



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
“ZARAGOZA”

“MODIFICACIÓN DE LAS FUNCIONES OVÁRICAS  
EN EL ANIMAL CON SÍNDROME DE OVARIO  
POLIQUÍSTICO, INDUCIDO POR LA  
ADMINISTRACIÓN DE VALERATO DE  
ESTRADIOL O LA EXPOSICIÓN A ESTRÉS POR  
FRÍO”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGA**

PRESENTA:

**MARÍA ISABEL NAVARRETE MORALES**



DIRECTORA DE TESIS: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA

MÉXICO, D. F.

MARZO, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**"ZARAGOZA"**

**DIRECCIÓN**

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **NAVARRETE MORALES MARÍA ISABEL**, con número de cuenta **306231344**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **18** del mes de **marzo** de 2014 a las **12:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE** M. en C. MARISELA VALDES RUIZ
- VOCAL** DRA. LETICIA MORALES LEDESMA
- SECRETARIO** M. en I.B.S.H.. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ
- SUPLENTE** DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR
- SUPLENTE** DRA. ELIA ROLDÁN REYES

El título de la tesis que presenta es: **Modificación de las funciones ováricas en el animal con síndrome de ovario poliquístico, inducido por la administración de valerato de estradiol o la exposición a estrés por frío.**

Opción de titulación: tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

México, D. F., 14 de febrero de 2014

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**

**DIRECTOR**  
ZARAGOZA  
**DIRECCION**

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**“Modificación de las funciones ováricas en el animal con síndrome de ovario poliquístico, inducido por la administración de valerato de estradiol o la exposición a estrés por frío”**

**Tesis presentada por: María Isabel Navarrete Morales.**

**Directora de Tesis: Dra. Leticia Morales Ledesma**

**Realizada en el Laboratorio de Fisiología Reproductiva de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción.**

**FES-ZARAGOZA, UNAM**

**Investigación realizada gracias al Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT,  
Clave: IN211813**

## *AGRADECIMIENTOS*

A **Dios**, por estar siempre presente en mi vida, por enseñarme tantas cosas a través de las personas que he conocido. Por darme el valor necesario para realizar este trabajo. Y sobre todo serenidad, sabiduría y salud.

A la **UNAM**, por permitirme conocer a excelentes profesores que me brindaron su apoyo y conocimiento a lo largo de mi formación académica, con el propósito de que lograra llegar hasta el final de mi carrera profesional.

A la **Dra. Leticia Morales Ledesma** por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por los conocimientos que me brindó, su apoyo y sobre todo por ser tan paciente conmigo.

A **Rosa Linares Culebro** por compartir sus conocimientos, por aportar ideas al escrito y colaborar en la parte experimental de esta tesis. Gracias por ser tan paciente conmigo y ayudarme a comprender mejor el trabajo realizado en el laboratorio.

Agradezco a los miembros del Jurado:

M. en C. Marisela Valdes Ruiz

Dra. Leticia Morales Ledesma

M. en I.B.S.H. Angélica Flores Ramírez

Dra. María Elena Ayala Escobar

Dra. Elia Roldán Reyes

Por dedicar tiempo y aportar sus conocimientos para la mejora de este trabajo.

A todos mis compañeros y amigos de laboratorio: Isa, Noé, Alina, Aldo, Rosa, Gaby, Deyra, Ely, Azucena y Juanito porque gracias a ellos el tiempo en el laboratorio fue mucho más agradable.

## DEDICATORIAS

A mi abuelita **Ángela García Cristóbal** porque siempre creyó en mí y sé que le hubiera gustado compartir este día conmigo. También a mis abuelitos **Elvira Gutiérrez** y **Juan Navarrete**. Esto va por ustedes tres, muy pronto nos volveremos a ver

A mis padres, **Soledad** y **Juan Carlos** por su apoyo incondicional para que pudiera cumplir este sueño. Gracias por todo su amor y dedicación para mí y mi hermana ¡Los amo!

Mamá gracias por estar siempre presente en todos mis logros, espero algún día poder retribuirte todo lo que me has brindado.

A mi hermana **Karla** que siempre ha estado conmigo, en las buenas y malas. Te agradezco mucho que me hayas apoyado a pesar de todo ¡Te amo hermanita!

A mis sobrinos **Elliot**, **Jesús**, **Allan**, **Zoe** y **Mathías**, porque deseo que ustedes también sean libres mediante el conocimiento.

A **Oscar**, por formar parte de mi vida, espero que en un futuro construyamos un mismo sueño, basado en la confianza y el respeto, lleno de logros e ilusiones ¡Te amo Oscar!

A todos mis tíos, **primos** y demás familiares que me han apoyado a en este camino.

A mis grandes amigos de toda la vida a los cuales quiero muchísimo:

**Vero**, porque fuiste mi mejor amiga desde el primer día de clases y siempre me has dado excelentes consejos. Gracias infinitas por tu amistad.

**Isa Six**, por tu gran amistad y porque he pasado a tu lado inolvidables momentos. Gracias por brindarme tu apoyo incondicional

**Alina** y **Noé** porque a pesar de la distancia y el tiempo nuestra amistad siga creciendo cada día.

**Daniela**, **Arturo** y **Yuritz** por tantos momentos de alegría, espero sigamos siendo tan buenos amigos como hasta ahora.

**Yared** y **Ger**, mis grandes amigos desde hace muchos años, me siento muy orgullosa de ser su amiga, los quiero infinito. Espero la distancia no nos separe nunca.

También quiero dedicar esta tesis al químico **Juan**, **Isabel Velasco** y **Miguel Atilano**, porque gracias a ellos he aprendido mucho tanto en materia laborar como personal. Mil gracias.

Que Dios bendiga a todas las personas que me apoyaron a lo largo de mi desarrollo académico.

¡Gracias!

...A través del conocimiento nos acercamos a Dios...

# ÍNDICE DE CONTENIDO

	<i>PÁGINA</i>
<i>ABREVIATURAS</i> _____	<i>i</i>
<i>RESUMEN</i> _____	<i>iii</i>
<i>INTRODUCCIÓN</i> _____	<i>1</i>
<i>MARCO TEÓRICO</i> _____	<i>3</i>
☉ <i>Ovario</i> _____	<i>3</i>
☉ <i>Desarrollo folicular</i> _____	<i>5</i>
☉ <i>Atresia folicular</i> _____	<i>9</i>
☉ <i>Ovulación</i> _____	<i>10</i>
☉ <i>Esteroidogénesis</i> _____	<i>13</i>
☉ <i>Teoría de la doble célula-doble hormona</i> _____	<i>14</i>
☉ <i>Etapas del desarrollo postnatal en la rata</i> _____	<i>17</i>
☉ <i>Ciclo estral</i> _____	<i>19</i>
☉ <i>Inervación ovárica</i> _____	<i>22</i>
☉ <i>Ganglio Celiaco Mesentérico Superior</i> _____	<i>23</i>
☉ <i>Biosíntesis y metabolismo de las monoaminas</i> _____	<i>25</i>
☉ <i>Síndrome de Ovario Poliquístico (SOPQ)</i> _____	<i>29</i>
☉ <i>Modelos de inducción del SOPQ</i> _____	<i>31</i>
<i>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</i> _____	<i>35</i>
<i>HIPÓTESIS</i> _____	<i>36</i>
<i>OBJETIVO GENERAL</i> _____	<i>36</i>

<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	36
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	37
🌀 <i>Animales</i>	37
🌀 <i>Inducción del SOPQ</i>	37
🌀 <i>Monitoreo del ciclo estral</i>	38
🌀 <i>Inyección de True blue</i>	38
🌀 <i>Autopsia</i>	38
🌀 <i>Cuantificación de ovocitos liberados</i>	39
🌀 <i>Valoración de la dinámica folicular</i>	39
🌀 <i>Cuantificación de monoaminas y su metabolito en GCMS y ovario</i>	40
🌀 <i>Cuantificación de Hormonas esteroideas en suero</i>	41
🌀 <i>Análisis estadístico</i>	41
<b>RESULTADOS</b>	43
<b>DISCUSIÓN</b>	63
<b>CONCLUSIONES</b>	73
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	74



## ABREVIATURAS

**5-HIAA:** Ácido 5-hidroxiindolacético

**GCMS:** Ganglio celiaco mesentérico superior

**5-HT:** Serotonina

**GH:** Hormona del crecimiento

**AMPc:** Adenosin monofosfato cíclico

**GnRH:** Hormona liberadora de las gonadotropinas

**bFGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos básico

**IGF-I:** Factor de crecimiento insulínico I

**DA:** Dopamina

**LH:** Hormona luteinizante

**DHEA:** Dehidroepiandrosterona

**MAO:** Monoaminoxidasa

**DHT:** 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona

**MHPG:** 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol

**DOPAC:** Ácido 3,4-dihidroxifenilacético

**NA:** Noradrenalina

**E<sub>2</sub>:** Estradiol

**NGF:** Factor de crecimiento neural

**EVGF:** Factor de crecimiento vascular endotelial

**NPO:** Nervio del plexo ovárico

**FSH:** Hormona folículo estimulante

**NOS:** Nervio ovárico superior

**NPY:** Neuropeptido Y

**PRL:** Prolactina

**P<sub>4</sub>:** Progesterona

**PT:** Propionato de testosterona

**RU486:** Antiprogestina mifepristona

**sSTAR:** Proteína reguladora de la  
esteroidogénesis

**SHBG:** Proteínas de unión a esteroides  
sexuales

**SOPQ:** Síndrome del ovario  
poliquístico

**T:** Testosterona

**TH:** Tirosina hidroxilasa

**VE:** Valerato de estradiol

**VIP:** Péptido intestinal vasoactivo

**VMA:** Ácido vanilmandélico

## RESUMEN

El síndrome del ovario poliquístico (SOPQ) es la fisiopatología más común en mujeres que entran a la etapa reproductiva. En el SOPQ se produce la alteración del eje hipotálamo-hipófisis-ovario que desencadena modificación en la secreción de hormonas esteroides, del desarrollo folicular, de la ovulación y elevada concentración de noradrenalina (NA) ovárica. La NA es el neurotransmisor que se encuentra en mayor cantidad en los ovarios y se sintetiza en el ganglio celiaco mesentérico superior (GCMS) por acción de la enzima limitante de las catecolaminas, la tirosina hidroxilasa (TH).

Existen diversos modelos experimentales para inducir el SOPQ, los principales son la administración de andrógenos o de estrógenos. La inyección intraperitoneal (i.p) de valerato de estradiol (VE) a ratas en etapa infantil provoca alteraciones en el ciclo estral, formación de quistes en los ovarios, anovulación, modificación en la secreción de gonadotropinas y aumento en el tono simpático, evaluado por el incremento en la concentración de NA en ovario.

La información simpática que inerva al ovario tiene origen en el GCMS, por lo que se decidió comparar la actividad monoaminérgica en éste y en el ovario en respuesta a la inducción del SOPQ por la administración de VE o la exposición a estrés por frío, así como la respuesta ovárica. Para ello, se utilizaron ratas hembras de 10 días de vida a las cuales se les inyectó 2 mg de VE vía i.p. A otro grupo de ratas de 24 días de edad, se colocaron en un cuarto frío por 8 semanas de lunes a viernes durante 3 horas. Todos los animales fueron sacrificados alrededor de los 80 días de vida al presentar un estro vaginal.

Sólo en los animales con VE se adelantó la apertura vaginal. El ciclo estral de los animales inyectados con VE se caracterizó por la presencia de diestros constantes, mientras que el ciclo de los animales estresados se modificó por la aparición de 2 proestros en un mismo ciclo. La ovulación de los animales con VE se bloqueó en un 80% y no se modificó en los animales sometidos a estrés. La concentración de progesterona ( $P_4$ ) y estradiol ( $E_2$ ) en los animales inyectados con

VE no se modificó, mientras que estas hormonas en las hembras sometidas a estrés por frío fue menor ( $P_4$ : 7.12 ng/mL  $\pm$  0.8 vs. 13.3 ng/mL  $\pm$  1.91) y ( $E_2$ : 23.81 pg/mL  $\pm$  2.05 vs. 44.33 pg/mL  $\pm$  5.73). La concentración de Testosterona sólo incrementó en los animales inyectados con VE (88.45 pg/mL  $\pm$  16.3 vs. 24.3 pg/mL  $\pm$  9.43). Las hembras inyectadas con VE presentaron incremento en la concentración de NA (7.33 pg/mL  $\pm$  1.5 vs. 3.73 pg/mL  $\pm$  0.8) y DOPAC (690 pg/mL  $\pm$  160 vs. 175 pg/mL  $\pm$  57) en GCMS con respecto a su grupo control. Mientras que en los animales sometidos a estrés por frío la relación 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG)/Noradrenalina (NA) fue mayor en ovario con respecto a su grupo control (1.2 pg/mL  $\pm$  0.18 vs. 0.4 pg/mL  $\pm$  0.1) y también la concentración de serotonina en GCMS (7428 pg/mL  $\pm$  1242 vs. 1777 pg/mL  $\pm$  440). En cuanto al número de neuronas marcadas en GCMS de los animales inyectados con VE fue mayor con respecto a su grupo control (430 vs. 57), mientras que, en los animales sometidos a estrés por frío el marcaje de neuronas fue del doble que en los animales con VE (1100 vs. 430).

Debido a que la administración de VE o la exposición a estrés por frío modifican de manera diferente las funciones ováricas y el contenido de monoaminas y sus metabolitos en GCMS y ovario, sugerimos que el mejor modelo para inducir el SOPQ es la inyección de VE, confirmando la heterogeneidad del síndrome.

## INTRODUCCIÓN

El ovario se encarga de producir gametos capaces de ser fecundados y sintetiza hormonas de naturaleza proteica y esteroide (Domínguez y col., 1991, Tresguerres, 2003). Ambos procesos se encuentran regulados por la vía endócrina y neural (Tresguerres, 2003).

Al ovario le llega información neural por medio del hilio y está integrada por información simpática aportada por el nervio ovárico superior y por el nervio del plexo ovárico, la información parasimpática llega a través del nervio vago. El origen de los nervios simpáticos está en el ganglio celiaco mesentérico superior (GCMS) (Sasahara y col., 2003). El ganglio celiaco en conjunto con el ganglio mesentérico y el aórtico-renal forman parte del plexo celiaco, el cual se localiza cerca de la aorta subdiafragmática en la región celiaca (Sisu y col., 2008).

Cuando existe alguna alteración en la vía nerviosa o endocrina que regula las funciones del ovario, se pueden originar patologías como el SOPQ, que afecta del 6 al 10% de mujeres que comienzan su etapa reproductiva (Morán, 2006). Las características de diagnóstico son el hiperandrogenismo, los ovarios poliquísticos y la anovulación (Goodarzi y col., 2011).

En aproximadamente el 70% de las mujeres con SOPQ se presenta alteración hipotalámica (Goodarzi, 2011), la cual consiste en el incremento en la frecuencia de los pulsos de secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), lo cual genera mayor liberación de hormona luteinizante (LH) pero no de hormona folículo estimulante (FSH), dando como resultado disociación en la relación LH:FSH (Morán, 2006).

Debido a la heterogeneidad del SOPQ (Azziz y col., 2009) es difícil establecer un modelo que reproduzca tanto la alteración del eje hipotálamo-hipófisis-ovario como de los factores metabólicos (Franks, 1995). Por ello, se buscan los modelos que reproduzcan las características de la patología lo más cercano a lo que se reporta para la mujer.

Entre los modelos más utilizados para determinar la etiología del SOPQ incluyen la administración de esteroides en diferentes etapas de desarrollo que inducen diversas características de la patología (Singh, 2005).

Existen evidencias de que un alto porcentaje de mujeres expuestas a factores estresantes desarrollan el SOPQ, por lo que un modelo animal para reproducirlo es mediante el estrés por frío (Singh, 2005).

En las últimas décadas se ha planteado que el SOPQ no sólo es el resultado de alteraciones endócrinas, sino que está participando la inervación extrínseca del ovario (Morales y col., 2010; Linares y col., 2013). Por lo que, en el presente estudio se decidió comparar el efecto de la administración de valerato de estradiol en la etapa infantil, o la respuesta al estrés por frío, cuando se inicia en la etapa juvenil, sobre la respuesta ovulatoria, la concentración de hormonas ováricas y la actividad del GCMS, evaluada por la concentración de catecolaminas, serotonina, y por el número de neuronas marcadas por el TB.

## MARCO TEÓRICO

### Ovario

En la mujer, los ovarios son glándulas en forma de almendra de 3 cm de largo, 1.5 a 2 cm de ancho y 1 cm de grosor, con peso aproximado de 14 g cada uno (Gartner y Hiatt, 2007). En la rata adulta, los ovarios tienen un peso aproximado de 30 mg cada uno y miden 4.35 mm de ancho, 5.5 mm de largo y tienen un grosor de 1.6 mm (Ramírez, 2011).

Tanto en la mujer como en la rata, esta glándula se localiza en la pelvis, suspendida en el ligamento ancho del útero por una prolongación llamada mesoovario, un pliegue derivado del peritoneo por el que transcurren los vasos sanguíneos que irrigan a los ovarios (Gartner y Hiatt, 2007).

