, P<0.05 vs. ovario izquierdo mismo grupo (Prueba de Fisher)

En las ratas en las que se realizó la sección unilateral del nervio ovárico superior, el ovario intacto respondió al estímulo con la PMSG con incremento en el peso, mientras que la gónada desnervada no presentó esta

respuesta. Con la sección bilateral el ovario que aumentó de peso fue el izquierdo. La administración de PMSG no modificó el peso del útero, en comparación con aquellos sacrificados en el día del primer estro espontáneo (Tabla XIII).

Tabla XIII: Media \pm eem del peso de los ovarios y del útero (mg/100 g) de animales con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa juvenil (32 días), sacrificadas al estro vaginal espontáneo o tratadas a los 36 días con 8 ui de PMSG y sacrificadas al día del primer estro vaginal.

| Grupo | O V A R I O S | | ÚTERO |
|-------|-----------------|-----------------|------------------|
| | Izquierdo | Derecho | |
| SNOI | 16.7 \pm 1.5 | 16.9 \pm 1.2 | 157.8 \pm 11.5 |
| +PMSG | 24.1 \pm 3.4 | 32.5 \pm 3.7* | 169.5 \pm 9.6 |
| SNOD | 16.3 \pm 2.1 | 18.7 \pm 2.9 | 144.3 \pm 11.1 |
| +PMSG | 27.2 \pm 3.9* | 23.6 \pm 3.0 | 167.6 \pm 16.3 |
| SBNO | 17.9 \pm 0.6 | 19.4 \pm 1.5 | 151.9 \pm 7.0 |
| +PMSG | 30.7 \pm 3.3* | 24.9 \pm 2.5 | 152.6 \pm 8.4 |

*, P<0.05 vs. su grupo desnervado sin gonadotropinas, mismo ovario (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey).

Población Folicular

Según varios autores (McCormack y col, 1964; Ojeda y Urbanski, 1994; Villavicencio y col, 1993) en el animal de 36 días de edad, el eje hipotálamo-hipófisis-ovario es capaz de responder a los estímulos hormonales. En esta etapa del desarrollo ya se han llevado a cabo muchos de los procesos neuroendócrinos que van a culminar con la primera ovulación. Y dado que la respuesta ovulatoria de los animales desnervados en la etapa infantil y estimulados con gonadotropinas fue semejante a lo observado en las desnervadas en la etapa juvenil, se decidió realizar el estudio de la población folicular sólo en los grupos operados a los 32 días de edad.

En las hembras intactas, sacrificadas al primer estro vaginal espontáneo, el ovario izquierdo presentó 120.0 ± 8.1 folículos y 129.3 ± 8.3 en el ovario derecho. En los grupos en los que se realizó la desnervación en la etapa juvenil, el número de folículos se encuentra disminuido en ambos ovarios. La estimulación con la PMSG no alteró el número total de folículos medidos en el ovario izquierdo y derecho de estos animales (Fig. 11).

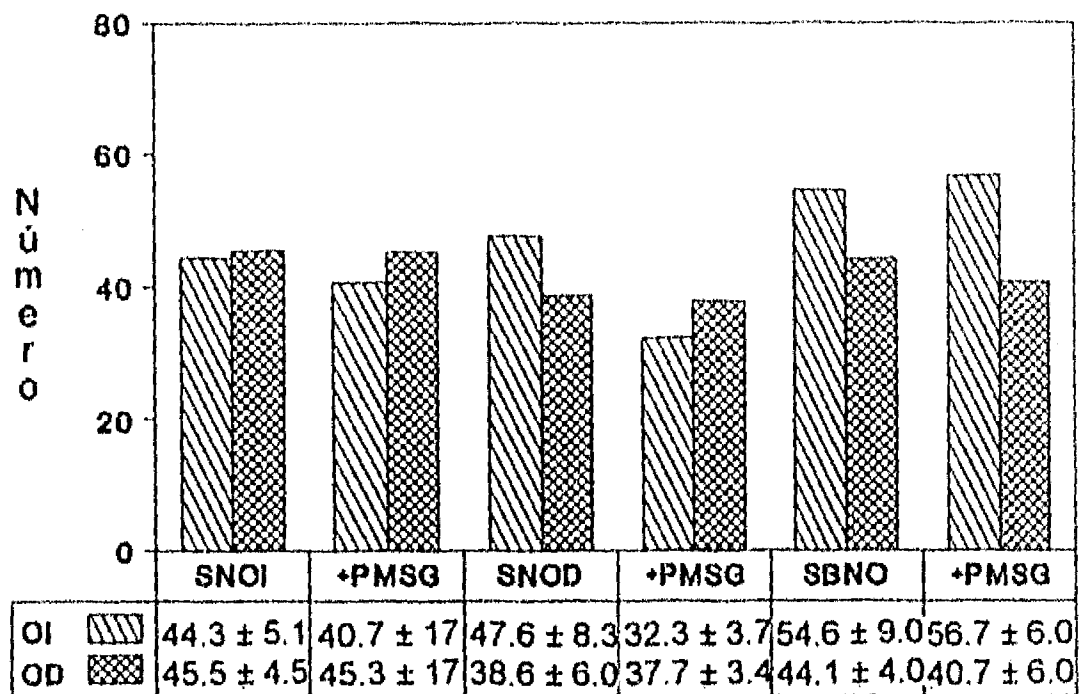


Fig. 11. Media \pm eem del número total de folículos medidos en ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa juvenil (32 días), sacrificadas al estro vaginal espontáneo o tratadas a los 36 días con 8 ui de PMSG y sacrificadas al día del primer estro vaginal.

En la tabla XIV se presenta la relación de estos folículos clasificados en sanos y atrésicos. Como se observa en los grupos con desnervación catecolaminérgica, la estimulación con la PMSG no modificó el número de los folículos sanos ni atrésicos.

Tabla XIV: Media \pm eem del número de folículos *sanos* o *atrésicos* de ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa juvenil (32 días), sacrificadas al estro vaginal espontáneo o tratadas a los 36 días con 8 ui de PMSG y sacrificadas al día del primer estro vaginal.

| Grupo | Ovario Izquierdo | | Ovario Derecho | |
|-------|------------------|----------------|-----------------|----------------|
| | Sanos | Atrésicos | Sanos | Atrésicos |
| SNOI | 30.0 \pm 4.2 | 14.3 \pm 2.6 | 31.2 \pm 3.3 | 14.3 \pm 2.2 |
| +PMSG | 20.0 \pm 9.6 | 20.7 \pm 8.6 | 25.0 \pm 13.1 | 20.3 \pm 4.9 |
| SNOD | 32.9 \pm 5.7 | 14.7 \pm 3.1 | 24.8 \pm 4.2 | 13.8 \pm 2.1 |
| +PMSG | 19.7 \pm 3.8 | 12.7 \pm 2.3 | 21.7 \pm 0.7 | 16.0 \pm 4.0 |
| SBNO | 38.8 \pm 5.6 | 14.7 \pm 2.9 | 30.2 \pm 3.1 | 13.9 \pm 2.2 |
| +PMSG | 32.7 \pm 3.3 | 24.0 \pm 4.6 | 22.0 \pm 5.0 | 18.7 \pm 4.3 |

Cuando se analizaron los resultados en función del diámetro de los folículos, se observó que en los animales con sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior la administración de PMSG no estimuló el crecimiento de los folículos pequeños ni de los grandes en el ovario intacto o desnervado (Fig. 12).

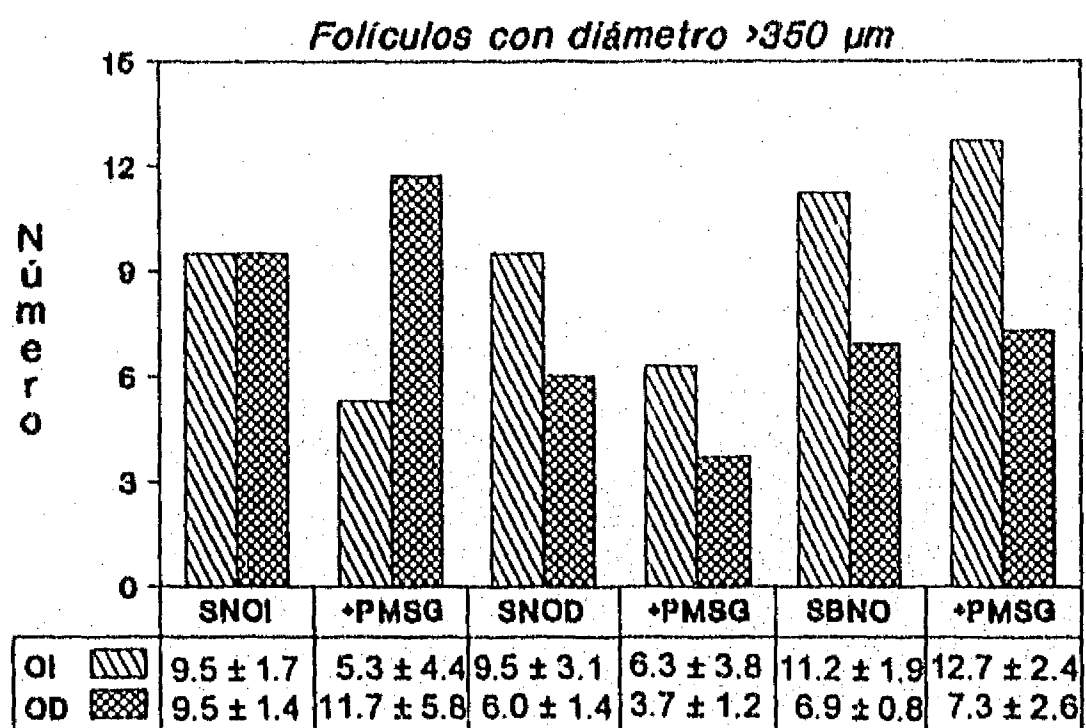
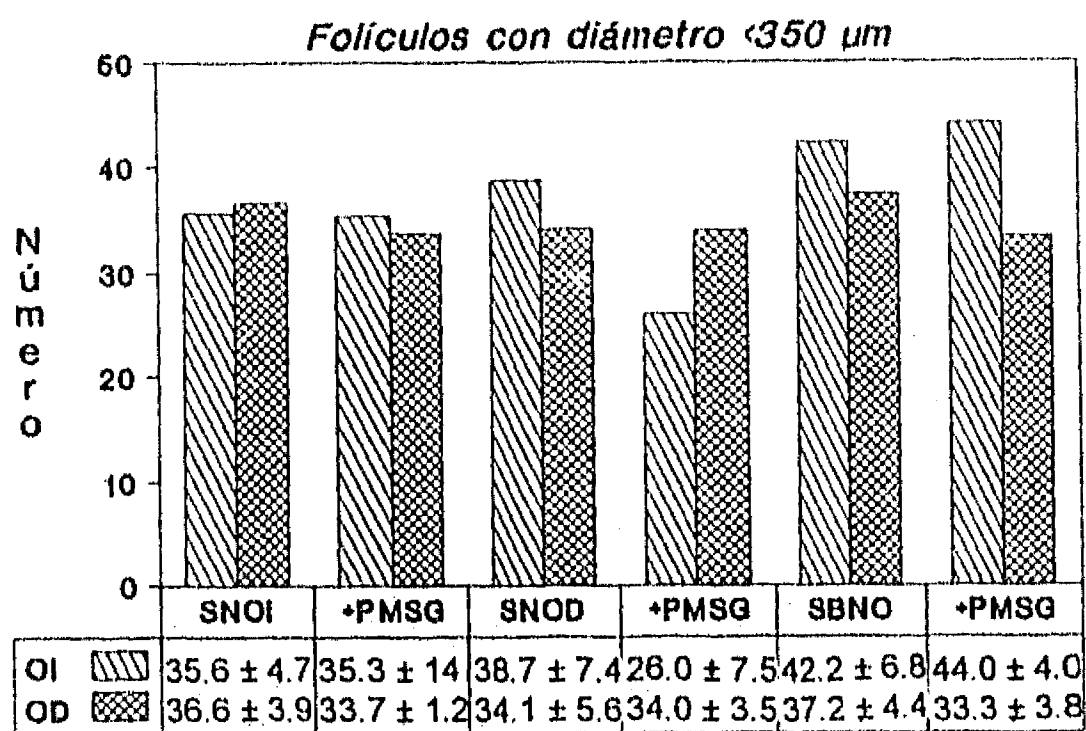


Fig. 12. Media ± eem del número de folículos medidos en ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o ambos nervios (SBNO), realizada en la etapa juvenil (32 días), sacrificadas al estro vaginal espontáneo o tratadas a los 36 días con 8 ui de PMSG y sacrificadas al día del primer estro vaginal.

Como se puede apreciar en la tabla XV, la estimulación con PMSG no aumentó el número de folículos sanos, comparado con el grupo desnervado y sin tratamiento hormonal, sacrificados al día del primer estro vaginal espontáneo.

Tabla XV: Media \pm eem del número de folículos sanos por rango, de ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa juvenil (32 días), sacrificadas al estro vaginal espontáneo o tratadas a los 36 días con 8 ui de PMSG y sacrificadas al día del primer estro vaginal.

| Grupo | Folículos Sanos por el Ovario Izquierdo | | Folículos Sanos por el Ovario Derecho | |
|-------|---|---------------|---------------------------------------|---------------|
| | <350 | >350 μ m | <350 | >350 μ m |
| SNOI | 26.9 \pm 3.9 | 4.1 \pm 1.0 | 27.8 \pm 2.9 | 4.0 \pm 1.0 |
| +PMSG | 17.8 \pm 8.4 | 2.3 \pm 1.5 | 20.0 \pm 10.7 | 5.0 \pm 2.6 |
| SNOD | 28.9 \pm 5.3 | 4.8 \pm 0.8 | 22.9 \pm 3.9 | 3.1 \pm 0.9 |
| +PMSG | 17.7 \pm 5.0 | 2.0 \pm 1.5 | 20.7 \pm 0.9 | 1.0 \pm 0.6 |
| SBNO | 32.7 \pm 4.7 | 6.8 \pm 1.9 | 27.6 \pm 3.1 | 3.4 \pm 0.8 |
| +PMSG | 26.7 \pm 2.4 | 6.0 \pm 1.7 | 19.7 \pm 3.7 | 2.3 \pm 1.3 |

Los resultados de este experimento nos llevaron a concluir que la información catecolaminérgica que transcurre por el nervio ovárico superior, modula de manera estimuladora los efectos que normalmente ejerce la PMSG. Esta afirmación se basa en que no se observó:

- incremento en el reclutamiento de los folículos con diámetro menor a 350 μ m.
- rescate de la atresia.
- aumento en la cuota ovulatoria.

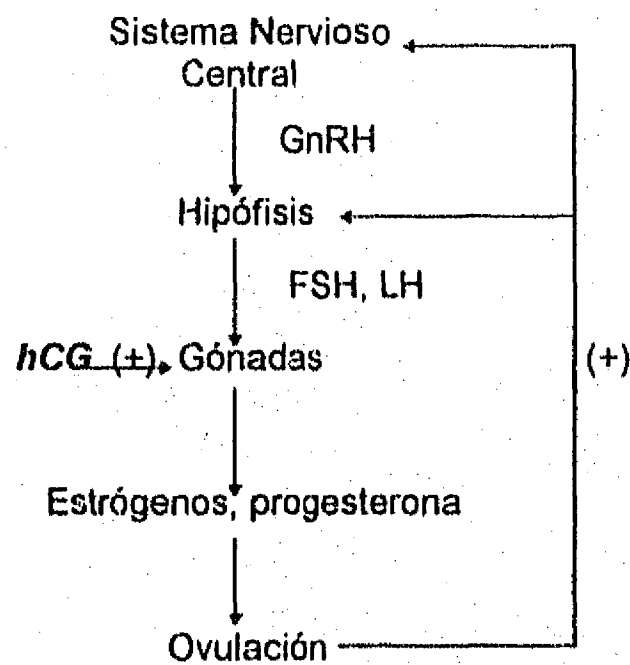
En apoyo a esta interpretación se tienen los resultados de Grob (1974) quien mostró que la desnervación catecolaminérgica disminuye la incorporación de timidina marcada en los folículos pequeños presentes en el ovario desnervado.

El aumento de peso de los ovarios en los grupos operados a los 32 días de edad, estimulados con la gonadotropina, puede explicarse por la duración de la actividad biológica de la PMSG, como ha sido mostrado previamente (Villavicencio y col, 1993).

En la rata intacta de 21, 24 ó 27 días de edad, la administración de PMSG provoca incremento del peso del útero como respuesta al aumento en la síntesis de esteroides (Arakawa y col, 1989; Villavicencio y col, 1993). Este efecto no lo observamos si la estimulación con PMSG se realiza en la etapa peripuberal (36 días de edad), lo que apoya el hecho de los efectos de la PMSG dependen de la edad en la que se realice la administración. En las hembras con sección uni o bilateral del nervio ovárico superior no se modificó el peso del útero, esto puede ser considerado como un indicador biológico de que no hubo cambios drásticos en el proceso de esteroidogénesis. Aguado y Ojeda (1984a) mostraron que la sección bilateral del nervio ovárico provoca una caída en la concentración de estrógenos y progesterona en plasma durante los primeros 24 min. que dura el estudio, sin embargo desconocemos si se mantiene o no esta disminución.

Efectos de la estimulación por la administración de hCG en animales prepúberes con sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior

En el experimento anterior se mostró que en los animales con sección unilateral del nervio ovárico superior, la estimulación con PMSG provocó aumento en el peso del ovario intacto, aunque la ovulación en el ovario desnervado sigue siendo muy escasa a pesar de que existen folículos grandes (> 350 μ m) que podrían responder al estímulo endógeno de la LH y de esta manera lograr que el ovario desnervado ovule normalmente. Estos resultados nos llevaron a pensar que al eliminar la inervación catecolaminérgica que transcurre por el nervio ovárico superior, disminuye la respuesta del folículo preovulatorio a la LH. Para probar esta hipótesis partimos del hecho de que si se administra hCG, la cual tiene el mismo efecto que la LH, se remede el "pico preovulatorio" que estimula la ruptura del folículo, lo que da como respuesta final la ovulación.



El modelo experimental para responder este planteo fue el siguiente:

Ratas en la etapa infantil (16 días de edad) o juvenil (32 días) se les realizó la sección del nervio ovárico superior izquierdo, derecho o de ambos nervios. Entre las 09:00 y las 11:00 del día 36 de edad los animales de los diferentes tratamientos fueron inyectados o no con 10 ui de hCG y se sacrificaron en la mañana del día del primer estro vaginal (Fig. 13). Los resultados obtenidos fueron los siguientes.

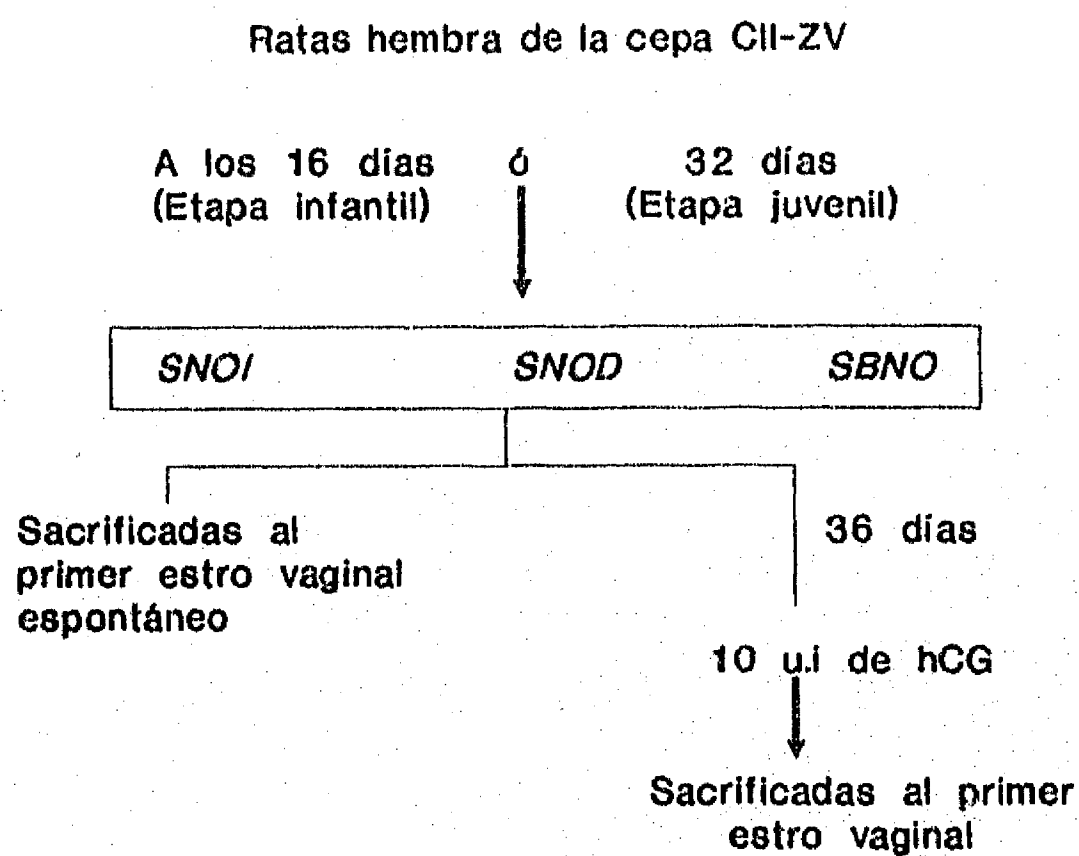


Fig. 13. Esquema del método utilizado para la estimulación con hCG.

Resultados

Efectos de la estimulación por la administración de hCG en animales prepúberes con sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior

En los animales intactos estimulados con hCG el primer estro vaginal se presentó 72 horas posteriores a la administración de la hormona. No se modificó ni la proporción de animales ovulantes ni el peso de los ovarios. Se observó un incremento por el número de ovocitos liberados por ambos ovarios, pero sólo fue estadísticamente significativo para el ovario izquierdo (Tabla XVI).

Tabla XVI.- Tasa de animales ovulantes por el ovario izquierdo o derecho, media \pm eem del número de ovocitos liberados y del peso de los ovarios (mg/100 g) de animales sin hormonas o tratados a los 36 días de edad con 10 ui de hCG, sacrificados al día del primer estro vaginal.

| Grupo | Tasa de ovulantes | Ovocitos liberados | Ovarios |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------------|
| Sin hormonas | | | |
| Ovario izquierdo | 12/20 | 3.5 \pm 0.4 | 17.2 \pm 0.8 |
| Ovario derecho | 13/20 | 3.5 \pm 0.5 | 17.4 \pm 0.7 |
| +hCG | | | |
| Ovario izquierdo | 6/7 | 5.7 \pm 0.8* | 18.4 \pm 1.4 |
| Ovario derecho | 7/7 | 5.4 \pm 0.9 | 19.1 \pm 2.2 |

*, P<0.05 vs el grupo sin gonadotropinas, mismo ovario (Prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la U de Mann-Whitney).

