

UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL ESTADO PUEBLA

**Centro interdisciplinario de Posgrados
Investigación y Consultoría**

**Departamento de maestría en
Ciencias de la Salud**



Tesis que para obtener el grado de:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

**Caracterización morfométrica de un pequeño plexo nervioso adosado
a la vena cava inferior relacionado con los ovarios en la rata hembra adulta**

P r e s e n t a:

MCP. Ana María Flores García

Director de Tesis

Dr. Cesar Feliciano Pastelín Rojas

Puebla, México.

Diciembre 2014





UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyla**

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 textos, imágenes, gráficas, 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 de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL ESTADO PUEBLA

**Centro interdisciplinario de Posgrados
Investigación y Consultoría**

**Departamento de
Ciencias de la Salud**



***Tesis que para obtener el grado de:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD***

**Caracterización morfométrica de un pequeño plexo nervioso adosado
a la vena cava inferior relacionado con los ovarios en la rata adulta**

P r e s e n t a:

MCP. Ana María Flores García

Director de Tesis:

Dr. César Feliciano Pastelín Rojas

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Puebla, Puebla.

Diciembre 2014

GRUPO DE TRABAJO:

Dra. Carolina Morán Raya

Dr. César Feliciano Pastelín Rojas

Institución donde se realizó el proyecto:

Laboratorio de Histología del Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción del ICUAP de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 14 Sur No. 6301 Ciudad Universitaria, colonia San Manuel, Puebla, Puebla. México.

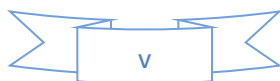
Teléfono: (222) 2295500 ext. 7162

Fax: (222) 2295500 ext.7162

Í N D I C E	Páginas
Introducción	1
CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO	
1.1. SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO	2
1.1.1 Plexos abdominales	2
1.1.2 Ganglios	3
1.1.3 Inervación ovárica	4
1.1.4 Nervio del Plexo Ovárico	6
1.1.5 Nervio Ovárico Superior	6
1.2 ANTECEDENTES	6
CAPÍTULO II ORGANIZACIÓN DEL TRABAJO	13
2.1 Definición del Problema	
2.2 Definición de variables	13
2.3 Justificación	14
2.4 Hipótesis	15
2.5 Objetivos	15
CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Organización de la investigación	16
3.2 Definición de la muestra	17
3.3 Procedimientos experimentales	17
3.4 Definición de recursos	20
CAPÍTULO IV RESULTADOS	21
4.1 Caracterización morfométrica del PAVCI	21
4.1.2 Neuronas posganglionares del PAVCI	24
CAPÍTULO V DISCUSIÓN DE RESULTADOS	26
4.2 Conclusión	31
Referencias	32

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Ganglios autonómicos	2
Figura 2. Disposición de ganglios e inervación vagal	4
Figura 3. Inervación ovárica	5
Figura 4. Ganglio celiaco derecho en cadáver humano	7
Figura 5. Conexiones ganglio caudal mesentérico	9
Figura 6. Complejo ganglio celiaco-mesentérico de la rata	11
Figura 7. Perikarya posganglionar	12
Figura 8. Fotografía plexo adosado a la vena cava inferior	18
Figura 9. Fotografía que muestra el procedimiento de la cirugía	19
Figura 10. Fotografía que muestra la ejecución transcárdial	20
Figura 11A. Plexo delimitado por tejido conectivo compuesto por un conglomerado de células neuronales.	22
Figura 11B. Cuerpos neuronales teñidos con tricrómica de Masson	22
Figura 12A. Muestra plexo teñido con técnica de Nissl	22
Figura 12B. Muestra cuerpos neuronales teñidos con técnica de Nissl.	22
Figura 13. Gráfica que muestra rango de tamaño de las neuronas identificadas con técnicas de histología.	23
Figura 14. Gráfica que muestra la distribución de cuerpos neuronales con forma circular predominante.	24
Figura 15. Cuerpos neuronales marcados con TB	25
Figura 16. Gráfica que muestra el porcentaje y rango del tamaño de las neuronas marcadas con TB.	26



ANEXOS

Anexo 1 TABLAS

Tabla 1. Técnica de deshidratación 34

Tabla 2. Tinción tricrómica de Masson 35

Tabla 3. Tinción de Nissl 37

Anexo 2

Antecedentes de técnicas de histología 38

Anexo 3

Técnicas de fijación de tejido 40

Anexo 4

Presentación de cartel en 56 Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. 41

Anexo 5

Abreviaturas 43

AGRADECIMIENTOS

Para la realización de este proyecto de investigación, se agradece a la coordinación del Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción del ICUAP de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por brindarme la oportunidad de ser parte de este equipo de trabajo. A mi director de tesis el Dr César Feliciano Pastelín Rojas, por su apoyo y colaboración en la realización de este trabajo de investigación, mediante la aportación de sus conocimientos, material didáctico y orientación en la realización de los procedimientos experimentales; de igual forma se agradece a los profesores de maestría que me apoyaron en la redacción final de esta tesis de posgrado.

INTRODUCCIÓN

En los mamíferos el sistema nervioso periférico está constituido por nervios y ganglios tanto simpáticos como parasimpáticos. Los ganglios simpáticos se localizan a lo largo de la cadena simpática (paravertebrales) y en el plexo abdominal (prevertebrales) los cuales, están situados de forma bilateral

En este trabajo se llevó a cabo la caracterización morfométrica por medio de técnicas de histología del plexo adosado a la vena cava inferior (PAVCI) y se utilizó un trazador neuronal para determinar si este plexo contiene neuronas que inervan al ovario para de esta manera poder designarlo como un ganglio y no como un plexo.

El PAVCI es una red de nervios que provienen del ganglio celiaco, cadena del tronco simpático lumbar y está formado por axones adrenérgicos, embebidos en una matriz de colágeno que reviste a la arteria y vena ovárica.

El circuito neuronal ovárico se considera una parte fundamental en la regulación de la secreción de hormonas ováricas y la pérdida de su integridad podría representar la asociación con patologías ováricas; se sabe que algunos componentes del circuito neuronal contribuyen en mayor medida que otras, por lo que en este trabajo se realizó la revisión de algunos componentes del circuito que participan en la regulación de las funciones ováricas.

Fue un estudio observacional, descriptivo donde se utilizaron nueve ratas hembras adultas de la cepa CIIZ-V de tres a cuatro de meses de edad (250 a 300g). Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de bioterio y con ciclo controlados de luz-oscuridad 12:12 horas. Las ratas se sacrificaron para diseccionar el plexo ovárico cuyos cortes fueron teñidos con técnicas de histología y trazadores neuronales.

CAPITULO I MARCO TEÓRICO

1.1. SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO

En la rata, el sistema nervioso autónomo (SNA) y periférico está constituido por nervios y ganglios tanto simpáticos como parasimpáticos. Los ganglios simpáticos se organizan en ganglios paravertebrales (cadena ganglionar) y prevertebrales localizados de forma bilateral. Los ganglios parasimpáticos (ganglios paraviscerales) se encuentran adyacentes a los órganos diana¹. (Figura1)

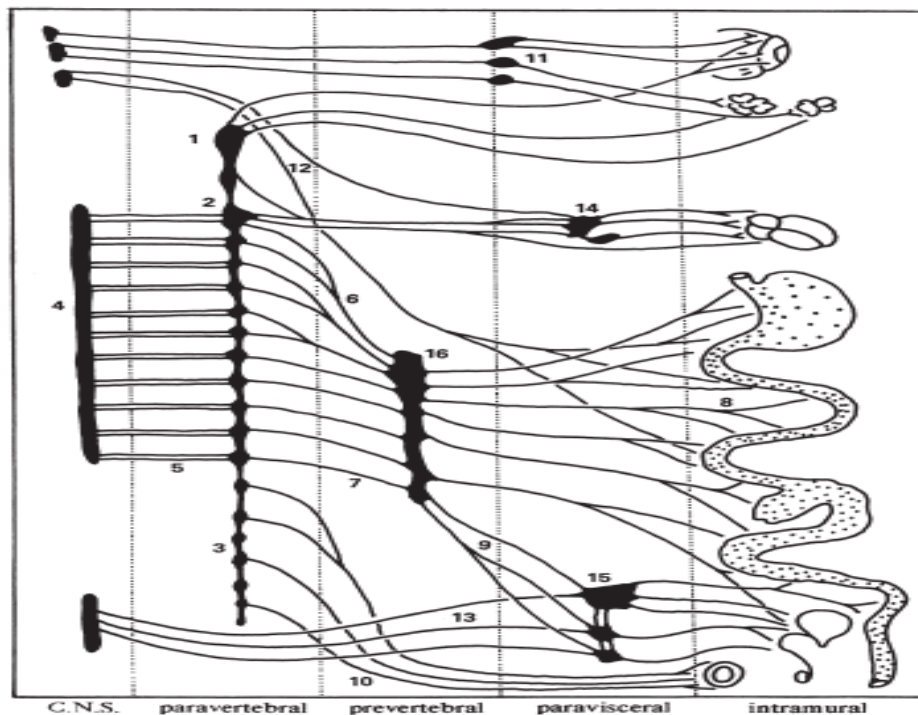


Fig.1 Muestra los principales ganglios autonómicos. Los números indican la posición topográfica de los principales nervios autonómicos y de algunos ganglios individuales: 1, ganglio cervical superior; 2, ganglio estrellado; 3, ganglio simpático lumbar; 4, columna intermediolateral en la espina dorsal toracolumbar; 5, ramas comunicantes; 6, nervios esplénicos; 7, nervios espláncnicos; 8, nervios mesentéricos; 9, nervio hipogástrico; 10, nervios perivesiculares; 11, ganglios esfenopalatinos; 12, nervio vago; 13, nervios pélvicos; 14, ganglios cardíacos; 15, ganglios pélvicos; 16, ganglios prevertebrales. Tomado de Gabella. 1995

1.1.1 Plexos abdominales

En el abdomen se describen dos principales estructuras ganglionares que son comúnmente referidas como plexos nerviosos. El plexo celiaco y el plexo

intermesentérico. El plexo celiaco que es una densa red nerviosa que rodea a la arteria aorta-ventral en el punto de donde salen la arteria mesentérica superior y el tronco celíaco, a nivel de la primera vértebra lumbar, detrás del estómago. Este complejo ganglionar es asimétrico, siendo el lado izquierdo más grande que el lado derecho³. El plexo celiaco recibe fibras aferentes de los nervios esplácnico mayor, menor y del nervio vago³⁻⁵⁻¹.

Por su parte, el plexo intermesentérico se encuentra localizado en posición ventral y ventrolateral a la aorta, entre las raíces de las arterias mesentéricas, conectando al plexo celiaco con el plexo mesentérico inferior. Los troncos intermesentéricos reciben contribuciones de los nervios esplánicolumbares³, siendo la fuente principal de este plexo el ganglio celíaco izquierdo, cuyas fibras son adrenérgicas y peptidérgicas. Otro camino de las fibras nerviosas que emergen de los ganglios celíacos son las que inervan el hígado, el estómago y el páncreas acompañando a las arterias hepáticas común, propia, gastroduodenal, pancreático-duodenal superior, gástrica derecha y gastroepiploica derecha⁴.

1.1.2 Ganglios

Los ganglios están constituidos por cúmulos de cuerpos neuronales, además de células nerviosas, granulares, gliales, células vasculares, mastocitos y fibroblastos²⁻¹. Por otra parte, se presentan numerosas uniones de tipo de adhesión que ocurren entre neuronas y células satélites¹.

Dentro de los ganglios prevertebrales se encuentran el ganglio celiaco, el mesentérico superior y el aórtico-renal. Este agregado ganglionar es bilateral y asimétrico².

El ganglio celiaco se encuentra situado alrededor de la arteria celiaca y la arteria mesentérica superior, a su vez, estas arterias separan al ganglio de su porción izquierda y derecha. El ganglio celiaco izquierdo es de forma de media luna y se encuentra situado sobre el lado lateral de la arteria celiaca y la arteria mesentérica superior, mientras que el ganglio celiaco derecho es triangular y es más pequeño que el izquierdo y se encuentra localizado detrás de la vena cava inferior⁶⁻¹.

(Figura 2). El complejo ganglionar formado por el ganglio celíaco y el ganglio mesentérico superior (GCMS) está situado alrededor de la arteria celíaca y la arteria mesentérica superior, a su vez estas arterias separan al GCMS en su posición izquierda y derecha; se extiende dorsalmente entre la glándula adrenal y la mitad craneal de los riñones^{21,1}. Estos ganglios son importantes ya que de ellos emergen nervios inervan directamente al ovario, ejerciendo acción directa sobre las células esteroideogénicas y por lo tanto controlando algunas funciones del tracto reproductivo³.