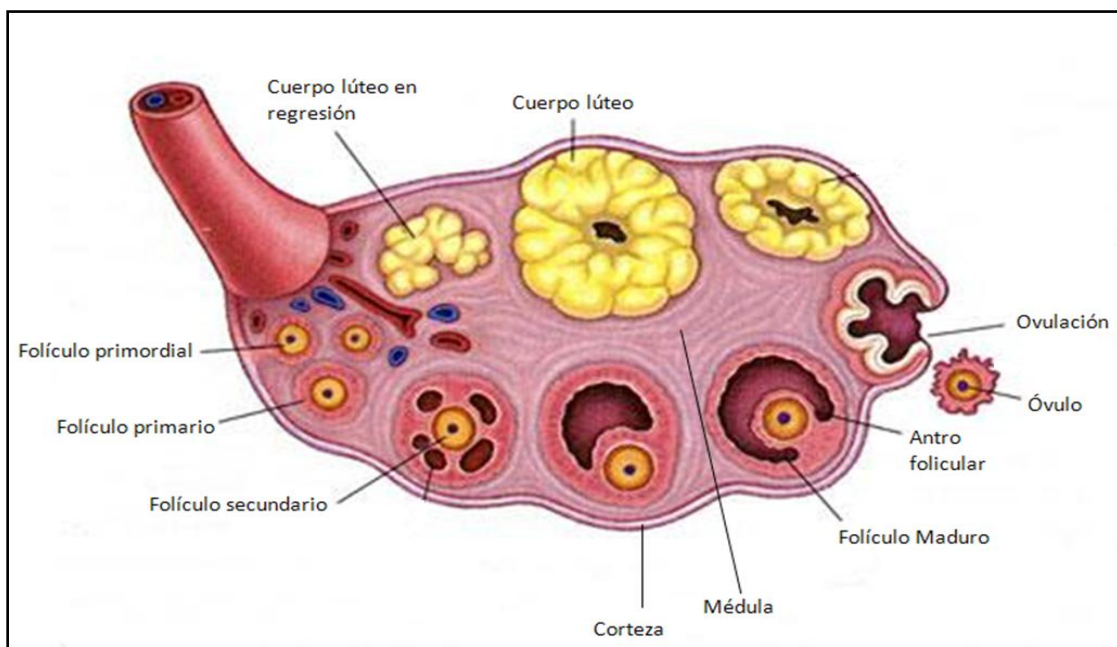
Cada ovario está recubierto por un epitelio cuboide denominado epitelio superficial (Hafez y Hafez, 2000). Debajo de este epitelio se encuentra la túnica albugínea, una cápsula de tejido conjuntivo, poco vascularizada (Gartner y Hiatt, 2007).

El ovario está formado por (Figura 1):

- ☉ Corteza: es la zona externa del ovario y se compone de una red de tejido conjuntivo, llamada estroma (también conocida como compartimiento intersticial), que contiene células estromales similares a fibroblastos y folículos ováricos en diversas etapas de desarrollo (Gartner y Hiatt, 2007).
- ☉ Médula: es la parte interna del ovario, ésta contiene una red vascular y tejido conjuntivo laxo. Los vasos sanguíneos de la médula derivan de las arterias ováricas (Gartner y Hiatt, 2007).
- ☉ Hilio: es la vía por la cual las terminales nerviosas, los vasos linfáticos, así como la arteria y la vena ovárica entran y salen del ovario (Welsch y Sobotta, 2008).
- ☉ Bursa ovárica: es una cápsula que rodea al ovario que se llena con líquido exudado por los folículos después de la ovulación. El espacio que se forma

entre el ovario y la bursa se denomina cavidad bursal (Li y col., 2007). La bursa le proporciona al ovario el microambiente necesario para el mantenimiento de los ovocitos (Beck, 1972). En la rata y el ratón, la bursa es casi completa y su ruptura antes de la ovulación limita el número de fetos en el cuerno uterino ipsilateral (Vanderhyden y col., 1986)

El ovario realiza dos funciones: la secreción de hormonas esteroideas [ $P_4$ , T y  $E_2$ ] y peptídicas (activina e inhibina) y el desarrollo de los folículos que culmina con la ovulación. Ambos procesos se encuentran regulados por la vía endócrina ejercida por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Este eje está influenciado por factores ambientales y nerviosos. El hipotálamo recibe una señal por parte de los estrógenos producidos en los ovarios, para que sea secretado el factor liberador de las gonadotropinas (GnRH) hacia el sistema portahipofisiario, ésta hormona llega a la adenohipófisis y actúa sobre los gonadotropos, lo cual favorece la secreción de la hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH), que viajan por el torrente sanguíneo hasta llegar al ovario, donde ejerce su función biológica (Tresguerres, 2003).



**Figura 1.** Esquema de un ovario de mujer señalando las diferentes estructuras que lo integran (Modificado de Gartner y Hiatt, 2007).



## Desarrollo folicular

La foliculogénesis es el proceso por el cual un folículo primordial se desarrolla hasta llegar a ser un folículo preovulatorio por acción de las gonadotropinas y por la información nerviosa que llega al ovario (Domínguez y col., 1991; Malamed y col., 1992; Tresguerres, 2003).

La transformación de un folículo ovárico en un cuerpo lúteo fue descrita por primera vez en 1672 por Regnier de Graaf. Desde ese momento quedó demostrado que el folículo ovárico constituye la unidad anatómico-funcional del ovario (Yen, 2001), cuya función es mantener, nutrir y madurar al ovocito hasta el momento de la ovulación, así como la secreción de hormonas ováricas (Domínguez y col., 1991).

El folículo está formado por el ovocito I, una membrana basal que aísla a las células de la granulosa del resto de los componentes del ovario y por células de la teca. Además de las células de la granulosa y las tecales, el folículo está rodeado por células de tejido conectivo y fibras musculares lisas que reciben el nombre de teca externa. El ovocito y las células foliculares no reciben irrigación sanguínea ni inervación de forma directa (Domínguez y col., 1991).

En la mujer, el desarrollo folicular se clasifica en 4 etapas de acuerdo al tamaño de los folículos, el desarrollo del ovocito y las células foliculares:

1. Folículos primordiales: miden de 30 a 60  $\mu\text{m}$  de diámetro, están conformados por un ovocito diploide primario (9 a 25  $\mu\text{m}$  de diámetro) el cual se encuentra detenido en la etapa de diploteno de la profase de la meiosis I (Carabatsos y col., 2002; Gartner y Hiatt, 2007; Norris y col., 2009) rodeado por una capa de células aplanadas precursoras de las células de la granulosa llamadas células pregranulosas (Yen, 2001).

Aquellos ovocitos que no son rodeados y aislados por células de la granulosa, en general mueren y son eliminados (Domínguez y col., 1991).

2. Folículos primarios: tienen un diámetro mayor a 60  $\mu\text{m}$ , se distinguen de los folículos primordiales por los cambios en el ovocito primario, las células foliculares y el tejido estromal circundante (Gartner y Hiatt, 2007).

El ovocito primario crece hasta unos 60  $\mu\text{m}$  de diámetro con un núcleo grande, denominado vesícula germinal (Gartner y Hiatt, 2007).

Las células foliculares adquieren una forma cuboide, es a partir de este momento que reciben el nombre de células de la granulosa. El folículo se denomina folículo primario unilaminar si solo una capa de células de la granulosa rodea al ovocito. Cuando estas células proliferan, se estratifican y forman varias capas de células alrededor del ovocito primario, el folículo se llama folículo primario multilaminar. La actividad proliferativa de estas últimas se debe a la molécula de señalamiento activina, producida por el ovocito primario (Gartner y Hiatt, 2007).

La activina, inhibina y folistatina son enzimas proteicas que regulan la secreción de FSH conformada por una cadena  $\alpha$  y una  $\beta$ . La inhibina disminuye y la activina estimula la función de los gonadotropos. La folistatina también suprime la expresión del gen que codifica para la expresión de la cadena  $\beta$  de la FSH, pero con una eficacia menor que la inhibina (Yen, 2001).

Durante esta etapa aparece la zona pelúcida, la cual se encarga de separar al ovocito de las células foliculares circundantes. La zona pelúcida se compone de tres glucoproteínas diferentes, ZP<sub>1</sub>, ZP<sub>2</sub>, ZP<sub>3</sub>, que el ovocito secreta (Gartner y Hiatt, 2007). Estas proteínas facilitan la fecundación por los espermatozoides (Cariño y col., 2001).

Las células del estroma comienzan a organizarse alrededor del folículo primario multilaminar y forman una teca interna, compuesta sobre todo por una capa celular vascularizada abundante, y una teca externa, integrada por tejido conjuntivo fibroso. Se observa la presencia de la

membrana basal que separa las células de la granulosa de la teca interna (Gartner y Hiatt, 2007).

3. Folículos secundarios: presentan un diámetro aproximado de 200  $\mu\text{m}$ , un estrato compuesto de 7 a 8 capas de células de la granulosa y múltiples espacios entre ellas llamados cuerpos de Call-Exner, que contienen líquido folicular originado por extravasación de componentes plasmáticos y por secreción de las células de la granulosa (Domínguez y col., 1991; Freeman, 1994).

Las células de la granulosa tienen receptores a FSH, la unión de la hormona a su receptor estimula la mitosis de las células, lo que resulta en el aumento del tamaño del folículo. Conforme crece el folículo, aumenta la actividad de las células, lo que se traduce en un aumento del líquido folicular que contiene glucosaminoglucanos, proteoglucanos, proteínas de unión a esteroides sexuales (SHBG) producidas por las células de la granulosa, así como  $\text{P}_4$ ,  $\text{E}_2$ , inhibina, folistatina y activina, las cuales regulan la liberación de LH y FSH (Gartner y Hiatt, 2007).

Los espacios llenos de líquido folicular, que separan a las células de la granulosa, se unen y forman el antro folicular. Las células granulosas se reordenan de tal manera que ahora el ovocito primario está rodeado por un grupo pequeño de células de la granulosa que se proyectan de la pared al antro. Su estructura se denomina cúmulo oóforo (Gartner y Hiatt, 2007).

Las células de la teca presentan todas las características de las células secretoras de hormonas esteroideas (abundante retículo endoplásmico liso y mitocondrias con crestas tubulares); las que están cerca de la membrana basal presentan nexos. En la teca interna existen numerosas terminaciones nerviosas, tanto colinérgicas como adrenérgicas (Domínguez y col., 1991).

La mayoría de los folículos que llegan a esta etapa del desarrollo sufren atresia y unos cuantos folículos secundarios continúan su desarrollo hacia folículos maduros (Gartner y Hiatt, 2007).

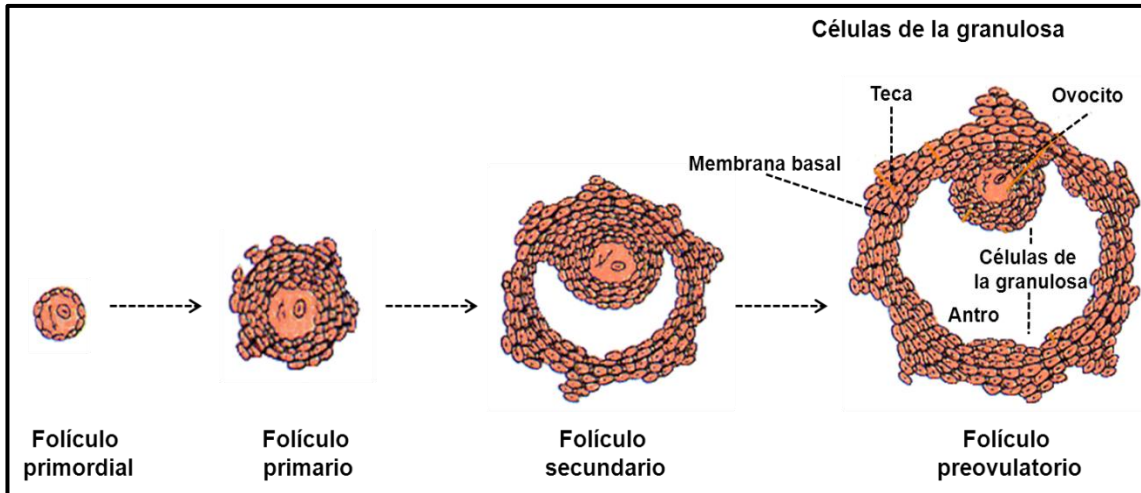
4. Folículo preovulatorio: en estos folículos se produce la ruptura y liberación del ovocito.

La proliferación continua de las células de la granulosa y la formación constante de líquido folicular resultan en la formación de un folículo preovulatorio (Figura 2) cuyo diámetro llega a 2,5 cm para el momento de la ovulación. Este folículo puede observarse como un abultamiento transparente en la superficie del ovario (Gartner y Hiatt, 2007).

En estos folículos se observan al ovocito en el cúmulo oóforo y rodeado por la corona radiada (Gartner y Hiatt, 2007); estas estructuras se forman a partir de células de la granulosa altamente diferenciadas, las cuales proporcionan nutrientes y factores necesarios para el crecimiento del ovocito. Poco antes de la ovulación, el ovocito y el cúmulo oóforo son desplazados hacia una posición excéntrica de la cavidad folicular y durante el proceso de ovulación, este complejo es expulsado de la cavidad folicular (Sánchez Criado, 1999; Goldfien y Monroe, 2000).

En el humano la foliculogénesis comienza a partir del tercer mes de gestación y para el nacimiento, éste cuenta con todos los folículos que se desarrollarán a lo largo de su vida reproductiva (Sotomayor y col., 2008). En la rata, el desarrollo folicular es un poco diferente al del humano, ya que en el ovario se inicia el proceso de foliculogénesis a partir de las 36 horas después del nacimiento (Malamed y col., 1992). La regulación del crecimiento y la diferenciación folicular durante la primera etapa del desarrollo parece depender fundamentalmente de la información que transcurre por la inervación del ovario y de las condiciones internas de éste, más que de la concentración plasmática de las gonadotropinas (Richards, 1980). En la rata, el crecimiento del folículo dura 19 días, desde que pasa del estado de “reposo” hasta que culmina con la ovulación.

Esto indica que durante la vida del folículo en crecimiento se ve expuesto al menos a cuatro “picos” preovulatorios de gonadotropinas (Domínguez y col., 1991).



**Figura 2.** Esquema que muestra el desarrollo folicular señalando las diferentes estructuras que lo integran (Tomado y modificado de Welsch y Sobotta, 2008).

### Atresia folicular

La atresia folicular es un proceso característico de los vertebrados (Saidapur, 1978). El ovario de los mamíferos contiene folículos en varias etapas de desarrollo. En la mujer, del 50 al 75% de los folículos van a degenerar antes de llegar a la etapa de madurez (Gartner y Hiatt, 2007), mientras que en roedores es del 77% (Byskov, 1978; Hsueh y col., 1994). Después de la ovulación, las células tecales se transforman en células teco-luteínicas del cuerpo lúteo. Las células tecointersticiales de folículos atrésicos con antro, pasan a formar parte de la glándula intersticial. En cambio, las que rodean a los folículos preantrales, en las que no se ha producido la diferenciación celular y que entran en atresia, no forman parte de la glándula intersticial, ya que no poseen receptores a LH (Domínguez y col., 1991). El resto del folículo es fagocitado por macrófagos (Gartner y Hiatt, 2007).

La atresia se presenta en cualquier etapa del desarrollo folicular, desde la vida fetal hasta la vida adulta, donde la tasa más alta ocurre en folículos antrales pequeños; justo antes del desarrollo final del folículo (Domínguez y col., 1991; Van Voorhis, 1999). Durante el proceso de atresia, ocurre una serie de cambios morfológicos en el ovocito, en células de la granulosa y células de la teca (Hsueh y col., 1994).

En la rata se ha propuesto una clasificación de la atresia basándose en las alteraciones de las capas de células de la granulosa (Byskov, 1974). La atresia ocurre en tres fases progresivas:

- ☉ Fase 1: más del 20% de células de la granulosa de un folículo atrésico presenta picnosis debido a la fragmentación de ADN y se encuentran adyacentes a la cavidad antral. Como en un folículo sano, en esta fase de atresia la membrana basal se mantiene intacta (Bukovsky y col., 1984).
- ☉ Fase 2: en esta fase las células de la granulosa picnóticas son más abundantes. La membrana basal se fragmenta y como resultado los leucocitos comienzan a invadir el compartimiento de células de la granulosa (Bukovski y col., 1979). Se ha demostrado que los folículos en esta fase de atresia son invadidos por linfocitos T citotóxicos, lo cual sugiere que el sistema inmune participa tanto en la diferenciación como en la degeneración folicular (Bukovsky y col., 1984).
- ☉ Fase 3: los folículos están encogidos. La mayoría de los parámetros en esta fase son los mismos que se presentan en la fase 2, excepto que el porcentaje de células picnóticas es de sólo el 5% probablemente por la presencia de macrófagos (Daud, 1988).

## Ovulación

La ovulación es el evento dominante en el ciclo estral, y se presenta durante el estro (Ruiz, 1988). Consiste en la ruptura del folículo preovulatorio, que resulta en la expulsión del ovocito secundario detenido en la etapa de diploteno de la

metafase II de la meiosis, acompañado de células del cúmulo oóforo y la corona radiada (Espey, 1999; Carabatsos y col., 2002; Norris y col., 2009). En el ovario humano este proceso comienza 5 ó 6 días antes del pico preovulatorio de LH (Yen, 2001).