En los animales intactos, la administración de hCG provocó en ambos ovarios disminución en el número de folículos con un diámetro <350 μ m sanos y atrésicos (Tabla XVII).

Tabla XVII. Media \pm em del número de folículos *sanos* o *atrésicos*, de animales sin tratamiento o tratados a los 36 días de edad con 10 ui de hCG, sacrificadas al día del primer estro vaginal.

| Grupo | Ovario Izquierdo | | Ovario Derecho | |
|---------------------|------------------|----------------|-----------------|----------------|
| | <350 | >350 μ m | <350 | >350 μ m |
| Sin hormonas | | | | |
| <i>Sanos</i> | 68.0 \pm 3.3 | 5.0 \pm 2.0 | 77.5 \pm 6.6 | 5.8 \pm 1.5 |
| <i>Atrésicos</i> | 36.5 \pm 5.0 | 11.0 \pm 2.4 | 35.0 \pm 4.1 | 12.8 \pm 4.2 |
| +hCG | | | | |
| <i>Sanos</i> | 35.3 \pm 2.2* | 10.3 \pm 3.3 | 44.7 \pm 4.4* | 8.3 \pm 2.2 |
| <i>Atrésicos</i> | 9.7 \pm 3.8* | 7.6 \pm 2.9 | 9.0 \pm 1.5* | 5.7 \pm 0.9 |

*, P<0.05 vs grupo intacto, mismo ovario y diámetro (prueba de "t" de Student).

Respuesta del animal desnervado en la etapa infantil y estimulado con hCG en la etapa peripuberal.

En los animales en los que se cortó el nervio ovárico izquierdo o ambos nervios, el tratamiento con hCG no incrementó la tasa de animales ovulantes. En tanto que con la sección del nervio derecho, el ovario desnervado y el innervado presentaron disminución en la proporción de animales ovulantes. En los grupos con sección unilateral el número de ovocitos liberados siguió bajo aún después de la estimulación con hCG, mientras que en los desnervados bilateralmente, el ovario derecho presentó un aumento en la cuota ovulatoria (Tabla XVIII).

Tabla XVIII : Tasa de animales ovulantes y media \pm eem del número de ovocitos liberados en ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa infantil (16 días), sacrificadas al estro vaginal espontáneo o tratadas a los 36 días con 10 ui de hCG y sacrificadas al día del primer estro vaginal.

| Grupo | Tasa de ovulantes por el Ovario | | Ovocitos liberados por el Ovario | |
|-------|---------------------------------|---------|----------------------------------|-----------------|
| | Izquierdo | Derecho | Izquierdo | Derecho |
| SNOI | 2/10 | 5/10 | 3, 4 | 6.0 \pm 1.4 |
| +hCG | 3/13 | 5/13 | 2.0 \pm 1.1 | 5.6 \pm 1.5 |
| SNOD | 8/8 | 3/8 | 6.5 \pm 0.8 | 1.5 \pm 0.9 a |
| +hCG | 3/12* | 0/12* | 8.0 \pm 0.0 | cero |
| SBNO | 3/8 | 2/8 | 3.5 \pm 1.3 | 4, 6 |
| +hCG | 4/7 | 5/7 | 3.5 \pm 1.6 | 6.2 \pm 1.8 |

*, P<0.05 vs grupo desnervado y sin gonadotropinas (Prueba de Fisher)

a, P<0.05 vs ovario izquierdo mismo grupo (Prueba de "t" Student).

La sección unilateral del nervio ovárico provocó disminución significativa del peso del ovario desnervado. En los animales que se cortaron ambos nervios ésta disminución sólo se presentó en el ovario derecho. En el grupo con sección del nervio ovárico derecho la administración hCG incrementó el peso del ovario intacto, mientras que en las hembras con sección de ambos nervios el aumento se observó en el ovario derecho. El peso del útero, sólo disminuyó ante el tratamiento con hCG en el grupo con sección del nervio izquierdo (Tabla XIX).

Tabla XIX: Media \pm eem del peso de los ovarios y del útero (mg/100 g) de ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa infantil (16 días), sacrificadas al estro vaginal espontáneo o tratadas a los 36 días con 10 ui de hCG y sacrificadas al día del primer estro vaginal.

| Grupo | O V A R I O S | | ÚTERO |
|-------|-----------------|-----------------|-------------------|
| | Izquierdo | Derecho | |
| SNOI | 15.6 \pm 2.3 | 22.7 \pm 1.1a | 168.5 \pm 7.7 |
| +hCG | 14.9 \pm 1.5 | 23.1 \pm 2.2a | 137.7 \pm 11.6* |
| SNOD | 19.4 \pm 2.1 | 11.1 \pm 1.6a | 142.5 \pm 4.0 |
| +hCG | 28.9 \pm 3.6* | 14.5 \pm 1.5a | 156.1 \pm 9.2 |
| SBNO | 21.9 \pm 2.2 | 13.9 \pm 1.6a | 175.6 \pm 15.6 |
| +hCG | 22.0 \pm 4.7 | 24.6 \pm 4.1* | 146.2 \pm 7.5 |

*, $P < 0.05$ vs. grupo desnervado sin gonadotropinas (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey).

a, $P < 0.05$ vs. ovario izquierdo, mismo grupo (Prueba de "t" Student).

Respuesta del animal desnervado en la etapa juvenil y estimulado con hCG en la etapa peripuberal.

En los animales en los que se realizó la desnervación en la etapa juvenil y se trataron con hCG no se observaron modificaciones en la tasa de animales ovulantes por el ovario izquierdo o derecho, excepto con la sección del nervio ovárico izquierdo en donde el ovario desnervado no ovuló. El número de ovocitos liberados no se alteró por la administración de la hCG en ninguno de los grupos, ya que el ovario desnervado siguió presentando un número reducido de ovocitos (Tabla XX).

Tabla XX: Tasa de animales ovulantes y media \pm eem del número de ovocitos liberados en ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa juvenil (32 días), sacrificadas al estro vaginal espontáneo o tratadas a los 36 días con 10 ui de hCG y sacrificadas al día del primer estro vaginal.

| Grupo | Tasa de Ovulantes por el ovario | | Ovocitos liberados por el ovario | |
|-------|---------------------------------|------------------|----------------------------------|---------------|
| | Izquierdo | Derecho | Izquierdo | Derecho |
| SNOI | 4/9 | 5/9 | 3.2 \pm 1.2 | 4.8 \pm 0.7 |
| +hCG | 0/7 | 5/7 ^a | cero | 6.0 \pm 0.5 |
| SNOD | 5/6 | 4/6 | 6.6 \pm 1.2 | 3.2 \pm 1.3 |
| +hCG | 6/8 | 2/8 | 6.0 \pm 0.3 | 4, 4 |
| SBNO | 8/11 | 8/11 | 3.4 \pm 0.9 | 3.8 \pm 0.8 |
| +hCG | 5/11 | 6/11 | 3.9 \pm 1.3 | 3.2 \pm 0.9 |

a, P<0.05 vs. ovario izquierdo mismo grupo (Prueba de Fisher)

Cuando se cortó el nervio ovárico superior izquierdo y se les administró hCG cuatro días después de la cirugía, el ovario intacto presentó un aumento de peso, incremento que también se presentó en el ovario izquierdo del grupo con sección bilateral. El peso del útero no presentó cambios por la administración de la hormona (Tabla XXI).

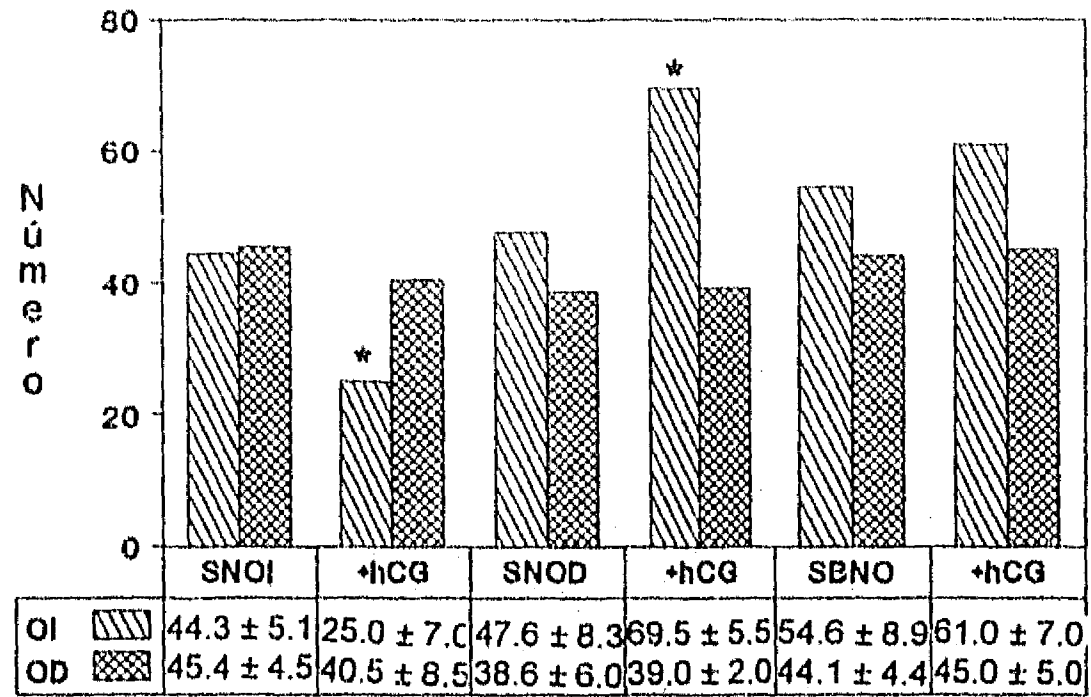
Tabla XXI: Media \pm eem del peso de los ovarios y del útero (mg/100 g) de animales con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa juvenil (32 días), sacrificadas al estro vaginal espontáneo o tratadas a los 36 días con 10 ui de hCG y sacrificadas al día del primer estro vaginal.

| Grupo | Ovarios | | Útero |
|-------|-----------------|-----------------|------------------|
| | Izquierdo | Derecho | |
| SNOI | 16.7 \pm 1.5 | 16.9 \pm 1.2 | 157.8 \pm 11.5 |
| +hCG | 22.0 \pm 2.6 | 28.2 \pm 1.6* | 140.8 \pm 9.2 |
| SNOD | 16.3 \pm 2.1 | 18.7 \pm 2.9 | 144.3 \pm 11.1 |
| +hCG | 22.3 \pm 1.2 | 20.4 \pm 1.9 | 138.4 \pm 4.1 |
| SBNO | 17.9 \pm 0.6 | 19.4 \pm 1.5 | 151.9 \pm 7.0 |
| +hCG | 28.2 \pm 3.3* | 26.9 \pm 2.9 | 148.1 \pm 6.8 |

*, P<0.05 vs. su grupo desnervado sin gonadotropina, mismo ovario (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey).

Población Folicular

En las hembras con sección del nervio ovárico izquierdo y estimuladas con hCG, el número total de folículos medidos en el ovario desnervado disminuyó significativamente y no se modificó en la gónada inervada. Mientras que con la sección del nervio derecho, el ovario intacto presentó aumento del número de folículos en respuesta al estímulo con la hCG. La sección bilateral no modificó este parámetro (Fig. 14).



* P < 0.05 vs. su grupo sin hCG, mismo ovario

Fig. 14 Media \pm eem del *número total de folículos* medidos en ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa juvenil (32 días), sacrificadas al estro vaginal espontáneo o tratadas a los 36 días con 10 ui de hCG y sacrificadas al día del primer estro vaginal.

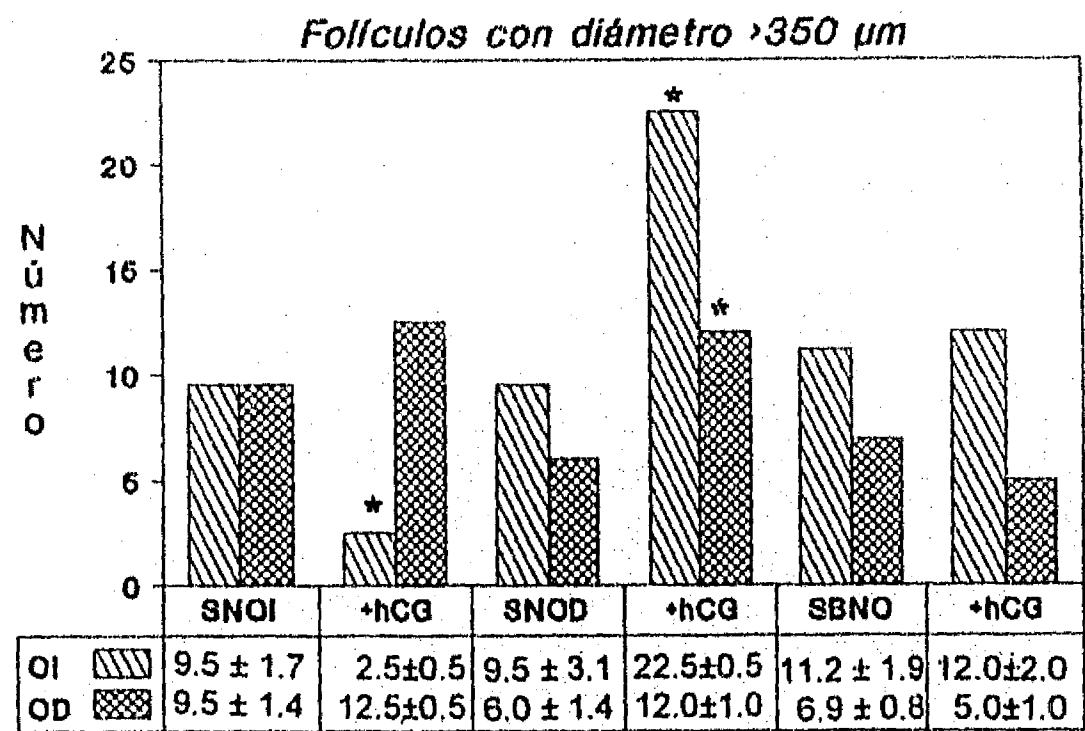
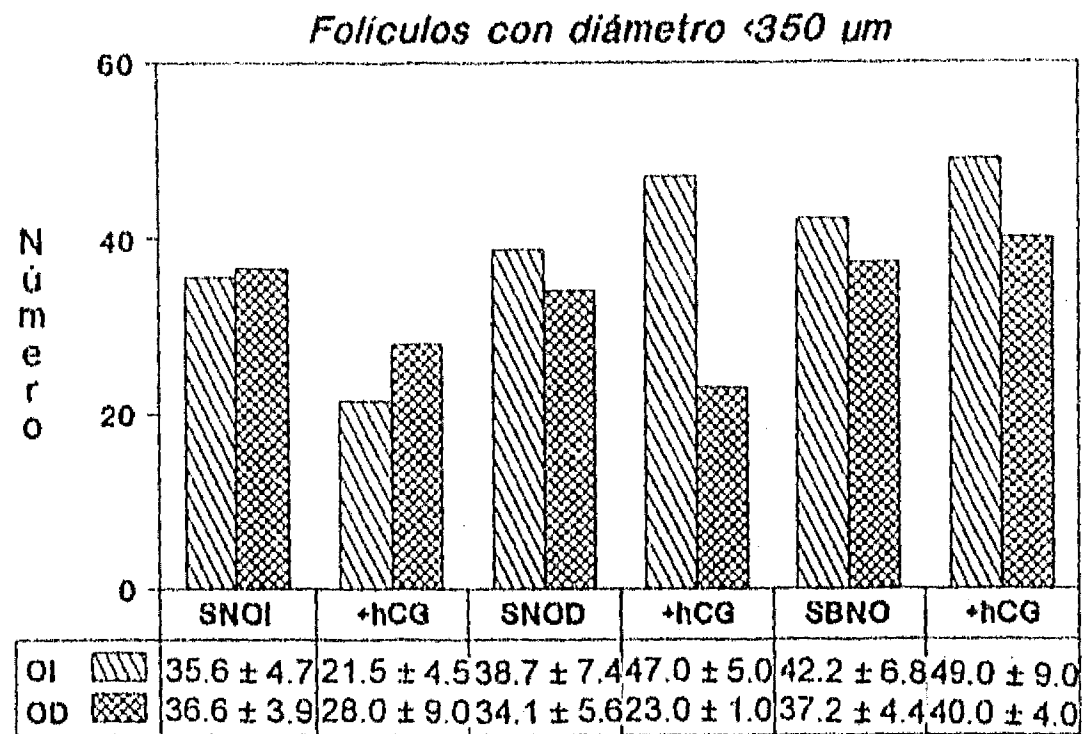
En las ratas con sección del nervio ovárico izquierdo, la administración de hCG disminuyó el número de folículos atrésicos en el ovario desnervado, sin cambios en la gónada intacta. Con la sección del nervio derecho la hCG provocó aumento del número de folículos sanos en el ovario intacto, sin cambios en el desnervado. Con la sección bilateral no hubo cambios por la estimulación con hCG (Tabla XXII).

Tabla XXII: Media \pm eem del número de *folículos sanos o atrésicos* de ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa juvenil (32 días), sacrificadas al estro vaginal espontáneo o tratadas a los 36 días con 10 ui de hCG y sacrificadas al día del primer estro vaginal.

| Grupo | Ovario Izquierdo | | Ovario Derecho | |
|-------|------------------|----------------|----------------|----------------|
| | Sanos | Atrésicos | Sanos | Atrésicos |
| SNOI | 30.0 \pm 4.2 | 14.3 \pm 2.6 | 31.2 \pm 3.3 | 14.3 \pm 2.2 |
| +hCG | 21.0 \pm 4.1 | 4.0 \pm 2.0* | 29.5 \pm 4.5 | 11.0 \pm 4.5 |
| SNOD | 32.9 \pm 5.7 | 14.7 \pm 3.1 | 24.8 \pm 4.2 | 13.8 \pm 2.1 |
| +hCG | 54.5 \pm 0.5* | 15.0 \pm 6.0 | 24.5 \pm 1.0 | 14.5 \pm 1.5 |
| SBNO | 38.8 \pm 5.6 | 14.7 \pm 2.9 | 30.2 \pm 3.1 | 13.9 \pm 2.2 |
| +hCG | 43.0 \pm 8.0 | 18.0 \pm 1.0 | 34.5 \pm 1.5 | 10.5 \pm 3.5 |

*, P<0.05 vs. grupo desnervado sin gonadotropina (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey).

Si se analizan los resultados en función del tamaño de los folículos, se observa que en las hembras en las que se cortó el nervio ovárico izquierdo, el número de folículos grandes (>350 μ m) disminuyó significativamente en el ovario desnervado y no se alteró en la gónada intacta. En las ratas a las que se seccionó el nervio ovárico derecho, el número de folículos grandes incrementó tanto en el ovario desnervado como en el intacto. Con la sección de ambos nervios la hCG no provocó cambios en la población de los folículos. En ninguno de los grupos experimentales se modificó el número de los folículos pequeños (Fig. 15).



*P<0.05 vs. su grupo sin hCG, mismo ovario

Fig. 15. Media ± eem del número de foliculos medidos en ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa juvenil (32 días), sacrificadas al estro vaginal espontáneo o tratadas a los 36 días con 10 ui de hCG y sacrificadas al día del primer estro vaginal.

Cuando a los folículos sanos se les distribuyó por rango se observó que en las hembras con sección del nervio ovárico derecho, la estimulación con hCG incrementó significativamente el número de folículos pequeños y grandes en el ovario intacto, mientras que en los otros grupos no se presentaron diferencias por el tratamiento hormonal (Tabla XXIII).

Tabla XXIII: Media \pm eem del número de folículos sanos por rango, de ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa juvenil (32 días), sacrificadas al estro vaginal espontáneo o tratadas a los 36 días con 10 ui de hCG y sacrificadas al día del primer estro vaginal.

| Grupo | Folículos Sanos por Ovario Izquierdo | | Folículos Sanos por Ovario Derecho | |
|-------|--------------------------------------|-----------------|------------------------------------|---------------|
| | <350 | >350 μ m | <350 | >350 μ m |
| SNOI | 26.9 \pm 3.9 | 4.1 \pm 1.0 | 27.8 \pm 2.9 | 4.0 \pm 1.0 |
| +hCG | 18.5 \pm 3.5 | 1.5 \pm 0.5 | 21.0 \pm 7.0 | 8.5 \pm 2.5 |
| SNOD | 28.9 \pm 5.3 | 4.8 \pm 0.8 | 22.9 \pm 3.9 | 3.1 \pm 0.9 |
| +hCG | 41.0 \pm 1.0* | 13.5 \pm 1.5* | 17.0 \pm 1.0 | 7.5 \pm 2.5 |
| SBNO | 32.7 \pm 4.7 | 6.8 \pm 1.9 | 27.6 \pm 3.1 | 3.4 \pm 0.8 |
| +hCG | 37.0 \pm 7.0 | 6.0 \pm 1.0 | 32.0 \pm 2.0 | 2.5 \pm 0.5 |

*; P<0.05 vs grupo desnervado sin gonadotropina, mismo ovario (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey).