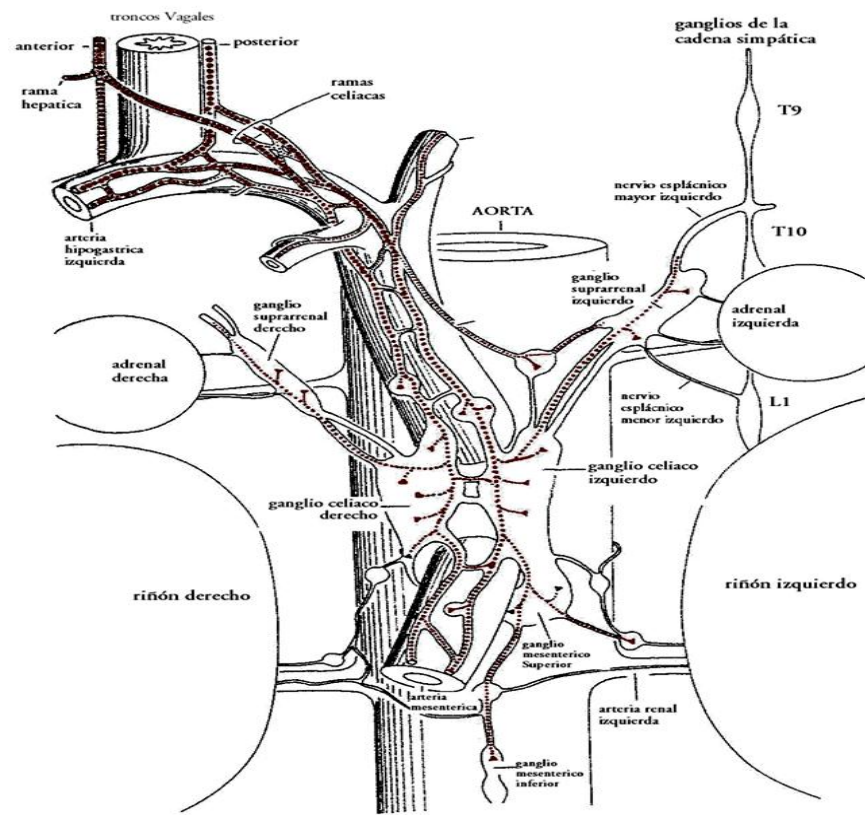


Fig.2 Muestra la disposición de ganglios y la inervación vagal aferente en la rata. Modificado de Berthoud y Powley. 1996.

1.1.3 Inervación ovárica (NPO y NOS)

La inervación del ovario incluye componentes somáticos y autonómicos que llegan a los ovarios por medio del nervio ovárico superior y el nervio del plexo ovárico³⁻⁶. Las fibras de estos nervios se consideran de tipo catecolaminérgico, aunque también poseen fibras inmunoreactivas a diversos péptidos: Péptido intestinal

Vasoactivo (VIP), la sustancia P (SP) y al péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Calcitonin Gene-related Peptide), por sus siglas en inglés. Dichas fibras llegan al ovario por vías diferentes. Las fibras VIP-érgicas llegan al ovario por medio del NOS, mientras que las que contienen SP y CGRP lo hacen por el plexo ovárico¹. Las fibras inmunoreactivas a la SP y al CGRP, comúnmente relacionadas con la innervación sensorial, se encuentran asociadas principalmente con los vasos sanguíneos, mientras que las VIP-érgicas están en contacto con el tejido intersticial de la glándula.

El ovario de la rata recibe innervación simpática por dos rutas NPO que acompaña a la arteria ovárica e inerva principalmente la vasculatura y el NOS (Figura 3) que corre junto con el ligamento suspensorio e inerva vasos sanguíneos, células de la glándula intersticial y células de la teca interna⁸.

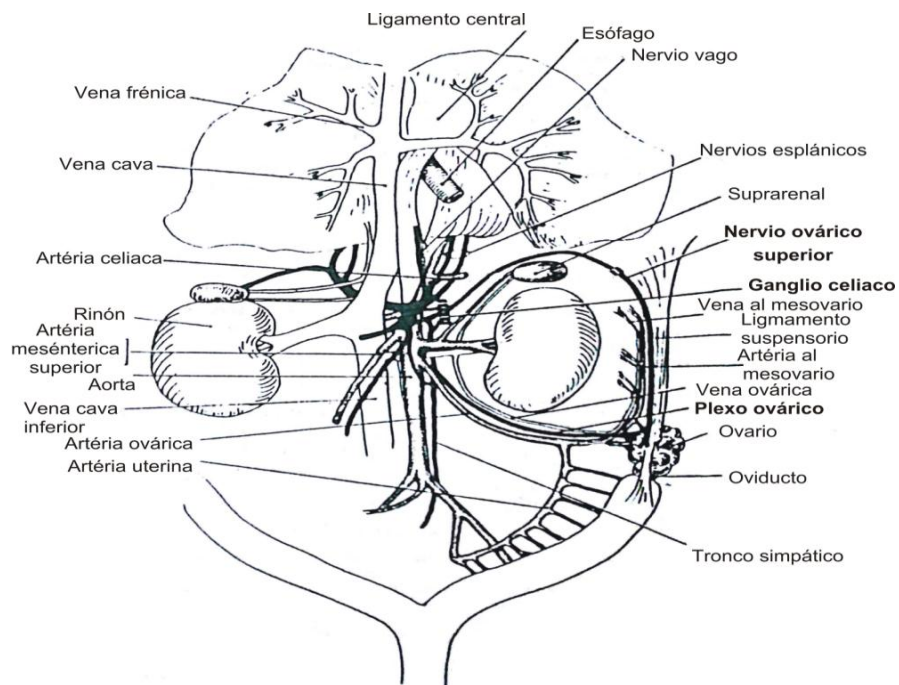


Fig.3 Innervación ovárica. Tomado de Lawrence y Burden, 1980.

1.1.4 Nervio del Plexo Ovárico (NPO)

Por su parte, *el NPO* es una rama del plexo aórtico y renal, está formado por axones adrenérgicos, embebidos en una matriz de colágeno que reviste a la arteria y vena ovárica. Dicho plexo inerva a los oviductos, al ligamento ancho y al ovario: en el ligamento ancho se comunica con fibras del plexo uterino y de esta forma inerva el útero. Las fibras aferentes que inervan al ovario se originan del segmento torácico 10 (T10), mientras que, los que inervan los oviductos corresponden al segmento torácico 11 (T11), segmento torácico 12 (T12) y el segmento lumbar 1 (L1)³⁻⁷. Este nervio proyecta sus fibras principalmente a la vascularidad del ovario⁸⁻⁹.

1.1.5 Nervio Ovárico Superior (NOS)

El NOS en la rata es una rama del plexo celiaco, sus cuerpos celulares preganglionares se encuentran en los segmentos T7 a L3 de la médula espinal; dicho nervio corre por el borde del ligamento suspensorio, este ligamento ocupa un pliegue en el peritoneo y se inserta cerca del lado ventral de la última costilla⁸⁻⁹. El NOS inerva al ovario, al oviducto y caudalmente a la musculatura del útero. En la rata este nervio posee una cubierta de peritoneo y aproximadamente 200 axones no mielinizados embebidos en una fina matriz de tejido conectivo⁸⁻¹⁰. Además, se considera la principal vía relacionada con la esteroidogénesis ovárica¹¹.

1.2 ANTECEDENTES

Estudios en diferentes especies han demostrado la presencia de estructuras posganglionares que contribuyen en la inervación y función ovárica, como es el caso de los ganglios prevertebrales.

1.2.1 Hombre

Un estudio anatómico en cadáveres humanos, describió el ganglio celiaco ubicándolo a nivel de T12 y L1, el GC izquierdo señalándolo enfrente de la crura

diafragmática, medial a la glándula adrenal izquierda y arteria mesentérica superior, mientras que el derecho lo refirió a la altura del ángulo superior en la entrada de la vena renal izquierda, riñón derecho, crura diafragmática derecha, en dirección hacia la vena cava inferior y arteria mesentérica superior; en la mayoría de los cadáveres las medidas de longitud fueron de 21.43 ± 5.53 mm del ganglio derecho y 20.02 ± 10.13 mm del ganglio izquierdo¹². (Figura 4)

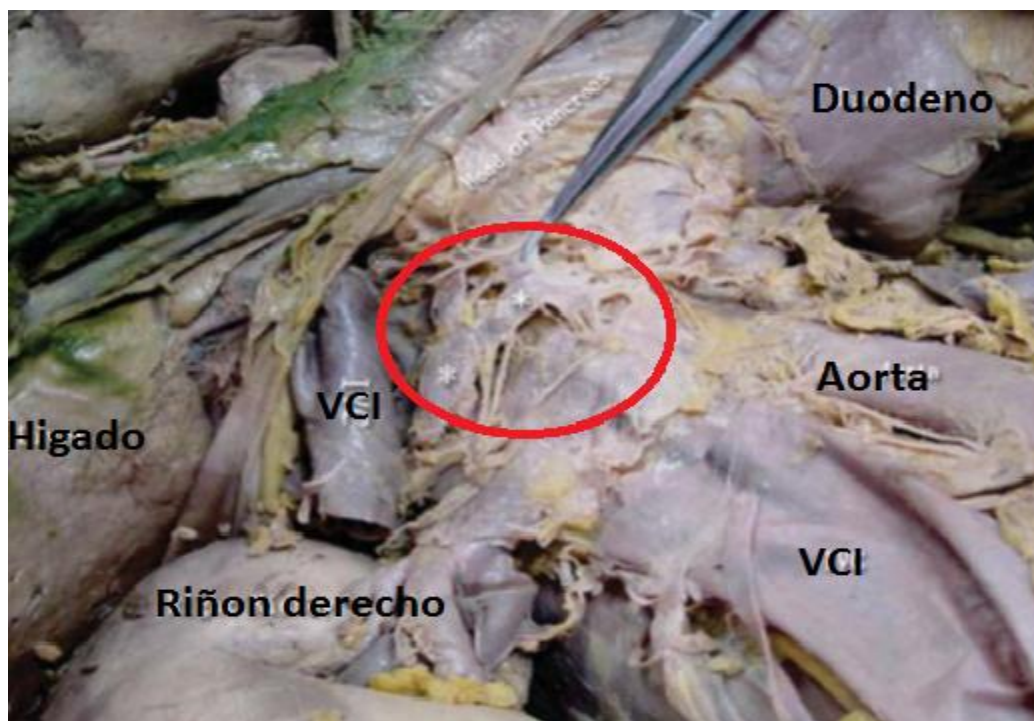


Fig.4 Muestra la disección del ganglio celiaco derecho en cadáver humano. El GC (círculo rojo) se ubicó cercano a la aorta entre la arteria celiaca y la arteria mesentérica superior y fue localizada en el espacio limitado por la vena cava inferior (VCI) el riñón derecho y la cabeza del páncreas. El páncreas se movió hacia arriba y la VCI se seccionó y se movió lateralmente. Ming, et al 2006.

Otro estudio realizado en humanos fue el de Wang, et al¹³, en donde el grupo de estudio fueron 103 pacientes (57 hombres y 46 mujeres) a los que se les realizó tomografía computada tomando imágenes desde el diafragma hasta la sínfisis del pubis, se pudo identificar el ganglio celiaco tanto izquierdo como derecho a nivel del origen de la arteria celiaca y de la arteria mesentérica superior y anterior a la crura diafragmática. El ganglio celiaco izquierdo fue identificado anteromedial a la glándula adrenal izquierda, mientras que el GC derecho se identificó posteromedial a la vena cava inferior y anteromedial a la glándula adrenal derecha. La morfología característica del ganglio observada fue multilobulada,o

discoide, se pudo observar que el GC izquierdo (2.2 y 0.1cm) es más grande que el derecho (2.0 y 0.3cm).

1.2.2 Cerdos

Estudios en donde identificaron cuerpos neuronales posganglionares, utilizando cerdos machos crossbreed a los cuales se les realizó laparotomía post-umbilical, después de la visualización de la superficie dorsal de la vejiga urinaria se inyectaron 50 μL de trazador fluorescente Fast Blue en cinco sitios del triángulo urinario vesical. El trazador retrogrado neuronal ayudo a localizar células neuronales en cada muestra colectada, en el tronco ganglionar simpático se visualizaron células neuronales, mientras que en el ganglio bilateral L1-S3 la media de neuronas encontradas fue de 1845.1 ± 259.3 en su mayoría localizadas a nivel L7-S2, mostrando una forma elíptica, el valor medio del área del soma fue de $465.6 \pm 82.7 \mu\text{m}^2$, también se identificaron neuronas en el ganglio craneal y caudal mesentérico con una media de 4287.5 ± 1450.6 hallando el $65.7 \pm 13.5\%$ en el ganglio izquierdo, siendo la forma oval predominante con núcleo redondo¹⁴.

1.2.3 Perros

En perros domésticos hembras y machos de 2 a 36 meses de edad, se diseco el ganglio caudal mesentérico, en este sentido el 80% de los ganglios se localizó a nivel del segmento inicial de la arteria mesentérica caudal, pero en el 20% de los casos el ganglio se ubicó en la superficie ventral de la misma arteria. En perros adultos la porción craneal del ganglio se localizó conectado a los nervios esplacnico-lumbares L4-L5, otras conexiones que se identificaron fueron plexo intermesentérico y en el ganglio celiaco y mesentérico craneal como se puede observar en la figura 5. Al microscopio se pudo observar un complejo ganglionar compuesto por unidades ganglionares separado por fibras nerviosas, capilares intraganglionares y fibras de colágeno. Las principales células ganglionares identificadas fueron circulares, el núcleo fue claro cuando se comparó con el citoplasma el cual fue hiperocrómico en la mayoría de las neuronas ganglionares analizadas¹⁵.