En la rata, la ovulación está determinada por la concentración de estradiol ovárico y los pulsos de secreción de GnRH y de gonadotropinas, los cuales se producen en determinadas horas y días del ciclo estral (Yen, 2001). La ovulación espontánea va a depender de la liberación de gonadotropinas, y no depende del apareamiento como en aquellas especies que ovulan de manera refleja o inducida. La rata es una especie poliéstrica, que repite su ciclo cada 4 ó 5 días a lo largo del año a menos que sea interrumpida por la preñez (Ruiz, 1988).

La ovulación sucede en la madrugada del estro, precedido por el pico preovulatorio de LH en la noche del proestro. Esta hormona inicialmente induce incremento en la concentración de esteroides ováricos (Ruiz, 1988) pero posteriormente la capacidad de síntesis de estrógenos por las células de la granulosa disminuye y la de  $P_4$  aumenta (Domínguez y col., 1991).

Antes de que se produzca la salida del ovocito hay edema en la teca interna y aumento de las prostaglandinas. Para que se produzca la ovulación son necesarios varios cambios en la pared del folículo y en las uniones entre las células de la granulosa y de la teca, que implican la ruptura de los desmosomas y de los nexos que presentan las células granulosas, así como la degradación de las fibras de colágeno, en respuesta a la disminución en la concentración de estrógenos en el líquido folicular (Domínguez y col., 1991).

La visualización endoscópica del ovario cerca de la ovulación revela un estigma cónico sobre la superficie del folículo protruyente que precede la ruptura (Yen, 2001).

Alternativamente, la formación del estigma y su ruptura pueden reflejar los efectos locales de las enzimas sobre los sustratos proteicos de la membrana basal. La presencia de inhibidores de las proteasas en el líquido antral inhibe la

ovulación. En la rata, el activador del plasminógeno, se localiza en altas concentraciones en las paredes foliculares ováricas justo antes de la ovulación. Este activador del plasminógeno, una proteasa sérica, estimula la conversión de plasminógeno en la enzima proteolítica activada, la plasmina. Esta a su vez activa la colagenasa, necesaria para la disolución de la membrana basal y el estroma folicular durante la ovulación. También se considera que el activador del plasminógeno puede estar involucrado en la disrupción de las uniones gap, y por ende, altera la comunicación entre el ovocito y el cúmulo celular circundante (Yen, 2001).

A la mitad del ciclo ovárico, la concentración de estrógenos incrementa y ello contribuye a que se presente el “pico” de LH y en menor magnitud el de FSH. Este es el estímulo que el folículo preovulatorio necesita para que se dé la ovulación. Posteriormente, se forma el cuerpo lúteo. Ya que después de la ruptura folicular, los capilares y los fibroblastos del estroma circundante proliferan y penetran la membrana basal. Esta rápida vascularización del cuerpo lúteo puede ser guiada por factores angiogénicos, algunos de los cuales son detectados en el líquido folicular. El factor de crecimiento vascular endotelial (EVGF) junto al factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) son agentes angiogénicos potenciales en el cuerpo lúteo. Las células de la granulosa se luteinizan y junto con las células tecointersticiales circundantes y la vasculatura dan origen al cuerpo lúteo (Yen, 2001).

Esta glándula endócrina es la mayor fuente de hormonas esteroides sexuales secretadas por el ovario durante la fase postovulatoria del ciclo (Vallcaneras y col., 2011). Un aspecto destacable de este evento consiste en la penetración de la membrana basal folicular por los vasos sanguíneos que proveen de proteínas de baja densidad (LDL) a las células de la granulosa (Yen, 2001).

En humanos, el receptor de LH se mantiene durante toda la vida del cuerpo lúteo. Otro potencial regulador de la función del cuerpo lúteo además de la LH, es el Factor de crecimiento insulínico I (IGF-I) que promueve la producción de  $E_2$  y  $P_4$  en las células luteínicas humanas. Los receptores de  $E_2$  y  $P_4$  también se han



localizado en el cuerpo lúteo y se ha postulado que estas hormonas también pueden regular su función (Yen, 2001).

En la rata la vida funcional del cuerpo lúteo es de aproximadamente de 4 días mientras que en la mujer, la expectativa de vida funcional es de aproximadamente 14 días. En caso de que el ovocito no sea fecundado, el cuerpo lúteo involuciona espontáneamente, y en el caso de la mujer es reemplazado por una cicatriz avascular conocida como cuerpo de albicans (Yen, 2001).

### Esteroidogénesis

Las células del folículo ovárico se encargan de secretar hormonas, entre ellas, las de naturaleza esteroide, proceso conocido como esteroidogénesis. Estas hormonas participan en la regulación de la función reproductiva, ya que su alteración puede repercutir en el desarrollo de patologías que conllevan a la infertilidad. Las hormonas esteroides ováricas no actúan de forma exclusiva en el ovario, ya que viajan por el torrente sanguíneo llegando a diversos tejidos y sistemas, por ejemplo, al sistema nervioso central, sistema cardiovascular, sistema músculo esquelético, sistema inmune, hígado, útero, tejido adiposo y cutáneo (Gore-Langton y Armstrong, 1994).

Los esteroides producidos por células de la granulosa influyen en la secreción de hormonas producidas en la teca y en la maduración meiótica del ovocito (Gore-Langton y Armstrong, 1994).

Las hormonas esteroides pueden ser clasificados con base a su estructura química o por su acción fisiológica principal. Dentro de las hormonas sexuales producidas por el ovario se conocen 3 clases: progestinas (gestágenos y progestágenos), andrógenos y estrógenos (Gore-Langton y Armstrong, 1994).

El sistema de clasificación químico relaciona a todos los esteroides con un complejo anillo principal, característico de la colastina compuesto por tres ciclohexanos y un ciclopentano (Gore-Langton y Armstrong, 1994).

Los esteroides ováricos según su principal función biológica se clasifican en tres grandes grupos: progestinas (C-21), andrógenos (C-19) y estrógenos (C-18):

- ☉ Estrógenos: la estrona y  $17\beta$ -estradiol, hacen referencia a la receptividad sexual (estro) en mamíferos hembras. La estrona fue el primer esteroide sexual identificado y el  $17\beta$ -estradiol es el esteroide más activo (Gore-Langton y Armstrong, 1994).
- ☉ Andrógenos: androstenediona y testosterona son precursores biosintéticos de los esteroides estrogénicos,  $17\beta$ -estradiol y estrona respectivamente, debido a que son fáciles de aromatizar (Gore-Langton y Armstrong, 1994).
- ☉ Progestinas: pregnenolona es la progestina más importante producida por las células de la teca interna ya que es la precursora de todas las hormonas sexuales. La progesterona es producida durante todo el desarrollo de los folículos, antes y después de la ovulación. Otro esteroide C-21 es la  $17\alpha$ -OH-progesterona, precursora inmediata de los andrógenos (Gore-Langton y Armstrong, 1994).

La comparación del contenido de hormonas esteroides entre la vena ovárica eferente y los vasos periféricos permitió distinguir entre los esteroides secretados por el ovario y aquellos producidos por las suprarrenales o por conversión periférica de precursores (Yen, 2001).

#### Teoría de la doble célula-doble hormona

El colesterol (*chole*, bilis y *stereos*, sólido) es el precursor inicial en la síntesis de hormonas esteroides (Yen, 2001). Las células con función esteroideogénica pueden obtener colesterol a partir de tres fuentes:

- ☉ Incorporándolo de la sangre a partir de lipoproteínas circulantes.
- ☉ Utilizando el colesterol almacenado bajo formas de esteres de colesterol.
- ☉ Sintetizándolo *de novo* a partir de acetato (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Botella, 1995).

La proteína implicada en el transporte de colesterol al interior de la mitocondria, es la proteína reguladora de la esteroidogénesis (StAR) (Yen, 2001).

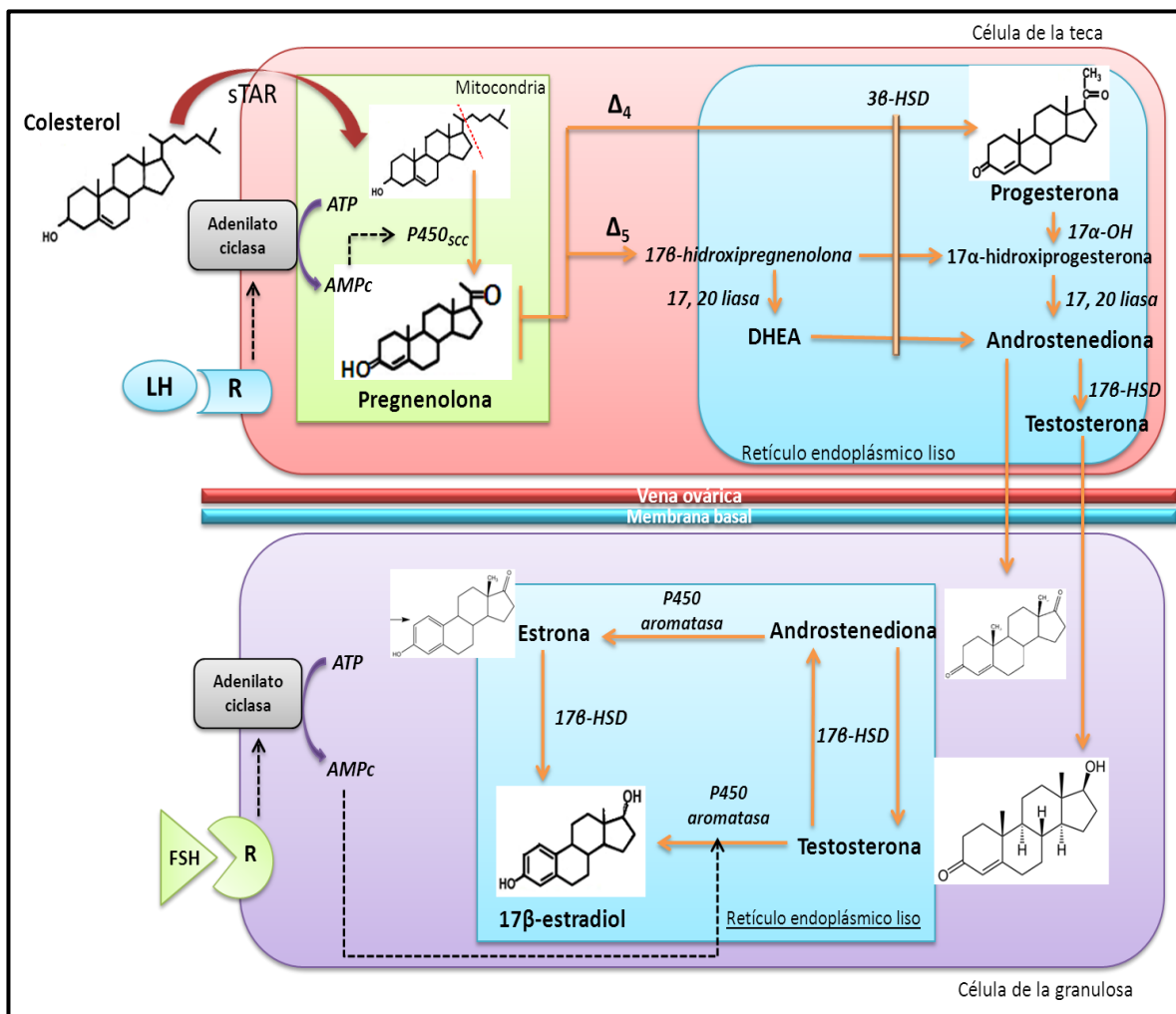
Las células de la teca presentan receptores a LH, la unión de la hormona a su receptor activa la síntesis de AMPc, el cual actúa como segundo mensajero. Este evento da lugar al primer paso de la síntesis de hormonas esteroides, que es la conversión de colesterol (esteroide de 27 carbonos) a pregnenolona (esteroide de 21 carbonos) (Figura 3). La reducción del número de carbonos se produce por oxidaciones catalizadas por enzimas de la familia de los citocromos P450. La primer enzima en actuar es la enzima P450<sub>scc</sub>, que se encuentra en la mitocondria de las células de la teca interna (Yen, 2001). Esta enzima corta la cadena lateral de 6 carbonos del colesterol transformándolo a pregnenolona (Gore-Langton y Armstrong, 1994).

A partir de la pregnenolona se producen diversas hormonas que se diferencian por seguir alguna de las siguientes rutas metabólicas

- ☉ Ruta  $\Delta 4$ : En ésta vía, la pregnenolona es convertida a progesterona por acción de la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $3\beta$ -HSD), enzima que se localiza en el retículo endoplásmico liso de las células tecales, granulosa y luteales. Generalmente, esta ruta se realiza en el cuerpo lúteo (Sánchez Criado, 1999).
- ☉ Ruta  $\Delta 5$ : Esta ruta, es utilizada en su mayoría por células de la teca y se lleva a cabo en el retículo endoplásmico liso. Las enzimas  $17\alpha$ -hidroxilasa y la  $17, 20$  liasa convierten la pregnenolona a dehidroepiandrosterona (DHE), que por actividad de la  $3\beta$ -HSD, es convertida en androstenediona. La  $17\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa ( $17\beta$ -HSD) transforma la androstenediona a testosterona (Sánchez Criado, 1999).

Una vez que los andrógenos (androstenediona o testosterona) son sintetizados por células de la teca interna se difunden a través de la membrana basal hacia las células de la granulosa, donde por actividad de las aromatasas son

convertidos a estrona o estradiol, respectivamente. Durante el curso de la síntesis de esteroides, las formas precursoras o intermedias pueden salir de las células e ingresar en la circulación, donde pueden ser detectadas y cuantificadas (Yen, 2001).



**Figura 3.** Biosíntesis de hormonas esteroides en el ovario, explicado a través de la “teoría de la doble célula-doble hormona”. Receptor (R), hormona luetinizante (LH), hormona estimulante del folículo (FSH), 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD), 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, Dihidroepiandrosterona (DHEA) (Tomado y modificado de Bremer, 2010).

## Etapas del desarrollo postnatal en la rata

La rata es utilizada como modelo experimental donde se puede evaluar las funciones reproductivas en un corto periodo de tiempo, gracias a que tienen un ciclo de vida de 2-3 años (Acuña y col., 2009). Varios de los mecanismos neuroendócrinos que se producen durante la maduración sexual en la rata, pueden ser extrapolados en el humano, por ejemplo, la similitud en el control de la secreción de la GnRH, la iniciación de la secreción de gonadotropinas, los componentes celulares de los circuitos de retroalimentación positiva, el desarrollo folicular y la secreción de la hormona de crecimiento en la pubertad (Becú-Villalobos, 1990).

En la rata, la apertura vaginal es la única señal externa que permite saber el comienzo de la función reproductiva. El inicio de la pubertad ocurre el día posterior a los picos preovulatorios de gonadotropinas. El desarrollo de los mecanismos involucrados en la reproducción se produce en un lapso corto de cinco semanas (Becú-Villalobos, 1990).

Con base en parámetros morfológicos y fisiológicos que se llevan a cabo en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, el desarrollo de la rata entre el nacimiento y la pubertad, se ha clasificado en 4 etapas (Ojeda y col., 1980):

- ☯ Etapa neonatal: abarca desde el nacimiento hasta el día 7 de vida y se caracteriza por la insensibilidad del ovario a las gonadotropinas. El crecimiento folicular se inicia en forma independiente a estas hormonas (Peter y col., 1970). Existen evidencias que señalan que la foliculogénesis depende de la inervación del ovario (Malamed y col., 1992). La retroalimentación de  $E_2$  no se establece claramente debido a la alta concentración de  $\alpha$ -feto proteína en suero, que se une a los estrógenos tornándolos biológicamente inactivos (Raynaud, 1973). Al final de esta etapa la concentración sérica de FSH empieza a aumentar y la de LH se mantiene baja. Entre el cuarto y quinto día comienzan a formarse los receptores a FSH y dos días después los de LH, lo cual hace evidente la

respuesta estrogénica del ovario a las gonadotropinas a partir de estos días. La FSH al unirse a su receptor, estimula la síntesis de aromatasas y con ello la producción de estradiol a partir de testosterona (Lamprecht y col., 1976).

☯ Etapa infantil: comprende del día 8 al 21 de vida.

Se caracteriza por concentraciones muy altas de FSH (Dohler y Wuttke, 1974; Mackinnon y col., 1976) que alcanza su máxima concentración a los 12 días de edad. Esto debido a la presencia de picos esporádicos de LH (Dohler y Wuttke, 1974; Mackinnon y col., 1976; Wuttke y col., 1980). Las concentraciones altas de FSH son fundamentales para el reclutamiento y crecimiento de los folículos que llegan a ovular en la pubertad (Hade y col., 1978; Ojeda y col., 1980).

A partir del día 15 de vida disminuye la FSH y desaparecen los picos de LH. Comienza a detectarse inhibina en suero, y la disminución de la  $\alpha$ -feto proteína condiciona un aumento de eficacia de la retroalimentación negativa del estradiol sobre las gonadotropinas (Becú-Villalobos, 1990).

☯ Etapa juvenil: inicia en el día 22 hasta el 32 de vida.