Los resultados de este experimento permiten sugerir que al igual que para la PMSG se requiere la integridad de la información neural proveniente del nervio ovárico superior, para que las gónadas respondan al estímulo con la hCG. En el caso de quitar la información originada por el nervio ovárico derecho, la gónada intacta es capaz de responder a la hCG con un aumento en el número

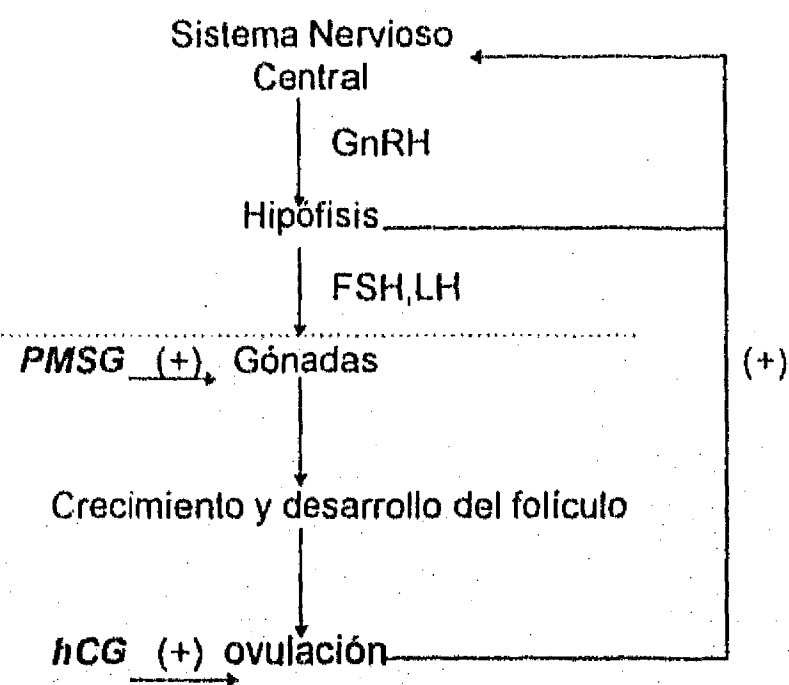
de folículos sanos, tanto pequeños como grandes pero que no fueron capaces de ovular, debido probablemente a que se requirió la estimulación previa con la FSH. Mientras que cuando se secciona el nervio ovárico izquierdo, la gónada intacta no presenta alteraciones en número de folículos y en la desnervada se observa una disminución del número total de folículos medibles. Esta respuesta diferencial nos llevan a plantear, que probablemente la información intrínseca de los ovarios es diferente (Domínguez y col, 1989), o bien a que la información que transcurre por el nervio ovárico izquierdo es diferente a la del derecho, tal y como fue planteado previamente (Klein y Burden, 1988a).

En la rata de 30 días de edad la administración de hCG provoca aumento en el peso del útero (Villavicencio, 1991). Dado que este efecto no se presentó cuando el ovario se encontró desnervado antes del estímulo hormonal, se puede sugerir que la esteroidogénesis se modificó en respuesta a la falta de información catecolaminérgica.

Efectos de la estimulación del crecimiento y maduración folicular por la administración secuencial de PMSG-hCG en animales prepúberes con sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior

Del experimento anterior se desprende que en las hembras con sección del nervio ovárico derecho, tanto el ovario desnervado como el intacto, mostraron un incremento significativo del número de folículos grandes (>350 μm de diámetro). El hecho de que la administración de PMSG o de hCG no restablece la cuota ovulatoria ni el número de folículos por parte de la gónada desnervada, nos llevaron a plantear que posiblemente la alteración no se

encuentra a nivel del sistema nervioso (síntesis de FSH y LH) sino que la alteración se encuentra en el propio ovario. Para analizar esta posibilidad se utilizó el modelo de administración secuencial de las gonadotropinas (PMSG+hCG) y de esta manera actuar directamente en el ovario.



Con base en las premisas anteriores se planteó el siguiente modelo experimental:

Ratas en la etapa infantil (16 días de edad) o juvenil (32 días) fueron sometidas a desnervación noradrenérgica por la sección del nervio ovárico superior izquierdo, derecho o de ambos nervios. Entre las 09:00 y las 11:00 h del día 36 de edad los animales de los diferentes tratamientos fueron inyectados o no con 8 ui de PMSG, 56 horas después se administró 10 ui de hCG y se sacrificaron en la mañana del día del primer estro vaginal (Fig.16). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Ratas hembra de la cepa CII-ZV

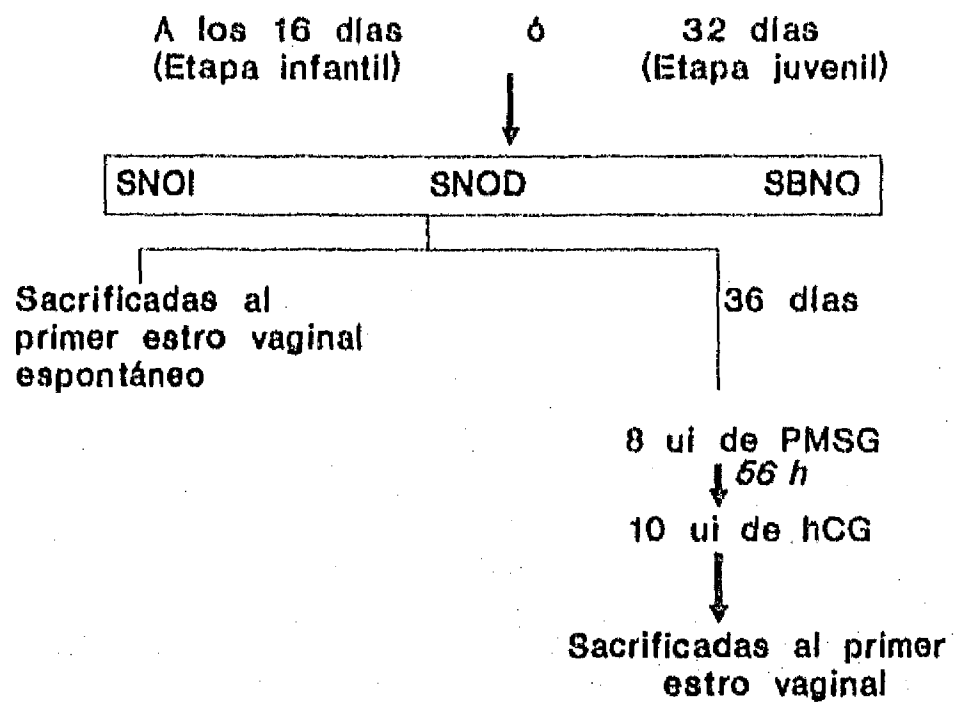


Fig. 16. Esquema del método utilizado para la estimulación secuencial con PMSG-hCG.

Resultados

Efectos de la estimulación del crecimiento y la maduración folicular por la administración secuencial de PMSG-hCG en animales prepúberes con sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior.

En los animales tratados a los 36 días de edad con PMSG-hCG, la apertura vaginal se presentó alrededor de las 20 horas posteriores a la administración de la hCG, en todos los casos el frotis vaginal correspondió a un estro.

En las ratas estimuladas con PMSG-hCG, el 75% de los ovarios izquierdos ovuló y el 87.5% lo hizo por el ovario derecho. El número de ovocitos liberados por cada ovario fue semejante al grupo sin tratamiento hormonal, sacrificados al día del primer estro vaginal espontáneo. El número total de ovocitos fue significativamente mayor en los animales tratados con PMSG- hCG (9.9 ± 0.8 ; 6.8 ± 0.5 , $P < 0.05$). El peso de los ovarios presentó un incremento significativo por el tratamiento hormonal (Tabla XXIV).

El peso del útero de los tratados con PMSG-hCG fue menor al observado en los animales sin tratamiento hormonal (127.5 ± 4.9 vs 163.5 ± 5.2 , $P < 0.05$) y en ninguno de los casos se observó útero distendido.

Tabla XXIV.- Tasa de animales ovulantes por el ovario izquierdo y derecho, media \pm eem del número de ovocitos liberados y del peso de los ovarios (mg/100 g) de animales sin tratamiento o tratados a los 36 días de edad con 8 ui de PMSG y 56 horas después con 10 ui de hCG, sacrificados al día del primer estro vaginal.

| Grupo | Tasa de ovulantes | Ovocitos liberados | Peso de ovarios |
|------------------------|-------------------|--------------------|-----------------|
| Sin tratamiento | | | |
| Ovario izquierdo | 12/20 | 3.5 \pm 0.4 | 17.2 \pm 0.8 |
| Ovario derecho | 13/20 | 3.5 \pm 0.5 | 17.4 \pm 0.7 |
| +PMSG-hCG | | | |
| Ovario izquierdo | 6/8 | 4.4 \pm 1.1 | 24.3 \pm 1.3* |
| Ovario derecho | 7/8 | 5.5 \pm 0.8 | 23.6 \pm 1.3* |

*, P<0.05 vs. el grupo sin hormonas, mismo ovario (Prueba de "t" Student).

Respuesta del animal desnervado en la etapa infantil y estimulado con PMSG-hCG en la etapa peripuberal.

En los animales desnervados tratados con PMSG-hCG, el primer estro vaginal se presentó aproximadamente 20 horas después de la administración de la hCG, que coincidió con la apertura vaginal.

En los animales con sección del nervio ovárico izquierdo o de ambos nervios y estimulados con PMSG-hCG, la tasa de animales ovulantes fue semejante a la del grupo sin gonadotropinas. Mientras que con la sección del nervio ovárico derecho tratados con gonadotropinas, la proporción de animales ovulantes disminuyó en ambos ovario.

En los grupos sin tratamiento hormonal, el ovario desnervado presentó un número de ovocitos menor comparado al ovario innervado. La estimulación con PMSG-hCG no modificó la cuota ovulatoria en el ovario desnervado ni en el intacto (Tabla XXV). De igual manera, en el grupo con sección bilateral el tratamiento con las gonadotropinas no modificó la respuesta observada en los animales sacrificados al día del estro vaginal espontáneo (Tabla XXV).

Tabla XXV : Tasa de animales ovulantes por el ovario izquierdo o derecho y media \pm eem del número de ovocitos liberados en ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa infantil (16 días), inyectadas o no a los 36 días con 8 ui de PMSG, 56 horas después 10 ui de hCG y sacrificadas al estro vaginal.

| Grupo | Tasa de ovulantes por el ovario | | Ovocitos liberados por el ovario | |
|-----------|---------------------------------|---------|----------------------------------|-----------------|
| | Izquierdo | Derecho | Izquierdo | Derecho |
| SNOI | 2/10 | 5/10 | 3, 4 | 6.0 \pm 1.4 |
| +PMSG-hCG | 1/8 | 6/8 a | 6 | 9.0 \pm 0.6 |
| SNOD | 8/8 | 3/8 | 6.5 \pm 0.8 | 1.5 \pm 0.9 a |
| +PMSG-hCG | 3/8 * | 0/8 * | 6.0 \pm 2.1 | cero |
| SBNO | 3/8 | 2/8 | 3.5 \pm 1.3 | 4, 6 |
| +PMSG-hCG | 4/9 | 3/9 | 4.8 \pm 1.7 | 3.4 \pm 2.0 |

*, P<0.05 vs. grupo desnervado sin gonadotropinas (Prueba de Fisher).

a, P<0.05 vs. ovario izquierdo mismo grupo (Prueba de "t" Student).

En los animales con sección del nervio ovárico izquierdo estimulados con PMSG-hCG, el ovario desnervado (izquierdo) y el intacto

(derecho) incrementaron significativamente su peso. Sin embargo, el ovario intacto presenta un incremento mayor comparado con el desnervado. En los animales con sección del nervio ovárico derecho, el tratamiento secuencial con gonadotropinas no modificó el peso de ambos ovarios, mientras que con la sección bilateral el ovario derecho presentó un incremento ante la estimulación hormonal (Tabla XXVI).

En los animales con desnervación el peso del útero no se modificó por la administración de la PMSG-hCG (Tabla XXVI).

Tabla XXVI: Media \pm eem del peso de los ovarios y del útero (mg/100 g) de ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa infantil (16 días), inyectadas o no a los 36 días con 8 ui de PMSG, 56 horas después 10 ui de hCG y sacrificadas al día del estro vaginal.

| Grupo | O v a r i o s | | Útero |
|-----------|-----------------|------------------|------------------|
| | Izquierdo | Derecho | |
| SNOI | 15.6 \pm 2.3 | 22.7 \pm 1.1a | 168.5 \pm 7.7 |
| +PMSG-hCG | 25.2 \pm 2.8* | 34.9 \pm 1.0*a | 143.8 \pm 6.4 |
| SNOD | 19.4 \pm 2.1 | 11.1 \pm 1.6a | 142.5 \pm 4.0 |
| +PMSG-hCG | 23.8 \pm 1.9 | 17.2 \pm 2.6 | 134.2 \pm 7.4 |
| SBNO | 21.9 \pm 2.2 | 13.9 \pm 1.6a | 175.6 \pm 15.6 |
| +PMSG-hCG | 28.8 \pm 5.8 | 24.6 \pm 2.5* | 135.5 \pm 6.8 |

*, P<0.05 vs. grupo desnervado sin gonadotropinas (Prueba de ANDEVA seguido por Tukey).

a, P<0.05 vs. ovario izquierdo mismo grupo (Prueba de "t" Student).

Respuesta del animal desnervado en la etapa juvenil y estimulado con PMSG-hCG en la etapa peripuberal.

En los grupos con sección del nervio ovárico izquierdo o de ambos nervios, el tratamiento con PMSG-hCG no modificó la tasa de animales ovulantes, en tanto que en los animales con sección del nervio ovárico derecho, el ovario desnervado no ovuló, mientras que el ovario intacto presentó superovulación. En el grupo con sección del nervio ovárico izquierdo, la gónada intacta presentó aumento en el número de ovocitos liberados por estímulo secuencial con las gonadotropinas (Tabla XXVII).

Tabla XXVII: Tasa de animales ovulantes y media \pm eem del número de ovocitos liberados en ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa juvenil (32 días), inyectadas o no a los 36 días con 8 ui de PMSG, 56 horas después 10 ui de hCG y sacrificadas al estro vaginal.

| Grupo | Ovulantes por ovario | | Ovocitos por ovario | |
|-----------|----------------------|---------|---------------------|------------------|
| | Izquierdo | Derecho | Izquierdo | Derecho |
| SNOI | 4/9 | 5/9 | 3.2 \pm 1.2 | 4.8 \pm 0.7 |
| +PMSG-hCG | 3/8 | 6/8 | 2.5 \pm 1.2 | 7.2 \pm 0.7 cd |
| SNOD | 5/6 | 4/6 | 6.6 \pm 1.2 | 3.2 \pm 1.3 |
| +PMSG-hCG | 8/11 | 0/11ab | 14.3 \pm 2.6c | cero |
| SBNO | 8/11 | 8/11 | 3.4 \pm 0.9 | 3.8 \pm 0.8 |
| +PMSG-hCG | 7/10 | 2/10b | 5.8 \pm 1.7 | 7, 6 |

a, P<0.05 vs. grupo desnervado sin gonadotropinas (Prueba de Fisher).

b, P<0.05 vs. ovario izquierdo mismo grupo (Prueba de Fisher).

c, P<0.05 vs grupo sin gonadotropinas (Prueba de Kruskal Wallis).

d, P<0.05 vs. ovario izquierdo, mismo grupo (Prueba de Kruskal Wallis).

Después del tratamiento con PMSG-hCG en los animales con sección del nervio ovárico izquierdo o de ambos nervios, se observó incremento en el peso de ambos ovarios, mientras que en aquellos con sección del nervio ovárico derecho, sólo el ovario intacto fue el que incrementó su masa. El peso del útero no se modificó por el tratamiento hormonal en ninguno de los grupos desnervados (Tabla XXVIII).

Tabla XXVIII: Media \pm eem del peso de los ovarios y del útero (mg/100 g) de animales con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa juvenil (32 días), inyectadas o no a los 36 días con 8 ui de PMSG, 56 horas después 10 ui de hCG y sacrificadas al estro vaginal.

| Grupo | O v a r i o s | | ÚTERO |
|-----------|-----------------|-----------------|------------------|
| | Izquierdo | Derecho | |
| SNOI | 16.7 \pm 1.5 | 16.9 \pm 1.2 | 157.8 \pm 11.5 |
| +PMSG-hCG | 26.1 \pm 3.6* | 31.8 \pm 2.5* | 122.8 \pm 11.1 |
| SNOD | 16.3 \pm 2.1 | 18.7 \pm 2.9 | 144.3 \pm 11.1 |
| +PMSG-hCG | 33.5 \pm 3.1* | 33.1 \pm 6.5 | 128.7 \pm 8.2 |
| SBNO | 17.9 \pm 0.6 | 19.4 \pm 1.5 | 151.9 \pm 7.0 |
| +PMSG-hCG | 33.6 \pm 5.7* | 27.0 \pm 1.7* | 134.0 \pm 5.2 |

*, P<0.05 vs. su grupo desnervado sin gonadotropinas, mismo ovario (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey).

Población Folicular

La estimulación con PMSG-hCG en los animales desnervados no modificó el número total de folículos medidos comparado con los grupos desnervados sin tratamiento hormonal, sacrificados al día del primer estro vaginal espontáneo (Fig. 17).

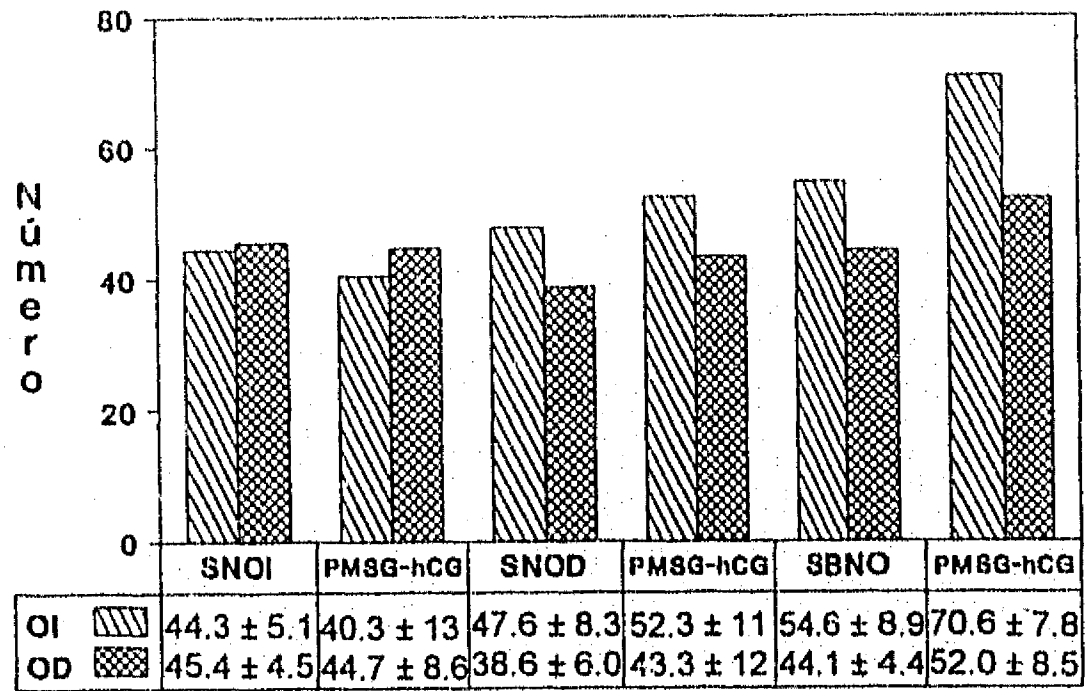


Fig. 17. Media ± eem del *número total de folículos* medidos en ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa juvenil (32 días), inyectadas o no a los 36 días con 8 ui de PMSG, 56 horas después 10 ui de hCG y sacrificadas al estro vaginal.

En los animales intactos sacrificados en el día del primer estro vaginal, el 60% de los folículos medidos fueron sanos y el restante fueron atrésicos. Estos porcentajes no se modificaron por la sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior.

La estimulación con PMSG-hCG en los grupos con sección unilateral, no alteró el número de folículos sanos o atrésicos en el ovario desnervado, ni en el intacto. En tanto que, con la sección bilateral se incrementó el número de folículos atrésicos del ovario izquierdo (Tabla XXIX).

Tabla XXIX: Media \pm eem del número de folículos sanos o atrésicos de ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) en la etapa juvenil (32 días), inyectadas o no a los 36 días con 8 ui de PMSG, 56 horas después 10 ui de hCG y sacrificadas al estro vaginal.

| Grupo | Ovario Izquierdo | | Ovario Derecho | |
|-----------|------------------|-----------------|----------------|----------------|
| | Sanos | Atrésicos | Sanos | Atrésicos |
| SNOI | 30.0 \pm 4.2 | 14.3 \pm 2.6 | 31.2 \pm 3.3 | 14.3 \pm 2.2 |
| +PMSG-hCG | 20.3 \pm 7.6 | 19.7 \pm 6.7 | 26.0 \pm 5.0 | 18.7 \pm 4.4 |
| SNOD | 32.9 \pm 5.7 | 14.7 \pm 3.1 | 24.8 \pm 4.2 | 13.8 \pm 2.1 |
| +PMSG-hCG | 31.3 \pm 8.4 | 21.0 \pm 5.9 | 27.7 \pm 9.0 | 15.7 \pm 3.3 |
| SBNO | 38.8 \pm 5.6 | 14.7 \pm 2.9 | 30.2 \pm 3.1 | 13.9 \pm 2.2 |
| +PMSG-hCG | 47.0 \pm 7.6 | 23.7 \pm 0.3* | 34.7 \pm 5.2 | 17.3 \pm 4.3 |

*, P<0.05 vs. grupo desnervado sin hormonas (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey).

El número de folículos pequeños y grandes que presentaron el ovario izquierdo y derecho fue semejante, independientemente del nervio seccionado. La estimulación con PMSG-hCG no modificó la población de estos folículos en ninguno de los grupos analizados (Fig. 18).