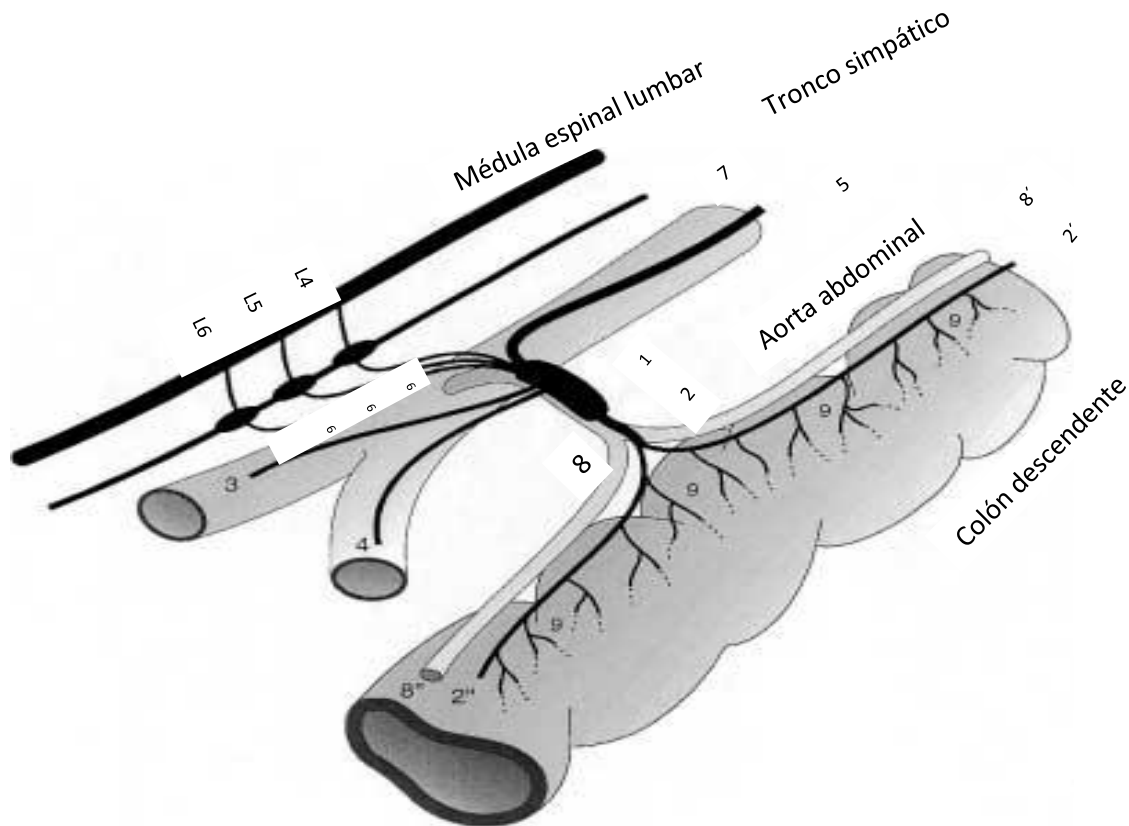


Fig.5 Muestra las conexiones del Ganglio Caudal mesentérico (GCM) con la médula espinal lumbar, con el plexo pélvico, con el colon descendente y recto en el perro doméstico. 1: GCM/ 2: Nervio hipogástrico principal/ 2': nervio colónico izquierdo/ 2'':nervio craneal rectal/ 3: nervio hipogástrico derecho/ 4: nervio hipogástrico izquierdo/ 5: plexo inter-mesenterico/ 6: nervios esplacnics lumbares/ 7: tronco simpático abdominal/ 8: arteria caudal mesentérica/ 8': arteria colónica izquierda/ 8'': arteria rectal craneal/ 9: nervios colónicos. Modificado de Gagliardo, et al, 2003.

1.2.4 Gato

Por su parte en el trabajo realizado por Coppi Maciel, et al¹⁶, utilizaron la coloración tricrómica de Masson, en ganglios celiaco-mesentéricos de gatos domésticos. Logrando identificar un total de 7 ganglios celiacos situados a nivel periarterial y con morfología variante entre rectangular, elíptica, mientras que también pudieron identificar 7 ganglios mesentéricos craneales 4 derechos y 3 izquierdos de morfología rectangular, elíptica y piriforme, también situados a nivel

periarterial; así mismo identificaron 11 ganglios celiaco-mesentericos constituidos por cuerpos neuronales localizados entre la arteria celiaca y mesentérica craneal.

1.2.5 Tupaya común

En el tupaya común (*Tupaia glis*) de ambos sexos, se describió la anatomía del complejo del ganglio celiaco, los autores lo describen como un órgano difuso, con dos masas derecha e izquierda situándolo opuesto a la 13th vertebra torácica hasta la primera vértebra lumbar anterior y lateral a la aorta abdominal, asociado a la arteria celiaca y a la arteria mesentérica superior, ambas arterias renales y glándulas adrenales, la forma del ganglio celiaco se describe en forma oval identificando al ganglio izquierdo más grande que el derecho 0.45x1.00x0.50 mm y 0.25x1.00x0.50 mm respectivamente¹⁷.

1.2.6 Rata

Existen estudios en ratas que han demostrado que la integridad en el sistema ganglio celiaco-nervio ovárico superior, es necesario como control neural en la función ovárica en el fenómeno reproductivo¹⁸. En este sentido se han reportado estudios donde utilizan trazador retrogrado, mostrando que el soma de las neuronas de dicha inervación se localiza en el ganglio nodoso, lo que permite sugerir que parte de los nervios ováricos, especialmente los parasimpáticos, son de naturaleza sensorial¹⁹.

En el trabajo realizado por Moran, *et al*², en donde utilizando ratas hembras adultas de la cepa CIIZ-V a las que se le inyectó true blue (TB) en la bursa ovárica se logró identificar cuerpos neuronales positivos a TB en el ganglio celiaco mesentérico superior, así como en un pequeño ganglio localizado en el ángulo entre la arteria renal y la aorta, lo que sugiere que la aparente asimetría en las conexiones entre ovarios y el GCMS, varían a lo largo del ciclo estral.

Posteriormente en el 2009 utilizando ratas hembras de la misma cepa, se demostró que en las ratas durante el periodo pre-pubertad y juvenil toman lugar las neuronas posganglionares alcanzando los ovarios que llegan del ganglio

prevertebral, en este mismo estudio se secciono el NOS, demostrando que éste juega un papel importante en el proceso de comunicación entre el GCMS y los ovarios conforme se acerca la pubertad²⁰.

Otros estudios realizados en ratas Wistar de 4-5 meses de edad, han demostrado que el origen del complejo ganglio celiaco-mesentérico superior (GCMS) se encuentra a nivel de la arteria celiaca y la arteria mesentérica superior, a la altura de las vértebras T13 y L1, entre las 2 glándulas suprarrenales y más arriba del riñón izquierdo y el tercio medio del riñón derecho.

El GCMS derecho se observó parcialmente cubierto por la cabeza del páncreas, y sobreencimado por la vena cava inferior; la irrigación del GCMS proviene de dos vías del nervio esplacnico mayor y del 4to o 5to nervio esplacnico lumbar. En este estudio se describió que el complejo tiene componentes ganglionares el ganglio suprarrenal izquierdo y derecho, el ganglio celiaco izquierdo y derecho y el ganglio intermesenterico. Figura 6.

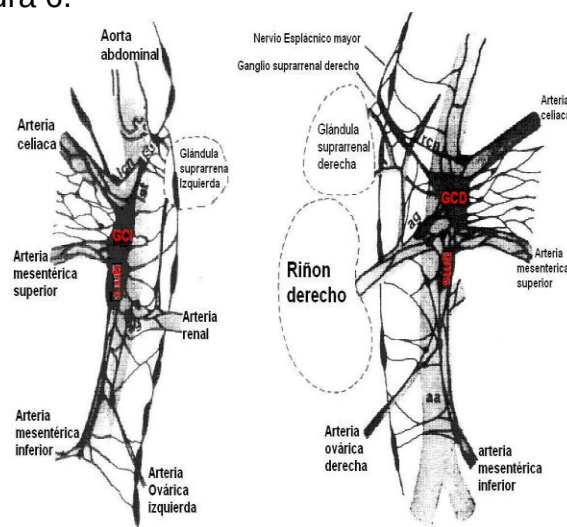


Fig.6 Muestra el complejo ganglio celiaco mesentérico de la rata. Modificado de Hammer. 1981

Hammer, *et al*²¹, también describieron a los ganglios suprarrenales situados en continuidad con el nervio esplacnico mayor a nivel de las glándulas suprarrenales; respecto a los ganglios celiacos los ubicaron en relación a la artería celiaca y la arteria mesentérica superior al origen de la aorta, el ganglio celiaco derecho posicionado caudolateral en forma de pera, más pequeño que el izquierdo, por su parte el ganglio celiaco izquierdo lo describen también caudolateral a la arteria

celiaca, más grande que el derecho caudal a la Arteria Mesentérica Superior (AMS). Ambos izquierdo y derecho conectados por nervios ganglionares a la aorta ventral.

Por su parte el ganglio intermesenterico hallando en su parte inicial unos pequeños ganglios considerados como aórtico-renales y grupos ováricos. El ganglio aorticorrenal surge en el ángulo entre la aorta y arterias renales, como se muestra en la figura 6 ²¹.

Otro estudio reportado en roedores por Mcneil y Burden²², utilizando ratas nulíparas Sprague-Dawley, con peso entre 150 y 250g, a las que se les inyectó true blue en el epitelio ovárico, 7-10 días después, se realizó perfusión a través del ventrículo izquierdo del corazón, y se removió el ganglio celiaco y la porción inferior del tejido incluyendo el pequeño ganglio preaortico caudal (GPC), se pudieron observar cuerpos neuronales posganglionares en GC y en GPC, localizados en el origen de la arterial renal y ovárica. (Figura 7)

A diferencia del GC la ubicación del GPC fue variable, incluso en algunas ratas se le designo ganglio ovárico, sin embargo solo se encontró una pequeña fracción de cuerpos neuronales en dicho ganglio.

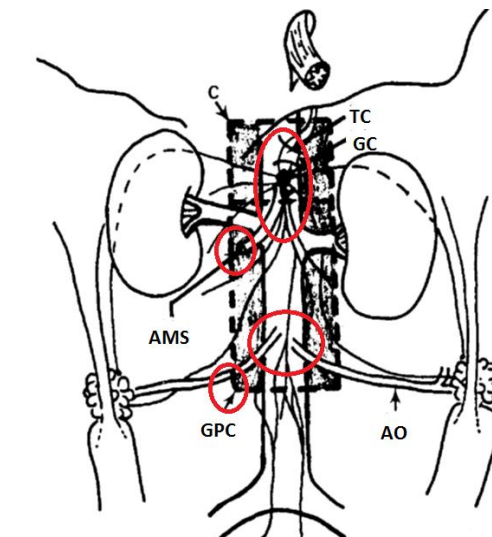


Fig.7 Diagrama que demuestra la perikarya posganglionar. El celiaco contiene la porción del ganglio celiaco, los círculos rojos indican (GC), tronco celiaco (TC), arteria mesentérica superior (AMS), y correspondiendo a la sección de la aorta. El ganglio caudal preaortico (GCP) la porción contiene varios ganglios microscópicos, las arterias renal izquierda y derecha y la ovárica. Correspondiendo a la sección de la aorta y tejido que lo rodea. Modificado de McNeil y Burden 1986.

CAPITULO II ORGANIZACIÓN DEL TRABAJO

2.1 Definición del Problema

Debido a la importancia que tienen las vías posganglionares en las funciones ováricas y a que en estudios anteriores en nuestro laboratorio han demostrado la existencia de otras estructuras ganglionares lo que nos ha llevado a pensar que las estructuras ganglionares prevertebrales no son las únicas que participan en la regulación hormonal, por lo tanto surge la siguiente interrogante.

¿Será posible considerar un pequeño plexo adosado a la vena cava inferior como un ganglio, ya que podría estar compuesto por cuerpos neuronales?

2.2 Definición de variables

Variable independiente: **Caracterización morfométrica**

Variable dependiente: **Plexo adosado a la vena cava inferior como posible ganglio**

2.3 Justificación

Actualmente las patologías ováricas en mujeres son muy comunes y se relacionan con una inadecuada regulación hormonal, al respecto, se han realizado estudios en humanos, perros, gatos y ratas que han demostrado que alteraciones a nivel del circuito neuronal pueden dar origen a procesos patológicos, ya que la secreción de hormonas está dada por el SNA y por el eje hipotálamo hipófisis, que actúan coordinadamente en la función de órganos reproductores, por lo tanto nos hemos dado a la tarea de investigar cuales son las estructuras nerviosas periféricas que contribuyen en mayor medida para mantener este equilibrio.