La concentración de FSH disminuye sensiblemente y en su comienzo, las concentraciones de LH son bajas y constantes. La LH comienza a secretarse en forma pulsátil (Andrews y Ojeda, 1981) y al final de la etapa, su concentración basal es mayor que en las etapas anteriores (Meijs-Roelofs y col., 1983), así como la amplitud de sus pulsos (Urbanski y Ojeda, 1983) que se producen durante la tarde, lo que establece un ritmo de secreción circadiano. A nivel ovárico se observa un aumento de receptores a LH (Smith-Withe y Ojeda, 1981), que junto con el patrón de secreción de la hormona se traduce en mayor esteroidogénesis (Becú-Villalobos, 1990).

El aumento gradual de la concentración de prolactina (PRL) y de la hormona del crecimiento (GH) facilita la acción estimulante de las gonadotropinas (Ojeda y col., 1980). En este momento se establece la retroalimentación positiva del estradiol sobre la secreción de LH (Ojeda y col., 1986).

- Etapa peripuberal: inicia el día 33 de vida y culmina con la primera ovulación. Se establece el ritmo circadiano de LH y de PRL. El incremento de la frecuencia de los pulsos de secreción de LH estimula la mayor producción de estradiol por parte de los ovarios. La concentración de estradiol produce una retroalimentación positiva sobre gonadotropinas (Urbanski y Ojeda, 1986). En el ovario se observa un máximo número de receptores para FSH y LH, lo que se traduce en mayor respuesta esteroideogénica (Ojeda y Urbanski, 1988). La concentración de E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> y T es mayor que en etapas anteriores (Mathews y col., 1987) y ello favorece la liberación de GnRH por parte del hipotálamo, la cual actúa sobre la adenohipófisis y estimula la liberación de FSH y LH, estas hormonas al ejercer su función sobre el ovario inducen la primera ovulación (Becú-Villalobos, 1990).

### Ciclo estral

El ciclo estral es regulado por mecanismos endócrinos y neuroendócrinos. La receptividad sexual en la mayoría de los vertebrados, excluyendo a algunos primates y a la especie humana, se restringe a periodos llamados ciclos estrales que se presentan rítmicamente. Durante el celo o estro, la hembra está fisiológicamente condicionada para recibir al macho y se presentan cambios estructurales en los órganos sexuales accesorios de la hembra. Los animales monoestrales o monoéstricos completan un solo ciclo de estro anualmente y un largo periodo de anestro que separa las épocas del celo. Los organismos poliestrales o poliéstricos completan dos o más ciclos anualmente si no se ven interrumpidos por la preñez (Ruiz, 1988).

Las ratas de laboratorio, ratones y los cobayos, son especies poliéstricas que repiten su ciclo durante el año sin grandes variaciones (Ruiz, 1988).

El ciclo estral se encuentra dividido en cuatro etapas: Proestro, Estro, Metaestro o Diestro I y Diestro II (Figura 4).

- ☯ Proestro: dura aproximadamente 12 horas (Suckow y col., 2006). Esta etapa anuncia el próximo celo y está caracterizada por la acción de la FSH, que actúa sobre el crecimiento y maduración de los folículos. Se caracteriza por el aumento en la secreción de estrógenos que van a sensibilizar al sistema nervioso central de tal manera que, la hipófisis secreta LH y estimule la ovulación.

En los roedores, la citología vaginal se caracteriza por la presencia de células epiteliales nucleadas (Ruiz, 1988).

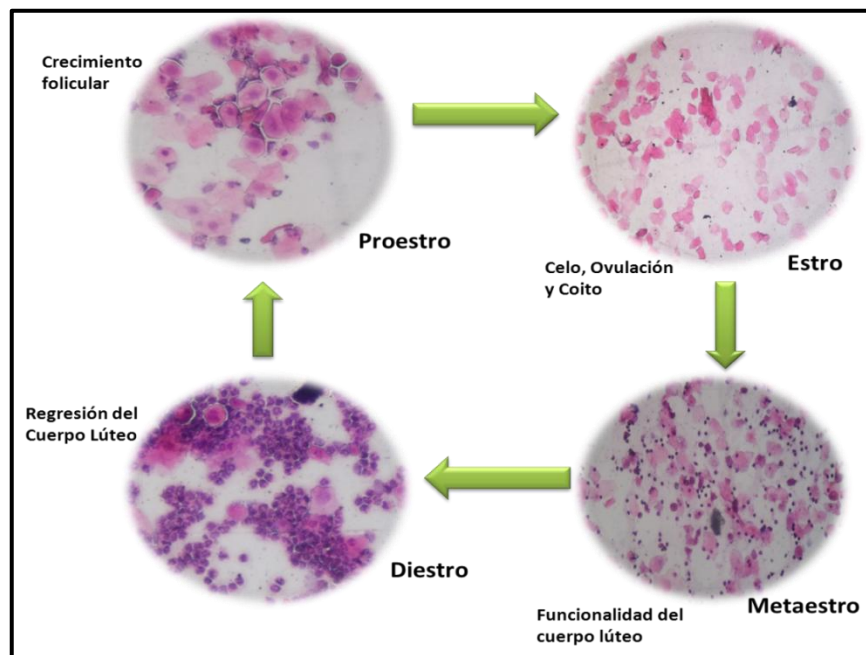
- ☯ Estro: tiene una duración de 12 horas aproximadamente (Suckow y col., 2006) y se caracteriza por tres eventos: el celo, la cópula y la ovulación. Durante esta etapa las hormonas predominantes son: la FSH, actuando sinérgicamente con un incremento muy marcado de la LH. Este estímulo endócrino se denomina “pico” de LH o “pico preovulatorio”. La hembra presenta un cambio de comportamiento para atraer al macho. En las ratas, el cambio de conducta comprende la vibración o temblor de las orejas y la lordosis como respuesta a la aproximación del macho. Una vez realizada la cópula o apareamiento y ya en la última parte del estro se presenta la ovulación, 36 a 38 horas después de la liberación preovulatoria de LH (Ganong, 1996; Geneser, 2000). Después de las 24 horas siguientes a la ovulación y la consecuente cópula, desaparece la conducta típica de celo de la hembra. El útero en esta etapa aumenta de tamaño progresivamente y se distienden debido a la acumulación de un líquido en su interior (líquido luminal). Gran parte de este líquido se pierde antes de la ovulación. En la mucosa vaginal se presentan repetidas mitosis y a medida que se acumulan nuevas células, las capas superficiales se hacen escamosas y cornificadas. Las células que se presentan en el frotis vaginal son cornificadas y con núcleo degenerado (Ruiz, 1988).
- ☯ Diestro: con una duración de 12 horas aproximadamente (Suckow y col., 2006), se caracteriza por la involución funcional y/o lisis de los cuerpos lúteos por lo que disminuye la progesterona circundante. El mecanismo de



involución o regresión del cuerpo lúteo en los roedores es un proceso rápido ya que es una especie donde el periodo de gestación dura 21 días. En esta etapa los cuernos uterinos se pueden observar pequeños y levemente contraídos. La pared vaginal presenta una mucosa delgada invadida de leucocitos, por lo que la citología vaginal muestra gran número de este tipo celular (Ruiz, 1988).

- ☉ **Metaestro:** dura aproximadamente 10 horas (Rodríguez, 1993). Es el periodo en que las concentraciones de estrógenos disminuyen y el cuerpo lúteo comienza a desarrollarse. La secreción de  $P_4$  aumenta gradualmente durante esta etapa (Cardinali y col., 1994). La mucosa vaginal entra en regresión y es invadida por leucocitos aun cuando todavía se encuentran células queratinizadas características del estro (Rodríguez, 1993).

En caso de que la hembra presente preñez, el resto del ciclo se interrumpe durante el periodo de gestación. El animal entrará nuevamente en un ciclo reproductor cuando finalice el estado de gestación o hasta la terminación de la lactancia de las crías (Ruiz, 1988).



**Figura 4.** Diagrama de flujo del ciclo estral (Tomado y modificado de Hafez y Hafez, 2000).

## Inervación ovárica

La inervación del ovario participa en la regulación del desarrollo folicular y la esteroidogénesis. Se clasifica en intrínseca y extrínseca. Dentro de la inervación extrínseca se encuentra la información simpática, parasimpática y la sensorial (Lawrence y Burden, 1980).

La inervación simpática está compuesta por un conjunto de neuronas dispuestas en distintas regiones:

1. Neuronas hipotalámicas: que controlan la actividad visceral.
2. Neuronas de la médula espinal: integran una variedad de reflejos originados por sensaciones viscerales de dolor o sensaciones de plenitud estomacal o intestinal, así como estimulaciones provenientes de receptores en los vasos sanguíneos y en las distintas vísceras.
3. Neuronas posganglionares de la cadena paravertebral: Reciben estímulos de las neuronas preganglionares a través de los ramos comunicantes blancos, compuestos por haces de fibras nerviosas que salen de la médula por los nervios de la raíz ventral, pero se separan de los nervios somáticos para entrar en los ganglios paravertebrales.
4. Neuronas posganglionares de los ganglios prevertebrales: Reciben fibras que solo cruzan los ganglios paravertebrales sin hacer sinapsis en las células nerviosas que se encuentran en ellos, viajando entonces directamente desde las neuronas preganglionares.

La inervación simpática deriva de cuerpos celulares del ganglio ovárico, el cual tiene su origen en la arteria ovárica y en cuerpos celulares del plexo renal y celíaco. Los nervios simpáticos que llegan al ovario son el nervio del plexo ovárico (NPO) y el nervio ovárico superior (NOS), se originan en el ganglio celíaco mesentérico superior (GCMS) y ambos transportan diversos neurotransmisores.

- ☉ El Nervio Ovárico Superior viaja junto al ligamento suspensorio e inerva vasos sanguíneos, células de la glándula intersticial y células de la teca. Los neurotransmisores que transcurren por este nervio son: Noradrenalina

(NA), Neuropeptido Y (NPY) y Péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Baljet y Drukker, 1979; Lawrence y Burden, 1980).

- ☉ El nervio de Plexo Ovárico se encuentra acompañado por la arteria ovárica e inerva principalmente la vasculatura del ovario (Lawrence y Burden, 1980). Los neurotransmisores que viajan por él son: sustancia P, NA y el péptido relacionado con el gen que codifica a la calcitonina (CGRP) (Aguado y Ojeda, 1984).

### Ganglio celíaco mesentérico superior

Es un complejo constituido por un aglomerado de unidades ganglionares separadas por fibras nerviosas, vasos capilares y septos de tejido conectivo (Sasahara y col., 2003). El ganglio celíaco en conjunto con el ganglio mesentérico y el aórtico renal forman parte del plexo celíaco, el cual se localiza cerca de la aorta subdiafragmática en la región celiaca (Sisu y col., 2008).

En la rata, los ganglios prevertebrales se organizan de manera diferente a otras especies. Estos ganglios prevertebrales se ubican en el abdomen a lo largo de la aorta y sus ramas (Figura 5).

Los ganglios prevertebrales son:

- ☉ Ganglio celíaco: forma parte de una masa de tejido conectivo y fibras nerviosas, las cuales forman el plexo celíaco (Miller y col., 1996). Recibe proyecciones de entrada por parte de la médula espinal y proyecta sus fibras postganglionares hacia varios órganos abdominales, incluyendo al páncreas y al hígado. La activación de estas fibras nerviosas incrementa de manera indirecta o directa la producción de glucosa (Vallcaneras y col., 2011). Está situado a cada lado del plano medio, entre la glándula suprarrenal y el origen del tronco celíaco, por delante de los pilares del diafragma. Por su lado externo reciben al nervio esplácnico; por el interno al vago posterior (Viso, 1998). Las células de este ganglio tienen

núcleo excéntrico con dos nucléolos, doble nucleolema y poros nucleares; en el citoplasma se encuentran vesículas del aparato de Golgi, vacuolas, mitocondrias, retículo endoplásmico y ribosomas libres (Vallcaneras y col., 2011).

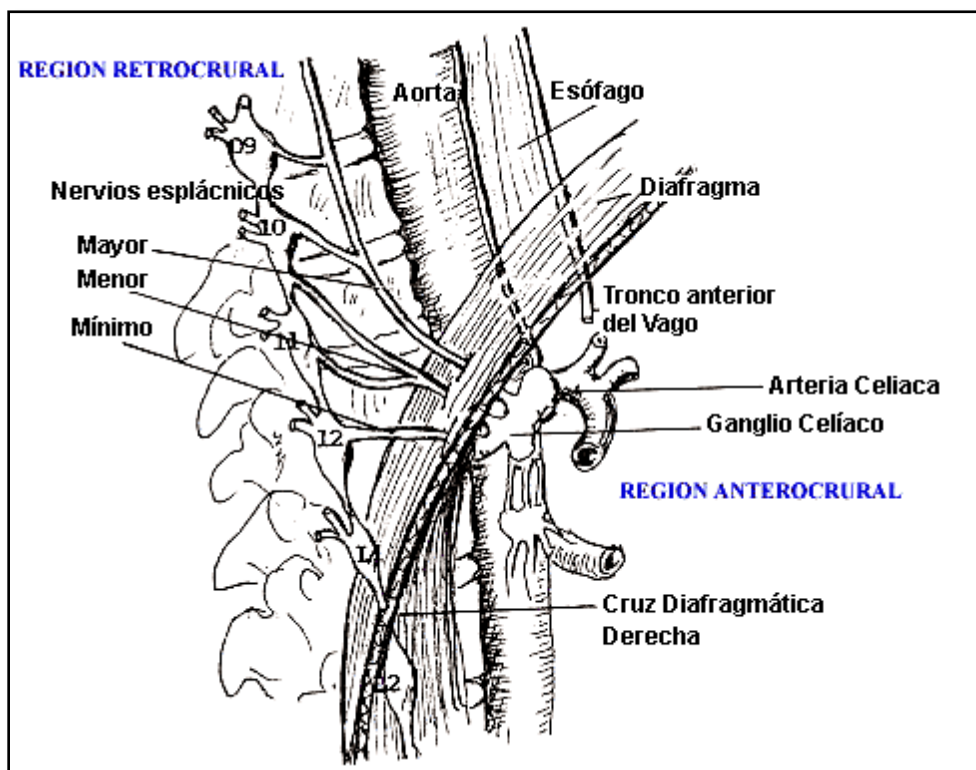
- ☯ Ganglio mesentérico superior: se encuentra ubicado en ambos lados del origen de la arteria mesentérica superior, Es el centro de integración de reflejos gastrointestinales ya que inerva el intestino delgado y el colon ascendente y transversal. No se conoce aún mucho de su estructura (Miller y col., 1996).
- ☯ Ganglio mesentérico inferior: inervado por los nervios espláncnicos lumbares y los mesentéricos inferiores, manda fibras posganglionares al colon descendente y sigmoide, recto, riñón, vejiga y órganos sexuales (Miller y col., 1996).
- ☯ Ganglio esplácnico: ubicado en los segmentos abdominales de los nervios espláncnicos mayores, en los ganglios inter-renales y en los ganglios mesentéricos inferiores (Miller y col., 1996).
- ☯ Ganglio aórtico renal: está situado respecto a la arteria renal, en la parte anterior e inferior, reciben filamentos del ganglio y plexo celíaco. Pueden haber uno o dos ganglios; uno superior y otro inferior. Este ganglio recibe al nervio esplácnico menor (Viso, 1998).

En estos ganglios se encuentran principalmente tres tipos de células:

- ☯ Neuronas pequeñas intensamente fluorescentes (SIF) (30-60 micrones) las cuales funcionan como interneuronas
- ☯ Células grandes o también llamadas noradrenérgicas (10-15 micrones) de tipo aferente
- ☯ Neuronas postganglionares (30-60 micrones) (Gibbins y col., 2003).

La rata cuenta con prominentes ganglios pareados en los nervios espláncnicos mayores, entre el ganglio celíaco y las cadenas simpáticas, pero aún no está claro qué órganos son abastecidos por las células nerviosas de estos ganglios (Quinson y col., 2001).

Las proyecciones de los ganglios prevertebrales simpáticos se organizan somatotópicamente. Los ganglios más rostrales son el esplácnico, celíaco y mesentérico superior, los cuales contienen neuronas que inervan todas las regiones del tracto gastrointestinal. Los ganglios mesentérico inferior y aórtico renal que se encuentran más caudalmente tienen neuronas que inervan la parte distal del intestino (Quinson y col., 2001). Todos estos ganglios se encuentran conectados entre sí por un gran número de fibras nerviosas (Viso, 1998).



**Figura 5.** Origen de los nervios espláncnicos. Situación retrocrural y anterocrural (Tomada y modificada de Viso, 1998).

### Biosíntesis y metabolismo de las monoaminas

La dopamina (DA), NA y adrenalina (A) son catecolaminas biogénicas que actúan en el sistema nervioso central como neurotransmisores u hormonas, también son importantes para mantener la homeostasis corporal en respuesta al estrés agudo y

crónico. La síntesis de estos neurotransmisores tiene lugar en la terminal nerviosa a partir de aminoácidos procedentes de la dieta (Mardomingo, 1994).

El precursor de todas las catecolaminas es el aminoácido L-tirosina, que proviene de dos fuentes: la alimentación y la síntesis hepática a partir de la fenilalanina, mediante la acción de la enzima fenilalanina hidroxilasa. La L-tirosina es convertida a L-dihidroxifenilalanina (L-dopa) por la enzima mitocondrial tirosina hidroxilasa (TH), que se encuentra en la médula suprarrenal, en el encéfalo y en los tejidos con inervación simpática. Este es un paso limitante en la síntesis y puede ser inhibida por análogos de la tirosina, como la  $\alpha$ -metiltirosina.