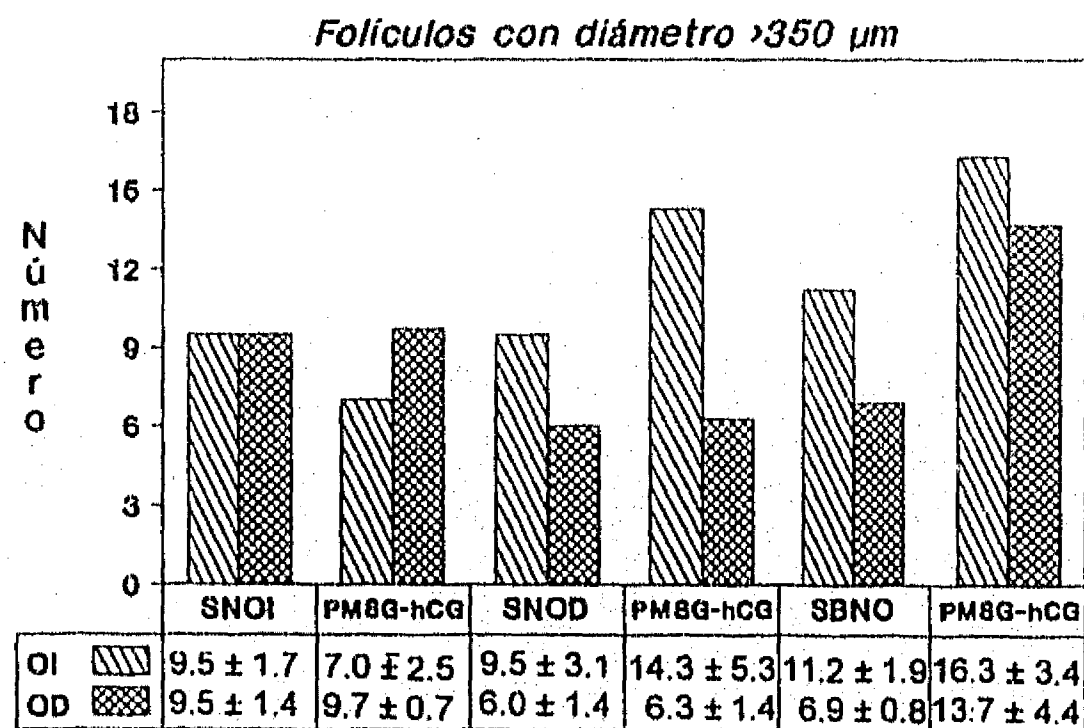
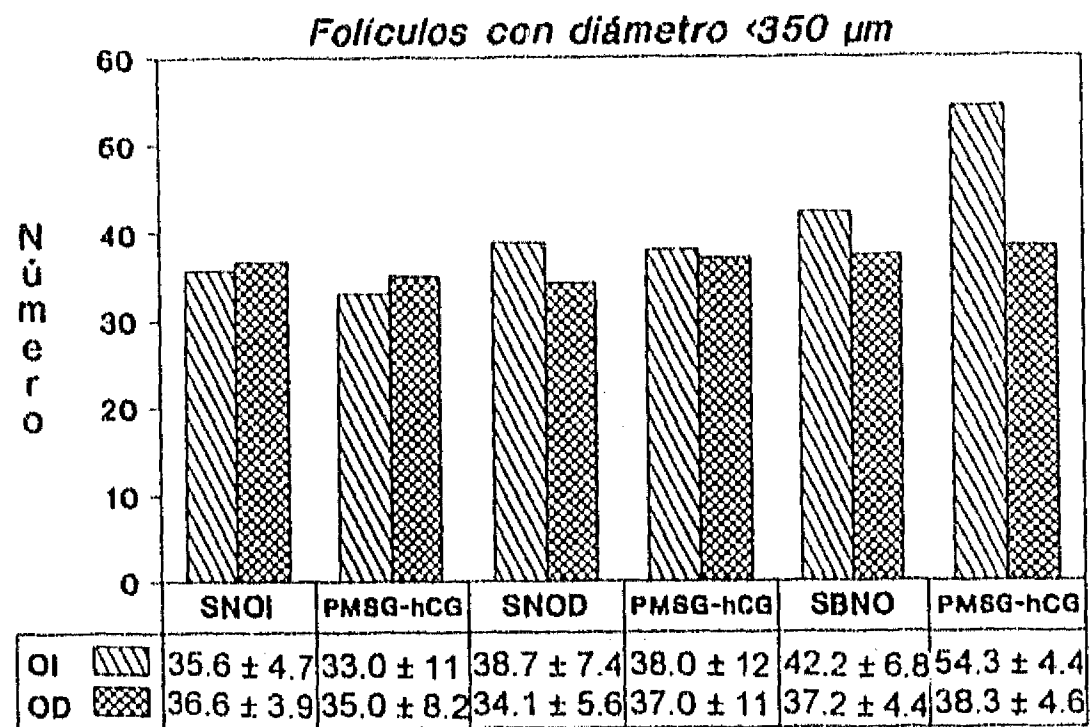


Fig. 18. Media ± eem del número de folículos medidos en ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa juvenil (32 días), inyectadas o no a los 36 días con 8 ui de PMSG, 56 horas después 10 ui de hCG y sacrificadas al estro vaginal.

En los animales con sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior, no se modificó el número de folículos sanos tanto en el ovario izquierdo como en el derecho (Tabla XXX).

Tabla XXX: Media \pm eem del número de *folículos sanos por rango*, de ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o de ambos nervios (SBNO) realizada en la etapa juvenil (32 días), inyectadas o no a los 36 días con 8 ui de PMSG, 56 horas después 10 ui de hCG y sacrificadas al estro vaginal.

| Grupo | Folículos Sanos por Ovario Izquierdo | | Folículos Sanos por Ovario Derecho | |
|-------|--------------------------------------|---------------|------------------------------------|---------------|
| | <350 | >350 μ m | <350 | >350 μ m |
| SNOI | 26.9 \pm 3.9 | 4.1 \pm 1.0 | 27.8 \pm 2.9 | 4.0 \pm 1.0 |
| +hCG | 18.7 \pm 8.6 | 1.7 \pm 1.2 | 23.0 \pm 5.5 | 3.0 \pm 0.6 |
| SNOD | 28.9 \pm 5.3 | 4.8 \pm 0.8 | 22.9 \pm 3.9 | 3.1 \pm 0.9 |
| +hCG | 27.0 \pm 8.5 | 4.3 \pm 0.3 | 26.0 \pm 8.9 | 1.7 \pm 0.3 |
| SBNO | 32.7 \pm 4.7 | 6.8 \pm 1.9 | 27.6 \pm 3.1 | 3.4 \pm 0.8 |
| +hCG | 40.3 \pm 5.3 | 6.7 \pm 2.6 | 29.0 \pm 3.6 | 5.7 \pm 2.1 |

Dado que en los animales en los que se realizó la sección del nervio ovárico derecho en la etapa juvenil, y se estimularon con PMSG-hCG se observó una superovulación por parte del ovario intacto (izquierdo), y que éste efecto no se presentó cuando se seccionó el nervio ovárico izquierdo, se pensó que probablemente en este último grupo no se dió una superovulación porque los folículos alcanzaron un tamaño preovulatorio antes de las 72 horas por lo que

podieran haber ovulado antes. Para probar esta hipótesis se planteó el siguiente experimento.

A ratas de 32 días de edad se les practicó la sección unilateral del nervio ovárico superior. Cuatro días posteriores a la cirugía se les aplicó 8 u.i de PMSG y 48 h después 10 u.i de hCG. Los animales fueron sacrificados en la mañana del día del primer estro vaginal (Fig. 19), con los siguientes resultados.

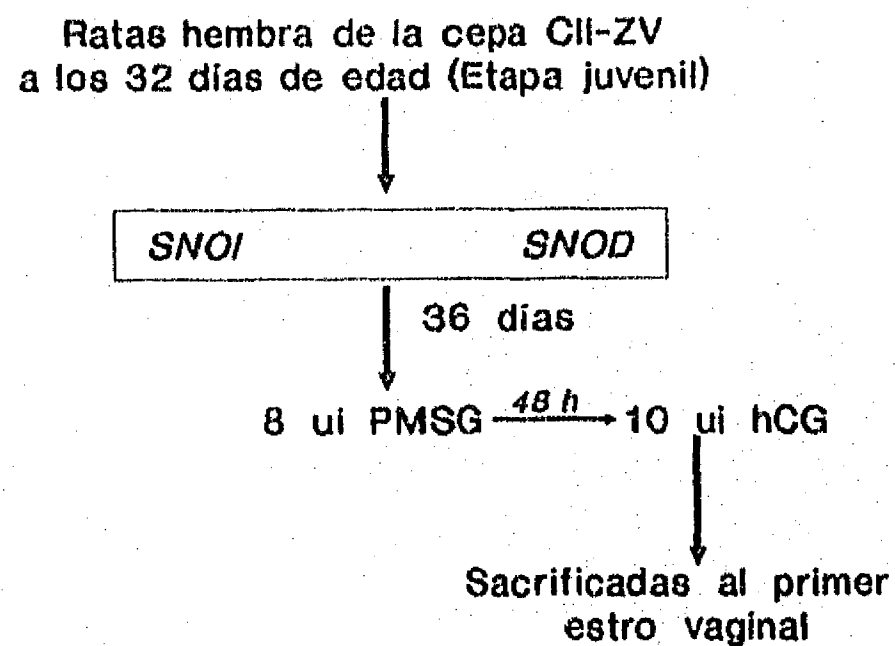


Fig. 19. Modelo experimental de la administración secuencial de PMSG-hCG

En los animales en los que se realizó la desnervación unilateral, el ovario desnervado no respondió al estímulo con PMSG-hCG. En los que se eliminó el nervio ovárico derecho, el ovario intacto (izquierdo) respondió con un aumento en el número de ovocitos liberados al día del estro, efecto que no se presentó cuando el nervio seccionado es el izquierdo (Tabla XXXI).

Tabla XXXI: Tasa de animales ovulantes y media \pm eem del número de ovocitos liberados de animales con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) realizada en la etapa juvenil (32 días), inyectadas o no a los 36 días con 8 ui de PMSG, 48 horas después 10 ui de hCG y sacrificadas al estro vaginal.

| Grupo | Tasa de ovulantes por el ovario | | Ovocitos liberados por el ovario | |
|-----------|---------------------------------|------------------|----------------------------------|---------------|
| | Izquierdo | Derecho | Izquierdo | Derecho |
| SNOI | 4/9 | 5/9 | 3.2 \pm 1.2 | 4.8 \pm 0.7 |
| +PMSG-hCG | 1/7 | 7/7 | 3 | 5.7 \pm 0.2 |
| SNOD | 5/6 | 4/6 | 6.6 \pm 1.2 | 3.2 \pm 1.3 |
| +PMSG-hCG | 5/6 | 0/6 ^a | 9.4 \pm 0.2 ^b | cero |

a, P<0.05 vs. grupo desnervado sin gonadotropinas (Prueba de Fisher).

b, P<0.05 vs. grupo desnervado sin gonadotropinas (Prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la U de Mann-Whitney).

En los animales con sección del nervio ovárico izquierdo y estimulados con PMSG-hCG incrementó el peso de los ovarios. Mientras que, con la sección del nervio ovárico derecho el incremento se presentó sólo en el ovario intacto (derecho). En los dos grupos de ratas desnervadas se observó disminución en el peso del útero por efecto de la PMSG-hCG (Tabla XXXII).

Tabla XXXII: Media \pm eem del peso de los ovarios y del útero de (mg/100 g) animales con sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) realizada en la etapa juvenil (32 días), inyectadas o no a los 36 días con 8 ui de PMSG, 48 horas después 10 ui de hCG y sacrificadas al estro vaginal.

| Grupo | O V A R I O S | | Útero |
|-----------|-----------------|-----------------|------------------|
| | Izquierdo | Derecho | |
| SNOI | 16.7 \pm 1.5 | 16.9 \pm 1.2 | 157.8 \pm 11.5 |
| +PMSG-hCG | 25.4 \pm 2.5* | 25.5 \pm 1.0* | 122.6 \pm 7.5* |
| SNOD | 16.3 \pm 2.1 | 18.7 \pm 2.9 | 144.3 \pm 11.1 |
| +PMSG-hCG | 29.0 \pm 3.3* | 19.9 \pm 2.3 | 110.1 \pm 5.5* |

* P<0.05 vs. grupo desnervado sin gonadotropinas (Prueba de "t" Student).

Nuestros resultados muestran que en los animales en los que se eliminó la principal fuente de información catecolaminérgica al ovario, por la sección del nervio ovárico superior, ya sea en la etapa infantil o juvenil el estímulo con la PMSG más la hCG no estimuló ni el crecimiento de los folículos

ni la respuesta ovulatoria. Sólo cuando se realizó la sección del nervio derecho en la etapa juvenil, el ovario intacto respondió con una superovulación. Estos resultados reafirman la idea de que en la rata desnervada se requiere de la estimulación previa con PMSG para que el folículo responda a la hCG.

El administrar la hCG 48 ó 56 horas después de la PMSG provoca respuestas muy semejantes, es decir se sigue presentando superovulación sólo en el grupo con sección del nervio derecho, sin cambios en los que se secciona el nervio ovárico izquierdo. Estos resultados, una vez más nos llevan a pensar en la posibilidad de que los ovarios son diferentes ya desde la etapa prepúber, como se ha mostrado que ocurre en la rata adulta (Dominguez y col, 1989).

Previamente se ha mostrado que uno de los efectos de la PMSG es rescatar a los folículos en crecimiento de la atresia, los cuales van a ovular en respuesta al estímulo con hCG (Hirshfield y Midgley, 1978). De manera que el aumento en peso del ovario estaría dado por un mayor número de folículos en crecimiento y por los cuerpos lúteos. Sin embargo, nuestros resultados muestran que la ganancia de peso en los ovarios, por la estimulación con las gonadotropinas, no se debe exclusivamente al aumento en el número de folículos, ya que como se mostró la población folicular no se modificó por estimulación hormonal. Es probable que en los animales desnervados haya incrementado la glándula intersticial o la retención de agua, lo que ocasionó el incremento del peso del ovario. Sin embargo se requieren más estudios para analizar esta posibilidad.

De los resultados obtenidos por la estimulación secuencial de las gonadotropinas se desprende que cuando quitamos el nervio ovárico derecho, la gónada intacta es capaz de tomar el comando y responder al estímulo gonadotrópico, lo que no ocurre si la gónada que queda inervada es la derecha.

Experimento 3.

Efectos de la sección unilateral del nervio ovárico superior, sobre la respuesta ovulatoria ante la estimulación inmediata con PMSG o hCG.

La desnervación quirúrgica provoca inhibición o sobrestimulación de los nervios seccionados. Para probar si la falta de respuesta del ovario desnervado se debió a una disminución en la sensibilidad del folículo a las gonadotropinas por la ausencia de la noradrenalina, se diseñó el siguiente modelo experimental:

A ratas de 32 días de edad se les practicó una laparotomía o sección del nervio ovárico izquierdo o derecho e inmediatamente se les administró por vía subcutánea 8 u.i de PMSG o 10 ui de hCG. Los animales fueron sacrificados al presentar el primer estro vaginal (Fig. 20) con los siguientes resultados.

Ratas hembra de la cepa CII-ZV

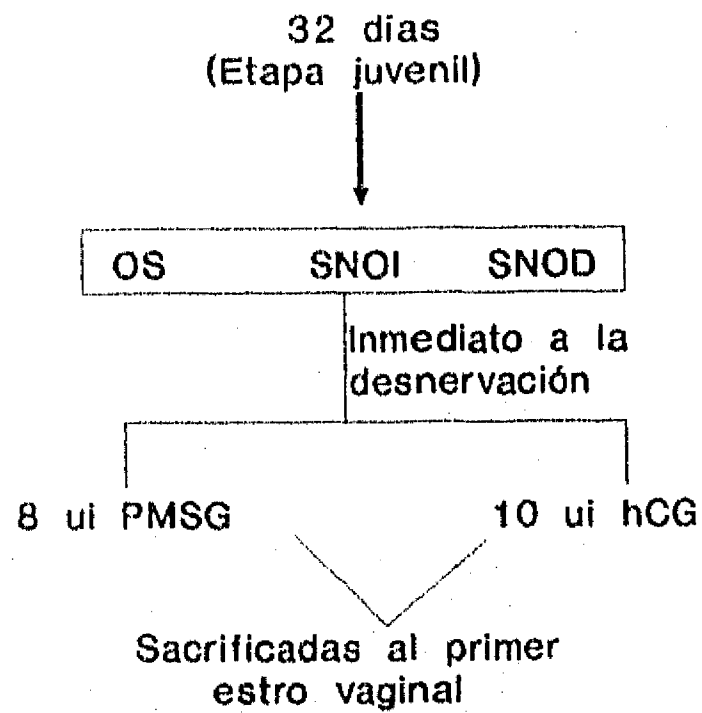


Fig. 20. Metodología de la estimulación con PMSG o hCG inmediatamente a la desnervación.

En los animales que se seccionó el nervio ovárico superior izquierdo y estimulados inmediatamente con PMSG, no hubo ovulación por parte del ovario desnervado, y sólo uno lo hizo por el ovario derecho. Cuando se secciona el nervio ovárico derecho, en el ovario desnervado no se observa ovulación, mientras que el innervado respondió de manera semejante a la del grupo con operación simulada (Tabla XXXIII).

Tabla XXXIII: Tasa de animales ovulantes por el ovario izquierdo o derecho y media \pm eem del número de ovocitos liberados de animales con operación simulada (OS) o sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) realizada a los 32 días de edad y tratadas inmediatamente con 8 u.i de PMSG, sacrificadas al día del primer estro vaginal.

| Grupo | Tasa de ovulantes por el ovario | | Ovocitos liberados por el ovario | |
|-----------|---------------------------------|---------|----------------------------------|---------------|
| | Izquierdo | Derecho | Izquierdo | Derecho |
| OS+PMSG | 4/5 | 5/5 | 5.0 \pm 1.3 | 5.8 \pm 0.4 |
| SNOI+PMSG | 0/5* | 1/5* | cero | 7 |
| SNOD+PMSG | 4/6 | 0/6* | 3.8 \pm 0.5 | cero |

* P<0.05 vs. grupo con OS (Prueba de Fisher).

Los ovarios de las ratas con sección unilateral y estimuladas inmediatamente a la desnervación con PMSG respondieron de manera similar al grupo con operación simulada, excepto en el grupo con sección del nervio derecho, en donde disminuyó el peso del ovario intacto. El peso del útero incrementó significativamente sólo en el grupo con sección del nervio ovárico derecho (Tabla XXXIV).

Tabla XXXIV: Media \pm eem del peso de los ovarios y del útero (mg/100 g) de animales con operación simulada o sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) realizada a los 32 días de edad y tratadas inmediatamente con 8 u.i de PMSG, sacrificadas al día del primer estro vaginal.

| Grupo | O V A R I O S | | Útero |
|-----------|-----------------|----------------|-------------------|
| | Izquierdo | Derecho | |
| OS+PMSG | 27.1 \pm 3.3 | 26.1 \pm 4.1 | 136.7 \pm 6.3 |
| SNOI+PMSG | 19.4 \pm 2.6 | 22.9 \pm 2.5 | 162.6 \pm 13.5 |
| SNOD+PMSG | 17.9 \pm 1.8* | 24.0 \pm 4.6 | 185.7 \pm 14.4* |

* P<0.05 vs. grupo con OS (Prueba de "t" Student).

Cuando se realizó la desnervación unilateral y se estimularon inmediatamente con la hCG, ninguno de los animales ovuló al presentarse el estro vaginal (Tabla XXXV).

Tabla XXXV: Tasa de animales ovulantes por el ovario izquierdo o derecho y media \pm eem del número de ovocitos liberados de animales con operación simulada o sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) realizada a los 32 días de edad y tratadas inmediatamente con 10 ui de hCG, sacrificadas al día del primer estro vaginal.

| Grupo | Tasa de ovulantes | | Ovocitos liberados | |
|----------|-------------------|---------|--------------------|---------------|
| | Izquierdo | Derecho | Izquierdo | Derecho |
| OS+hCG | 4/5 | 5/5 | 5.0 \pm 1.0 | 6.0 \pm 1.4 |
| SNOI+hCG | 0/9* | 0/9* | cero | cero |
| SNOD+hCG | 0/8* | 0/8* | cero | cero |

* P<0.05 vs. el grupo con OS (Prueba de Fisher).

Los ovarios de las ratas con sección unilateral y estimuladas inmediatamente a la desnervación con hCG respondieron de manera similar al grupo con operación simulada, excepto en el grupo con sección del nervio derecho, en donde disminuyó el peso del ovario intacto. El peso del útero sólo incremento el grupo con sección del nervio izquierdo (Tabla XXXVI).

Tabla XXXVI: Media \pm eem del peso de los ovarios y del útero (mg/100 g) de animales con operación simulada o sección del nervio ovárico superior izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) realizada a los 32 días de edad y tratadas inmediatamente con 10 u.i de hCG, sacrificadas al día del primer estro vaginal.

| Grupo | O V A R I O S | | Útero |
|----------|-----------------|----------------|-------------------|
| | Izquierdo | Derecho | |
| OS+hCG | 32.2 \pm 1.8 | 33.3 \pm 5.3 | 168.2 \pm 10.0 |
| SNOI+hCG | 30.9 \pm 2.3 | 30.8 \pm 1.9 | 204.3 \pm 14.9* |
| SNOD+hCG | 25.0 \pm 1.6* | 31.2 \pm 3.1 | 153.4 \pm 7.2 |

* P<0.05 vs. OS (Prueba de "t" de Student).

Con estos resultados podemos sugerir que los mecanismos que regulan la ovulación y la ganancia de peso son diferentes. Así vemos que en animales en los que se realizó la desnervación unilateral y se estimularon inmediatamente con la hCG se observó una ganancia de peso pero no hay ovulación. Al parecer el "desconectar" al ovario de su información neural lo torna

incapaz de responder al estímulo hormonal para producir una ovulación normal o una superovulación.

Descartamos que los resultados de falta de ovulación se deban a un efecto del estrés causado por la cirugía ya que en los animales con operación simulada se observó respuesta al estímulo con cualquiera de las gonadotropinas.

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo muestran que en la rata prepúber la información neural que transcurre por el nervio ovárico superior, modula de manera estimulante la respuesta del ovario a las gonadotropinas en los mecanismos que regulan la ovulación y el crecimiento folicular y, que la respuesta del ovario derecho es diferente a la del izquierdo.

Por el uso de técnicas de histofluorescencia se ha mostrado que el ovario de la rata presenta fibras noradrenérgicas, adrenérgicas y dopaminérgicas (Papka y col, 1985; Stefenson y col 1981). En nuestra cepa de animales, la única amina que se detectó por el método de HPLC fue la noradrenalina, hecho similar al descrito por otros autores (Aguado y Ojeda, 1984b; Selstam y col, 1985). En otros estudios en los que se determinó la presencia de catecolaminas por un método radioenzimático, se detectó la presencia de noradrenalina y dopamina en el ovario de ratas en la etapa juvenil o en la rata adulta en el día del proestro, aunque la concentración de dopamina se encuentra 10 veces por debajo del de la noradrenalina (Bahr y col, 1981; Ben-Jonathan, y col, 1984). Probablemente en nuestro estudio no se detectó dopamina por el método de extracción empleado en el cual se pierde durante el proceso aproximadamente un 40% de las catecolaminas presentes. Para comprobar esta posibilidad se requiere de realizar otras pruebas en las que la extracción sea más eficiente.

En este estudio se observa que en la rata intacta el contenido de noradrenalina ovárica incrementó con la edad del animal, semejante a lo descrito por el grupo de Ben-Jonathan (1984) quienes mostraron que en la rata, el contenido de noradrenalina en el ovario va incrementando durante el desarrollo

ontogénico y es entre los 35 y 40 días de edad, fecha en la que se presenta la primera ovulación, que se observó una disminución del neurotransmisor.

Existe la controversia de si hay o no correlación entre la concentración de las catecolaminas y la ovulación. Así en la rata adulta, con ciclos de cuatro días de duración, no existen variaciones en el contenido de noradrenalina durante el ciclo estral (Ferruz y col, 1991 y datos no publicados de nuestro laboratorio), mientras que en la gata, se presenta una caída en el contenido de noradrenalina después de que se ha inducido la ovulación (Lara y Belmar, 1991). En la rata de 28 días de edad, la estimulación con PMSG provocó disminución en la concentración de noradrenalina 12 horas posteriores a la estimulación y aún después de la ovulación la concentración del neurotransmisor se mantiene baja (Bahr y Ben-Jonathan, 1981). Estas diferencias pueden ser debidas a la especie del animal en estudio y porque en algunos de los casos la ovulación es espontánea y en otros inducida.