En estudios anteriores se identificó que del *Ganglio Celiaco* emergen fibras posganglionares como el NOS y el NPO que inervan al ovario. Dicha inervación es importante para que se lleven a cabo las funciones ováricas. Sin embargo, en la rata como en otras especies se tiene una nomenclatura diferente para las estructuras ganglionares de la región toraco-abdominal. En la rata se han descrito la mayoría de los ganglios intramurales. Sin embargo, en esta especie no se ha reportado la estructura nerviosa adosada a la vena cava inferior, por ello nos hemos preguntado si es probable que el Plexo Adosado a la Vena Cava Inferior sea una estructura anatómica capaz de contribuir en igual medida que las estructuras ganglionares pre-vertebrales que ejercen acción directa sobre las células luteínicas a nivel de ovario, contribuyendo en la secreción hormonal. Por lo tanto, en este estudio se pretende demostrar mediante la caracterización neuronal por medio estudios de histología y del trazador retrogrado que el Plexo Adosado a la Vena Cava Inferior es un ganglio según su constitución morfométrica.

Esta propuesta a la vez nos permitirá un mayor conocimiento de las diferentes vías neuronales que participan en la regulación de las funciones ováricas en la rata, lo cual hará posible establecer si existe relación en la generación de estrés y la aparición de patología ovárica, así como propiciar en el lector algún interés en relación a la importancia de mantener la integridad del circuito neuronal hacia el ovario. Ya que en el área médica por ejemplo, las cirugías a nivel pélvico se

realizan sin respetar dicha inervación, lo que podría traer serias consecuencias postquirúrgicas.

2.4 Hipótesis

2.4.1 Hipótesis alternativa

El plexo adosado a la vena cava inferior está compuesto por cuerpos neuronales por lo tanto puede ser considerado como un ganglio.

2.4.2 Hipótesis nula

El plexo adosado a la vena cava inferior no es un ganglio, sino una red de fibras que entrecruzan para conformar un plexo nervioso.

2.4 Objetivos

2.5.1 Objetivo general

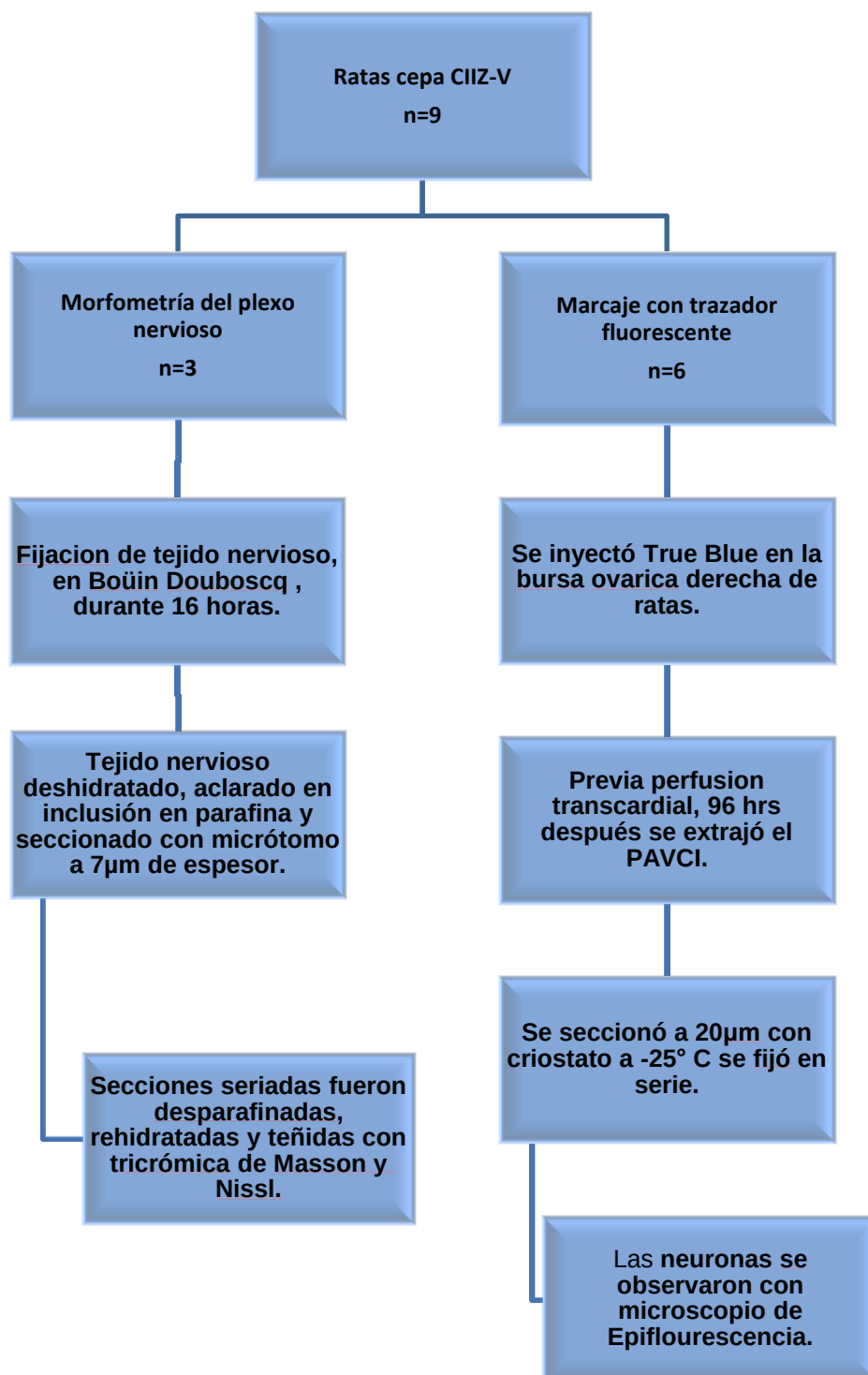
Determinar la red de axones adosados a la vena cava inferior y evaluar la estructura nerviosa mediante estudios histológicos y el uso de un trazador neuronal.

2.5.2 Objetivos específicos

- Describir mediante técnicas de histología la anatomía macroscópica del plexo nervioso adosado a la vena cava inferior.
- Realizar una caracterización neuronal del plexo adosado a la vena cava inferior.
- Determinar con la ayuda de un trazador retrogrado neuronal si el plexo nervioso contiene neuronas posganglionares que inervan al ovario.

CAPITULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Organización de la investigación



3.2 Definición de la Muestra

Se utilizaron nueve ratas hembras adultas de la cepa CIIZ-V de tres a cuatro de meses de edad (200 a 250g); mismas que fueron mantenidas en condiciones estándar de bioterio a una temperatura de 24 ± 2 °C y con ciclo controlados de luz-oscuridad 12:12 horas. Los animales fueron colocados en cajas de acrílico colectivas 47 x 33 x 20 cm, con camas de aserrín y se les proporcionó agua y alimento (Nutrícubos Purina) *ad libitum*.

El protocolo experimental fue aprobado por el comité de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, para el manejo de los animales de laboratorio, según las reglas del Consejo Mexicano sobre el cuidado y uso de los animales experimentales (NOM-002-200-1999).

3.2.1 Diseño del estudio

El estudio realizado fue de tipo observacional porque el investigador solo identificó los cuerpos neuronales, descriptivo porque el investigador solo realizó la descripción de la ubicación anatómica del plexo adosado a la vena cava inferior con base en la identificación de cuerpos neuronales se logró determinar si se trata de un ganglio o solo de fibras nerviosas.

3.3 Procedimientos experimentales

Se realizaron dos procesos experimentales el primero para identificar con estudios de histología (n=3) el núcleo y los cuerpos neuronales del plexo adosado a la vena cava inferior; el segundo para mostrar neuronas autonómicas posganglionares que inervan al ovario mediante trazador retrogrado True Blue (n=6).

3.3.1 Estudio histológico

Tres ratas hembras adultas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (60 mg/kg, IP; Anestesal, Smith Kline, México DF, México). Se realizó una incisión en el área abdominal, se localizó y disecó el plexo adosado a la vena cava inferior

Usando un microscopio estereoscópico, se realizaron dibujos y se tomaron fotografías del PAVCI (Figura 8).

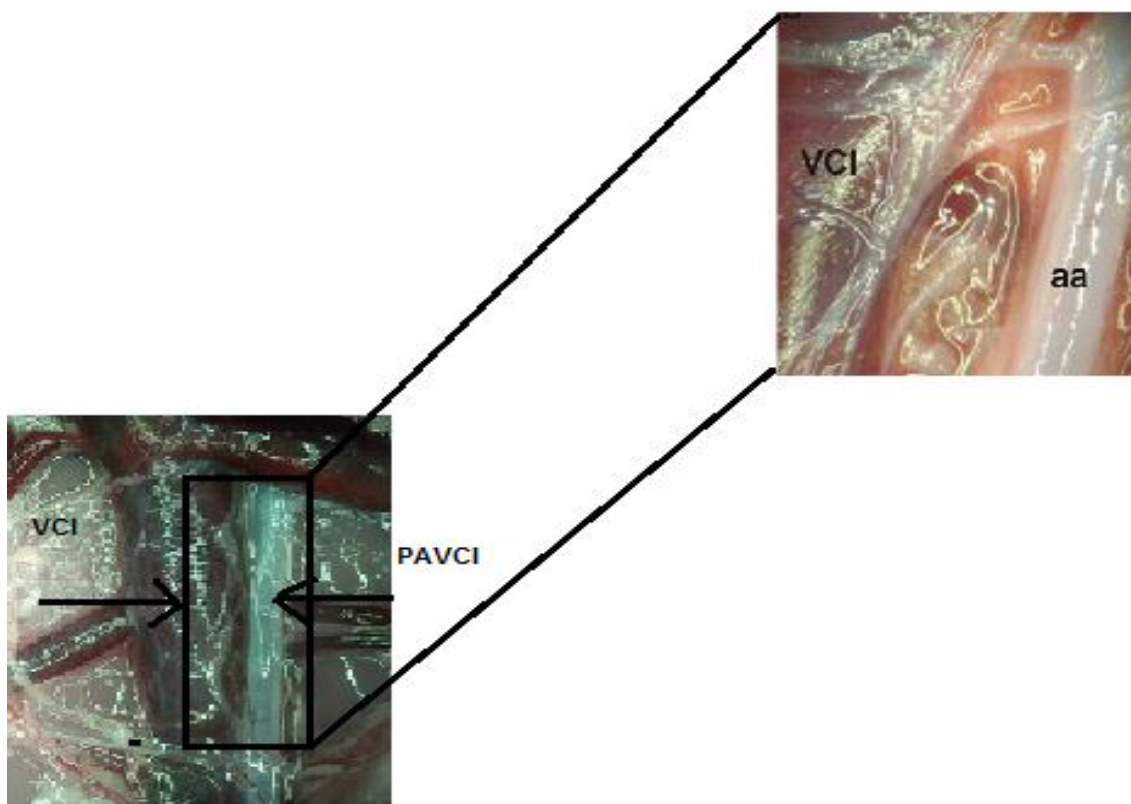


Fig.8 Fotografía tomada a través del microscopio estereoscópico que muestra el plexo adosado a la vena cava inferior (PAVCI), (VCI) Vena Cava Inferior. En la proyección se muestra el plexo adosado a la vena cava inferior (VCI Vena Cava Inferior, aa: Aorta abdominal).

3.3.2 Colecta del tejido

El tejido nervioso en fresco fue fijado por inmersión en Bouin Dobboscq, durante 16 horas. Después se deshidrató (Tabla 1) y embebió en parafina para ser cortadas con un micrótom (Leica RM 2135, serie 4) a 7 μ m de espesor. Las secciones seriadas fueron desparafinadas, rehidratadas y teñidas con Tricrómica de Masson (Tabla 2); para ajustar el error de doble conteo se utilizó la fórmula de Abercrombie, ($p = \text{Numero de células intervalo corrección (No. de células contadas X intervalo corrección seccionado / el grosor del corte + el diámetro calculado en cada célula)}$)⁴⁴. Finalmente con ayuda del microscopio óptico, se realizó el conteo de neuronas.

3.3.3 Neuronas posganglionares que inervan al ovario

Las ratas fueron anestesiadas con ketamina (90 mg/kg) y xilazina (15 mg/kg) vía intraperitoneal (IP). En la región lateral se realizó un pequeño corte de piel, músculo y peritoneo, para exponer el ovario, se inyectaron 3-5 ml de TB en la bursa ovárica derecha. La aguja permaneció en su lugar por 1-2 minutos después de la administración del marcador. Al momento de retirar la aguja se colocó una gota de sellador para asegurar que el TB permaneciera dentro de la bursa ovárica y el ovario fue reintroducido a la cavidad. (Figura 9)

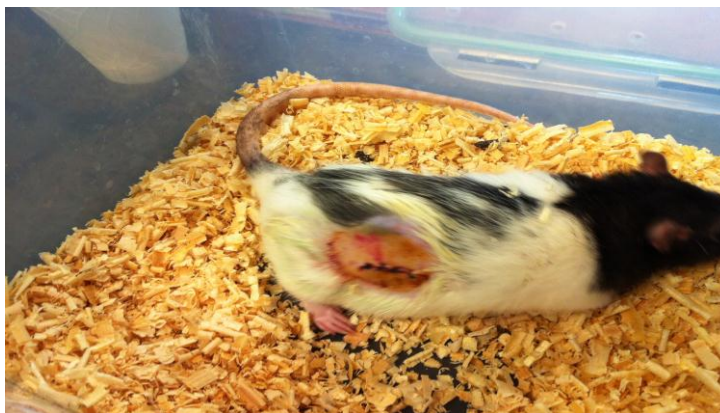


Fig.9 Fotografía que muestra el procedimiento de la cirugía.