La L-dopa por acción de la enzima citoplásmica L-amino ácido descarboxilasa da origen a L-dihidroxifeniletilamina (DA). La DA puede seguir dos vías: 1) la oxidación por la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa, la cual resulta en la formación de NA; 2) que se metabolice a ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) a través de la monoamino oxidasa (MAO).

La NA puede biotransformarse en A por acción de la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa (Figura 6 A) (Jubiz, 1998).

La NA y la A son catabolizadas a través de dos enzimas: la catecol O-metiltransferasa (COMT) y la MAO, las cuales se encuentra en el hígado y en los riñones. La degradación de NA da lugar a la normetanefrina, mientras que la A forma la metanefrina. Por acción de la COMT y de la MAO, la NA puede llegar a degradarse hasta formar 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) en el espacio sináptico (Jubiz, 1998; Nestler y col., 2001).

Existen diversos tipos de receptores para NA. Los alfa, que a nivel del tallo cerebral, intervienen en respuestas inhibitorias de la liberación del neurotransmisor, en virtud de que funcionan como autorreceptores en las membranas presinápticas, y los receptores beta que facilitan la liberación de NA.

Ambos tipos de receptores también se encuentran en la membrana postsináptica (Alcaraz, 2001).

Los principales núcleos noradrenérgicos se localizan en el tallo cerebral en una zona que recibe el nombre de *locus coeruleus*, participan en la regulación de la vigilia y de ciertos estados afectivos. La disminución en la NA cerebral se relaciona con la depresión (Alcaraz, 2001).

El contenido de catecolaminas varía según el tejido en el cual son determinadas. En la médula suprarrenal, el cociente de A/NA es de 4:1, mientras que en las terminaciones nerviosas es de 1:1. Los feocromocitomas son tumores que se encuentran en la médula suprarrenal y secretan altas cantidades de catecolaminas (Jubiz, 1988).

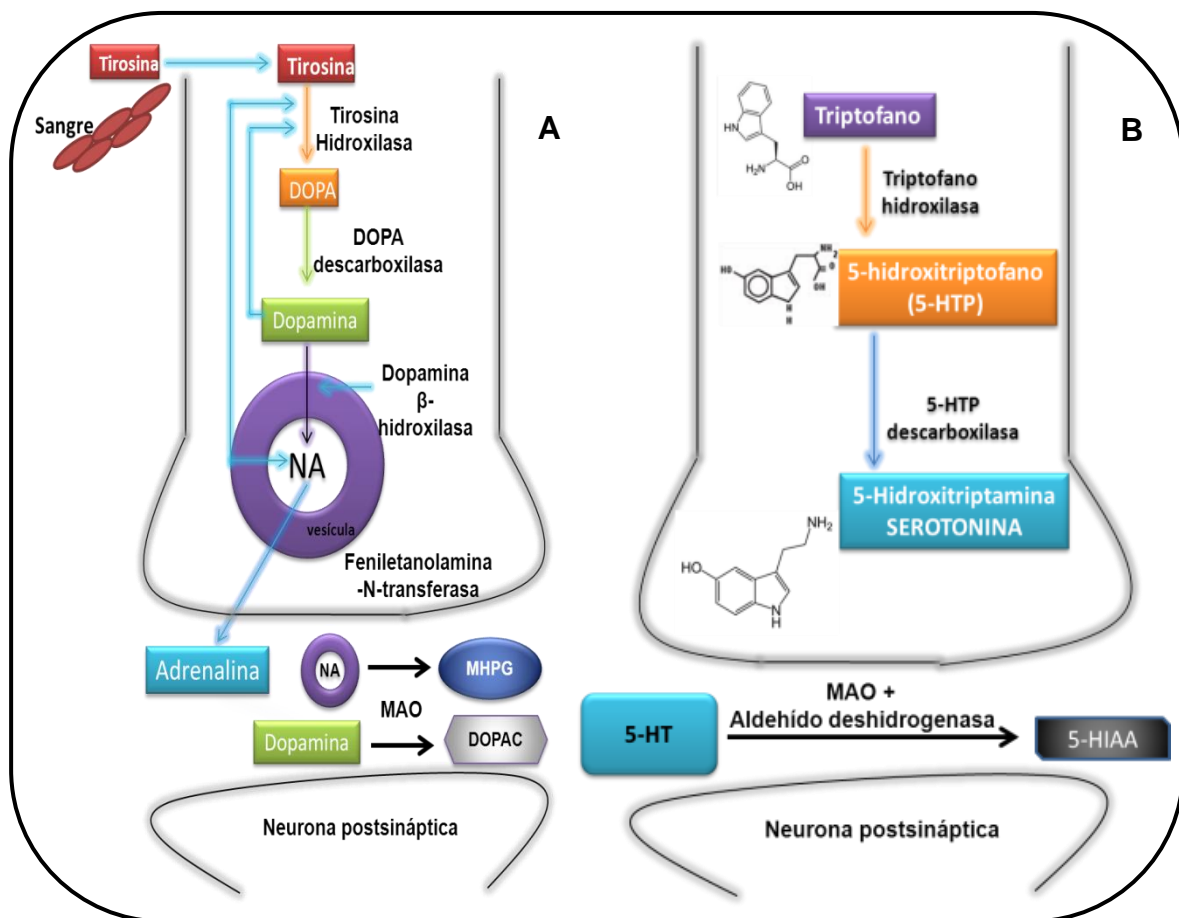
#### Biosíntesis de Serotonina (5-HT)

La 5-HT o 5-hidroxitriptamina es una amina que se localiza principalmente en el sistema nervioso central, donde actúa como neurotransmisor, también se encuentra en el tracto gastrointestinal y en las plaquetas. La serotonina es liberada por estímulos nerviosos, químicos y mecánicos. Los receptores para la serotonina son el 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub>, los cuales son receptores acoplados a proteínas G, con excepción de los 5-HT<sub>3</sub> que son inotrópicos. La serotonina tiene la capacidad de intervenir en la sensibilidad al dolor y el sueño, produce vasoconstricción en el cerebro y en las vísceras (Ahumada y col., 2002).

La Síntesis de la 5-HT se da a partir del aminoácido L-triptófano, el cual es transportado al cerebro a través de la barrera hematoencefálica, es captado por la célula y se oxida mediante la enzima triptófano hidroxilasa, la cual, junto con el cofactor tetrahidrobiopterina y el oxígeno, convierte el triptófano en 5-hidroxitriptofano (5-HTP). El 5-HTP es descarboxilado por la L-aminoácido descarboxilasa pasando a 5-hidroxitriptamina (Figura 6 B). La 5-HT se almacena en vesículas que la protegen y evitan su degradación (Nestler y col., 2001). La 5-HT es catabolizada en el espacio sináptico por la MAO y la aldehído

deshidrogenasa dando como producto la formación del ácido 5-hidroindolacético (5-HIAA) principal metabolito de 5-HT (Florez y col., 1992; Nestler y col., 2001).

En el sistema nervioso central las neuronas serotoninérgicas sintetizan su propia 5-HT y la enzima triptófano hidroxilasa constituye el marcador específico de dichas neuronas con la técnica inmunohistoquímica. La 5-HT se libera en el espacio sináptico mediante despolarización y entrada de calcio en la membrana presináptica. Una vez liberada, una parte de la misma actúa sobre los receptores postsinápticos, otra difunde al espacio extracelular y otra parte es recapturada por la membrana presináptica. La recaptura es inhibida por determinados fármacos fundamentalmente los antidepresivos (Mardomingo, 1994).



**Figura 6. A Biosíntesis de catecolaminas y B Biosíntesis de Serotonina** (Tomado y modificado de Brown, 1994).



## Síndrome de ovario poliquístico (SOPQ)

El síndrome del ovario poliquístico (SOPQ) es la patología más frecuente de mujeres en edad reproductiva (Morán, 2006), afectando del 6 al 10% de ellas (Goodarzi y col., 2011).

Si bien, la patología fue descrita hace más de medio siglo por Stein y Levental se desconoce aún con certeza su origen (Yen, 2001). Actualmente, para diagnosticar el SOPQ es necesario que se presenten dos de las tres siguientes características: 1) anovulación, 2) hiperandrogenismo clínico o bioquímico y 3) ovarios quísticos (Morán, 2006). Dos de tres mujeres con la patología también presentan disfunciones metabólicas, lo cual incrementa el riesgo de desarrollar diabetes *mellitus* tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (Goodarzi y col., 2011).

Las funciones reproductivas están reguladas por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Yen, 2001). La alteración en alguno de estos componentes desencadena que los demás se vean modificados. En aproximadamente el 70% (Goodarzi y col., 2011) de las mujeres con SOPQ se presenta una irregularidad hipotalámica, la cual consiste en un incremento en la frecuencia de los pulsos de secreción de (GnRH), lo cual genera mayor liberación de LH pero no de FSH, dando como resultado una disociación en la relación LH:FSH (Morán, 2006).

Existen diversas hipótesis para explicar el origen del SOPQ, entre ellas se encuentran las siguientes:

- ☉ Hipótesis hipotalámica: plantea un defecto neuroendócrino primario dado por el aumento en la frecuencia y la amplitud de los pulsos de GnRH, lo que da como resultado alteraciones en la secreción de gonadotropinas, y en el ovario la sobreproducción de andrógenos y anovulación (Matalliotakis y col., 2006).
  
- ☉ Hipótesis de la insulina: un defecto único en la acción de la insulina conlleva a la hiperinsulinemia. Se sugiere que la insulina remeda la acción de la LH

lo que resulta en el exceso de la secreción de andrógenos y anovulación (Matalliotakis y col., 2006).

- ⊗ Hipótesis del ovario: establece un defecto primario en la sobre expresión del complejo enzimático P450c17 y de la enzima 3 $\beta$ -HSD, los cuales participan en la producción de andrógenos en células de la teca. La sobreexpresión de estas enzimas ocasiona el incremento en la secreción de andrógenos, lo que conlleva a la anovulación (Bremer, 2010).

El exceso de andrógenos es considerado por muchos investigadores como la principal característica del SOPQ, ya que del 80-85% de mujeres con la patología presentan hiperandrogenismo clínico (Goodarzi y col., 2001).

En el SOPQ el hiperandrogenismo y la hiperinsulinemia, derivada de la resistencia a la insulina, alteran la señalización parácrina intraovárica, lo que se traduce en la hipertrofia en células de la teca. La consecuente detención del desarrollo folicular en mujeres con la patología está acompañada por irregularidades en el ciclo menstrual, anovulación y la acumulación de pequeños folículos antrales ubicados en la periferia del ovario, conduciendo a la morfología poliquística típica (Morán, 2006).

En el 70% de las mujeres con la patología aumentan los pulsos y la frecuencia en que se secreta la LH (Lobo, 1991), de manera que la relación LH:FSH es de 2:1. La concentración desproporcionada de FSH observada en mujeres con SOPQ altera el desarrollo folicular, ya que para que se dé la foliculogénesis es necesario un aumento en la concentración de FSH del 30% con respecto a la de LH (Yen, 2001).

Aunado al desorden endócrino a principios de la década de los 90's se postula que el SOPQ es el resultado de una mayor actividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario, esto se apoya en el hecho de que la eliminación bilateral del NOS, principal fuente de inervación simpática, restablece la ovulación y la morfología ovárica (Barria y col., 1993; Lara y col., 1993).

## Modelos de inducción del SOPQ

Durante muchos años se han desarrollado modelos animales para determinar la etiología de este síndrome. Entre los modelos más utilizados incluyen a la rata tratada con esteroides sexuales en diferentes etapas del desarrollo. Sin embargo, debido a la heterogeneidad del síndrome (Azziz y col., 2009) es difícil establecer un modelo que reproduzca tanto la alteración del eje hipotálamo-hipófisis-ovario como de los factores metabólicos (Franks, 1995). Por ello, en la investigación sobre la etiología del SOPQ se busca los modelos que reproduzcan las características más cercanas a lo reportado en la mujer con la patología.

Los roedores son los animales más utilizados como modelo biológico para estudiar el SOPQ, por su tamaño, el corto lapso de vida, un índice de reproducción alto y por sus diversas líneas genéticas (Danni y Donna, 2012).

La inducción del síndrome se puede lograr mediante la administración de productos farmacéuticos, la exposición a luz constante y la aplicación de tecnología transgénica (Singh, 2005).

Dentro de los modelos más utilizados para inducir la patología mediante fármacos se encuentran los siguientes:

### Andrógenos

El hiperandrogenismo es la manifestación primaria del SOPQ. Una de las hipótesis sobre la etiología de la patología es que la exposición a un exceso de andrógenos en los primeros años de vida conduce a que la mujer manifieste el síndrome en la edad adulta (Parker y Mahesh, 1976).

En la rata, se puede inducir la patología a través de implantes o inyecciones diarias de dehidroepiandrosterona (DHEA), propionato de testosterona (TP) o 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT). Los resultados que se obtienen de estos modelos en cuanto a la concentración de hormonas y la morfología ovárica son diversos (Singh, 2005). Con algunos modelos de inducción las características del SOPQ

son temporales y dependen de la administración del andrógeno elegido (Danni y Donna, 2012).

Los animales androgenizados presentan aumento en el peso corporal provocando no solo la inducción del síndrome, sino también desordenes metabólicos, como lo son la resistencia a la insulina y diabetes *mellitus* tipo 2, por lo que este modelo es utilizado para conocer mejor la relación que tiene la obesidad con el SOPQ (Danni y Donna, 2012).

### Estrógenos

La administración de estrógenos como benzoato de estradiol o VE a ratas hembras durante la etapa infantil conduce a la aciclicidad y ovarios anovulatorios polifoliculares en la edad adulta de los animales (Mahajan, 1988).

El estrógeno más utilizado para inducir la patología en la rata es el VE, la administración de 2 mg del fármaco provoca dentro de las 8 semanas posteriores a la inyección, alteraciones en los pulsos de secreción de la GnRH, desajuste en el almacenamiento y liberación de LH y bajas concentraciones de E<sub>2</sub> (Brawer y col., 1986; Lara y col., 1993; Krishna, 2005).

### Antiprogestinas

La administración de una antiprogestina como la mifepristona (RU486) provoca que la rata presente más de 8 días consecutivos en la etapa de estro, dando como resultado el bloqueo de la ovulación, cornificación vaginal persistente y útero balonado. RU486 incrementa la concentración de LH, PRL, T y E<sub>2</sub>, mientras que disminuye la concentración de FSH en suero. Los ovarios presentan quistes y folículos en diferentes grados de atresia (Sánchez-Criado y col., 1993).

### Exposición a luz constante

La rata expuesta a luz constante desarrolla anovulación crónica asociada con ovarios poliquísticos. La intensidad, duración y las características espectrales de la

luz van a determinar la velocidad a la que la anovulación se produce (Lambert, 1975).

Varios estudios reportan que la concentración de LH de ratas expuestas a luz constante no tiene modificaciones, mientras que la concentración de FSH y  $P_4$  son bajas, y la de  $E_2$  aumenta con respecto a un animal testigo (Takeo, 1984).

La ovulación espontánea en ratas implica el control de un reloj neuroendócrino. Los picos de gonadotropinas que inducen la ovulación son controladas por el ciclo luz-oscuridad. Cuando los animales están expuestos a luz constante durante un periodo de 24 horas, el fotoperiodo de luz-oscuridad desaparece y esto contribuye a la inducción del SOPQ (Weber y Adler, 1979).

Los mecanismos subyacentes asociados con la anovulación crónica en ratas expuestas a luz constante no se entienden completamente. Se postula que el sistema nervioso simpático se activa debido a un estrés continuo provocado por la exposición a la luz constante (Singh, 2005).

La anovulación crónica y el desarrollo del SOPQ en ratas expuestas a luz constante se debe a la disminución de la producción de melatonina secretada por la glándula pineal en las primeras horas de la fase de oscuridad (Krishna, 2005). Además de la glándula pineal, la piel puede estar relacionada en el desarrollo de la anovulación crónica en ratas sometidas a luz constante (Krishna, 2005), ya que se ha descrito un sistema serotoninérgico y melatoninérgico cutáneo en la rata, el hámster y el humano (Semak y col., 2004).

#### Exposición a estrés por frío

Observaciones clínicas sugieren que el estrés es un factor importante en el desarrollo del SOPQ (Lobo, 1991), si bien como factor único no participa en la etiología de la patología, se sugiere que puede ser un elemento importante para que se modifique la secreción de neurotransmisores centrales implicados en la regulación de los pulsos de secreción de GnRH y las funciones reproductivas (Dorfman y col., 2003).

El estrés no solo altera la secreción de neurotransmisores, sino también incrementa el tono simpático que inerva al ovario, del cual se sabe que participa en el desarrollo y mantenimiento del SOPQ. Razón por la cual, se ha utilizado el modelo de la rata sometida estrés por frío para reproducir las características presentadas en la mujer con la patología (Paredes y col., 1998; Araya y col., 2004).