Por un análisis preliminar de nuestros resultados podemos sugerir que en la rata prepúber no existe correlación entre las variaciones de noradrenalina ovárica y la presencia de ovulación, por lo que parecería que la regulación de la función del ovario no obedece exclusivamente a la influencia del sistema catecolaminérgico, sino que seguramente se trata de un sistema multifactorial en el que además de las catecolaminas se encuentran involucrados péptidos y otros neurotransmisores.

En el estudio de la participación del sistema catecolaminérgico en la función del ovario, se utilizan modelos en los que se elimina la información neural por vía farmacológica o quirúrgica. La información disponible acerca de los efectos de la desnervación catecolaminérgica por vía quirúrgica es con el modelo del animal con sección de ambos nervios ováricos y en algunos casos se elimina también el plexo ovárico (Aguado y Ojeda, 1984a; 1984b; Marchetti y col, 1987;

Selstam y col, 1985). Recientemente hemos mostrado que los efectos de la desnervación bilateral son diferentes a cuando sólo se elimina uno de los nervios y que además, la respuesta dependió del nervio que se secciona. Es necesario destacar que los efectos de la desnervación unilateral afectan principalmente el ovario desnervado, aunque también existen alteraciones muy puntuales en el ovario inervado, lo que podría indicar la existencia de una(s) vía(s) neural(es) de comunicación interovárica (Chávez y col, 1991; Morales y col, 1990; 1993).

Una de las evidencias que apoyan la posible existencia de una comunicación neural entre los ovarios, es el hecho de que en la rata en la etapa infantil, la sección del nervio ovárico superior izquierdo provocó en la gónada desnervada, disminución en el contenido de noradrenalina ovárica 24 horas después de la cirugía, mientras que, en la gónada intacta se presentó aumento compensador. Este efecto se presentó sólo pocas horas después de la sección y desaparece a medida que pasa el tiempo de recuperación, lo que podría explicarse por un proceso de readaptación del sistema ante la falta de la información neural proveniente del nervio ovárico superior. Es probable que la "comunicación" interovárica se pueda traducir en un aumento en la actividad de síntesis o liberación de noradrenalina por parte del ovario intacto, que se presenta sólo durante las primeras horas post-desnervación.

Según la información disponible, no existen evidencias anatómicas que indiquen que las fibras del nervio ovárico superior se ramifiquen e inerven a ambos ovarios. Se sabe que a cada una de las gónadas le llega información ipsilateral por este nervio ovárico (Klein y Burden, 1988a). Así, cuando se encapsularon los dos ovarios y se les aplicó un trazador retrógrado e inmediatamente después se seccionó el ligamento izquierdo, el marcador se encontró sólo del lado donde se mantuvo intacto el ligamento (McNeill y Burden, 1987). Este conjunto de evidencias nos llevan a pensar que probablemente la

"comunicación" interovárica no este dada por el mismo nervio ovárico superior sino que sería por otra vía neural.

En apoyo a esta interpretación Klein y col (1989) mostraron que en la rata adulta, la estimulación eléctrica de la parte central del nervio ovárico superior en la tarde del diestro, provocó aumento en el potencial de acción de las fibras del plexo ovárico, lo que les permitió sugerir la existencia de una vía neural refleja. Es posible que el plexo ovárico sea la vía de comunicación interovárica, sin embargo se requiere de más estudios morfo-funcionales, para afirmar o descartar esta posibilidad.

Dado que cuando se elimina el nervio ovárico superior izquierdo, el ovario derecho responde inicialmente con un aumento en las concentraciones de noradrenalina, efecto que no se observa en el ovario izquierdo cuando cortamos el nervio ovárico derecho, podemos sugerir que la "comunicación" neural entre los ovarios viaja del ovario izquierdo al derecho.

Otro de los aspectos a resaltar sobre los efectos de la desnervación unilateral del nervio ovárico superior, es la capacidad que presenta la gónada desnervada a "restablecer" el contenido de noradrenalina después de un tiempo post- desnervación. Como se observó en los resultados es más drástico eliminar la información neural en la etapa juvenil que en la infantil. Es posible que en el caso de intervenir a los animales en la etapa infantil, sacrificados al día del primer estro vaginal (aproximadamente 25 días después de la cirugía), los animales cuenten con el tiempo suficiente para echar andar los mecanismos necesarios y presentar una recuperación en el contenido de la amina. Existen reportes que muestran que los efectos de una desnervación sobre los parámetro evaluados es más drástico conforme el animal se aproxima a la pubertad (Marchetti y col. 1987)

Los resultados observados en el animal con sección unilateral del nervio ovárico superior, permiten sugerir que el ovario ante la falta de información que proviene por esta vía neural queda bajo la "dirección" de las vías eferentes como puede ser el caso del nervio vago. Se sabe que el nervio vago presenta entrecruzamiento de alguna de sus ramas accesorias (Powley y col, 1983), de tal forma que podría existir comunicación por esta vía. Es posible sugerir que al realizar una sección unilateral del nervio ovárico superior, el vago sea una de las vías que se encargue de llevar la información al sistema nervioso central, éste la procesa y la dirige a las gónadas. Con esta hipótesis no descartamos que además de la regulación ejercida por el vago, exista una comunicación interovárica (Esquema 1).

Con los resultados obtenidos en el animal con sección bilateral del nervio ovárico superior no se puede definir claramente cual es la participación del sistema catecolaminérgico en la regulación de la función del ovario. A la fecha, existen evidencias controversiales acerca del papel que juega esta inervación en la regulación de la ovulación. Mientras que la mayoría de las evidencias obtenidas con el modelo de sección bilateral de los nervios ováricos, parecen apuntar que tanto en la rata prepúber como en la adulta, la inervación catecolaminérgica no es indispensable en el proceso ovulatorio (Aguado y Ojeda 1984b; Selstam y col, 1985; Wylie y col, 1985). Cuando se realiza la desnervación con fármacos que destruyen las terminales noradrenérgicas, se ha observado que en la rata, en el ratón y la cobaya prepúber la inervación noradrenérgica periférica parece inhibir la reactividad del folículo a las gonadotropinas, ya que la administración de guanetidina al nacimiento resultó en un incremento en el número de ovocitos liberados al día del primer estro vaginal (Flores y col, 1990; Riboni y Domínguez, 1995; Rosas y col, 1989).

Estos resultados aparentemente contradictorios sobre la participación o no de la noradrenalina en la regulación de la ovulación pueden ser explicados si se

tiene en cuenta que una desnervación catecolaminérgica por medios farmacológicos, con drogas de acción periférica, destruye todas las fibras que presenta este neurotransmisor, mientras que con la quirúrgica podemos de manera "puntual" eliminar alguna de las vías que arriban a las gónadas. En este último caso, no sólo se elimina una parte de la información catecolaminérgica, sino también la de tipo peptidérgico, como es el caso del VIP y de la SP que participan en varias de las funciones del ovario (Ahmed y col, 1986). En la rata, el VIP estimula el proceso de esteroidogénesis (Ahmed y col, 1986) y en el mono, facilita el crecimiento folicular (Schultheis y col, 1992).

A mediados de la década de los 80's se reportó que en la rata de 24 días de edad, la sección bilateral del nervio ovárico superior provoca una depleción en el contenido de noradrenalina ovárica en un 60%, siete días después de la desnervación (Aguado y Ojeda, 1984b), semejante a lo que ocurre en la rata adulta (Lawrence y Burden, 1980). En este trabajo observamos que la eliminación de ambos nervios en la etapa infantil depleta incluso a valores no detectables el contenido de noradrenalina desde las primeras 24 horas. Mientras que, cuando se realiza este mismo tipo de desnervación en la etapa juvenil, si bien disminuye el contenido de la amina éste puede ser determinado por el método empleado. Sin embargo, si partimos del hecho de que el animal a los 32 días de edad presenta un contenido de noradrenalina mayor que el registrado a los 16 días, resulta evidente que es más drástico la desnervación en la etapa juvenil que en la infantil, semejante a lo que observamos con la sección unilateral del nervio ovárico superior.

En ninguno de los grupos con sección bilateral, independientemente del tiempo postoperatorio, se observó recuperación del contenido de noradrenalina, aunque esta falta de recuperación no se acompañó de modificaciones en la edad de la apertura vaginal ni la respuesta ovulatoria, como ya había sido mostrado en la rata con ovulación espontánea o inducida (Aguado y Ojeda, 1984b; Selstam y

col, 1985). Estas evidencias pueden ser interpretadas como una hipersensibilidad del ovario a las catecolaminas, lo que le permite mantener su cuota ovulatoria de forma normal, ya sea por un aumento de la respuesta a la noradrenalina que permanece en el ovario, a la adrenalina que le llega por sangre o a la que sintetiza el propio ovario (Aguado y Ojeda, 1984b; Bahr y Ben-Jonathan, 1981; Ben-Jonathan y col, 1984; Marchetti y col, 1987). Existe otra posibilidad, que el ovario ante la falta de información neural proveniente del nervio ovárico superior, los demás sistemas de neurotransmisores tomen el "comando" en la regulación de la función del ovario y de como resultado una ovulación normal.

La sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior resulta en la reducción del número de folículos pequeños, con diámetro menor a las 350 μm (Morales, 1991), y dado que existen evidencias que la sección bilateral del nervio ovárico superior no modifica el flujo sanguíneo (Aguado y Ojeda, 1984a) pensamos que la disminución inicial del contenido de noradrenalina modifica la sensibilidad del folículo ovárico a las gonadotropinas, tal y como se ha postulado que ocurre en la rata o ratón en los que se afectaron las fibras catecolaminérgicas por la administración de guanetidina o reserpina (Chávez y col, 1987; Flores y col, 1990a; Rosas y col, 1989).

En la rata adulta, en la que se induce el bloqueo del pico preovulatorio de la FSH/LH por la administración del pentobarbital o fenobarbital en la mañana del proestro, no se observan folículos entre las 390 y 500 μm de diámetro, los que normalmente se observan en una rata cíclica en el día del estro. En las hembras tratadas con el barbitúrico, el reemplazo con la FSH restablece el patrón de distribución de los folículos. Estas evidencias son interpretadas como que la FSH es la hormona que se encarga de seleccionar aquellos folículos que van a continuar creciendo y van a responder al pico de la LH que se produce en el siguiente ciclo estral (Hirshfield y Midgley, 1978). En nuestros animales intactos la estimulación con la PMSG en la etapa peripuberal también provocó la aceleración

del crecimiento folicular, lo que permitió se de un aumento en la cuota ovulatoria 72 horas después del tratamiento hormonal.

Se ha postulado que en la rata intacta, la PMSG además de promover el crecimiento de los folículos rescata a algunos de estos que estaban destinados a la atresia. Braw y Tsafiriri (1980) muestran que en la rata de 26 días la administración de 15 ui de PMSG no modifica el número de folículos >120 μ m de diámetro, pero que disminuye la atresia en aquellos folículos que denomina del tipo 5 (170-370 μ m) y 6 (370-500 μ m), 12 horas después de que se administra la PMSG. Como se sabe, la PMSG tiene los mismos efectos biológicos que la FSH endógena, por lo que se le considera como una FSH-like, de manera que los autores concluyen que esta PMSG tiene un efecto anti-atrésico en los folículos antrales. Este efecto descrito para la PMSG, puede explicar el porque en nuestros animales estimulados en la etapa peripuberal aumenta la cuota ovulatoria, comparada con la registrada en animales de ovulación espontánea.

Aunque tradicionalmente se ha explicado que el crecimiento folicular se produce en respuesta a la unión de la FSH a su receptor en las células de la granulosa, en donde promueve la mitosis y el rescate de la atresia, existen evidencias que llevan a sugerir que la acción de las gonadotropinas en el ovario es modulada por la inervación catecolaminérgica que recibe la gónada (Chávez, 1991; Flores y col, 1990; Rosas y col, 1989). Como lo muestra el hecho de que en la rata adulta hemicastrada con autoinjerto de ovario, la inyección secuencial de gonadotropinas no induce ovulación, mientras que si el animal es desnervado con guanetidina, el injerto así estimulado presenta señales de ovulación, lo que ha sido interpretado como una evidencia más de que la inervación noradrenérgica del ovario o las catecolaminas circulantes, modulan la acción de las gonadotropinas en el folículo ovárico (Ayala y col, 1988).

Los resultados del presente estudio son semejantes a los observados en la rata de 24 días de edad con sección de ambos nervios ováricos y estimulados 24 horas después con 6 ó 8 ui de PMSG, donde el número de cuerpos lúteos no se incrementó por la estimulación hormonal (Selstam y col, 1985). De igual manera, en la rata adulta con sección unilateral del nervio ovárico superior y tratadas con 30 ui de hCG, el ovario desnervado no responde al estímulo hormonal, lo que se ha interpretado como que la inervación está modulando la reactividad del compartimiento folicular a las gonadotropinas (Chávez y col, 1991).

A partir de los resultados de la estimulación ovárica por la administración única o secuencial de gonadotropinas se puede afirmar que la inervación noradrenérgica y VIPérgica, que llega al ovario por el nervio ovárico superior, regula de manera estimulante el crecimiento y maduración folicular que culmina con la secreción hormonal y la ovulación.

Al parecer, la información neural que transcurre por el nervio ovárico superior tiene mayor influencia en la regulación del crecimiento folicular inducido por la administración de PMSG, que en la regulación de la síntesis de esteroides responsables de la canalización de la vagina. En ninguno de los grupos de animales desnervados y estimulados con gonadotropinas se modificó la edad de la apertura vaginal, lo que puede ser un indicador de que la esteroidogénesis se llevó a cabo de manera normal, esto se apoya también en el hecho de que no se encontraron cambios en el peso del útero (indicador biológico de la secreción de estrógenos). Mientras que algunos autores han mostrado que en la rata adulta la sección bilateral del nervio ovárico superior provoca disminución en la concentración de estrógenos y progesterona durante los primeros 20 minutos que dura el estudio, (Aguado y Ojeda, 1984a), existen otros que señalan que después de la desnervación bilateral no se modifica la concentración de estrógenos y la de progesterona disminuye a los 30 min. esta disminución se ve acompañada de una respuesta de lordosis menor, lo que indica que la inervación proveniente del

nervio ovárico superior no sólo participa en la esteroidogénesis sino también en los procesos reproductivos (Erskine y Weaver, 1988).

La modulación que ejerce la inervación en la respuesta del ovario depende de la edad del animal, ya que cuando la desnervación unilateral se realiza en la etapa juvenil, el estímulo con PMSG resultó en un incremento en el peso de los ovarios intactos. Dado que en estos animales no se produjo un aumento en la respuesta ovulatoria, y por consiguiente incremento en el compartimiento luteal, podemos suponer que el aumento de peso está dado por el compartimiento intersticial. Además ya que en los animales con sección del nervio ovárico superior se produce disminución en el número total de folículos, se puede pensar que la leca interna de los folículos que aparentemente se "pierden", pasan a formar parte del tejido intersticial. Descartamos que se hayan producido cambios en el compartimiento folicular dado que en los animales desnervados y estimulados con PMSG no incrementó el número de folículos.

Si bien, en los animales desnervados y estimulados con hCG se observó una respuesta ovulatoria semejante a los tratados con PMSG, el crecimiento folicular fue diferente. Así, en los animales con sección del nervio ovárico derecho y estimulados con hCG se observó incremento de los folículos grandes, sin que llegaran a ovular debido quizá a la falta de estimulación previa con la FSH. Esta idea se confirma en los animales con sección del nervio ovárico derecho, en donde la administración secuencial de las gonadotropinas provocó superovulación en la gónada inervada.

A diferencia de lo que observamos en la rata con sección del nervio ovárico superior, en la cobaya prepúber desnervada con 6-OHDA, el estímulo por la administración secuencial de PMSG-hCG no incrementa la ovulación, ni el número total de folículos. Los autores postulan que al parecer los nervios adrenérgicos no parecen ser necesarios para inducir la ovulación, previa

estimulación gonadotrópica. Sin embargo, no excluyen que las catecolaminas circulantes puedan participar en el proceso ovulatorio (Curry y col, 1984).

En los animales con sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior el ovario desnervado no respondió al estímulo secuencial con PMSG-hCG, por lo que podemos sugerir que en la rata prepúber la información neural que llega por el nervio ovárico superior, sería necesaria para el efecto amplificador de las gonadotropinas sobre el compartimiento folicular. En cambio, cuando el bloqueo catecolaminérgico es de tipo general como ocurre en la rata adulta tratada con reserpina tres horas antes de la estimulación con la FSH-LH, donde se observa un aumento en la cuota ovulatoria y disminución en el porcentaje de folículos con diámetro $>500 \mu\text{m}$, lo que se ha interpretado como una amplificación de los efectos de la FSH por la depleción aguda de la noradrenalina (Chávez y col, 1987). Estas diferencias apoyan nuestra interpretación de que la información que llega al ovario por el nervio ovárico superior, es algo más que sólo la concentración de noradrenalina en el ovario.

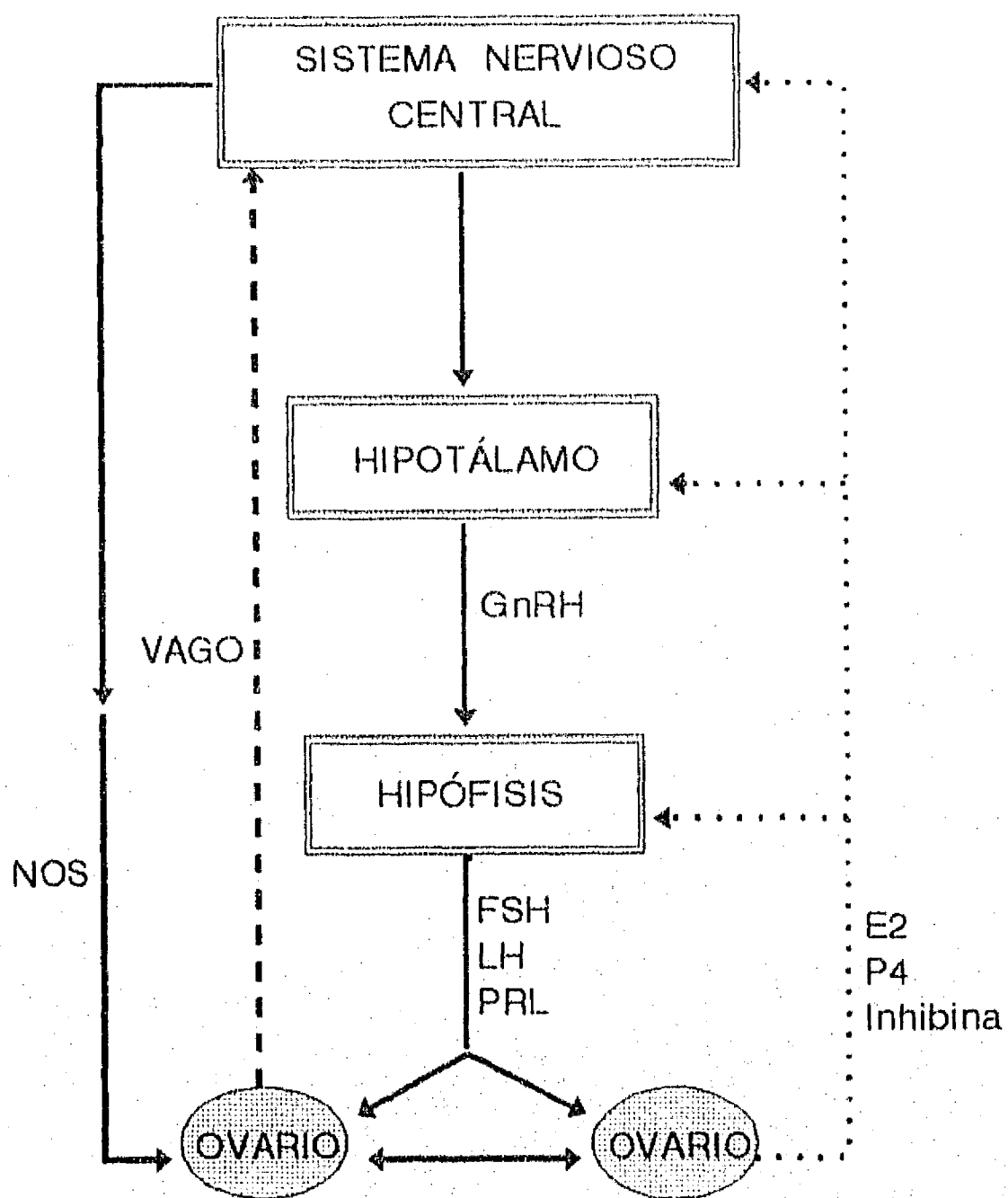
Por estudios *in vitro* se ha mostrado que la activación de los receptores β -adrenérgicos por la administración de isoproterenol incrementa la producción de esteroides inducida por la hCG (Dyer y Erickson, 1985). Aunado a esta evidencias Ferruz y col, (1991) plantean que al parecer las gonadotropinas actuarían sobre la terminal presináptica estimulando la liberación de las catecolaminas. Esta interpretación podría explicar el hecho de que en los animales desnervados no se observe el efecto amplificador de las gonadotropinas.