Después, de 96 horas, las ratas inyectadas con TB fueron anestesiadas con pentobarbital sódico e inmediatamente se perfundieron transcardialmente con 200 ml de solución salina heparinizada (0.09%), seguido, por 200 ml de solución fijador a temperatura ambiente (paraformaldehído 1% en 0.1 M amortiguador fosfato (Figura 9). Posteriormente se seccionó el plexo nervioso, almacenándose por 24-48 h en solución sucrosa a 4 °C (crioprotección) y fue embebido en un medio de Tissue-Tek para congelar el plexo nervioso y usando un criostato a -25 °C (Microm HM SOSN) las secciones fueron cortadas a 20 μ m transversalmente y se montaron en portaobjetos y secados a temperatura ambiente de 6-24 horas.



Fig.10 Fotografía que muestra ejecución de perfusión transcardial.

Los cortes se observaron con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX41), equipado con un iluminador vertical y un filtro de excitación de 340-380 nm para visualizar las neuronas positivas al trazador TB, finalmente se analizó y se midió el área de los cuerpos neuronales tomando fotografías en un microscopio de UV.

3.4 Definición de Recursos

3.4.1 Recursos humanos

Para la realización del estudio se contó con la participación de:

Investigador M.C.P. Ana María Flores García

Dra. Carolina Morán Raya

Dr. César Feliciano Pastelín Rojas

3.4.2 Recursos financieros

El estudio es parte de un proyecto postdoctoral que está siendo financiado por Conacyt (CPR 172023), ProMed (103.S/13/9492) y por proyectos de la Vicerrectoría (VIEP: MORC-NAT433-1 y64) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

3.4.3 Recursos materiales

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Histología del Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción del ICUAP de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

- Cuenta con microscopio de epifluorescencia Olympus BX41 equipado con un iluminador vertical fluorescente y un filtro de excitación de 340-380 nm.
- Microscopio estereoscópico
- Micrótomos Leica RM 2135, serie 4.
- Criostato Leica CM1850.
- Cuenta con todos los reactivos e insumos para la realización del estudio.

CAPÍTULO IV RESULTADOS

4.1 Caracterización morfométrica del PAVCI

En el análisis histológico se pudo observar que el plexo adosado a la vena cava inferior está rodeado por tejido conectivo (Figura 11A), en cuyo interior se pudieron observar células nucleadas (Figura 11B), con la técnica de Nissl se pudo confirmar la presencia de cuerpos neuronales en el tejido nervioso estudiado, visualizando el soma de las células neuronales, lo que nos permitió definir al PAVCI como una estructura posganglionar (Figuras 12A y 12B).

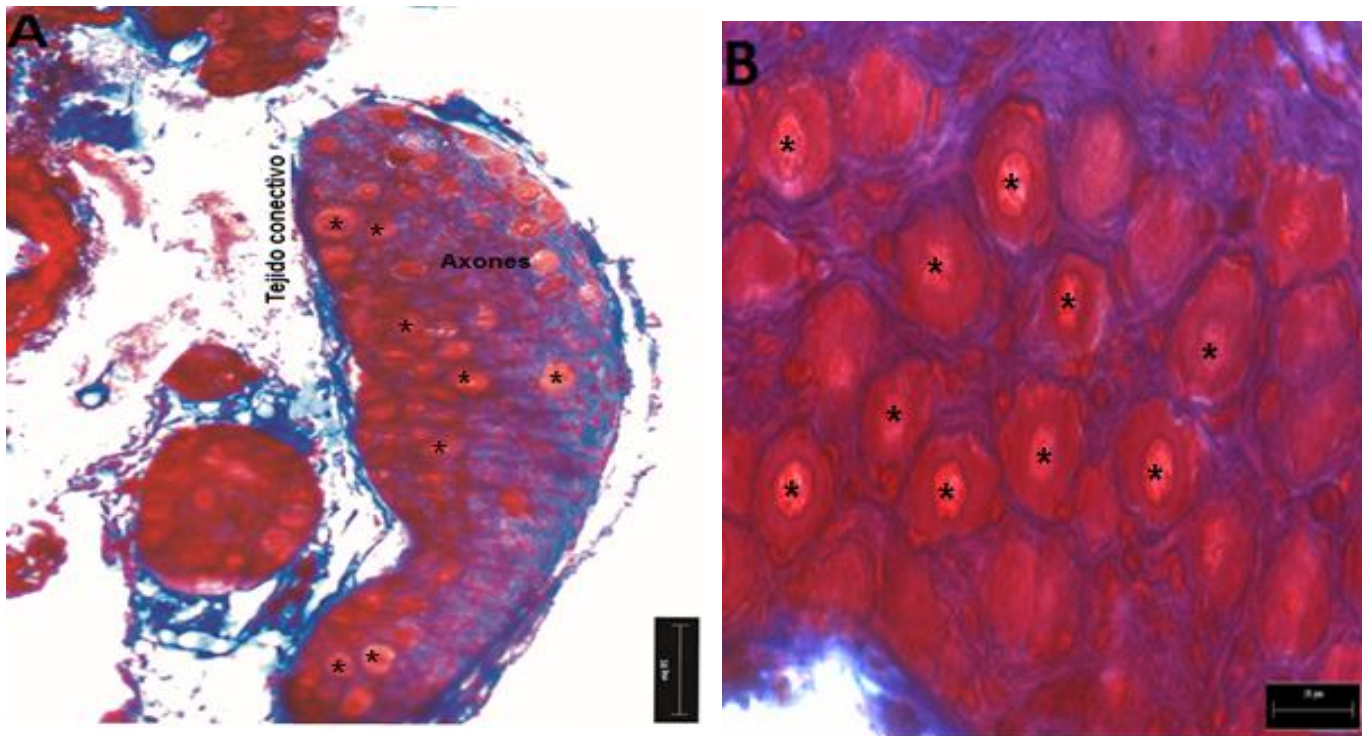


Fig.11A Fotografía al microscopio que muestra el plexo delimitado por tejido conectivo compuesto por un conglomerado de células neuronales teñidos con tricromica de Masson. Fig.11B Fotografía al microscopio que muestra cuerpos neuronales teñidos con Tricromica de Masson, * muestran los cuerpos neuronales circulares y piriformes.

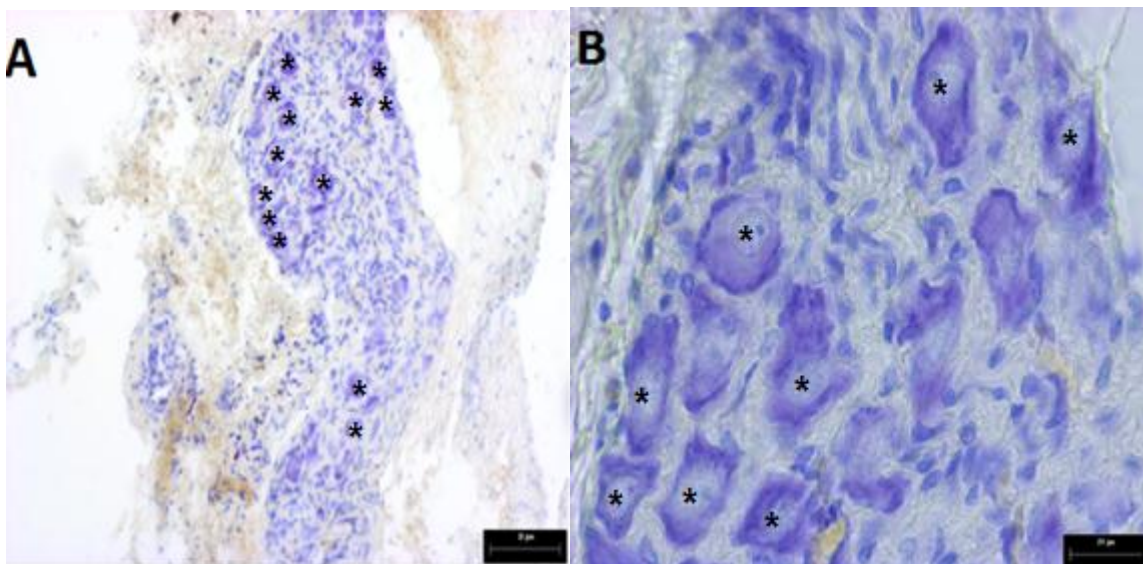


Fig.12A muestra el plexo delimitado por tejido conectivo compuesto por * cuerpos neuronales vistos con tinción de Nissl 10x. Fig12B Fotografía al microscopio que muestra * cuerpos neuronales teñidos con técnica de Nissl 60x.

Al respecto se observó que el PAVCI está compuesto por cuerpos neuronales, con una media promedio de 2041 ± 176.72 , cuerpos neuronales, de los cuales solo se seleccionaron al azar 30 células neuronales para tener una muestra representativa, clasificándose en neuronas chicas con un rango de $131-299 \mu\text{m}^2$ y grandes con un rango de $301-492 \mu\text{m}^2$, predominando el tamaño grande. (Figura 13)

También se evaluó el área del núcleo de los cuerpos neuronales. El tamaño del núcleo de las neuronas chicas tuvo un promedio de $247.06 \mu\text{m}^2$, mientras que el núcleo de las neuronas grandes tuvo en promedio de $383.48 \mu\text{m}^2$ (Figura 13), por su parte la forma circular fue predominante mostrando hasta un 53% de cuerpos neuronales, seguida de la forma piriforme con un porcentaje de 37%. (Figura 14)

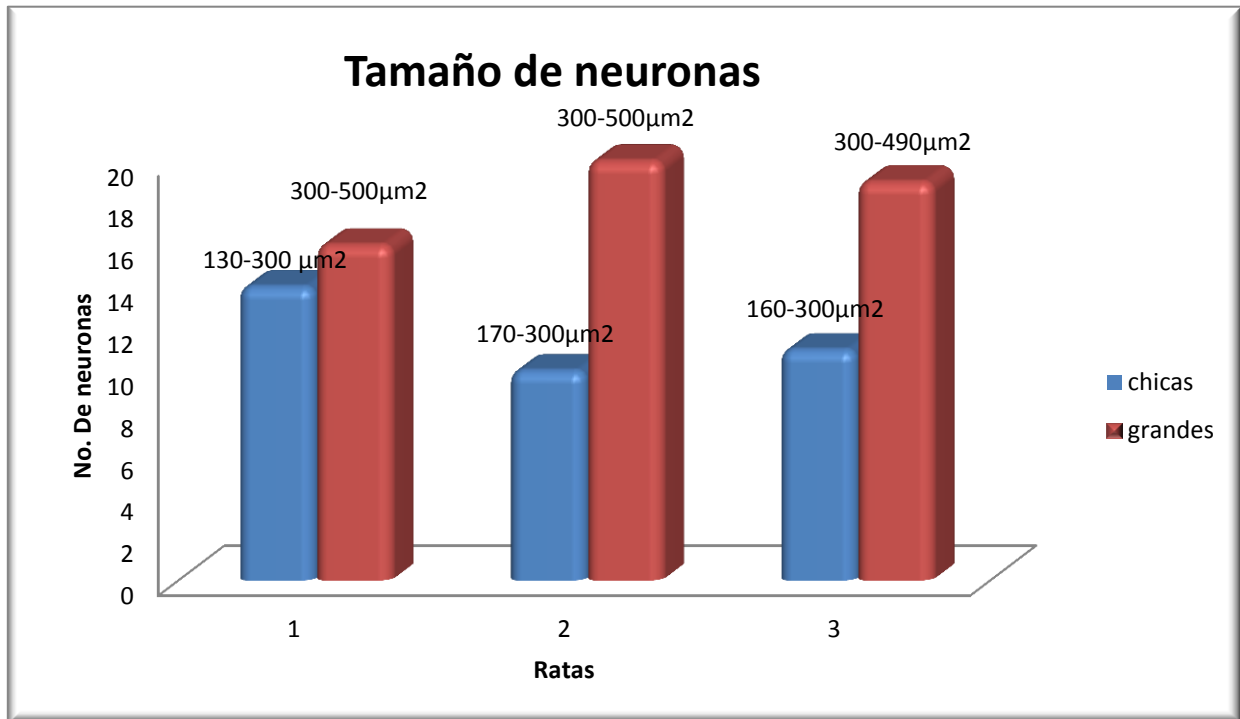


Fig.13 Grafica que muestra el rango de las neuronas chicas y grandes identificadas con técnicas de histología.