El estrés por frío incrementa la actividad de los nervios simpáticos, evaluado por el aumento en la concentración de NA ovárica, ésta hiperactividad se asocia con cambios en la homeostasis del organismo, alteraciones en el comportamiento sexual, la formación de quistes ováricos y cambios en la concentración de hormonas esteroides. Por lo que se utiliza este modelo en la investigación de la etiología del síndrome (Araya y col., 2004).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Actualmente se ha incrementado la presencia del SOPQ en mujeres jóvenes, su incidencia se ha asociado a factores hormonales, ambientales y genéticos. El cuadro que caracteriza al síndrome es el hiperandrogenismo, la disminución en la frecuencia ovulatoria e incluso su ausencia, y la poliquistosis ovárica. Estas alteraciones pueden desencadenar daños metabólicos que complican aún más la patología. Para estudiar la etiología del síndrome se han utilizado diversos modelos experimentales, en los que se pretende reproducir las alteraciones endócrinas que caracterizan a la mujer.

Se ha sugerido que la formación de los quistes ováricos es antecedida por el incremento en la actividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario, y que se originan en el GCMS. Para analizar si ésta hiperactividad neural se produce independientemente del inductor empleado, en el presente estudio se analizó en la rata adulta, el efecto de la administración de una dosis de VE en la etapa infantil, o la respuesta al estrés por frío, cuando se inicia en la etapa juvenil, sobre la respuesta ovulatoria, la concentración de  $P_4$ , T y  $E_2$  y la actividad del GCMS, evaluada por la concentración de monoaminas, y por el número de neuronas marcadas por el TB.

## **HIPÓTESIS**

Si el desarrollo del SOPQ es el resultado de la mayor actividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario, y esta depende del inductor, entonces la respuesta ovárica entre el modelo del animal inyectado con VE y el sometido a estrés por frío será diferente.

## **OBJETIVO GENERAL**

Comparar en la rata los efectos que tiene el tratamiento con VE o la exposición a estrés por frío, sobre la respuesta del ovario y del ganglio celiaco mesentérico superior

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Comparar los efectos que tiene el tratamiento con VE o la exposición a estrés por frío en el desarrollo del SOPQ, sobre el inicio de la pubertad y el patrón del ciclo estral.
- Analizar los efectos que tiene el tratamiento con VE o la exposición a estrés por frío, sobre la respuesta ovulatoria espontánea y la dinámica del crecimiento folicular.
- Comparar en los dos modelos de inducción del síndrome, la concentración de progesterona, testosterona y estradiol en suero.
- Analizar los efectos que tiene el tratamiento con VE o la exposición a estrés por frío en el desarrollo del SOPQ, sobre la concentración de monoaminas y sus metabolitos en el ovario y en el GCMS.
- Determinar en el GCMS el número de neuronas marcadas en los dos modelos experimentales.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### Animales

Se utilizaron ratas hembras de la cepa CII-ZV, mantenidas en condiciones de bioterio: iluminación de 14 h luz por 10 h de oscuridad, temperatura de 22°C ± 2°C. Agua y comida disponible todo el tiempo. En todos los casos se siguió lo establecido por la Ley Mexicana de Protección Animal para el uso de animales de experimentación (NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

El día de nacimiento se consideró como el día 0 de vida, al día siguiente las ratas fueron sexadas. En cada caja fueron colocadas 5 hembras y 1 macho, con el fin de evitar alteraciones en la maduración del sistema nervioso (Salas y col., 1991). Los animales fueron destetados a los 24 días de vida.

### Inducción del SOPQ

Cuando los animales cumplieron 10 días de vida se asignaron al azar en alguno de los siguientes grupos experimentales, cada uno de ellos consistió de 10 animales.

#### *Ratas tratadas con valerato de estradiol*

A estos animales se les administró 2 mg de VE (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo. USA) (Brawer y col., 1978) disuelto en 0.1mL de aceite de maíz (vehículo) vía intraperitoneal (i.p). A partir de la administración del fármaco se monitoreó el día en que se produjo la canalización de la vagina y se inició la toma diaria de frotis vaginal.

#### *Ratas tratadas con vehículo*

Estas ratas fueron inyectadas i.p con 0.1 mL de Vh, esto para descartar posibles alteraciones provocadas por el vehículo en las funciones ováricas y en la concentración de monoaminas y sus metabolitos.

### *Ratas sometidas a estrés por frío*

Para este tratamiento se utilizaron ratas en etapa juvenil de 24 días de edad, las cuales se mantuvieron 3 horas diarias de lunes a viernes en un horario de 8 a 11 am en un cuarto frío a temperatura constante de 4°C, por un lapso de 8 semanas hasta el momento del sacrificio. Estas son las condiciones que se reportan para inducir el SOPQ (Bernuci y col., 2008).

### *Ratas sin tratamiento*

Se utilizó un último grupo como testigo absoluto, al cual no se le dispuso ningún tipo de tratamiento.

### Monitoreo del ciclo estral

Posterior a la edad en que las ratas canalizaron vagina se hizo el seguimiento de su ciclo estral mediante un frotis vaginal durante 2 ciclos completos. El frotis se reanudó dos semanas antes de que fueran sacrificadas.

### Inyección de True Blue

Para analizar el número de neuronas activas en el GCMS, se utilizaron otros grupos de animales inyectados con VE o expuestos al estrés por frío, con sus respectivos grupos testigo. Cuando los animales alcanzaron la edad de 76 días de vida, se les realizó una incisión i.p por donde se expuso el ovario izquierdo o derecho y se inyectó en la bursa 3 µL de True Blue (TB) (Sigma, St. Louis Missouri, USA) disuelto en agua destilada. Se esperó 5 minutos para reintroducir el ovario a la cavidad abdominal, esto para evitar que el TB se disperse por todo el organismo. Todos los animales con TB fueron puestos en una cámara de luz fluorescente para confirmar que el trazador no se salió de la bursa, tal y como ya se ha reportado (Morán y col., 2008). Los animales que presentaron fluorescencia fuera del ovario se descartaron para este estudio.

### Autopsia

Todos los grupos experimentales fueron sacrificados aproximadamente a los 80 días de edad en el día del estro, entre las 12:00 y 13:00 del día. En los grupos donde se realizó la inyección del trazador retrógrado en la bursa

ovárica, la autopsia se realizó por perfusión. En el resto de los grupos experimentales se realizó por decapitación.

#### *Autopsia por decapitación*

Se colectó la sangre en un tubo de ensaye. Se extrajeron el GCMS, los ovarios, el útero y las adrenales. Todos los órganos fueron pesados en una balanza analítica con una sensibilidad de 0.01 mg. El GCMS y los ovarios de 5 ratas se guardaron en un ultracongelador a -70°C para posteriormente cuantificar por HPLC la concentración de NA, DA, 5-HT y sus metabolitos. Los ovarios de otras tres ratas por grupo se utilizaron para el análisis morfométrico.

#### *Autopsia por perfusión*

Los animales a los que se les inyectó en bursa el TB fueron anestesiados con una inyección i.p. de 40 mg/kg de pentobarbital sódico, fueron perfundidos vía intracardiaca con 250 mL de solución salina al 0.9% fría, posteriormente se inyectaron 250 mL de paraformaldehído al 4%. Después de la perfusión se extrajeron el GCMS y los ovarios. Se colocaron en solución fijadora por aproximadamente 18 horas, posteriormente se colocaron en un medio crioprotector de sacarosa al 10, 20 y 30% sucesivamente. Posteriormente se realizaron cortes seriados de 20 µm de ganglio y de ovario, esto con ayuda de un criostato a temperatura de -20 °C. Todos los cortes fueron analizados con ayuda de un microscopio de fluorescencia, identificando el número de células positivas a TB. Se obtuvieron imágenes con ayuda de una cámara digital (Optronics 603000, USA) y fueron analizadas con el software KS-300 Imaging System 3.0 (Carl ZeissVisionGmbH, Germany).

#### Cuantificación de ovocitos liberados

Los oviductos se separaron de los ovarios y con ayuda de un microscopio estereoscópico, se observó y cuantificó el número de ovocitos liberados, por cada ovario.

#### Valoración de la dinámica folicular

Al momento de la autopsia los ovarios fueron fijados en solución de Bouin por 24 horas, se deshidrataron en alcohol al 70 y 96%, se incluyeron en parafina.

Posteriormente se realizaron cortes histológicos de manera seriada a 10  $\mu\text{m}$  de grosor y fueron teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina.

Para la determinación del diámetro folicular, se midió con ayuda de un ocular micrométrico (de 1/100 divisiones) el diámetro mayor ( $D_1$ ) y el perpendicular a éste ( $D_2$ ), que corresponden a la distancia de membrana basal a membrana basal. El diámetro promedio ( $D_p$ ) se determinó solo en folículos que presentaron núcleo y nucléolo bien definidos y se calculó con la relación:  $D_p = (D_1 + D_2)/2$ .

La dinámica folicular se evaluó mediante la proporción de folículos sanos y atrésicos. Se consideraron folículos atrésicos aquellos que presentaron al menos una de las siguientes características: picnosis nuclear de células de la granulosa, descamación de éstas en la cavidad antral y engrosamiento de la capa de células de la teca.

#### Cuantificación de monoaminas y su metabolito en GCMS y Ovario

La concentración de monoaminas y sus metabolitos, se cuantificó en el ganglio y en los ovarios de los animales de los diferentes grupos experimentales, por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), tal y como se ha realizado en nuestro laboratorio (Morales y col., 2010). Los ganglios y ovarios se homogeneizaron en 500  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) al 0.1 N, fueron centrifugados a 12,500 rpm, a 4°C durante 30 minutos; el sobrenadante fue filtrado a través de filtros de celulosa regenerada de tamaño de poro 0.2  $\mu\text{m}$ ; se inyectó 20  $\mu\text{L}$  del filtrado al sistema de cromatografía.

El equipo de HPLC se compone de una bomba isocrática (modelo L-250, Perkin Elmer), una válvula de inyección (Reodine modelo 7125 con capacidad de 20  $\mu\text{L}$ ), una precolumna de sílica (3.5 cm x 4.6 mm) y una columna C18 de fase reversa (25 cm x 4.6 mm) conectada a un detector electroquímico amperométrico LC-4C (BionaticalSystem Inc. USA) acoplado a un inyector Nelson 1020 (Perkin Elmer). La concentración de monoaminas y sus metabolitos fueron expresados en pg/mg de ganglio o de ovario.

El equipo de HPLC identifica automáticamente el neurotransmisor, en este caso NA, DA, 5-HT y sus metabolitos, se compara el tiempo de retención de un estándar y realiza el cálculo de su concentración mediante la comparación del área bajo la curva de las muestras problema, con el área del estándar del neurotransmisor.

#### Cuantificación de hormonas esteroides en suero

Las concentraciones plasmáticas de P<sub>4</sub>, T y E<sub>2</sub>, fueron cuantificadas por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) de fase sólida, mediante reactivos comerciales Coat-A-Count (DiagnosticProducts, Los Angeles, CA, USA).

En tubos de polipropileno que ya contienen el anticuerpo específico: anti-progesterona-I o anti-estradiol-I se adicionó 100 µL de la muestra problema, en el caso de los tubos que contuvieron anti-testosterona-I se adicionó 50 µL de la muestra. En todos los casos, se adicionaron 1 mL de la hormona marcada con I<sup>125</sup>. Para facilitar la reacción, la mezcla se agitó en un vortex durante un minuto y se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. Luego se decantaron las muestras, se removieron el exceso de líquido y se determinó la concentración de hormona en la muestra problema con la ayuda de un contador de rayos gamma (modelo Cobra 5005, Packard <sup>TM</sup>), en función de las cuentas por minuto y una curva de calibración. La concentración de P<sub>4</sub> se expresó en ng/mL, mientras que la T y E<sub>2</sub> en pg/mL en suero.

La cuantificación hormonal se realizó en el Laboratorio de Hormonas Esteroides del Departamento de Biología de La Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

#### Análisis estadístico

Los resultados del peso corporal, el peso de los órganos y el contenido de monoaminas y sus metabolitos en GCMS y ovario, se analizaron por la prueba de Análisis de Varianza Multifactorial (ANOVA) seguida de la prueba de *Tukey-Kramer*.

Para hacer la comparación de dos grupos se utilizó la prueba “*t*” de *Student*.

La edad de apertura vaginal y el número de ovocitos liberados fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la prueba de U de Mann-Whitney.

La tasa de animales ovulantes se analizó por la prueba de  $J_i^2$ . Se consideraron significativas las diferencias cuya probabilidad fue igual o menor a 0.05.

## RESULTADOS

Efecto de la administración de VE o la exposición a estrés por frío sobre la actividad ovárica y del GCMS.

### Apertura vaginal y primer estro vaginal

En los animales tratados con VE se observó un adelanto en la edad de apertura vaginal y un retraso en la presencia del primer estro. Mientras que en los animales expuestos a estrés por frío no se modificó el inicio de la pubertad, con respecto a su grupo control (Tabla 1).

	<b>Edad de apertura vaginal (Días)</b>	<b>Primer estro vaginal <sup>1</sup></b>
<b>Vh</b>	37.3 ± 1.1	1.5 ± 1.2
<b>VE</b>	19.7 ± 0.6*	11.1 ± 2.8*
<b>TA</b>	41.5 ± 0.9	2.8 ± 1.4
<b>Estrés</b>	40.1 ± 0.6	2.1 ± 1.0

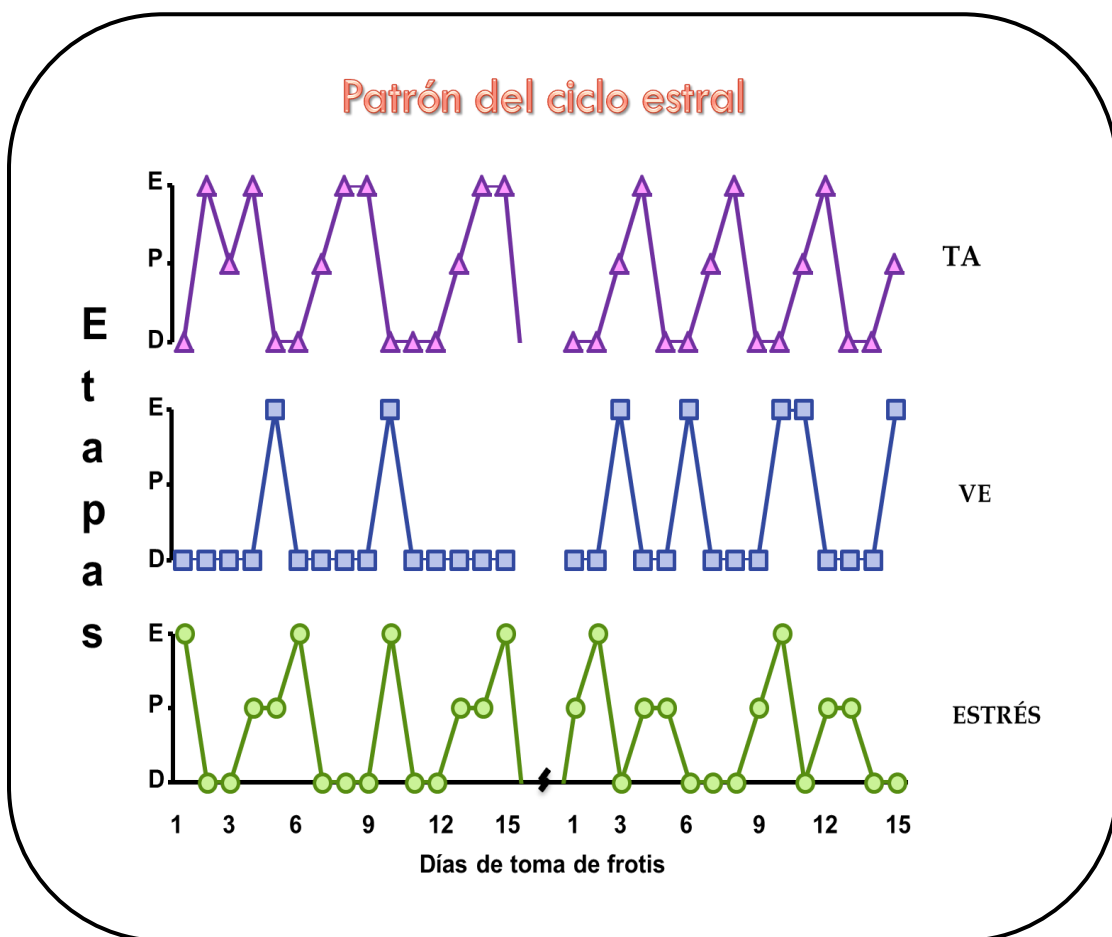
<sup>1</sup>Días transcurridos entre la apertura vaginal y la presencia del primer estro vaginal  
\*p < 0.05 vs. Vh (prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de U de Mann-Whitney).

**Tabla 1.** Media ± e.e.m de la edad de la apertura vaginal (días) y del primer estro vaginal de animales testigo absoluto (TA) o inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), o expuestos a los 24 días de edad a estrés por frío, durante 8 semanas.

## Ciclo estral

La administración del vehículo no modificó el patrón del ciclo estral, comparado con el grupo de animales testigo absoluto (datos no mostrados). En las hembras tratadas con VE se observó alteración en el ciclo estral, donde predominó la presencia de diestro con algunos estros, mientras que los animales sometidos a estrés por frío se observó la presencia de dos días seguidos en proestro (Figura 7).