Las funciones del ovario son reguladas por las hormonas de la adenohipófisis, las sintetizadas por el propio ovario, por la inervación que recibe, y por una familia de factores de crecimiento que participan en dicho evento. Tal es el caso del IGF-I, el cual estimula la proliferación y diferenciación de las células de la teca y la granulosa en forma sinérgica con las gonadotropinas (Teissier y col, 1994). Dado que la inervación catecolaminérgica llega a hacer

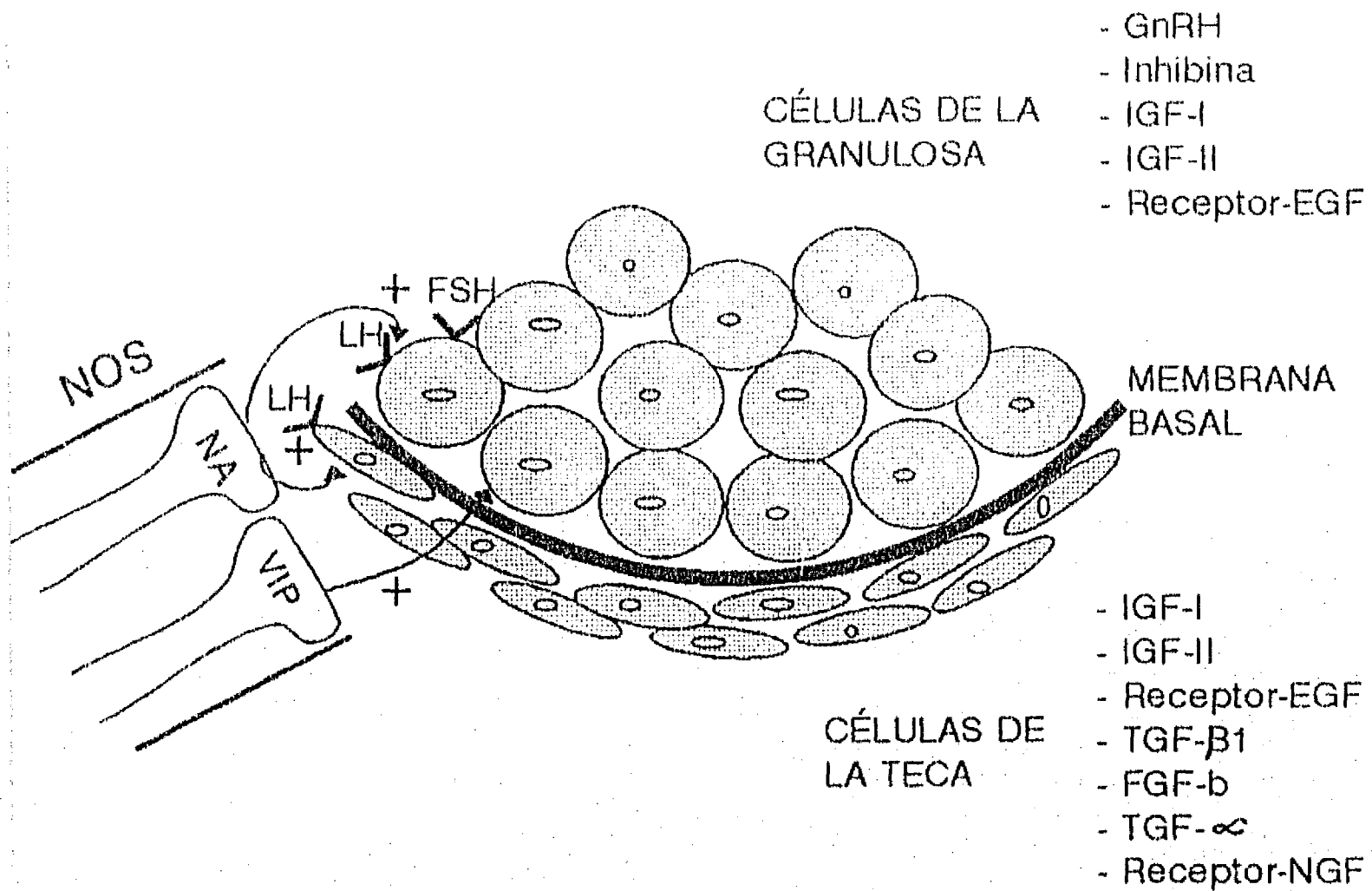
contacto con las células de la teca, es posible que la inervación actúe como un modulador de la acción de los factores de crecimiento, estimulando o inhibiendo la acción de los mismos. Existen evidencias de que algunos factores de crecimiento son determinantes en la diferenciación del folículo ovárico. El receptor para el IGF-I, se expresa más en las células de la granulosa de los folículos atresicos y en menor proporción en las células de la teca, patrón de distribución que se invierte en el folículo sano, sin embargo se desconoce la acción directa del factor sobre la foliculogénesis y la atresia (Teissier y col, 1994). Se requieren de más estudios para dilucidar si existe relación entre la inervación que recibe la gónada y la función de los factores de crecimiento.

La noradrenalina que recibe el ovario proviene de cuatro fuentes (Domínguez y col, 1991), mientras que el VIP lo hace por el nervio ovárico superior (Aguado y Ojeda, 1984b). La noradrenalina al unirse a su receptor en las células de la teca estimula la síntesis de andrógenos y en la granulosa estimula la aromatización (Ojeda y Urbanski, 1994). El VIP estimula la actividad de las aromatasas (Ahmed y col, 1986). Además de estas acciones descritas para la noradrenalina y el VIP el folículo produce varios factores de crecimiento que modulan su crecimiento y diferenciación (Esquema 2), por lo que es posible que la información neural que llega por el nervio ovárico superior module la secreción, las acciones de estos factores o ambos.

En conjunto, las evidencias obtenidas en este estudio permiten plantear la hipótesis de que la información neural que transcurre por el nervio ovárico superior, actúa como sistema de amplificación de los efectos de las gonadotropinas sobre el crecimiento y diferenciación folicular, y que la modulación que se ejerce depende de la edad del animal y de la especie en estudio.



Esquema 1. Modelo propuesto en la regulación de la función del ovario por las hormonas hipofisarias y por la innervación aferente que llega por el nervio ovárico superior (NOS) y la eferente (nervio vago). Donde además se sugiere la posible existencia de una vía de comunicación interovárica.



Esquema 2. Modelo propuesto para explicar la interacción entre la inervación que llega por el nervio ovárico superior (NOS) y las gonadotropinas. La LH al unirse a su receptor en la teca estimula la síntesis de andrógenos, que son aromatizados en las células de la granulosa por acción de la FSH, éstos efectos son amplificados por la noradrenalina que llega por el NOS. Al parecer el crecimiento del folículo es modulado por los factores de crecimiento producidos en la teca y en la granulosa, como el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF); al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF); al factor de crecimiento epidermal (EFG); al factor de crecimiento transformador (TGF) y al factor de crecimiento neural (NGF).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que:

- En la rata prepúber el nervio ovárico superior modula de manera estimulante la respuesta a las gonadotropinas en los mecanismos que regulan la ovulación y el crecimiento folicular.
- Es probable que exista una vía de "comunicación neural" entre los ovarios, por la que la gónada que mantiene intacta su inervación responde con ovulación compensadora.
- La desnervación unilateral en la etapa infantil provoca disminución temporal en el contenido de noradrenalina, que se normaliza al día del primer estro vaginal, probablemente como resultado de la síntesis de novo del neurotransmisor.
- En los animales con sección bilateral del nervio ovárico superior se presentó disminución en el contenido de noradrenalina, sin embargo la respuesta ovulatoria al primer estro vaginal fue normal. Es probable que en este caso, la ovulación se regule no sólo por la noradrenalina sino por la participación de otros sistemas de neurotransmisores.
- Se requiere de la integridad de la inervación noradrenérgica para que la PMSG pueda rescatar a los folículos de la atresia y promover su crecimiento.
- Existe diferencia en la respuesta de los folículos del ovario izquierdo y derecho a la hCG, que dependen de la inervación que le llega por el nervio ovárico superior.
- En los animales con sección del nervio ovárico superior, la respuesta al estímulo secuencial de las gonadotropinas depende del ovario que mantiene intacta su inervación.
- Al parecer, la información neural que transcurre por el nervio ovárico superior modula de manera estimuladora el paso de un folículo pequeño (<350µm) a un estado preovulatorio.
- Durante la fase aguda de la desnervación unilateral los ovarios no responden al estímulo gonadotrópico lo que apoya la idea de la comunicación interovárica.

PERSPECTIVAS

De este estudio surgen varias interrogantes algunas de las cuales se plantean a continuación:

- ¿Existe realmente una comunicación interovárica, y si es así, cuál(es) es(son) las vías?
- ¿Cuál es la interrelación entre la inervación del ovario que llega por el nervio ovárico superior con otros tipos de inervación?
- ¿La inervación que llega por el nervio ovárico superior esta vinculada a la regulación del número y afinidad de los receptores a las gonadotropinas?
- ¿En la rata prepúber, la sección del nervio ovárico superior provoca modificaciones en la esteroidogénesis que se vinculen con el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico?
- ¿La información neural que llega por el nervio ovárico superior modula la acción de los factores de crecimiento producidos por el folículo?

BIBLIOGRAFIA

Aguado, L.I. y Ojeda, S.R. (1984a): Ovarian adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion. *Endocrinology* **114:1944-1946**.

Aguado, L.I. y Ojeda, S.R. (1984b): Prepubertal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. Role of noradrenergic innervation. *Endocrinology* **114:1845-1853**.

Aguado, L.I. y Ojeda, S.R. (1986): Prepubertal rat ovary: Hormonal modulation of b-adrenergic receptors and progesterone to adrenergic stimulation. *Biology of Reproduction* **34:45-50**.

Aguado, L.I., Petrovic, S.L. y Ojeda, S.R. (1982): Ovarian b-adrenergic receptors during the onset of puberty: Characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology* **110:1124-1132**.

Ahmed, C.E., Dees, W.L. y Ojeda, S.R. (1986): The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP). Containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology* **118:1682-1689**.

Arakawa, S., Iyo, M., Ohkawa, R., Kambegawa, A., Okinaga, S. y Arai, K. (1989): Steroid hormone receptors in the uterus and ovary of immature rats treated with gonadotrophins. *Endocrinol. Japon* **36:219-228**.

Ayala, Ma.E y Domínguez, R. (1988): Ovulatory response to the sequential administration of follicle stimulating hormone and human chorionic gonadotropin by autografted ovary in unilaterally ovariectomized adult rat with peripheral denervation induced by guanethidine treatment. *La Revista de Investigación Clínica* **40:149-155**.

Bahr, J.M. y Ben-Jonathan, N. (1981): Preovulatory depletion of ovarian catecholamines in the rat. *Endocrinology* **108:1815-1820**.

Bahr, J.M. y Ben-Jonathan, N. (1985): Ovarian catecholamines during the prepubertal period and reproductive cycle of several species. En: N. Ben-Jonathan, J.M. Bahr y R.I. Weiner. (Ed.). *Catecholamines Hormones Regulators*. Raven Press, New York, pp. 279-292.

Bahr, J., Kao, L. y Nalbandov, A.V. (1974). The role of catecholamines and nerves in ovulation. *Biology of Reproduction* **10:273-290**.

Baljet, B. y Drukker, J. (1979): The extrinsic innervation of the abdominal organs in the female rat. *Acta Anatomical* **104:243-267**.

Ben-Jonathan, N., Arbogast, L.A., Rhoades, T.A. y Bahr, J.M. (1984): Norepinephrine in the rat ovary: Ontogeny and de novo synthesis. *Endocrinology* **115:1426-1431**.

- Boullin, D.J., Costa, E. y Brodie, B. (1966): Discharge of tritium-labeled guanethidine by sympathetic nerve stimulation as evidence that guanethidine is a false transmitter. *Life Sciences* 5:803-808.
- Braw, R.H. y Tsafiri, A. (1980): Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* 59:267-272.
- Burden, H.W. (1978): Ovarian innervation. In: Jones, R.E (Ed.) *The vertebrate ovary: Comparative Biology*. Plenum Press, New York, Chapter.18:615-638.
- Burden, H. W. (1985): The adrenergic innervation of mammalian ovaries En: Ben-Jonathan, N., Barh, J.M and Weiner, R.I (Eds.). *Catecholamines as hormone regulator*. Raven Press, New York.
- Cruz, Ma.E., Chávez, R. y Domínguez, R. (1986): Ovulation, follicular growth and ovarian reactivity to exogenous gonadotropins in adult rats with unilateral or bilateral section of the vagi nerves. *La Revista de Investigación Clínica* 38:167-171.
- Curry, T.E. Jr., Lawrence, I.E. Jr. y Burden, H.W. (1984): Ovarian sympathectomy in the guinea pig. II. Effects on follicular development during the prepubertal period and following exogenous gonadotropin stimulation. *Cell Tissue Research* 236:593-596.
- Chávez, R. (1991): Participación de la inervación aferente al ovario en la regulación del crecimiento folicular y la ovulación. La rata adulta como modelo de estudio. (Tesis de doctorado). Departamento de Fisiología. Instituto de Investigaciones Biomédicas.
- Chávez, R., Carrizosa, L. y Domínguez, R. (1991): Effects of superior ovarian nerve section on spontaneous and induced ovulation in adult rats. *Medical Science Research* 19:41-42.
- Chávez, R., Cruz, Ma.E y Domínguez, R. (1987): Modifications on the ovarian response to gonadotropins induced by catecholamine depletion in vagotomized adult rat. *La Revista de Investigación Clínica* 39:149-153.
- Dees, W.L., Ahmed, C.E y Ojeda, S.R. (1986): Substance P-and Vasoactive intestinal peptide-containing fibers reach the ovary by independent routes. *Endocrinology* 119:638-641.
- Dees, W.L., Kozlowski, G.P., Dey, R. y Ojeda, S.R. (1985): Evidence for the existence of substance P in the prepubertal rat ovary. II. Immunocytochemical localization. *Biology of Reproduction* 33:471-476.
- Dohler, K.D. y Wuttke, W. (1974): Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. *Endocrinology* 94:1003-1007.

Domínguez,R., Cruz,M.E y Chávez,R. (1989): Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation. En: Hirsfield, A.N (Ed.). **Growth factors and the ovary**. Plenum Press. New York and London. pp 321-325.

Domínguez, R., Chávez, R. y Cruz, Ma.E. (1991): La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: Domínguez, R (Coordinador). **Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción**. Universidad Nacional Autónoma de México. Coordinación de la Investigación Científica Programa Universitario de Investigación en Salud. pp 163-188.

Domínguez,R., Gaitán,C.,Quintanar,J.L y Méndez,S.A. (1983): Diferente respuesta de la ovulación inducida en rata prepúber, al bloqueo beta adrenérgico antes de la administración de FSH o LH. **XXIII Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología**. p71.

Domínguez,R., Gaitán, C.M., Méndez,S.A y A.Ulloa-Aguirre. (1987): Effects of catecholaminergic blockade by haloperidol or propranolol at different stages of the oestrous cycle on ovulation and gonadotrophin levels in the rat. **Journal of Endocrinology 113:37-44**.

Dyer, Ch, A. y Erickson, G. F. (1985): Norepinephrine amplifies human chorionic gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by ovarian theca-Interstitial. **Endocrinology 116: 1645-1652**.

Erickson, G. F. (1982): Follicular maturation and atresia. En: The gonadotropins:Basic Science and Clinical Aspects in Female. Flamigni, C y Givens, J.R (Eds.). Sero Symposium No. 42. Academic Press, New York pp 177-185.

Erskine, M. S. y Weaver, Ch. E. (1988): The role of ovarian sympathetic innervation in the control of estrous responsiveness in the rat. **Hormones and Behavior 22: 1-11**.

Ferruz,J., Ahmed C.E., Ojeda,S.R. y Lara,H.E. (1992): Norepinephrine release in the immature ovary is regulated by autoreceptors and neuropeptide-Y. **Endocrinology 130:1345-1351**.

Ferruz, J., Barria,A., Galleguillos,X.y Lara,H.E. (1991): Release of norepinephrine from the rat ovary: Local modulation by gonadotrophins. **Biology of Reproduction 45:592-597**.

Flores, A., Ayala, Ma.E. y Domínguez, R. (1990): Does noradrenergic peripheral innervation have a different role in the regulation ovulation in the puberal and adult rat?. **Medical Science Research 18:817-818**.

Frawley, L.S. y Henricks,D.M. (1979): Mode of gonadotropin secretion in infantile female rats and role of estrogen in feedback regulation. **Endocrinology 105:1064-1072**.

Funkenstein, B., Nimrod, A. y Linder, H.R. (1980): The development of steroidogenic capability and responsiveness to gonadotrophins in cultured neonatal rat ovaries. *Endocrinology* 106:98-106.

Gerendai, I. y Halasz, B. (1981): Participation of a pure neuronal mechanism in the control of gonadal functions. *Andrologia* 13:275-282.

Gibson, W.R., Roche, P.S., Summers, R.J. y Wylie, S.N. (1984): Time course of sympathetic denervation of the rat ovary after freezing its nerve supply. *Journal of Reproduction and Fertility* 72:429-433.

Goldman, B.D. (1981): Puberty. En: Adler, N.T. (Ed.), *Neuroendocrinology of Reproduction Physiology and Behavior*. Plenum Press, New York, p.229.

Greenwald, G.S. y Roy, S.K. (1994): Follicular development and its control. En: Knobil, E. and Neill, J.D. (Eds). *The Physiology of Reproduction*, segunda edición. Raven Press-New York. 629-724.

Grob, H.S. (1974): Follicle growth in denervated ovaries of hypophysectomized mice. *Federation Proceeding* 33:213

Hadfield, H.G., Crane, M.E., Nugent, E.A., Milio, C. y Narasimhachari, N. (1985): Determination of 13 catecholamines, indolamines, metabolites and precursors in less than 20 minutes during a simple HPLC run. *Journal of Liquid Chromatography* 8: 2689-2697.

Hirshfield, A.N. (1992): Heterogeneity of cell populations that contribute to the formation of primordial follicles in rats. *Biology of Reproduction* 47:466-473.

Hirshfield, A.N. y Midgley, A.R. (1978): The role of FSH in the selection of large ovarian follicles in the rat. *Biology of Reproduction* 19:597-605.

Hurk, R.V., Spek, E.R., Dijkstra, G., van Vorstenbosch, C.J.A.H., Hulsof, S.C.J. y Dieleman, S.J. (1992): Effects of pregnant mares's serum gonadotrophin on the micromorphology of antral follicle in heifers, with special reference to atypical granulosa cells. *J. Reprod. Fert.* 95:903-913.

Hsueh, A.J.W., Billig, H. y Tsafiri, A. (1994): Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews* 15:707-724.

Jones, R.E., Desan, P.H., López, K.H. y Austin, H.B. (1990): Asymmetry in diencephalic monoamine metabolism is related to side of ovulation in a reptile. *Brain Research* 506:187-191.

Jordan, A. W. (1981): Changes in ovarian β -adrenergic receptors during the estrous cycle of the rat. *Biology of Reproduction* 24:245-248.

Kannisto, P., Ekblad, E., Helm, G., Owman, C.H., Sjöberg, N.O., Stjernquist, S., Sundler, F. y Wallas, B. (1986): Existence and coexistence of peptides in nerves of mammalian ovary and oviduct demonstrated by immunocytochemistry. *Histochemistry* 86:25-34.

Klein, C.M. y Burden, H.W. (1988a): Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neuroscience Letters* 85: 217-222.

Klein, C.M. y Burden, H.W. (1988b): Substance P- and vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-immunoreactive nerve fibers in relation to ovarian postganglionic perikarya in para- and prevertebral ganglia: Evidence from combined retrograde tracing and immunocytochemistry. *Cell Tissue Research* 252:403-410.

Klein, C.M., Ray, R.H. y Burden, H.W. (1989): Direct electrical stimulation of the superior ovarian nerve in rats causes an increase in neuronal activity in the ipsilateral ovarian plexus nerve. *Brain Research* 479:194-200.

Lara, H.E. y Belmar, J. (1991): Release of norepinephrine from the cat ovary: Changes after ovulation. *Biology of Reproduction* 44:752-759.

Lara, H.E., Dees, W.L., Hiney, J.K., Dissen, G.A., Rivier, C. y Ojeda, S.R. (1991): Functional recovery of the developing rat ovary after transplantation: Contribution of Extrinsic innervation. *Endocrinology* 129:1849-1860.

Lara, H.E., Hill, D.F., Katz, K.H. y Ojeda, S.R. (1990a): The gene encoding nerve growth factor is expressed in the immature rat ovary: Effect of denervation and hormonal treatment. *Endocrinology* 126:357-363.

Lara, H.E., McDonald, J.K., Ahmed, C.E. y Ojeda, S.R. (1990b): Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. *Endocrinology* 127:2199-2209.

Lara, H.E., McDonald, J.K. y Ojeda, S.R. (1990c): Involvement of nerve growth factor in female rat sexual development. *Endocrinology* 126:364-375.

Lawrence, I.E. Jr., y Burden, H.W. (1980): The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The Anatomical Record* 196:51-59.

Malamed, S., Gibney, J.A. y Ojeda, S.R. (1990): Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis. *Anatomical Record* 226:64A-65A.

Malamed, S., Gibney, J.A. y Ojeda, S.R. (1992): Ovarian innervation develops before folliculogenesis in the rat. *Cell Tissue Res* 270:87-93.

Marchetti, M.C., Badr, M., Follea, N. y Pelletier, G. (1987): Ovarian adrenergic nerves directly participate in the control of luteinizing hormone-releasing hormone and adrenergic receptors during puberty: A biochemical and autoradiographic study. *Endocrinology* 121:219-226.

McCormack, Ch.E. y Meyer, R.H. (1964): Minimal age for induction of ovulation with progesterone in rats: Evidence for neural control. *Endocrinology* 74: 793-799.

McNeill, D.L. y Burden, H.W. (1987): Neuropeptides in sensory perikarya projecting to the rat ovary. *The American Journal of Anatomy* 179:269-276.

Morales, L. (1991): Estudio de la participación del nervio ovárico superior en el proceso de pubertad espontánea de la rata entera y hemicastrada. (Tesis de Maestría). **Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza, UNAM.**

Morales, L. Ayala, M.E., Flores, A. y Domínguez, R. (1988): Variaciones en el crecimiento y la diferenciación folicular inducida por la administración de propionato de testosterona (Pt) al nacimiento XXXI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. C-92.

Morales, L., Chávez, R. y Domínguez, R. (1990): Differences in spontaneous ovulation after unilateral or bilateral section of the superior ovarian nerve in prepubertal rat. XV Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, A.C. 78-82, Acapulco, Guerrero.

Morales, L., Chávez, R. y Domínguez, R. (1993): Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve. **Medical Science Research 21:15-17.**

Ojeda, S.R., Aguado, L.I. y Smith, S. (1983): Neuroendocrine mechanisms controlling the onset of female puberty: The rat as a model. **Neuroendocrinology 37: 306-313.**

Ojeda, S.R., Urbanski, H.F. y Ahmed, C.E. (1986): The onset of female puberty: Studies in the rat. **Recent Progress in Hormone Research, Vol.42: 382-442.**

Ojeda, S.R. y Urbanski, H.F. (1994): Puberty in the rat. En: Knobil, E and Neill, J.D. (Eds). **The Physiology of Reproduction**, segunda edición. Raven Press-New York. **363-409.**

Papka, R.E., Cotton, J.P. y Traurig, H.H. (1985): Comparative distribution of neuropeptide tyrosine, vasoactive intestinal polypeptide, substance P-immunoreactive, acetylcholinesterase-positive and noradrenergic nerves in the reproductive tract of the female rat. **Cell Tissue res. 242:475-490.**

Peters, H., Byskov, A.G. y Faber, M. (1973): Intraovarian regulation of follicle growth in the immature mouse. En: Peters, H. (De.). **The Development and maturation of the ovary and its functions.** Amsterdam: Excerpta Medica: **20-23.**

Powley, T.L., Prechtl, J.C., Fox, E.A. y Berthoud, H.R. (1983): Anatomical considerations for surgery of the rat abdominal vagus: distribution, paraganglia and regeneration. **J. Auton. Nerv. Syst. 9: 79-97.**

Ramaley, J.A. (1980): Biological clocks and puberty onset. **Federation Proc. 39:2355-2359.**

Ramírez, V.D. (1973): Endocrinology of puberty. En: **Handbook of Physiology**. Section 7. Endocrinology. Vol III part I pp. 1-29 American Physiological Society. Washington, D.C.