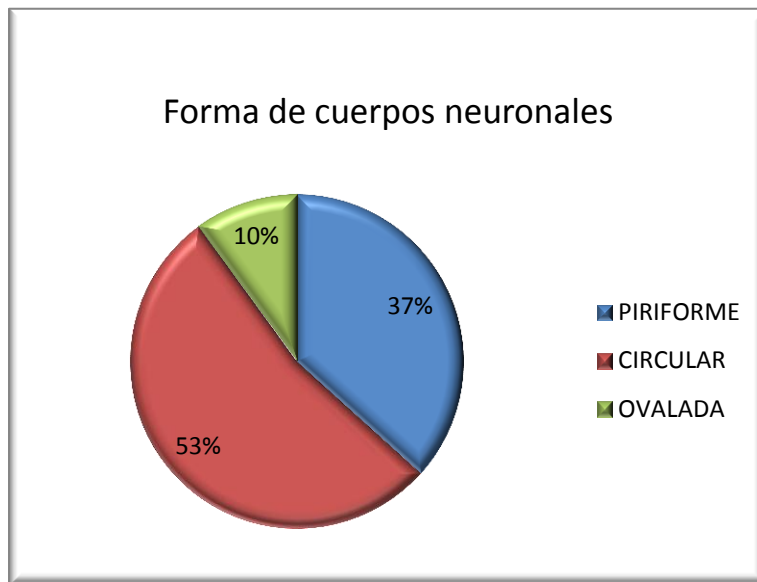


Fig.14 Muestra grafica de distribución de la forma de los cuerpos neuronales la forma circular predominante con un 53%. (Número de neuronas tomadas al azar.)

4.1.2 Neuronas posganglionares de PAVCI

Una técnica que permite visualizar cuerpos neuronales mediante trazado retrogrado en el tejido nervioso es el uso de marcadores como lo es el True Blue. En este estudio con el uso del Trazador retrogrado fluorescente y con microscopio de fluorescencia, se encontraron un total de 405 neuronas positivas a TB, (Figura 15) las cuales por su tamaño se clasificaron en chicas con un rango 113.168-350.651 μm^2 , en medianas con un rango 352.580-636.145 μm^2 y grandes 643.861-1305.513 μm^2 (Figura 16), con un área del soma del cuerpo en promedio de 384.13649 $\mu\text{m}^2 \pm 196.32464$, observándose en forma elíptica; estas neuronas positivas a TB son las que se piensa que realmente participan en las funciones ováricas.

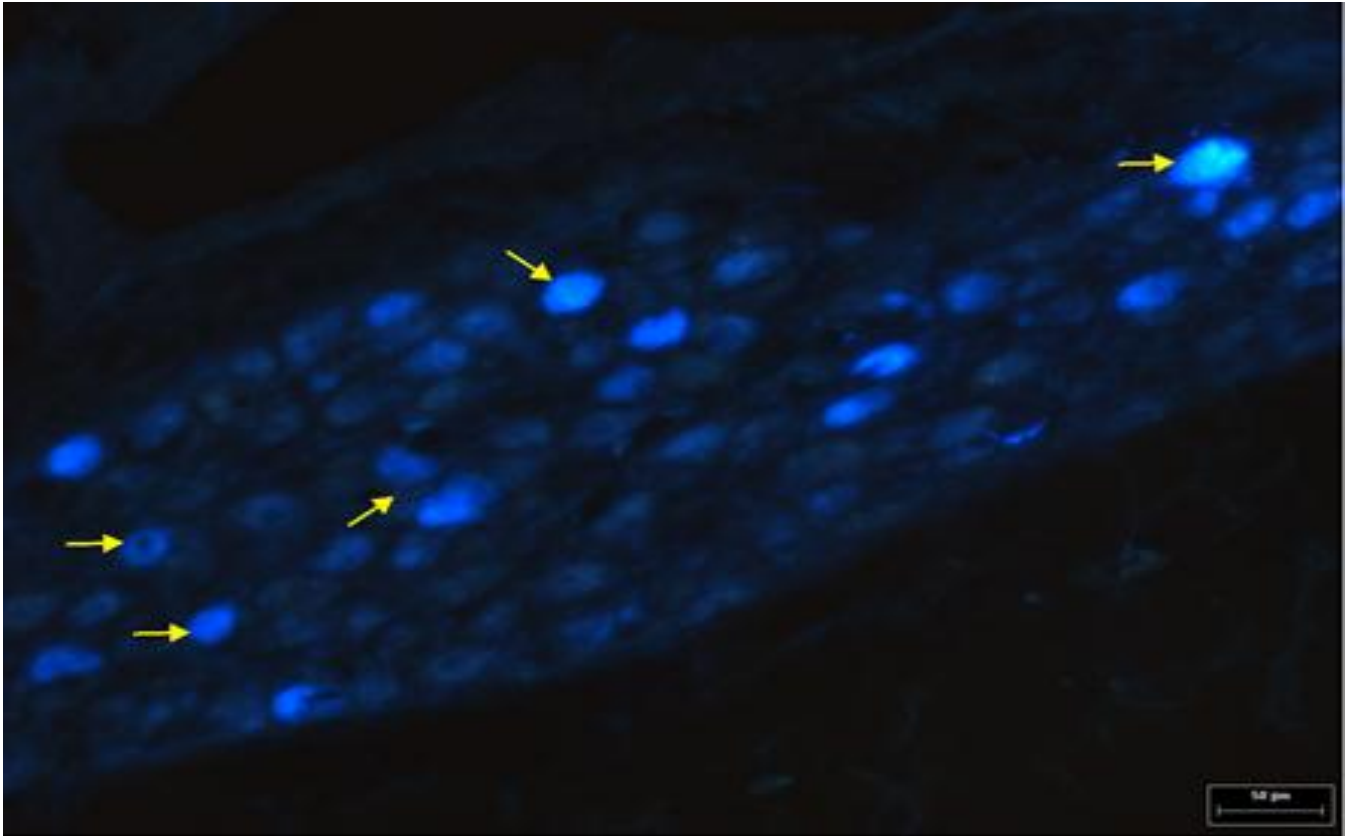


Fig. 15 Muestra cuerpos neuronales marcados con true blue. Vistos al microscopio de fluorescencia

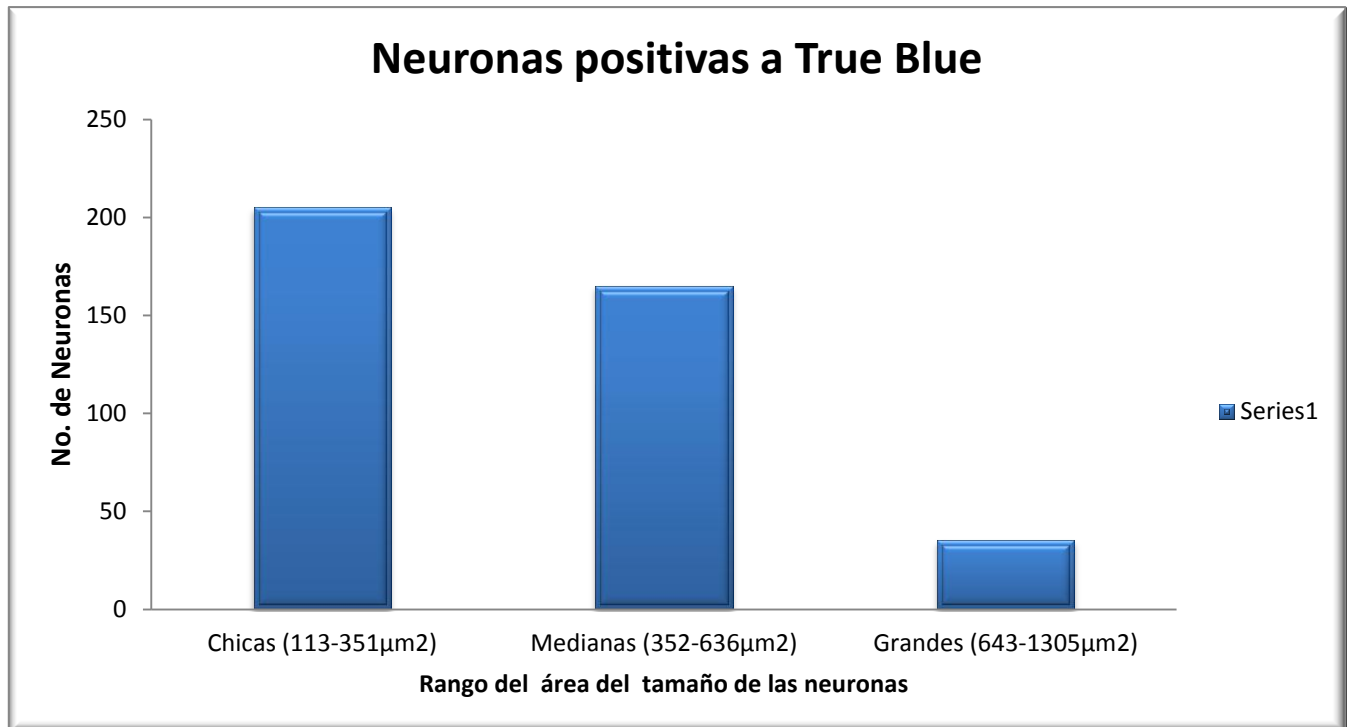


Fig. 16 Gráfica que muestra el porcentaje y rango del tamaño de las neuronas marcadas con True Blue.

CAPÍTULO V DISCUSIÓN

Estudios anteriores en roedores en la región anatómica que inerva al ovario se ha encontrado que las estructuras ganglionares no son las únicas que participan en la regulación neural del ovario, ya que en otras vías posganglionares se han podido identificar cuerpos neuronales, lo cual nos hace pensar que la estructura posganglionar estudiada en este trabajo a la que denominamos PAVCI posee cuerpos neuronales y por lo tanto podría tener similar participación a la del ganglio celiaco en la innervación y función ovárica, sin embargo, según lo reportado en estudios previos no se ha logrado definir anatómicamente ya que algunos autores lo mencionan a nivel de la arteria ovárica y estudios en otras especies no refieren haber encontrado un pequeño plexo adicional.

En estudios previos llevados a cabo en roedores se ha reportado la presencia de un pequeño ganglio ubicado a nivel del origen de la arteria ovárica al que se le ha designado como ganglio ovárico y en el que se han encontrado pequeñas cantidades de células neuronales posganglionares, en el estudio realizado por

Mcneil y Burden en 1986 lograron identificar alrededor de 12.2 ± 3.4 células neuronales en ganglio celiaco mientras que en el ganglio pre-aórtico caudal encontraron 11.8 ± 2.6 células neuronales²²; en nuestro estudio encontramos la presencia de un pequeño plexo pero adosado a la vena cava inferior en el que se corrobora la presencia de un conglomerado de células neuronales con técnicas de histología identificando 2041 ± 176.72 , mientras que con el uso de trazador neuronal se lograron cuantificar 405 cuerpos neuronales positivos al marcador neuronal, por lo que se deduce que este plexo es un ganglio que podría tener igual participación a la del ganglio celiaco en la innervación y función ovárica, pudiendo decir que se trata del ganglio mesentérico superior por la ubicación anatómica. Similar a lo reportado por Moran, *et al*², en donde utilizando ratas hembras adultas de la cepa CIIZ-V se identificaron cuerpos neuronales positivos a TB en el complejo ganglio celiaco-mesentérico superior, así como en un pequeño ganglio localizado en el ángulo entre la arteria renal y la aorta, en dicho estudio se inyectó el trazador en el ovario derecho, pudieron observar solo en el ganglio prevertebral celiaco-mesentérico del mismo lado células neuronales, mientras que cuando se inyectó trazador en el ovario izquierdo se logró identificar células neuronales en el complejo ganglio celiaco mesentérico superior bilateral. Sin embargo, cuando el trazador fue inyectado en ovario derecho o izquierdo en día proestro y sacrificando después de 2 ciclos estrales consecutivos, en el día estro, los animales inyectados en el ovario izquierdo mostraron un más alto número de células neuronales que los animales inyectados en ovario derecho (65 ± 3.1 vs 38 ± 4.7 , $p < 0.05$ Student's t test). Cuando los animales se inyectaron con true blue en la bursa ovárica del ovario derecho e izquierdo en cada día del ciclo estral y sacrificadas en el siguiente ciclo de cada día del ciclo estral en el mismo día del tratamiento, el número de neuronas positivas al marcador en el ganglio celiaco-mesenterico superior vario de acuerdo al ovario inyectado y al día del ciclo estral en que se inyectó el trazador neuronal². En nuestro estudio no se tomó en cuenta el día del ciclo estral en el que se inyectó el trazador neuronal, ya que únicamente nos interesaba saber si el pequeño plexo tenía cuerpos neuronales para poder clasificarlo como un ganglio.