**Figura 7.** Patrón representativo del **ciclo estral** de animales testigo absoluto (TA) o inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), o expuestos a los 24 días de edad a estrés por frío, durante 8 semanas. Todos los animales fueron sacrificados alrededor de los 80 días de edad, al presentar un estro vaginal.





### Tasa de Animales Ovulantes

La tasa de animales ovulantes disminuyó de manera significativa en los animales tratados con VE con respecto a su grupo control, mientras que los animales expuestos a estrés por frío no presentan cambios en este parámetro (Tabla 2).

<b>TASA DE ANIMALES OVULANTES</b>			
	<b>Ovario</b>		<b>Ambos Ovarios</b>
	<b>Izquierdo</b>	<b>Derecho</b>	
<b>Vh</b>	11/12	10/12	12/12
<b>VE</b>	1/10•	2/10•	2/10•
<b>TA</b>	7/9	9/9	9/9
<b>Estrés</b>	6/10	8/10	9/10

•p<0.05 vs. Vh (prueba de Fisher).

**Tabla 2.** Proporción de **animales ovulantes por el ovario izquierdo, el ovario derecho o ambos ovarios** de animales testigo absoluto (TA) o inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), o expuestos a los 24 días de edad a estrés por frío, durante 8 semanas. Todos los animales fueron sacrificados alrededor de los 80 días de edad al presentar un estro vaginal.

### Número de ovocitos liberados

Sólo dos de las hembras inyectadas con VE ovularon con un número de ovocitos alto por parte del ovario derecho. En los animales sometidos a estrés no se observaron modificaciones en la liberación de los ovocitos liberados con respecto al grupo TA (Tabla 3).

<b>NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS</b>			
	<b>Ovario</b>		<b>Ambos Ovarios</b>
	<b>Izquierdo</b>	<b>Derecho</b>	
<b>Vh</b>	5.1±0.7	4.8±0.6	8.7±0.9
<b>VE</b>	(4)	(10, 9)	
<b>TA</b>	6.3±0.8	5.7±0.8	10.6±1.5
<b>Estrés</b>	5.0±0.8	5.1±0.8	7.9±1.0

Los números entre paréntesis indican el número de ovocitos liberados por el ovario de los animales ovulantes

**Tabla 3.** Media ± e.e.m. del **número de ovocitos liberados** por **el ovario izquierdo, el ovario derecho o por ambos ovarios** de animales testigo absoluto (TA) o inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), o expuestos a los 24 días de edad a estrés por frío, durante 8 semanas. Todos los animales fueron sacrificados alrededor de los 80 días de edad, al presentar un estro vaginal.

### Número de folículos en desarrollo

En las hembras inyectadas con VE el número de folículos totales y sanos fue menor que en los animales con Vh, mientras que la atresia aumentó. Los animales sometidos a estrés por frío presentaron menor número de folículos sanos y mayor número de folículos atrésicos con respecto al grupo TA. Entre los dos modelos de inducción del síndrome se observa que la cantidad de folículos sanos es mayor en los animales sometidos a estrés por frío y el número de folículos con atresia es mayor en las hembras con VE. El número total de folículos no fue diferente entre los dos modelos (Tabla 4).

	<b>NÚMERO DE FOLÍCULOS</b>		
	<b>Totales</b>	<b>Sanos</b>	<b>Atrésicos</b>
<b>Vh</b>	250.0 ± 14.5	239.5 ± 14.2	10.5 ± 1.0
<b>VE</b>	157.3 ± 14.1♣	10.5 ± 6.7♣	146.8 ± 14.4♣
<b>TA</b>	162.0 ± 25.2	153.0 ± 25.3	9.0 ± 0.4
<b>Estrés</b>	136.0 ± 11.2	67.3 ± 12.2♦★	68.3 ± 8.3♦★

♣ p< 0.05 vs. Vh (prueba de "t" de Student); ♦ p< 0.05 vs. TA (prueba de "t" de Student); ★ p< 0.05 vs. VE (prueba de "t" de Student)

**Tabla 4.** Media ± e.e.m. del **número de folículos totales, sanos y atrésicos** de animales inyectados a los 10 días de edad con valerato de estradiol (VE), o expuestos a los 24 días de edad a estrés por frío, durante 8 semanas. Todos los animales fueron sacrificados alrededor de los 80 días de edad, al presentar un estro vaginal.

### Número de folículos sanos

En los animales inyectados con VE el número de folículos sanos pequeños y medianos disminuyó con respecto al grupo con Vh, mientras que el número de folículos preovulatorios no se modificó. En los animales sometidos a estrés por frío el número de folículos pequeños, medianos y preovulatorios fue menor con respecto a su grupo control. El número de folículos pequeños fue menor en los animales inyectados con VE que en las hembras expuestas a estrés por frío, mientras que el número de folículos medianos y preovulatorios no se modificó entre ambos grupos (Tabla 5).

	NÚMERO DE FOLÍCULOS SANOS		
	Pequeños ≤ 350	Medianos 351-499	Preovulatorios ≥ 500
<b>Vh</b>	230.8 ± 14.1	7.25 ± 1.7	1.5 ± 0.6
<b>VE</b>	9.8 ± 6.3♣	0.3 ± 0.3♣	0.5 ± 0.3
<b>TA</b>	141.3 ± 25.1	8.5 ± 1.0	3.3 ± 0.5
<b>Estrés</b>	65.2 ± 12.2★♦	1.8 ± 0.7♦	0.3 ± 0.2♦

♣ p < 0.05 vs. Vh (prueba de "t" de Student); ♦ p < 0.05 vs. TA (prueba de "t" de Student); ★ p < 0.05 vs. VE (prueba de "t" de Student)

**Tabla 5.** Media ± e.e.m del número de folículos sanos pequeños, medianos y preovulatorios de animales inyectados a los 10 días de edad con valerato de estradiol (VE), o expuestos a los 24 días de edad a estrés por frío, durante 8 semanas. Todos los animales fueron sacrificados alrededor de los 80 días de edad, al presentar un estro vaginal.

### Número de folículos atrésicos

En los animales inyectados con VE el número de folículos pequeños y medianos fue mayor que el grupo tratado con Vh. En los animales sometidos a estrés por frío el número de folículos pequeños atrésicos fue mayor que en los ovarios de las ratas TA. Al comparar los dos modelos, se observa que en los animales inyectados con VE el número de folículos pequeños es mayor que en las hembras estresadas por frío. El número de folículos medianos y preovulatorios atrésicos no fue diferente entre ambos modelos (Tabla 6).

	<b>NÚMERO DE FOLÍCULOS ATRÉSICOS</b>		
	<b>Pequeños ≤ 350</b>	<b>Medianos 351-499</b>	<b>Preovulatorios ≥ 500</b>
<b>Vh</b>	9.3 ± 0.5	1.0 ± 0.6	0.3 ± 0.3
<b>VE</b>	142.5 ± 14.0♣	4.0 ± 0.9	0.3 ± 0.3
<b>TA</b>	6.0 ± 1.1	2.8 ± 0.6	0.3 ± 0.3
<b>Estrés</b>	64.3 ± 7.8★♦	3.8 ± 0.6	0.2 ± 0.2

♣ p < 0.05 vs. Vh (prueba de "t" de Student); ♦ p < 0.05 vs. TA (prueba de "t" de Student); ★ p < 0.05 vs. VE (prueba de "t" de Student)

**Tabla 6.** Media ± e.e.m. del **número de folículos atrésicos pequeños, medianos y preovulatorios** de animales inyectados a los 10 días de edad con valerato de estradiol (VE), o expuestos a los 24 días de edad a estrés por frío, durante 8 semanas. Todos los animales fueron sacrificados alrededor de los 80 días de edad, al presentar un estro vaginal.

### Peso relativo de los ovarios

El peso corporal de todos los grupos experimentales no se modificó, por lo que se decidió reportar los pesos de los órganos como peso relativo.

En los animales tratados con VE el peso del ovario izquierdo y derecho fue estadísticamente menor respecto al grupo con Vh, lo que se reflejó en la masa ovárica. La exposición a estrés por frío no modificó el peso de los ovarios con respecto a su grupo control. El peso del ovario izquierdo de animales expuestos al estrés por frío fue mayor que en los animales inyectados con VE (Tabla 7).

<b>PESO RELATIVO DE LOS OVARIOS</b>					
	n	PC	Ovario		Masa Ovárica
			Izquierdo	Derecho	
<b>Vh</b>	12	232.2 ± 5.0	12.6 ± 0.6	13.3 ± 0.6	26.0 ± 1.0
<b>VE</b>	10	223.9 ± 4.6	10.9 ± 0.6♦	11.6 ± 0.8•	22.5 ± 1.2♦
<b>TA</b>	9	224.7 ± 5.5	14.3 ± 1.0	12.2 ± 0.8	26.9 ± 1.1
<b>Estrés</b>	10	213.6 ± 5.9	13.5 ± 0.6♣	13.1 ± 0.4	26.6 ± 0.6

♦p<0.05 vs. Vh; ♣p<0.05 vs. VE (prueba de "t" de Student).

**Tabla 7.** Media ± e.e.m. del **peso corporal (PC)** y el **peso relativo** (mg/100 g p. c.) **del ovario izquierdo, ovario derecho y masa ovárica** de animales testigo absoluto (TA) o inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), o expuestos a los 24 días de edad a estrés por frío, durante 8 semanas. Todos los animales fueron sacrificados alrededor de los 80 días de edad, al presentar un estro vaginal.

### Peso relativo de útero y adrenales

La administración del VE o el estrés inducido por frío, no modificó el peso del útero ni de las adrenales con respecto a sus grupos control (Tabla 8).

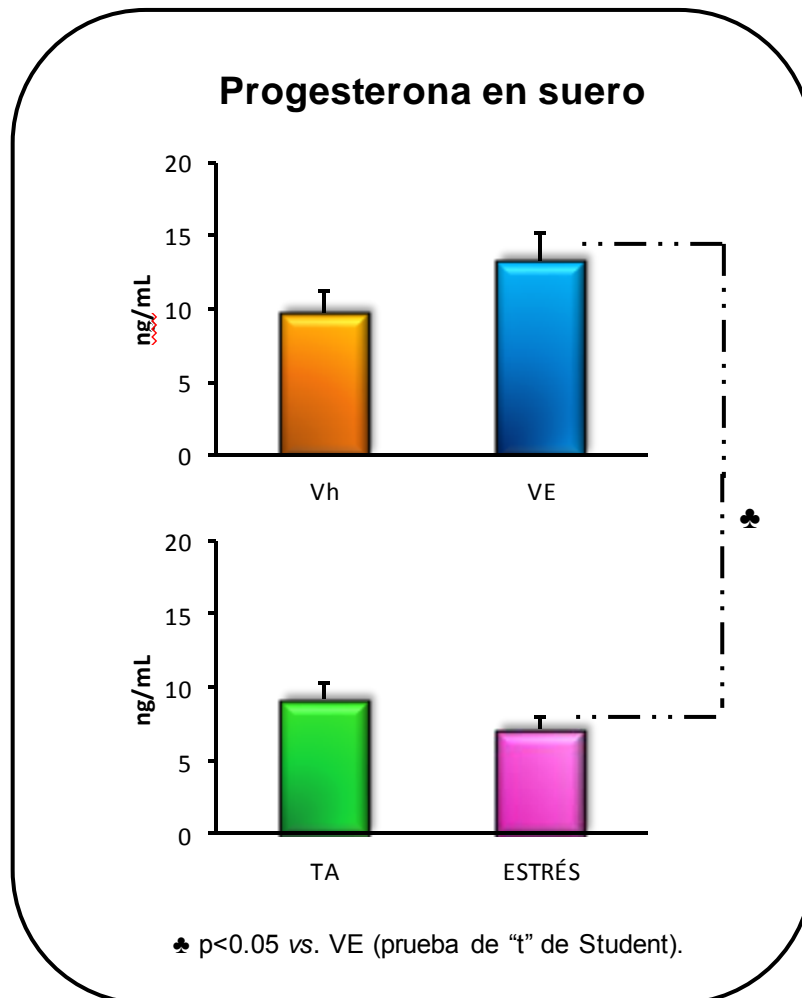
<b>PESO RELATIVOS DE LOS ÓRGANOS</b>					
	n	Útero	Adrenal		Masa adrenal
			Izquierda	Derecha	
<b>Vh</b>	12	128.0 ± 3.8	10.2 ± 0.8	10.2 ± 0.4	19.5 ± 1.1
<b>VE</b>	10	127.8 ± 6.2	10.3 ± 0.5	10.0 ± 0.4	20.2 ± 0.8
<b>TA</b>	9	138.3 ± 7.7	10.5 ± 0.2	9.9 ± 0.3	20.4 ± 0.4
<b>Estrés</b>	10	135.9 ± 3.3	11.4 ± 1.0	10.8 ± 0.4	21.1 ± 1.7

**Tabla 8.** Media ± e.e.m. del **peso relativo** (mg/100 g p.c.) **del útero, adrenal izquierda, adrenal derecha y masa adrenal** de animales testigo absoluto (TA) o inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), o expuestos a los 24 días de edad a estrés por frío, durante 8 semanas. Todos los animales fueron sacrificados alrededor de los 80 días de edad, al presentar un estro vaginal.

### Concentración de Progesterona en suero

En los animales tratados con VE o sometidos a estrés por frío no se modificó la concentración plasmática de P<sub>4</sub>, respecto a sus grupos testigo. Al hacer la comparación entre los dos modelos de inducción del síndrome del ovario poliquístico, se observó que la concentración de P<sub>4</sub> es menor en los animales sometidos a estrés (Figura 8).

**Figura 8.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de **Progesterona en suero** de animales testigo absoluto (TA) o inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), o expuestos a los 24 días de edad a estrés por frío, durante 8 semanas. Todos los animales fueron sacrificados alrededor de los 80 días de edad, al presentar un estro vaginal.

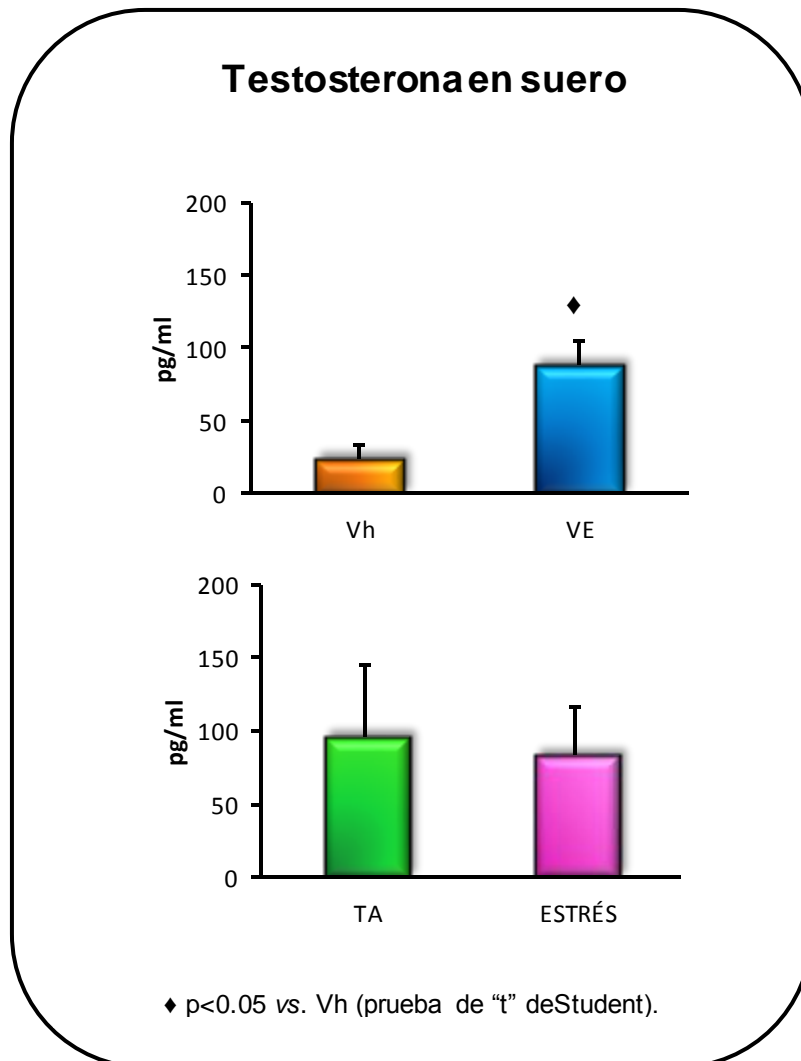




### Concentración de Testosterona en suero

En los animales tratados con VE incrementó la concentración de T, respecto al grupo con Vh. En las hembras sometidas a estrés por frío, no se modificó la concentración de la hormona. Entre el grupo con VE y el de estrés, la concentración de la hormona fue semejante (Figura 9).