Ratner, A., Sanborn, C.R. y Weiss G.K. (1980): β -adrenergic stimulation of cAMP and progesterone in rat ovarian tissue. *American Physiological Society E-139 - 143.*

Riboni, R. y Dominguez, R. (1995): Noradrenergic peripheral denervation in newborn female guinea pig results in the acceleration of follicular growth. En: **International Symposium on Life Cycle of the Ovarian Follicle**. Serono Symposia. 2-5 de Noviembre p. 43

Richards, J.S. (1980): Maturation of ovarian follicles : Actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiological Reviews 60:51-89.*

Richards, J. y Bogovich, K. (1982): Effects of human chorionic gonadotrophin and progesterone on follicular development in the immature rat. *Endocrinology 111:1429-1438.*

Rosas, P., Arguello, M.S. y Dominguez, R. (1989): Effects of noradrenergic peripheral denervation on spontaneous or induced puberty in normal and hypothyroid hairless female mice. *Medical Science Research 17:285-286.*

Sawamoto, J. y Sasamoto, S. (1973): Follicular development after the first ovulation in immature rats pretreated with PMS. *Endocrinol. Japon 20:581-585.*

Schultheis, T.D., Dees, W.L. y Ojeda, S.R. (1992): Postnatal development of sympathetic and sensory innervation of the Rhesus monkey ovary. *Biology of Reproduction 47:760-767.*

Selstam, G., Norjavaara, E., Tegenfelt, T., Lundeberg, S., Sandstrom, Ch. y Sven-Ake, P. (1985): Partial denervation of the ovaries by transection of the suspensory ligament does not inhibit ovulation in rats treated with pregnant mare serum gonadotrophin. *The Anatomical Record 213:392-395.*

Skarzynski, D. y Kotwica, J. (1993): Mechanism of noradrenaline influence on the secretion of ovarian oxytocin and progesterone in conscious cattle. *Journal of Reproduction and Fertility 97:419-424.*

Sokka, T. y Huhtaniemi. (1995): Functional maturation of the pituitary-gonadal axis in the neonatal female rat. *Biology of Reproduction 52:1404-1409.*

Stefenson, A., Owman, Ch., Sjoberg, N-O., Sporn, B. y Wallen, B. (1981): Comparative study of the autonomic innervation of the mammalian ovary, with particular regard to the follicular system. *Cell Tissue Res 215:47-62.*

Teissier, M.P., Monget, P., Monniaux, D. y Duran, P. (1994): Changes in insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Biology of Reproduction 50: 111-119.*

Villavicencio, J. (1991): Un estudio de los mecanismos que regulan el crecimiento y la diferenciación folicular en la rata prepúber: El papel de la hormona estimulante del folículo y sus isohormonas. (Tesis de Maestría). **Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la salud.**

Villavicencio, J. y Domínguez,R. (1993): Differences in follicular growth and atresia induced by gonadotrophin stimulation in pre-pubertal rats are age-dependent. ***Medical Science Research* 21:361-362.**

Villavicencio, J., Flores, A. y Domínguez,R. (1993): Age dependence of the ovulatory response to gonadotrophins in prepubertal rats. ***Medical Science Research* 21:69-71.**

Weiss, G. K., Dail,W.G. y Ratner, A. (1982): Evidence for direct neural control of ovarian steroidogenesis in rats. ***Journal of Reproduction and Fertility*. 65:507-511.**

Wylie, S.N., Roche,P.J. y Gibson,W.R. (1985): Ovulation after sympathetic denervation of the rat ovary produced by freezing its nerve supply. ***Journal of Reproduction and Fertility* 75:369-373.**

Apéndice A.

El cromatógrafo líquido utilizado consta de:

- 1) Bomba isocrática de flujo constante modelo LC250 (Perkin Elmer). El loop del inyector es de 100 μ l.
- 2) La columna utilizada es de 4.6 mm de diámetro interno que consiste en un tubo de acero inoxidable con paredes gruesas y con una longitud de 25 cm. El relleno de la columna está formado por microesferas de sílice porosa que tiene un diámetro de 10 μ m. A la superficie de las microesferas se encuentran unidos una monocapa de grupos octadecil ($C_{18}H_{27}$).
- 3) Detector electroquímico modelo LC-4C (Bioanalytical System) con un electrodo de trabajo de platino.
- 4) Integrador modelo LC1-100 (Perkin Elmer).
- 5) La fase móvil fue preparada de la siguiente manera:

En un vaso de precipitado con agitador magnético se colocan 470 ml de agua bidestilada (previamente filtrada con un filtro orgánico), se agregan 15.75 g de ácido cítrico agitando hasta disolver por completo; esta solución se lleva a pH=3 adicionado poco a poco la solución concentrada de NaOH. Una vez que la solución se ha llevado al pH indicado, se adicionan 100mg de SOS (ácido 1-octansulfónico), agitando continuamente. Esta solución se lleva al sistema de filtración millipore con una membrana de poros de 0.22 μ m de diámetro. Una vez filtrada la solución, se traspasa a un matraz junto con el agitador magnético, se coloca sobre la parrilla de agitación y se conecta al sistema de inyección de helio para eliminar el aire que contenga la solución; durante aproximadamente 15 minutos. Después de este tratamiento se continúa degasificando la solución con el sistema de vacío, hasta que se considera que la solución ha quedado completamente degasificada. A la solución degasificada se le agregan 20 ml de acetonitrilo y 15 ml de tetrahidrofurano, se agita levemente y se coloca al sistema de HPLC.

- 6) La validación del método se realizó utilizando concentraciones conocidas de los estándares (Fig. 21).

En la Fig. 22. a) se muestra una corrida cromatográfica de los estándares, en donde se observa una buena separación de la noradrenalina y del estándar interno (DHBA) b) y el cromatograma de una muestra de ovario.

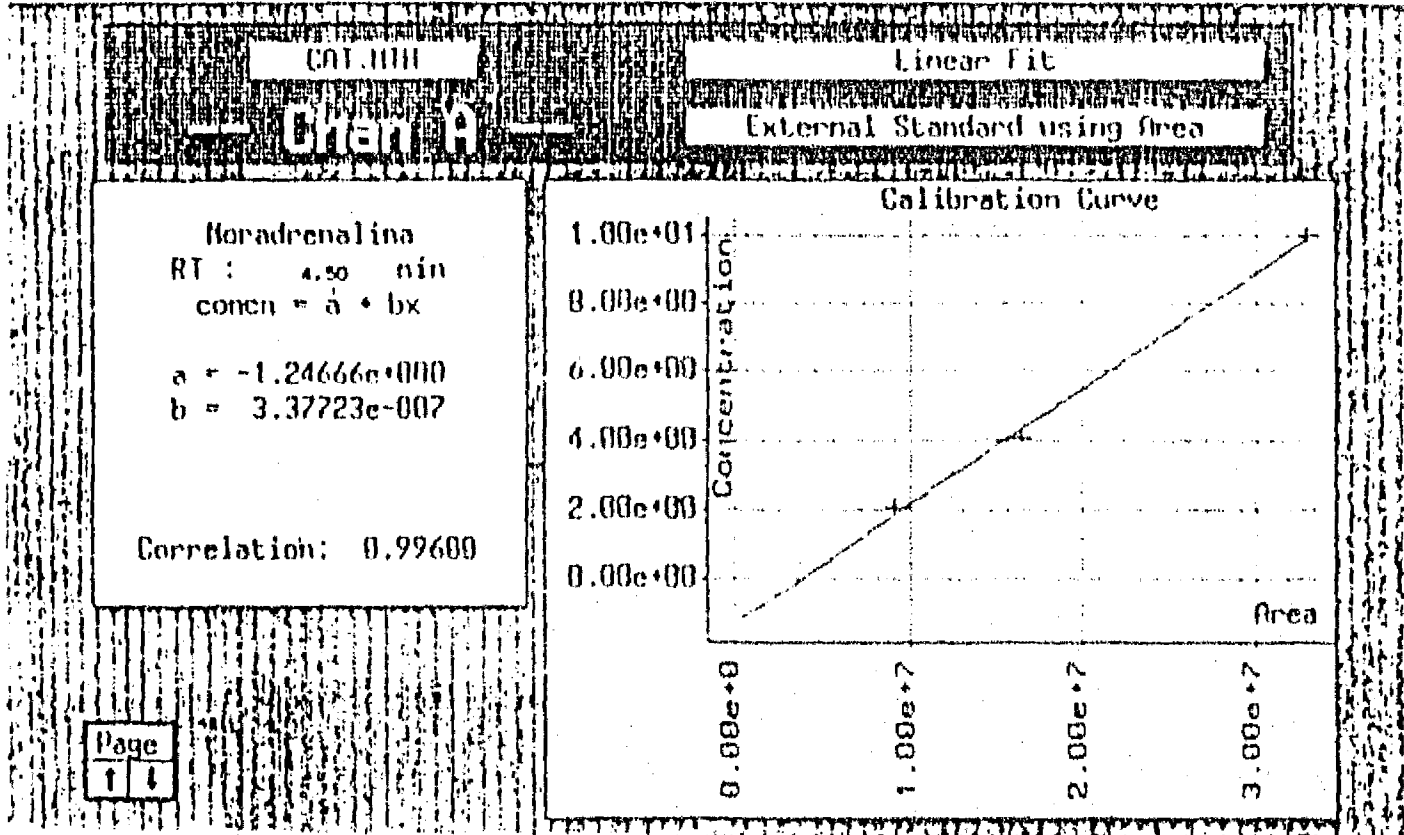
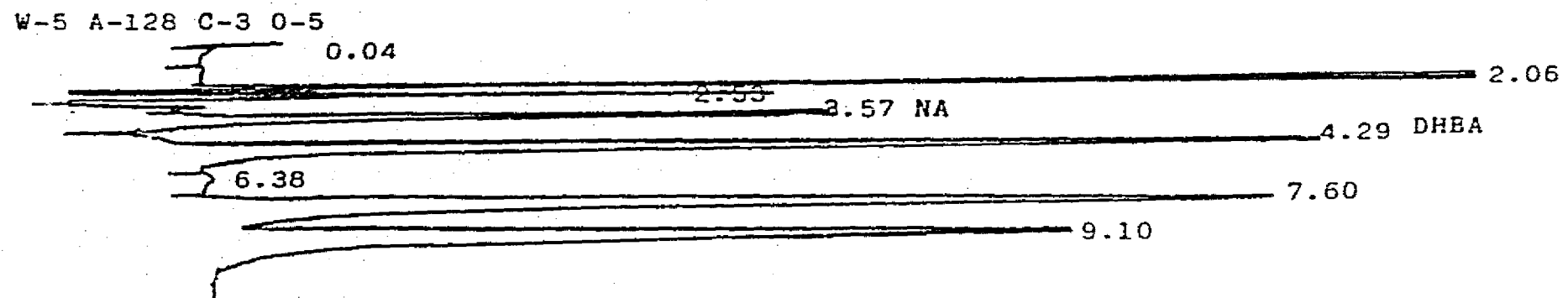
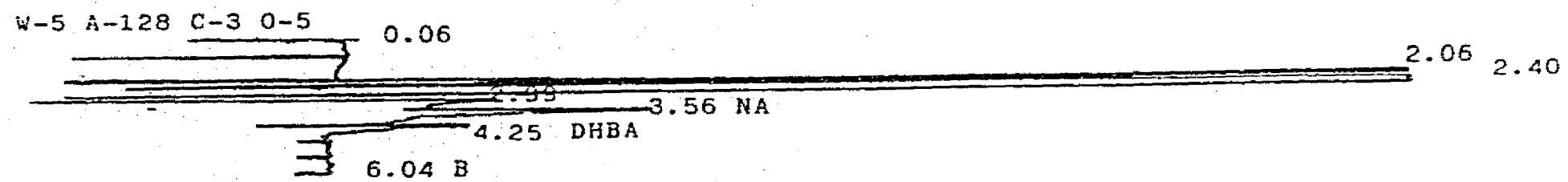


Fig. 21. Curva de calibración para la noradrenalina.



a) Cromatograma de un estándar



b) Cromatograma de una muestra de ovario

Fig. 22. Cromatograma de un estándar y de una muestra de ovario.

PUBLICACIONES

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

L. Morales, R. Chávez and R. Domínguez

Biology of Reproduction Research Unit, Laboratory of Physiology of Reproduction, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 9 020, CP 15000 México, D.F., México

Keywords: Superior ovarian nerve, prepubertal, ovulation.

Introduction: The sympathetic innervation arrives at the ovary by the superior ovarian nerve (SON) and ovarian plexus [1]. Immunohistochemistry studies on the ovaries of the rat show the presence of catecholaminergic innervation from day 16 of pregnancy. Also, the pattern of innervation varies during the life of the animal [2].

The bilateral transection of the SON in early juvenile rats (24 days) led to more than 60% depletion in ovarian norepinephrine content of the ovary, without affecting the timing of vaginal opening and first ovulation [3]. Ovulation induced by PMSG treatment in 25-day-old rats was not modified by this treatment [4]. This led the authors to suggest that "these nerves seem not to play an obligatory role in ovulation" [4].

There is evidence suggesting that the role of noradrenergic ovarian innervation in the regulation of ovulation differs between the adult and prepubertal rat [5]. Furthermore, we have previously shown that spontaneous ovulation in the denervated ovary provoked by a unilateral transection of the SON, is reduced in the adult rat [6]. Also, participation of the ovarian innervation in regulating ovulation seems to be different in the intact and hemiovariectomised rat [7, 8].

Based on these observations we decided to compare the effects of unilateral and bilateral section of the SON at different times before puberty on the first spontaneous ovulation of intact and hemiovariectomised rats.

Materials and methods: Pre-pubertal female rats of C117-V strain from our own breeding stock, were maintained under conditions of controlled lighting (lights on from 05:00 to 21:00 h). The animals were kept with the dams until day 21 when they were weaned, and kept in group cages (six rats per cage), with free access to food and tap water thereafter. All surgery was done under ether anaesthesia.

On days 16, 20, 24, 28 and 32 groups of rats were allotted at random to one of the following groups:

Untouched controls were killed by cervical dislocation on the day of first vaginal oestrus.

Sham-operated rats were laparotomised and the wound sealed.

Denervated animals: a midline incision was made to provide access to the suspensory ligament (right, left or both) containing the SON; it was isolated from the surrounding tissue, and the nerve was sectioned [6].

Hemiovariectomy: the rats were laparotomised and the left or right ovary extirpated.

Hemiovariectomy plus denervation: The animals were laparotomised, the left or right ovary extirpated and the suspensory ligament of the remaining ovary was isolated and the nerve sectioned.

Rats were inspected daily for vaginal opening and when it

occurred, vaginal smears were obtained daily. On the day of first vaginal oestrus, all animals were killed by bleeding under anaesthesia.

At autopsy, the right and left oviducts were dissected and the ova present were counted. Ovaries and uteri were removed and weighed on a precision balance.

In hemiovariectomised animals the compensatory ovulation (CO) and compensatory ovarian hypertrophy (COH) were calculated as following [9]: CO = (number of ova shed by the *in situ* ovary - number of ova shed by the same ovary of untouched control group)/(number of ova shed by the same ovary of untouched control group) × 100.

COH = (weight of the *in situ* ovary - weight of the same ovary of untouched control group)/(weight of the same ovary of untouched control group) × 100.

Data on the weight of the ovaries and uteri, age of vaginal opening and first ovulation, and number of ova shed were analysed by multivariate analysis of variance (MANOVA), followed by Tukey's test; ovulation rate (number of ovulating/number of treated ones) by Fisher's exact probability test or chi-square test; and compensatory ovulation and compensatory ovarian hypertrophy by Mann-Whitney U test. A *p* value less than 0.05 was considered significant.

Results and discussion: Because there were no differences in body weight, age at vaginal opening, age at first ovulation, ovulation rate, or weight of the ovaries and uterus between untouched control and sham operated animals, these data were combined to form a single control group.

The age of vaginal opening and first ovulation were similar to control animals in hemiovariectomised rats with or without unilateral section of the SON and in intact unilateral and bilateral denervated animals.

An increase in the ovulation rate occurred in those rats with section of the right SON (35/39 vs 44/65, *p* < 0.05), whilst differences were not observed in those groups of animals with left or bilateral section of the SON (left 30/47; bilateral 37/52 vs 44/65, NS). Significant differences in the ovulation rate between the innervated and denervated ovary were not observed, except in those animals with the section of the right SON done on day 16, when the ovulation rate was higher in the innervated ovary (left) than in the denervated one (right) (8/8 vs 3/8, *p* < 0.05).

The number of ova shed by the left and right ovaries were similar in control group. Bilateral denervation did not modify the number of ova shed by the left or right ovaries. When a unilateral section of the SON was done, however, the number of ova shed by the denervated ovary diminished significantly, while an increase in the innervated ovary was observed (Table 1). The modifications induced by the section of left SON were similar in all ages studied.

Rats with section of the left SON showed an increase in the weight of the right ovary (innervated), without changes

Table 1: Number of ova shed by the right and left ovary in control rats and animals with section of the left, right or both superior ovarian nerves, autopsied on the day of first vaginal oestrus (means \pm SEM).

| | Control | Section of left SON | Section of right SON | Bilateral section of SON |
|-----------------------|--------------------------|---|---------------------------------------|---------------------------|
| Left ovary | 3.4 \pm 0.4 | 1.8 \pm 0.4* | 4.8 \pm 0.5* | 3.4 \pm 0.5 |
| Right ovary | 3.4 \pm 0.3 | 5.4 \pm 0.4* | 1.9 \pm 0.4* | 3.2 \pm 0.4 |
| Total | 6.8 \pm 0.5 | 7.4 \pm 0.4 | 6.8 \pm 0.5 | 6.6 \pm 0.5 |
| By age of denervation | | | | |
| 16 days | Left ovary 1.4 \pm 0.9 | Right ovary 6.0 \pm 1.4* [@] | Left ovary 1.5 \pm 0.9 [@] | Right ovary 2.5 \pm 1.5 |
| 20 days | Left ovary 2.0 \pm 0.5 | Right ovary 5.0 \pm 1.2* [@] | Left ovary 3.4 \pm 0.7 | Right ovary 2.7 \pm 0.8 |
| 24 days | Left ovary 1.5 \pm 0.7 | Right ovary 5.6 \pm 0.9* [@] | Left ovary 4.4 \pm 0.9 | Right ovary 2.8 \pm 1.9 |
| 28 days | Left ovary 1.3 \pm 0.8 | Right ovary 5.5 \pm 0.9* [@] | Left ovary 3.1 \pm 0.9 | Right ovary 3.2 \pm 1.1 |
| 32 days | Left ovary 3.2 \pm 1.2 | Right ovary 4.8 \pm 0.7* | Left ovary 6.6 \pm 1.2* | Right ovary 3.8 \pm 0.8 |

* As compared with control group, $p < 0.05$; [@] As compared with left ovary, $p < 0.05$ (MANOVA followed by Tukey's test).

in the denervated (left), whilst in those with a section of the right SON the weight of denervated ovary diminished without changes in the other one. Bilateral section of the SON provoked an increase in the weight of the left ovary. The weight of the uterus was not modified by denervation (Table 2).

On the day of first vaginal oestrus the ovulation rate was

Table 2: Weight (mg/100 g body weight) of the right and left ovary and uterus in control rats and animals with section of the left, right or both superior ovarian nerves (SON), autopsied on the day of first vaginal oestrus (means \pm SEM).

| Group | Right ovary | Left ovary | Uterus |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Control | 16.6 \pm 0.5 | 16.1 \pm 0.5 | 163.5 \pm 5.2 |
| Left section SON | 18.5 \pm 0.7* | 14.8 \pm 0.8 | 168.4 \pm 4.8 |
| Right section SON | 14.5 \pm 0.8* | 16.6 \pm 0.9 | 161.4 \pm 5.2 |
| Bilateral section | 15.9 \pm 0.7 | 18.3 \pm 0.7* | 164.2 \pm 4.3 |

* As compared with control group, $p < 0.05$ (MANOVA followed by Tukey's test).

similar in control and hemiovariectomised rats: 68% of control (44/65); 69% in hemiovariectomised rats with the right ovary *in situ* (34/49); 78% in hemiovariectomised with the left ovary *in situ* (36/46).

In hemiovariectomised animals the section of the SON induced a decrease in the ovulation rate (right ovary *in situ* 17/53 vs 34/49; left ovary *in situ* 23/49 vs 36/46; $p < 0.05$). As in intact animals, differences in ovulation rate by the denervated ovary in hemiovariectomised animals were not observed, except in those animals with the left ovary *in situ* denervated on day 16, or with the left or right ovaries *in situ* denervated on day 32. At these times the ovulation rate was lower than in the hemiovariectomised innervated ovaries (Table 3).