Harmer y Santer²¹ por su parte reportaron el estudio realizado en ratas Wistar en donde describen que el origen del complejo ganglio celiaco-mesentérico superior (GCMS) se encuentra a nivel de la arteria celiaca y la arteria mesentérica superior, a la altura de las vértebras T13 y L1, entre las 2 glándulas suprarrenales y más arriba del riñón izquierdo y el tercio medio del riñón derecho. El GCMS derecho lo observaron parcialmente cubierto por la cabeza del páncreas, y sobre-encimado por la vena cava inferior. Nuestros resultados sugieren que la ubicación anatómica de la estructura estudiada en este trabajo podría corresponder al ganglio mesentérico superior. Por lo tanto, podemos decir que existe discrepancia en cuanto a la ubicación anatómica que ha sido descrita con anterioridad del ganglio celiaco y el ganglio mesentérico superior a diferencia de lo encontrado en este trabajo, el ganglio mesentérico superior lo ubicamos adosado a la vena cava inferior.

Sin embargo estudios en otras especies como en el cadáveres humanos Ming *et al*¹² han descrito, la anatomía del ganglio celiaco tanto derecho como izquierdo. El GC izquierdo lo señalan enfrente de la crura diafragmática, medial a la glándula adrenal izquierda y arteria mesentérica superior, mientras que el derecho lo refieren a la altura del ángulo superior en la entrada de la vena renal izquierda, riñón derecho, crura diafragmática derecha, en dirección hacia la vena cava inferior y arteria mesentérica superior.

En rata al lóbulo que sobresale a la arteria mesentérica superior, se le ha llamado ganglio mesentérico superior²¹, pero en el presente trabajo y de datos aun no publicados del grupo, evidenciamos que no es un ganglio independiente, sino solo parte del celiaco izquierdo³³.

Estudios en perros domésticos hembras y machos se diseco el ganglio caudal mesentérico (GCM), en el 80% de los casos se localizó a nivel del segmento inicial de la arteria mesentérica caudal, pero en el 20% de los casos el ganglio se ubicó en la superficie ventral de la misma arteria.

Por su parte en el trabajo realizado por Coppi Maciel, *et al*¹⁶, utilizaron la coloración tricrómica de Masson, en ganglios celiaco-mesentéricos de gatos

domésticos. Logrando identificar ganglios celiaco-mesentericos constituidos por cuerpos neuronales localizados entre la arteria celiaca y mesentérica craneal. En nuestro estudio utilizamos la técnica con tricrómica de Masson para identificar células neuronales en el PAVCI, lo que nos permitió definirlo como una estructura ganglionar.

En otro estudio utilizando tupaia glis de ambos sexos, también reportan la anatomía del complejo del ganglio celiaco los autores lo describen asociado a la arteria celiaca y a la arteria mesentérica superior, ambas arterias renales y glándulas adrenales, la forma del ganglio celiaco se describe en forma oval identificando al ganglio izquierdo más grande que el derecho¹⁷. Sin embargo en todos estos estudios reportados en otras especies no se reporta la presencia de un ganglio adicional.

Con respecto a la innervación ovárica hay evidencia en estudios en roedores que demuestran que el ovario de mamíferos está bajo la influencia directa de factores neurales, ya que además de las fibras nerviosas del plexo ovárico ha sido descrita la vía adicional del nervio ovárico superior y se ha demostrado que ambas vías provienen del complejo ganglionar celiaco-mesentérico⁶. En nuestro estudio se refuerza esta evidencia ya que se encontraron neuronas en fibras posganglionares simpáticas.

Por otra parte, se sabe que el sistema nervioso autónomo es importante en la regulación de conductas, por lo que la respuesta bajo situaciones de estrés es alta y por lo tanto podría decirse que hay una relación entre la activación del sistema nervioso simpático con trastornos metabólicos; pudiendo considerar que esta activación juega un papel importante en la patogénesis ovárica, ya sea a nivel de ovario como de órganos pélvicos en general²³.

Se han obtenido pruebas de que cuando hay una hiperactivación de nervios que llegan al ovario, se genera el desarrollo de ovario poliquístico de la rata. En este sentido se ha probado que el estrés puede activar los nervios simpáticos que pueden inducir cambios en el desarrollo folicular y formación de quistes. Según

estudios realizados en ratas y hamsters, se ha mostrado que grandes folículos ovulan en respuesta a una oleada de hormona luteinizante, en estos roedores se mantuvo un crónico frío intermitente durante 3 y 11 semanas lo que indujo un incremento en la actividad nerviosa simpática del ovario, lo que sugiere que el estrés crónico es capaz de generar cambios en el desarrollo folicular y la aparición de estructuras prequísticas en el ovario²⁴.

Por otra parte el estrés según Cannon, se podría entender como una respuesta adaptativa fisiológica a estímulos emocionales o físicos a los que el organismo se puede exponer ya sean reales o físicos, que originan una activación del sistema nervioso simpático. Por lo que en este trabajo se pretende establecer una relación entre la generación de estrés físico y la estimulación del sistema nervioso autónomo²⁵.

Por otra parte la integridad de las vías que inervan al ovario es fundamental en el control y secreción hormonal ya que como se sabe los ovarios reciben información neural principalmente a través del NOS, del NPO y del nervio vago; según lo demostrado en el estudio de Morales-Ledesma, *et al*²⁶, utilizando ratas hembras pre-púberes, la sección unilateral del nervio ovárico superior en el síndrome de ovario poliquístico depende de modificaciones en otros mecanismo neurales que regulan las funciones ováricas, ya que se demuestra una disminución de la ovulación espontanea por la denervación ovárica pero además hay alteraciones en la secreción de hormona folículo estimulante luteinizante y de norepinefrina a nivel ovárico. Es por lo que este trabajo pretende despertar interés en los posibles usuarios del conocimiento de respetar la inervación no solo ovárica, sino también de otros órganos pélvicos sobre todo en el caso de las cirugías que se realizan a nivel pélvico, entre las que podemos mencionar la realización de obstrucción tubarica bilateral, miomectomia u ooforectomia e incluso las mismas cesáreas, en las que se seccionan nervios importantes que en determinado momento podrían traer consecuencias como dolor postquirúrgico intenso, dismenorrea, alteraciones en el ciclo ovulatorio y por ende problemas de infertilidad.

4.2 Conclusión

Nuestros resultados sugieren que la estructura estudiada puede considerarse un ganglio ya que está delimitada por tejido conectivo y contiene un conglomerado de células nerviosas, en este sentido la ubicación anatómica de dicha estructura podría corresponder al ganglio mesentérico superior. Por lo tanto podemos decir que existe discrepancia en cuanto a la ubicación anatómica que ha sido descrita con anterioridad del ganglio celiaco y el ganglio mesentérico superior ya que como se ha visto se ha descrito incluso a nivel del origen de la arteria renal y ovárica, además el ganglio celiaco izquierdo ha sido situado sobre el lado lateral de la arteria celiaca y la arteria mesentérica superior, mientras que el ganglio celiaco derecho lo describen localizado detrás de la vena cava inferior; a diferencia de lo encontrado en este trabajo la estructura anatómica estudiada podría corresponder al ganglio mesentérico superior ubicándose adosado a la vena cava inferior y además se deduce que podría contribuir a la funciones del nervio ovárico. Por otra parte se puede concluir que del total de las neuronas identificadas con estudios de histología llevados a cabo en este trabajo 2041 cuerpos neuronales, solo 405 células neuronales marcadas con el trazador fluorescente son las que realmente participan en las funciones ováricas.

REFERENCIAS

1. **Gabella G.** Autonomic nervous system. In the Rat Nervous System. G.Paxinos Academic Press, 2a ed. San Diego; 1995. pp. 81–103.
2. **Morán Carolina, Franco Alma, Morán José Luis, Handall Anabella, Morales Leticia Domínguez Roberto.** Neural Activity Between Ovaries and the Prevertebral Celiac–Superior Mesenteric Ganglia Varies During the Estrous Cycle of the Rat. *Endocrine*. 2005;26(2):147–152.
3. **Baljet B. and Drukker J.** The extrinsic innervation of the pelvic organs in the female rat. *Acta anat*. 1980;107:241–67.
4. **Tiscornia OM Yacomotti J. Losardo RJ.** Investigación y revisión conceptual de la innervación gastro-duodeno-pancreática en ratas. *Rev chil Anat*. 2009;20(1):37–48.
5. **Berthoud Hans-Rudolf, Neuhuber Winfried L.** Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Autonomic Neuroscience: Basic Clin*. 2000;85:1–17.
6. **Aguado Luis I.** Role of the Central and Peripheral Nervous System in the Ovarian Function. *Microsc Res Tech*. 2002;59:462–73.
7. **Burden HW, Lawrence IE Jr Louis TM y Hodson CA.** Effect of abdominal vagotomy on the estrus cycle of the rat and the induction of pseudopregnancy. *Neuroendocrinology*. 1980;33:218–22.
8. **Lawrence IE y Burden HW.** The origin of the extrinsic adrenergic innervations of the rat ovary. *Anat Rec*. 1980;196:51–59.
9. **Klein CM, Ray RH y Burden H.** Directic electrical stimulation of the superior ovarian nerve in rats causes an increase in neuronal activity in the ipsilateral ovarian plexus nerv. *Brain Res*. 1989;479(6):194–200.
10. **Payen AF.** Ultrastructural study of the nerve plexus accompanying the ovarian artery and vein in the rat. *Anat Rec*. 1978;190:47–64.
11. **Aguado LI y Ojeda SR.** Prepubertal ovarian function is finely by direct adrenergic influences. Role of noradrenergic innervation. *Endocrinology*. 1984;114(5):1845–53.
12. **Zhang XM, Zhao QH, Zeng NL, Cai CP, Xie XG, Li CJ, et al.** The Celiac Ganglia: Anatomic Study Using MRI in Cadavers. *AJR*. 2006;186:1520–1523.
13. **Wang Zhen J. Webb Emily M. Westphalen Antonio C. Yeh Benjamin M.** MultiY Detector Row Computed Tomographic Appearance of Celiac Ganglia. *J Comput Assist Tomogr*. 2010;34(3):343–347.
14. **Ragionieri L., Botti M.,Gazza Sorteni C., Chiocchetti R., Clavenzani P., Minelli L., et al.** Localization of peripheral autonomic neurons innervating the boar urinary bladder trigone and neurochemical features of the sympathetic component. *Eur J Histochem*. 2013;57e16:93–105.
15. **Gagliardo K.M., Guidi W.L. Da Silva R.A. and Ribeiro A.A.C.M.** Macro and Microstructural Organization of the Dog's Caudal Mesenteric Ganglion Complex. *Anat Histol Embryol*. 2003;32:236–43.
16. **Coppi Maciel Ribeiro Antonio Augusto ; Rodrigues de Souza Romeu ; Barbosa José; Filho Antonio Fernandes.** Anatomic study of the celiac, celiac mesenteric and cranial mesenteric ganglia and its connections in the domestic cat. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2000;37(4).
17. **Promwikorn Waraporn, Thongpila Sakporn, Thaworn Mingsakul Pradidarcheep Wisut , Chunhabundit Panjit and Somana Reon.** Angioarchitecture of the coeliac sympathetic ganglion complex in the common tree shrew (*Tupaia glis*). *J Anat*. 1998;193:409–16.

18. **Casais M, Sosa Z Y RA and ALI.** Coeliac ganglion adrenergic activity modifies ovarian progesterone during pregnancy: its inter-relationship with LH. *Endocrinology*. 2001;170:575–84.
19. **Burden HW, Leonard M SC y LI.** The sensory innervations of the ovary; a horseradish peroxidase study in the rat. *Anat Rec*. 1983;207:623–7.
20. **Morán Carolina, Zarate Fabiola Morán José Luis Handall Anabella and Domínguez Roberto.** Lateralization of the connections of the ovary to the celiac ganglia in juvenile rats. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7(50):1–7.
21. **Hamer D.W. and Santer R.M.** Anatomy and Blood Supply of the Coeliac-Superior Mesenteric Ganglion Complex of the Rat. *Anat Embryol*. 1981;162:353–62.
22. **McNeill D.L. and Burden H.W.** Neuropeptide Y and somatostatin immunoreactive perikarya in preaortic ganglia projecting to the rat ovary. *JReprod.fert*. 1986;78:727–732.
23. **Lansdown Andrew and Rees D. Aled.** The sympathetic nervous system in polycystic ovary syndrome: a novel therapeutic target? *Clin Endocrinol*. 2012;77:791–801.
24. **Dorfman M, AV Araya AV, Fiedler JF, Luna SL, Romero C, Lara HE.** Role of Stress and Sympathetic Innervation in the Development of Polycystic Ovary Syndrome. *ARBS Annu Rev Biomed Sci*. 2003;5:79–86.
25. **Larauche Muriel, Mulak Agata and Taché Yvette.** Stress and visceral pain: from animal models to clinical therapies. *Exp Neurol*. 2012;233(1):49–67.
26. **Morales-Ledesma Leticia, Linares Rosa, Rosas Gabriela, Morán Carolina, Chavira Roberto Cárdenas Mario, et al.** Unilateral sectioning of the superior ovarian nerve of rats with polycystic ovarian syndrome restores ovulation in the innervated ovary. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010;8(99):1–7.
27. **Estrada Flores Elvira, Peralta Zamora Leonor Rivas Manzano Patricia.** Manual de técnicas histológicas. AGT editor SA México, 1982.
28. **Sigma-Aldrich.** Procedimiento ht15. Steinheim Alemania; 2003.
29. **Certistain.** Merck KgaA,64271. Alemania; 2004.
30. **Skagerberg Gunnar, Björklund Anders LO.** Further studies on the use of the fluorescent retrigrade tracer True Blue in combination whit monoamine histochemistry. *Neurosci methods*. 1985.
31. **Vercelli A. Repici M.Garbosa D. Grimaldi A.** Recent tecnicas for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals. *Brain Res Bul*. 2000;51(1):11–28.
32. **Kasukurthia Rahul, Brennerb Michael J, Moorea M. Amy, Arash Moradzadech, Rayd Wilson Z., Santosaa Katherine B., et al.** Transcardial perfusion versus immersion fixation for assessment of peripheral nerve regeneration. *J Neurosci Methods*. 2009;184:303–309.
33. **Pastelín C.F., Téllez Y., Muñoz M., Rosas N., Handal A., Cruz Y. et al.** The anatomy of celiac ganglion related with the ovaries in female rats. *Soc Neurosci*. 2013;1–4.