The compensatory ovulation by the right ovary decreased with the age of the animals. The effects of the section of SON also varied with time of surgery. A significant decrease was

COMPENSATORY OVULATION

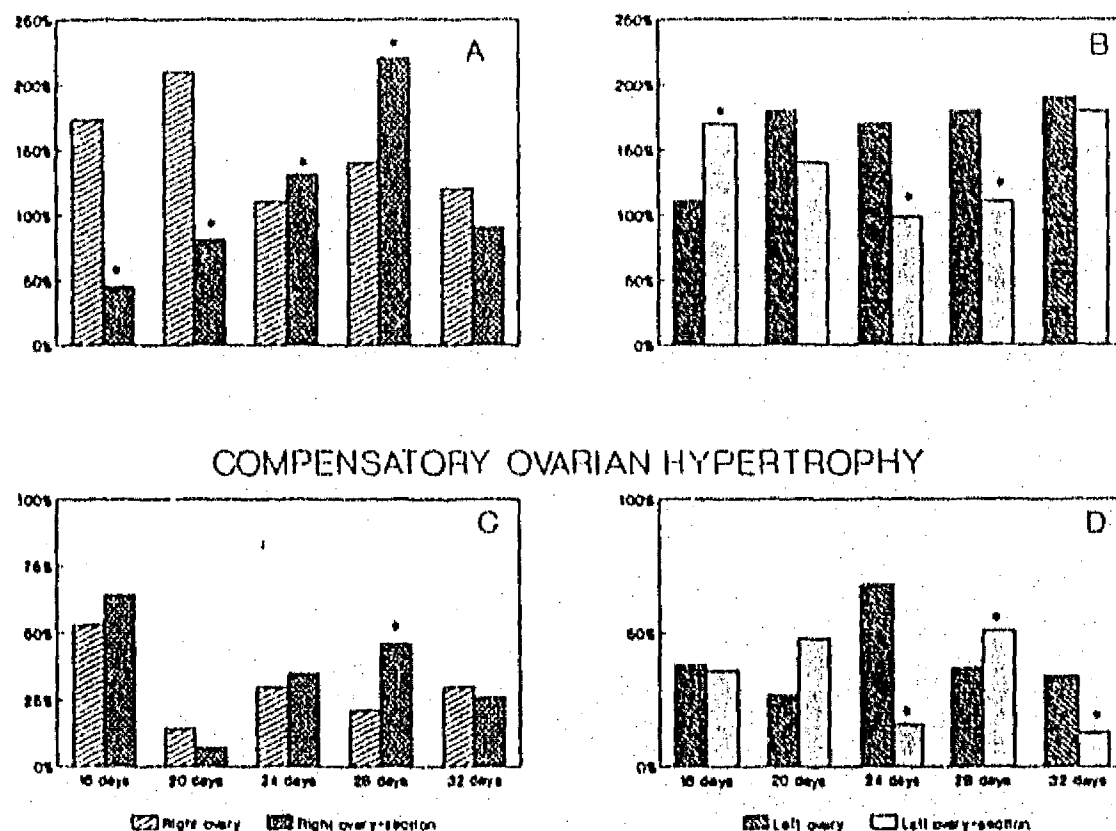


Figure 1: Panel A. Compensatory ovulation by the right ovary decreased by the effects of the section of the superior ovarian nerve performed on days 16 or 20, and increased when it was done on days 24 or 28. Panel B. When the left ovary was *in situ* the section of the superior ovarian nerve was followed by an increase in the compensatory ovulation when done on day 16, and a decrease when performed on days 24 or 28. Panel C. Compensatory ovarian hypertrophy by the right ovary increased in rats with the section of the right superior ovarian nerve carried out on day 28. Panel D. The compensatory ovarian hypertrophy by the left ovary decreased in rats with a section of the left superior ovarian nerve performed on days 24 or 32, while it increased when done on day 28.

* As compared with right or left ovary, $p < 0.05$.

Table 3. Ovulation rate (number of ovulating animals/number of treated), in animals hemiovariectomised (Hovx) or hemiovariectomised plus section of the superior ovarian nerve of the remaining ovary, antiposited the day of first vaginal oestrus.

| Age | Left Hovx | Left Hovx + RSON | Right Hovx | Right Hovx + LSON |
|-----|-----------|------------------|------------|-------------------|
| 16 | 9/12 | 3/10* | 11/12 | 7/11 |
| 20 | 7/9 | 3/10 | 6/10 | 8/13 |
| 24 | 4/9 | 3/8 | 3/7 | 1/6 |
| 28 | 6/10 | 5/13 | 8/8 | 6/10 |
| 32 | 8/9 | 3/12* | 7/9 | 1/9** |

* As compared with left Hovx, $p < 0.05$; ** As compared with right Hovx, $p < 0.05$ (χ^2 test or Fisher's exact probability test).

observed in rats treated on days 16 or 20, and an increase in those treated on days 24 or 28, but no effect when the treatment was done on day 32 (Figure 1, panel A). When the left ovary was *in situ*, compensatory ovulation was lower in rat treated on day 16 than in those treated on days 20, 24, 28 or 32. Compensatory ovulation increased in those animals with section of the left SON produced on day 16 and a decrease thereafter (Figure 1, panel B).

The compensatory ovarian hypertrophy by the right and left ovaries was different according to the age of treatment. When the SON was sectioned in 28 day old rats, there was an increase in the COH (Figure 1, panels C and D).

Our findings are consistent with those of Aguado and Ojeda [3], who showed that bilateral section of the SON affected neither the first spontaneous ovulation nor the age of vaginal opening. Based on the diminution in the number of ova shed by the denervated ovaries, we suggest that, as in the adult rat, the SON modulates the ovulatory response in a stimulatory and lateralised way in the pre-pubertal rat.

These results differ from those observed in pre-pubertal rats with a peripheral noradrenergic denervation induced by guanethidine administration, where a delay in the age of vaginal opening and an increase in the number of ova shed in the first ovulation were observed [5]. Such differences could be explained by the age of denervation (newborn vs rats during the infantile and juvenile periods) and by the model of study used. Guanethidine destroys peripheral sympathetic neurons when administered chronically [10]. Meanwhile, section of SON removes the noradrenergic fibres of parenchymal tissue of the ovary, including the interstitial gland and follicular walls, also the peptidergic information arriving to the ovary [3, 11].

The increase in the number of ova shed by the innervated ovary (compensatory ovulation), which varies with the age when the section was done, supports the idea of neural communication between both ovaries, as suggested by others

[12]. It also correlates with different regulatory mechanisms between the adult and prepubertal animal [6].

The effects of bilateral section on ovulation are not the addition of the effects of left and right denervation, implying the existence of a modulatory effect in gonadotrophin action on ovulation via other neural pathways. Bilateral section of the SON did not affect gonadotrophin plasma levels [3].

In the pre-pubertal animal, compensatory ovulation and ovarian hypertrophy are not parallel and depend on the *in situ* ovary, similar to the adult rat [13]. The neural information arriving by the SON seems to play a different role in the intact and hemiovariectomised animal (ovulation rate and number of ova shed by the denervated ovary).

In animals with both ovaries, the denervated ovary released very few ova (right ovary 1.9 ± 0.4 and left ovary 1.8 ± 0.4). In the hemiovariectomised animals, a compensatory ovulation occurred in all ovaries, where the innervation provided by the SON was eliminated. Combining the results of all hemiovariectomised rats with section of the SON, the right ovary released 7.2 ± 0.8 ova, and the left one 8.6 ± 0.5 . Such difference could reflect the existence of other neural inputs to both ovaries in the intact animal, which are not present in the hemiovariectomised animal.

1. Lawrence, J.E. Jr and Budden, H.W. 1980. *The Anatomical Record*, 196, 54-59.
2. Ojeda, S.R., Urbanski, H.F. and Ahmed, C.E. 1986. *Recent Progress in Hormone Research*, 42, 382-442.
3. Aguado, I. and Ojeda, S. 1984. *Endocrinology*, 114, 1815-1853.
4. Sebstam, G., Norstam, E., Tegengren, T. et al. 1985. *Anatomical Record*, 213, 392-395.
5. Doree, A., Ayala, M.E. and Dominguez, R. 1990. *Med. Sci. Res.*, 18, 817-818.
6. Chávez, R., Carrizosa, I. and Dominguez, R. 1991. *Med. Sci. Res.*, 19, 41-42.
7. Chávez, R., Cruz, M.E. and Dominguez, R. 1987. *J. Endocrinol.*, 113, 397-401.
8. Chávez, R., Cruz, M.E. and Dominguez, R. 1987. *Med. Sci. Res.*, 15, 1529-1530.
9. D'Abreu, H., Cassina, M.P., Barreiro, J.P. et al. *Med. Sci. Res.*, accepted for publication.
10. Lutz, H.E., McDonald, J.K., Ahmed, C.E. and Ojeda, S.R. 1990. *Endocrinology*, 127, 2199-2209.
11. Aguado, I. and Ojeda, S.R. 1984. *Endocrinology*, 114, 1944-1946.
12. Giendai, L., Marchetti, B., Manger, S., Amico Rocas, M. and Scapapini, U. 1978. *Neuroendocrinology*, 17, 272-278.
13. Cruz, M.E., Castro, I. and Dominguez, R. 1992. *J. Endocrinol.*, 133, 205-210.

These studies were supported by CONACYT, Programa Universitario de Investigación en Salud, and Dirección General de Asuntos del Personal Académico, grant ESP-200191, U.N.A.M.

Reprint requests to: Dr Cecilia Morales, Unidad de Investigación en Biología de la reproducción, Facultad de Estudios Superiores Zorobá, Ap 9-020, CP 15000, México D.F., México.

Paper received: 2nd November, 1992.

Ovarian norepinephrine content in prepubertal rats with superior ovarian nerve section: temporal studies

R. Chávez, L. Morales, Ma.É. González and R. Domínguez

Biology of Reproduction Research Unit, Laboratory of Physiology of Reproduction, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 9-020, CP 15,000 México, D.F., México

Keywords: Ovary, catecholamines, superior ovarian nerve, prepuberty.

Introduction: A multiplicity of evidence suggest that the sympathetic innervation contributes to the regulation of ovarian function [1-3]. Noradrenergic innervation arrives at the ovary via the suspensory ligament (superior ovarian nerve, SON) and ovarian plexus [4]. In previous reports we have presented evidence that the unilateral sectioning of the SON reduces the ovulatory response of the denervated gonad, in both prepubertal and adult rats [5, 6]. In the prepubertal animal the unilateral sectioning brought about a diminution in the number of ova shed by the denervated ovary, with an increase in the innervated one. These results support the idea of neural communication between both ovaries [7] and suggest the differing participation of the right and left nerves in ovulation [5].

Based on these results we decided to study the temporary effects of the unilateral or bilateral section of the SON on the ovarian catecholamine content in infantile and juvenile rats.

Materials and methods: Prepubertal female rats of CHZ-V strain obtained from our own breeding stock, were maintained under conditions of controlled lighting (lights on from 05:00 to 21:00 h). The animals were kept with dams until day 21 when they were weaned, with free access to food and tap water.

On days 16 or 32 of age, the rats were assigned to the following groups: (1) untouched control rats; (2) sham-operated animals (SO); (3) rats with left superior ovarian nerve section (LSON); (4) rats with right superior ovarian nerve section (RSON) and (5) rats with both superior ovarian nerves cut (BSON). All operations were done under ether anaesthesia and the nerve was sectioned as described previously [6].

Animals with each treatment were killed by decapitation 24 or 72 h after post-surgery or on the day of first vaginal oestrus (FVO). At autopsy, right and left ovaries were excised

and processed for catecholamine measurement. Each ovary was homogenised in 300 µL of 0.1 M perchloric acid containing dihydroxy-benzylamine as internal standard. Catecholamines were extracted from homogenates by absorption in acid-washed alumina, and measured by HPLC [8]. Samples were assayed in 50 µL duplicated aliquots.

Results were analysed by multivariate analysis of variance (MANOVA), followed by Tukey's test.

Results and discussion: No differences were observed in the parameters studied between intact and sham-operated groups. Therefore, we have presented only the results obtained from animals with the sham operation. Only norepinephrine was detected in the prepubertal rat ovary by the present method. The content of catecholamine and the weight of ovaries increased with the age, as reported by other authors [2]. There were no differences between right and left ovary.

In 16 day old rats, the section of the left SON reduced the concentration of norepinephrine in the denervated ovary. Rats killed 24 h after surgery showed a significant increase in the content of catecholamine by the innervated one (right). The content of the amine in the right ovary of animals with section of the RSON was reduced at 24 h and 72 h after sectioning, while the bilateral section depleted the amine in all groups (Table 1).

Animals denervated in the juvenile period (32 day old), showed a reduction in the norepinephrine content by the denervated ovary. No detectable levels were observed in animals with the LSON killed at 24 h or on the FVO day. BSON reduced the amine content of both ovaries at all times studied (Table 2).

Section of the SON during the infantile period provoked an increase in weight of ovaries at 24 or 72 h after denervation, while in juvenile animals this effect was observed in animals with BSON, or with LSON and killed on the day of FVO. This is probably attributable to an increase in the weight by hyperaemia of the gonad (Table 3).

Our results show that, in the prepubertal rat, the effects of

Table 1: Norepinephrine concentration (ng mg⁻¹) in the left (LO), or right ovary (RO) in 16 day old rats with or without superior ovarian nerve sectioning, killed at different times (means ± SEM)

| Group | n | Time post-surgery | | n | FVO | |
|---------|---|--------------------------|------|--------------------------|-----|--------------|
| | | 24 h | 72 h | | | |
| SO LO | 5 | 0.36 ± 0.07 | 4 | 0.36 ± 0.04 | 3 | 0.67 ± 0.06 |
| SO RO | 3 | 0.29 ± 0.14 | 4 | 0.32 ± 0.03 | 3 | 0.67 ± 0.05 |
| LSON LO | 7 | 0.11 ± 0.01* | 6 | 0.09 ± 0.02* | 5 | 0.31 ± 0.11* |
| LSON RO | 8 | 0.74 ± 0.09 ^a | 6 | 0.23 ± 0.03 ^a | 7 | 0.65 ± 0.13 |
| RSON LO | 7 | 0.32 ± 0.04 | 9 | 0.21 ± 0.02 | 5 | 0.45 ± 0.11 |
| RSON RO | 5 | ND ^a | 7 | 0.15 ± 0.05* | 4 | 0.52 ± 0.20 |
| BSON LO | 4 | ND | 4 | ND | 5 | ND |
| BSON RO | 6 | ND | 4 | ND | 5 | 0.17 ± 0.07* |

* As compared with ipsilateral ovary in SO, p < 0.05

^a As compared with left ovary in the same group, p < 0.05

Table 2: Norepinephrine concentration (ng mg^{-1}) in the left (LO), or right ovary (RO) in 32 day old rats with or without superior ovarian nerve sectioning, killed at different times (means \pm SEM)

| Group | n | Time post-surgery | | n | 72 h | n | FVO |
|---------|---|------------------------------|--|---|------------------------------|---|------------------------------|
| | | 24 h | | | | | |
| SO LO | 6 | 0.57 \pm 0.05 | | 8 | 0.73 \pm 0.07 | 4 | 0.70 \pm 0.20 |
| SO RO | 6 | 0.62 \pm 0.06 | | 9 | 0.65 \pm 0.07 | 4 | 0.69 \pm 0.21 |
| LSON LO | 5 | ND | | 6 | 0.30 \pm 0.13* | 4 | ND |
| LSON RO | 6 | 0.42 \pm 0.04 ^a | | 6 | 0.80 \pm 0.25 | 3 | 0.45 \pm 0.06 ^a |
| RSON LO | 3 | 0.49 \pm 0.16 | | 7 | 0.66 \pm 0.08 | 5 | 0.40 \pm 0.03 |
| RSON RO | 3 | 0.16 \pm 0.04* | | 8 | 0.13 \pm 0.03 ^a | 7 | 0.12 \pm 0.03 ^a |
| BSON LO | 5 | 0.08 \pm 0.02* | | 6 | 0.28 \pm 0.13* | 5 | 0.12 \pm 0.02* |
| BSON RO | 5 | 0.12 \pm 0.02* | | 6 | 0.14 \pm 0.05* | 5 | 0.34 \pm 0.25 |

* As compared with ipsilateral ovary in SO, $p < 0.05$.^a As compared with left ovary in the same group, $p < 0.05$. ND - not detectable.Table 3: Weight of ovaries (mg) in 16- or 32 day old rats with or without superior ovarian nerve sectioning, killed at different times (means \pm SEM).

| Group | Time post-surgery | | |
|--------------|-------------------|------------------|------------------|
| | 24 h | 72 h | FVO |
| 16 days SO | 9.3 \pm 0.25 | 13.0 \pm 0.98 | 24.1 \pm 4.90 |
| 16 days LSON | 12.9 \pm 0.81* | 17.6 \pm 0.73 | 24.7 \pm 1.56 |
| 16 days RSON | 10.3 \pm 1.06 | 20.5 \pm 2.14* | 25.0 \pm 1.07 |
| 16 days BSON | 13.5 \pm 0.65* | 16.8 \pm 0.80* | 34.6 \pm 2.04 |
| 32 days SO | 18.9 \pm 1.10 | 24.9 \pm 2.30 | 28.5 \pm 4.30 |
| 32 days LSON | 20.8 \pm 1.91 | 21.9 \pm 1.09 | 46.3 \pm 1.81* |
| 32 days RSON | 22.1 \pm 1.64 | 27.2 \pm 1.97 | 29.2 \pm 1.47 |
| 32 days SON | 39.1 \pm 2.92* | 36.7 \pm 2.76* | 38.3 \pm 2.24 |

* As compared with ipsilateral ovary in SO, $p < 0.05$. ^a As compared with left ovary in the same group, $p < 0.05$.

the unilateral or bilateral section of the SON on the concentration of norepinephrine are temporary, lateralised and age-dependent. Data from other authors have demonstrated that bilateral transection of the suspensory ligament, in intact [9] or stimulated juvenile rats [10], provokes a reduction in ovarian levels of norepinephrine. Our results show that the fall in the ovarian catecholamine content persists until 30 days after transection of the SON, with paulatine recuperation.

Data not published by our laboratory have shown that the transection of the SON diminishes the number of follicles measurable, up 40% of the control values, suggesting that ovarian innervation plays a role in the regulation of follicular growth. Furthermore, in the adult rat, the response of the denervated ovary to gonadotrophin administration was lessened [6]. It is possible that the content of norepinephrine is closely associated with the modulation of the follicle to the gonadotrophins, as reported by other authors [1].

Our results on the temporary changes in concentration of the neurotransmitter in the denervated ovary after surgery support the idea of the *de novo* production of catecholamines by the ovary [2].

On the other hand the evidence from the unilaterally-SON sectioned animal, with a decrease in norepinephrine content by the denervated ovary and a fast increase in the intact gonad. strengthens the idea of a neural communication

between ovaries. This provides information that could be unidirectional (left to right ovary), and stimulatory.

1. Ferruz, J., Barria, A., Galleguillos, X. and Lara, H.E. 1991. *Biology of Reproduction*, 45, 592-597
2. Ben-Jonathan, N., Arbogast, L.A., Rhoades, T.A. and Bahr, J.M. 1984. *Endocrinology*, 115, 1426-1431
3. Bahr, J.M. and Ben-Jonathan, N. 1981. *Endocrinology*, 108, 1815-1820
4. Lawrence, I.E. Jr. and Burden, H.W. 1980. *Anatomical Record*, 196, 51-59
5. Morales, L., Chávez, R. and Domínguez, R. 1993. *Medical Science Research* 21, 15-17
6. Chávez, R., Carrizosa, L. and Domínguez, R. 1991. *Medical Science Research*, 19, 41-42
7. Cerendal, I., Marchetti, B., Mauger, S. et al. 1978. *Neuroendocrinology*, 27, 272-278
8. Keller, R., Oke, A., Melford, I. and Adams, R. 1976. *Life Science*, 19, 993-1004
9. Agundo, L.I. and Ojeda, S.R. 1984. *Endocrinology*, 114, 1845-1853
10. Selatan, O., Nojima, E., Tegenfeli, T. et al. 1983. *Anatomical Record*, 213, 392-395

These studies were supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN210893), PADEP grant 30378, and Programa Universitario de Investigación en Salud, U.N.A.M.

Reprint requests to: Dr Chávez, R. Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, A.P. 9-020, CP 15,000, México, D.F., México.

Paper received: 2nd August, 1994; amended 12th September, 1994.

*XVIII Congreso
Latinoamericano de
Ciencias Fisiológicas*



12 al 16 de Abril de 1994
Centro de Conferencias
Palacio Municipal
Montevideo - Uruguay

**Resúmenes de Simposios y
Comunicaciones Libres**

P5/19**EL NERVIJO OVARICO SUPERIOR COMO MODULADOR DE LA ACCION DE LAS GONADOTROPINAS***Morales, L. y Chaves, R.*

Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, FES Zaragoza, UNAM, México. Resultados previos permiten suponer que el Nervio Ovárico Superior (NOS) modula la acción de las gonadotropinas sobre el ovario, ya que su sección provoca disminución de la cuota ovulatoria. Para probar esta hipótesis, se analizó la respuesta del animal desnervado al estímulo gonadotrópico, sobre la ovulación y el crecimiento folicular. Ratos de 32 días de edad fueron sometidos a sección del NOS izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO), cuatro días después se aplicaron 8 u.i. de PMSG, 10 u.i. de hCG u 8 u.i. de PMSG + 10 u.i. de hCG, el grupo testigo (TA) sólo recibió hormonas a los 36 días de edad. Los animales se sacrificaron al estro vaginal, con los siguientes resultados

| | PMSG | | hCG | | PMSG+hCG | |
|------|----------|----------|---------|----------|-----------|---------|
| | OI | OD | OI | OD | OI | OD |
| TA | 6.5±0.9 | 6.5±1.2 | 4.9±1.0 | 5.4±0.9 | 4.4±1.1 | 5.5±0.8 |
| SNOI | 1.3±0.9* | 5.7±0.8 | cero* | 6.0±0.5 | 2.5±1.2 | 7.2±0.7 |
| SNOD | 6.8±1.2 | 0.6±0.3* | 6.0±0.3 | 1.3±0.8* | 15.1±2.9* | cero* |
| SBNO | 7.6±2.2 | 3.4±1.3 | 3.9±1.3 | 3.2±0.9 | 5.8±1.7 | 2.6±1.6 |

*P<0.05 vs TA, "t" de Student.

En los animales desnervados el número de folículos totales fue menor que en los testigo, con aumento del porcentaje de atrésicos. Los resultados indican que el NOS modula la respuesta del ovario a las gonadotropinas y regula de manera estimulante el paso de los folículos de reserva a los de crecimiento.

Trabajo apoyado por PADEP y DGAPA, IN210893.

P5/20**SECREÇÃO PULSATIL DE LH EM RATOS: INTERAÇÃO COM A GLÂNDULA PINEAL***Nouaka, K.O., Hossokawa, N.M., Costa Neto, C.M., Antunes-Rodrigues, J.*

*Depto. de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, SP; *Dept. Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP - SP - Brasil.

A literatura tem mostrado que a glândula pineal e seu produto de secreção, a melatonina, possui atividade antigonadotrófica. O objetivo do presente trabalho foi estudar a secreção pulsátil de LH, com coleta de amostras de sangue a cada 5 minutos durante 2 horas, em ratos intactos, castrados, pinealectomizados e pinealectomizados + castrados. Foi também estudada a secreção pulsátil de LH em ratos intactos e castrados tratados com melatonina; e em ratos intactos e pinealectomizados tratados com LHRH. Os resultados mostram que a pinealectomia (nem a operação fictícia) não modifica a secreção pulsátil de LH. Entretanto, a pinealectomia promove uma diminuição do ritmo de secreção pulsátil de LH em resposta à castração. O tratamento com melatonina (50µg/100g PC, sc, 30 minutos antes do início da coleta das amostras de sangue) seja em ratos intactos ou ratos castrados, não modificou a secreção pulsátil de LH. A secreção de LH induzida por LHRH (100ng/100g PC, iv, 20 minutos antes do início do experimento) não é diferente nos animais intactos. Entretanto, esta resposta induzida não ocorreu quando os animais foram pinealectomizados 20-21 dias antes do experimento.

Apoio Financeiro: CAPES, FOMENTO/UFSCar