Anexo 1 TABLAS

Tabla 1 Técnicas de Deshidratación

Deshidratación		
	Reactivo	Tiempo
1	Alcohol 70%	15 min
2	Alcohol 80%	15 min
3	Alcohol 96%	15 min
4	Alcohol 96%	15 min
5	Alcohol 96%	15 min
6	Alcohol 100%	15 min
7	Alcohol 100%	15 min
8	Alcohol 100%	15 min
9	Alcohol - Xilol	15 min
10	Xilol	15 min
11	Xilol	15 min
12	Parafina 1	45 min
13	Parafina 2	60 min

Tabla 2. Tinción Tricrómica de Masson

Tinción Tricrómica de Masson		
	Reactivo	Tiempo
Desparafinar		
1	Xileno	5 min
2	Xileno	5 min
3	Xileno: Etanol	5 min
Hidratación		
4	Etanol 100%	5 min
5	Etanol 100%	5 min
6	Etanol 96%	3 min
7	Etanol 80%	3 min
8	Etanol 60%	3 min
9	Agua destilada	3 min
Mordente		
10	Fijador Bouïn	12 hrs
11	Agua corriente	15-20 min
12	Hematoxilina de Weigert	12 min
13	Agua corriente	40 seg
14	Agua destilada	40 seg
Azulamiento		
15	Amoniaco 1%	3 min
16	Agua corriente	40 seg
17	BiebrichScarlet- Fushina ácida	5 min
18	Agua corriente	40 seg
Contraste		
19	Ác. Fosfomolibdico- Ag. Fosfotunstico	5 min
20	Azul de anilina	4 min
21	Ác. Acético Glacial 1%	3 min

22	Agua corriente	40 seg
Deshidratación		
23	Etanol 96%	40 seg
24	Etanol 96%	30 seg
25	Etanol 100%	30 seg
26	Etanol 100%	30 seg
27	Etanol : Xileno	10 seg
28	Xileno	10 seg
29	Xileno	10 seg
Montaje		
30	Citoseal TM 60	

Tabla 3. Tinción de Nissl

Tinción de Nissl		
	Reactivo	Tiempo
Desparafinar		
1	Xileno	5 min
2	Xileno	5 min
3	Xileno: Etanol	5 min
Hidratación		
4	Etanol 100%	5 min
5	Etanol 100%	5 min
6	Etanol 96%	3 min
7	Etanol 80%	3 min
8	Etanol 60%	3 min
9	Violeta de crésilo	40 min
10	Agua corriente	40 seg
Deshidratación		
11	Agua destilada	
12	Etanol 96%	40 seg
13	Etanol 96%	30 seg
14	Etanol 100%	30 seg
15	Etanol 100%	30 seg
16	Etanol : Xileno	10 seg
17	Xileno	10 seg
18	Xileno	10 seg
Montaje		
19	Entellan	

Anexo 2

Antecedentes de técnicas de histología

El conocimiento de las técnicas histológicas para la conservación y la visualización de los tejidos se remonta al siglo XVI, con el uso de lentes simples aunado al advenimiento del microscopio como auxiliares para el estudio de detalles finos y texturas de tejidos de órganos de diferentes especies²⁷.

De igual forma, se inició el empleo de técnicas de tinción y fijación para conservación de tejidos, en 1714 Leeuwenhoek empleó por primera vez una solución alcohólica de azafrán para teñir cortes de músculo; más tarde se empezaron a usar otras técnicas como la tinción del tejido óseo con rubia y posteriormente la inyección vascular con masas coloreadas para muestras de vegetales²⁷.

En el siglo XIX se aplicaron las siguientes técnicas: en 1838 Gottfried utilizó por primera vez el carmín y el índigo en sus investigaciones sobre infusorios; sin embargo estas técnicas distaban de ser ideales, ya que no eran adecuadas para conservar los tejidos, por lo que se empezaron a aplicar técnicas de fijación mediante desecación con alcohol sublimado, ácido crómico y nitrato de plata; más adelante en 1860 Daniel V. Recklinghausen introdujo la impregnación argéntica como método histológico de observación, pero es hasta 1863 cuando Wilhelm Waldeyer empleó la fuscina y ensayo del teñido de las fibras nerviosas con extracto de palo de Campeche (hematoxilina), endureciendo al mismo tiempo los especímenes mediante congelación, inclusión en parafina, celoidina, gelatina entre otros; en 1873 Camilo Golgi recomendó por primera vez el método de impregnación argéntica para las investigaciones del sistema nervioso central y periférico. También la combinación de hematoxilina–eosina fue utilizada por Carl David Wilhem Busch en 1877, siendo desde entonces la técnica más usada. Por otra parte en 1885 se dió a conocer la hematoxilina de Delafield. En 1886 Paul Ehrlich descubrió la hematoxilina ácida y en 1892 fue publicado el modo de aplicación de la hematoxilina férrica de Martin Heidenhain. Así empezó en esta

época la mejora de técnicas de teñido mediante nuevas combinaciones, surgiendo las coloraciones triples o tricrómicas con hematoxilina, fucsina ácida y ácido pícrico²⁷. 27

Así también se inició el perfeccionamiento de cortes delgados siendo el micrótopo uno de los instrumentos más antiguos como el construido por George Adams en 1770, agregándose posteriormente micrótopos que endurecen los tejidos con nieve carbónica o mediante dispositivos eléctricos que permiten cortes delicados²⁷. 27

Técnicas de histología para tinción de tejido nervioso

Tinciones tricrómicas son tintes nucleares, colágenos y citoplásmicos como ácido fosfotúngstico o fosfomolibdico, su creación se le atribuye a Mallory, pero fue modificada posteriormente por Masson, utilizando azul de anilina. Generalmente estas tinciones se utilizan para tinción de tejido conectivo, músculo y fibras colágenas, para intensificar la coloración final, los cortes de tejido deben ser tratados con solución de Bouin²⁶. 28

Por su parte, la *Tinción de Nissl* consiste en el empleo del violeta de cresilo (acetato), un colorante acidófilo perteneciente al grupo de colorantes de oxazina, se usa para la tinción del núcleo celular al cual tiñe de color azul, y al retículo endoplasmático rugoso para visualizar cuerpos de Nissl tiñéndolos en color violeta; por lo tanto, se emplea para las tinciones del sistema nervioso central en donde se pueden teñir las neuronas presentes en el tejido, obteniéndose información sobre el tamaño y afinidad tentorial de los somas neuronales²⁸. 29

Por último, se describe el marcaje fluorescente *True blue*. El uso de trazador retrogrado de conexiones neuronales inicio en 1979 con los estudios de Kuypers y colaboradores²⁹. 30 Una técnica que permite visualizar cuerpos neuronales mediante degeneración retrograda. La dirección preferencial se basa en el transporte axonal; se han desarrollada varios marcadores neuronales anterógrado y retrógrados, a estos marcadores con el paso del tiempo se han agregado

colorantes fluorescentes que dan la oportunidad de marcar múltiples conexiones nerviosas³⁰. 31

Anexo 3

Técnicas de fijación de tejido.

Existen diversos métodos de fijación entre ellos la perfusión transcardial y la de inmersión simple, siendo la perfusión el estándar de oro sobre todo para estudios de tejido neural. La perfusión transcardial la cual utiliza la vasculatura para alcanzar la entrega sistémica de fijación en el animal vivo. En esta técnica el animal es anestesiado, se abre la pared torácica y se expone el corazón latiendo. Una aguja es insertada en el ventrículo izquierdo con el fin de bombear el fijador hacia el circuito sistémico. El tejido de interés es luego colocado en un baño fijador. Este método tiene ciertas desventajas entre ellas el tiempo intensivo requiriendo altos volúmenes de fijador, algunos de los cuales son sospechosos carcinógenos, por lo que el animal necesita ser sacrificado al tiempo en que se recolecta el tejido. Una de las razones por las que se usa este tipo de fijación perfusión es porque minimiza la anoxia y evita el daño mecánico del tejido.

Sin embargo, según lo demostrado en el estudio de Kasukurthi, *et al*³⁵, 32 en el cual se utilizaron 18 ratas macho Lewis para recolectar el nervio ciático, se usaron dos técnicas de fijación por inmersión simple y perfusión transcardial con glutaraldehído y paraformaldehído, los resultados no mostraron diferencias significativas entre los métodos de fijación.

En nuestro estudio previa inyección del trazador retrógrado en la bursa ovárica, se optó por realizar la perfusión transcardial con paraformaldehído 1% en 0.1 M amortiguador fosfato, pH 7.4, ya que en estudios anteriores (referencia adra Carolina Moran)¹⁰ se ha demostrado que es una adecuada técnica de fijación para estudios de tejido neural.

Anexo 4

Presentación de cartel en 56 Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas



Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas

Memoria



56
congreso
nacional
de ciencias
fisiológicas

Tlaxcala, Tlaxcala del 1 al 5 de Septiembre 2013



C - 148 Fibras posganglionares del ganglio celiaco que inervan órganos abdominales de la rata hembra

Pastelín RC (1), Muñoz SM (2), Téllez DY (2), Flores GA (2), Rosas MN (1), Handal SA (2), Morán RC (2). (1) Posgrado en Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Químicas-Instituto de Ciencias, BUAP, (2) Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción del ICUAP-BUAP.

El principal componente de la innervación de los órganos abdominales está constituido por neuronas posganglionares del ganglio celiaco (GC). En la rata hembra, se han realizado numerosos estudios morfométricos para comprender la anatomía y fisiología del GC. Sin embargo, existen pocos trabajos anatómicos que detallen los órganos blanco que son innervados por dicho ganglio. Por otra parte, se ha descrito que los axones que inervan a las gónadas provienen del GC e inervan a los ovarios. El objetivo del presente estudio fue describir la organización anatómica del GC así como las ramas que inervan los ovarios; además de caracterizar al plexo adosado a la vena cava inferior. Se utilizaron 20 ratas de 3 meses de edad de la cepa CHIZV las cuales fueron anestesiadas. El ganglio celiaco y sus ramas fueron disecados. El plexo nervioso fue corroborado por técnicas histológicas. Los resultados muestran que el GC es bilateral. Las porciones derecha e izquierda se localizan entre la arteria celiaca y la arteria mesentérica superior. El GC derecho presenta variaciones en su forma y de él emergen seis ramas, la primera corre ventral a la aorta y se une al ganglio suprarrenal, otra de las ramas corre por encima de la arteria celiaca y se conecta al GC izquierdo. El GC izquierdo presenta cinco ramas: Una de sus ramas corre caudal a la vena cava inferior y detrás de la vena renal izquierda, alcanzando a un pequeño plexo nervioso adosado a la vena cava inferior, de este plexo emerge la innervación de los ovarios. Los estudios histológicos muestran que dicho plexo está formado por fibras y posee un conglomerado de células nucleadas con cuerpos esféricos, ovoides o piriformes, visualizándose cuerpos de Nissl, lo que sugiere que el engrosamiento celular sí contiene células nerviosas y es un ganglio. Nuestros resultados sugieren que el ganglio celiaco en la rata hembra es asimétrico y sólo el lado derecho varía su forma. Por otra parte, el nervio del plexo ovárico emerge del ganglio autonómico simpático adosado a la vena cava inferior, cuyas neuronas posganglionares podrían contribuir al control de las funciones del ovario.



Anexo 5

Abreviaturas

AMS: Arteria Mesentérica Superior

CGRP: Calcitonin Genereelated Peptide

GC: Ganglio celiaco

GCM: Ganglio Caudal Mesentérico

GCMS: Ganglio Celiaco Mesentérico Superior

GPC: Ganglio Preaórtico Caudal

NOS: Nervio Ovárico Superior

NPO: Nervio del Plexo ovárico

PAVCI. Plexo Adosado a la Vena Cava Inferior

SNA: Sistema nervioso autónomo

SP: Sustancia P

T B: True Blue