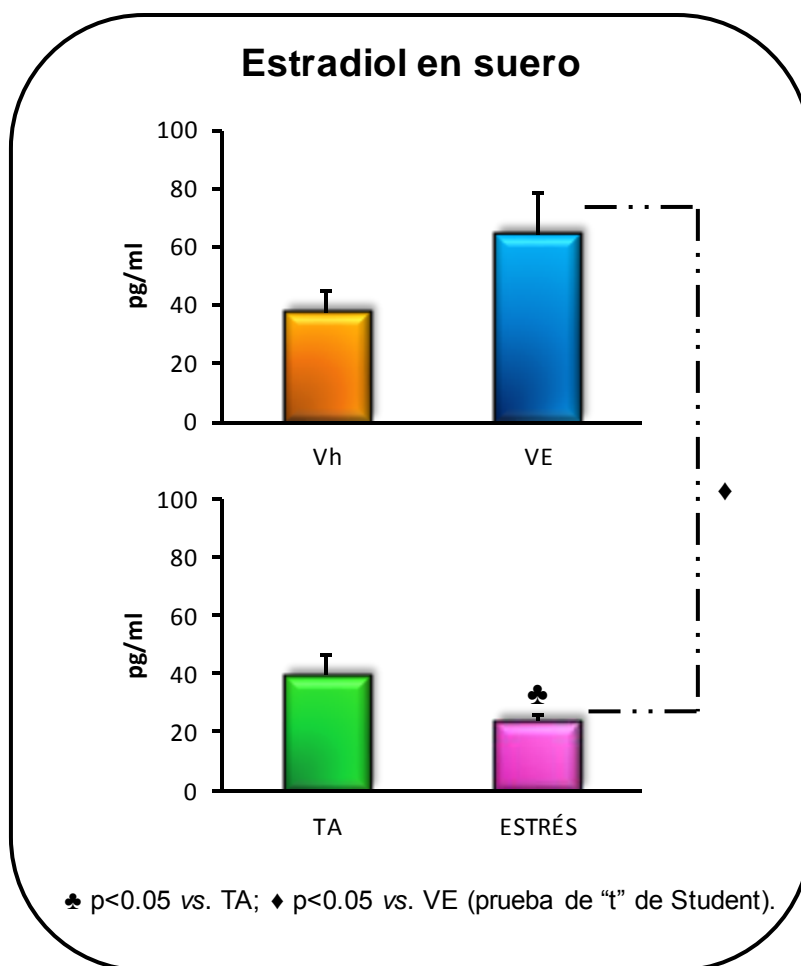
**Figura 9.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de **Testosterona en suero** de animales testigo absoluto (TA) o inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), o expuestos a los 24 días de edad a estrés por frío, durante 8 semanas. Todos los animales fueron sacrificados alrededor de los 80 días de edad, al presentar un estro vaginal.



### Concentración de Estradiol en suero

El aumento en la concentración de la hormona en los animales inyectados con VE no fue estadísticamente significativo, respecto a su grupo testigo. La exposición al estrés por frío disminuyó significativamente la concentración de E<sub>2</sub> con respecto al grupo TA (Figura 10). Al comparar los dos modelos de inducción del SOPQ se observó que la concentración de E<sub>2</sub> es menor en los animales con estrés por frío.

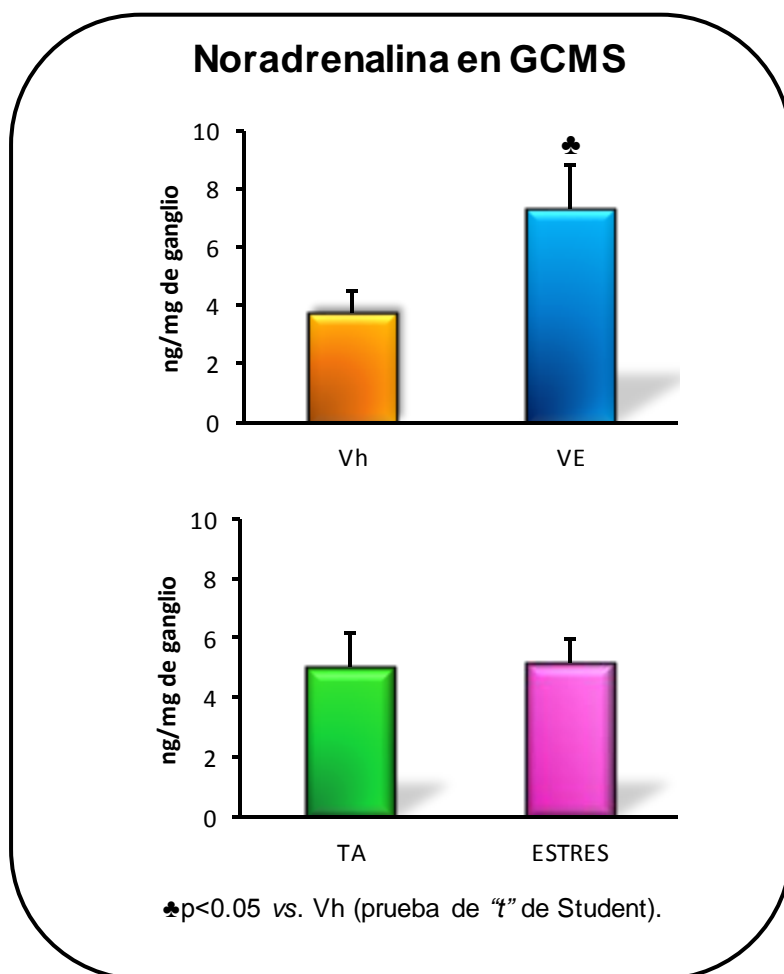
**Figura 10.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de **Estradiol en suero** de animales testigo absoluto (TA) o inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), o expuestos a los 24 días de edad a estrés por frío, durante 8 semanas. Todos los animales fueron sacrificados alrededor de los 80 días de edad, al presentar un estro vaginal.



## Concentración de Noradrenalina en el Ganglio Celiaco Mesentérico Superior

En los animales tratados con VE la concentración de NA en GCMS fue mayor, respecto a su grupo testigo. La concentración del neurotransmisor no se modificó en los animales sometidos a estrés por frío con respecto a su grupo control. La comparación entre los dos modelos mostró que la concentración de la amina es similar (Figura 11). La sensibilidad del método no permitió cuantificar la concentración del metabolito de NA.

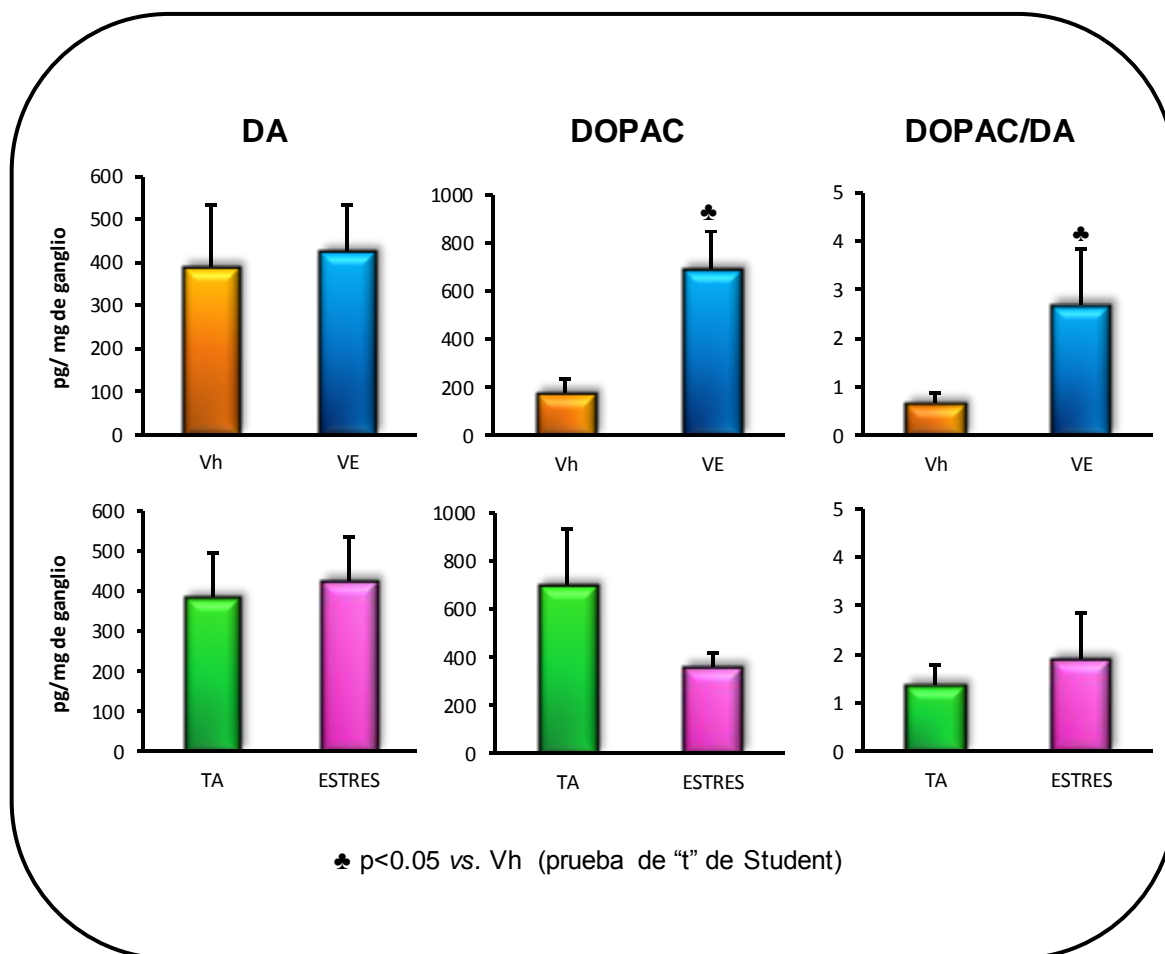
**Figura 11.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de **Noradrenalina (NA) en ganglio celiaco mesentérico superior (GCMS)** de animales testigo absoluto (TA) o inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), o expuestos a los 24 días de edad a estrés por frío, durante 8 semanas. Todos los animales fueron sacrificados alrededor de los 80 días de edad, al presentar un estro vaginal.



### Concentración de DA y DOPAC en el Ganglio Celiaco Mesentérico Superior

La administración de VE o el estrés inducido por la exposición al frío no modificó la concentración de DA en el GCMS. En el grupo con VE incrementó la concentración del metabolito y la actividad de las neuronas respecto al grupo con Vh (Figura 13).

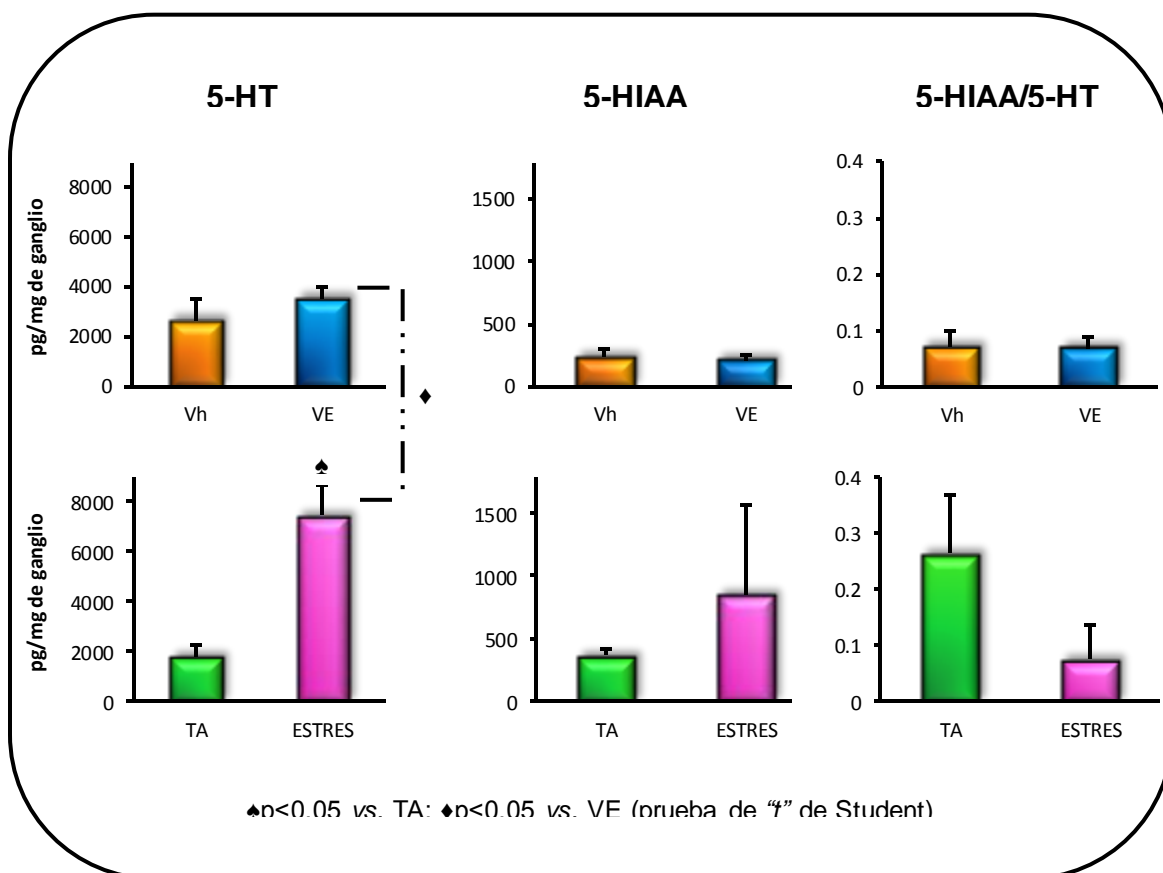
**Figura 13.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de **DA**, **DOPAC** y la relación del metabolito entre su neurotransmisor en el ganglio celiaco mesentérico superior (GCMS) de animales testigo absoluto (TA) o inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), o expuestos a los 24 días de edad a estrés por frío, durante 8 semanas. Todos los animales fueron sacrificados alrededor de los 80 días de edad, al presentar un estro vaginal.



## Concentración de 5-HT y 5-HIAA en el Ganglio Celiaco Mesentérico Superior

En los animales inyectados con VE, la concentración de 5-HT no mostró cambios significativos con respecto al grupo vehículo. En los animales expuestos a estrés por frío aumentó la concentración de 5-HT con respecto a su grupo control. Al hacer la comparación entre los dos modelos de inducción, las hembras estresadas presentaron la mayor concentración de 5-HT. La concentración de 5-HIAA y la relación 5-HT/5-HIAA no se modificó en ningún grupo experimental (Figura 15).

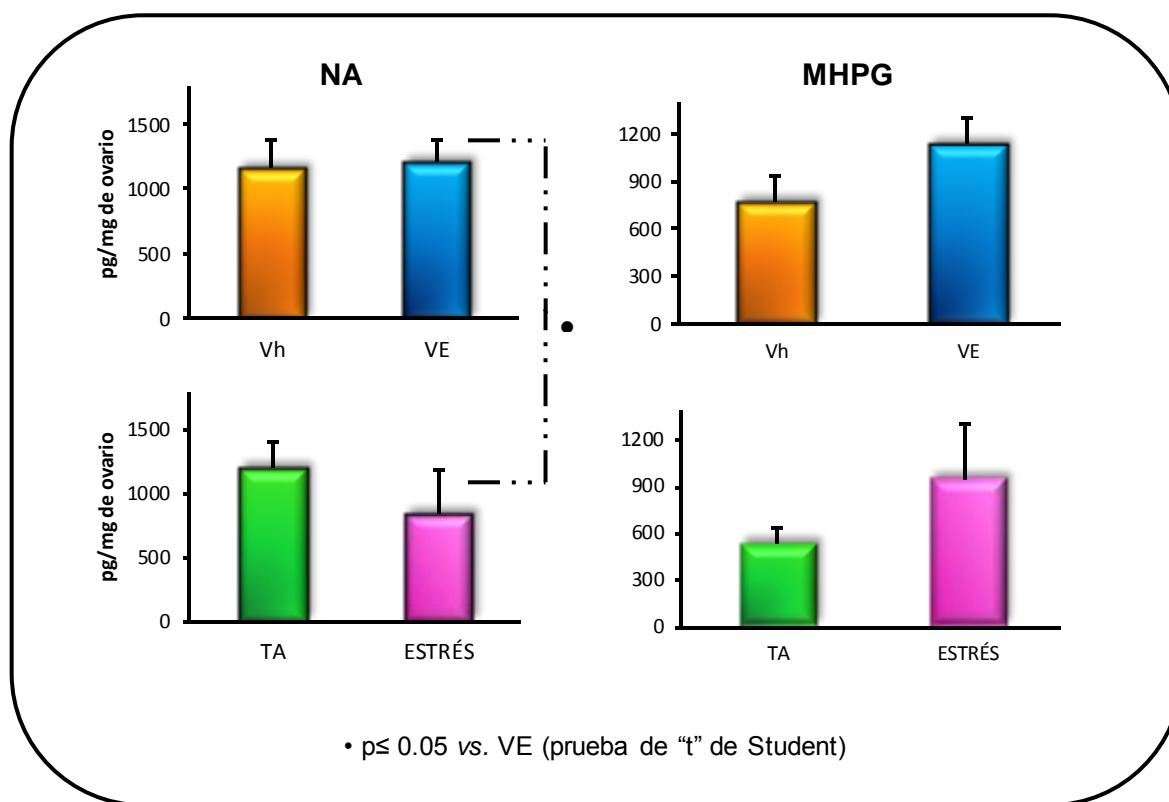
**Figura 15.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de **5-HT**, **5-HIAA** y la relación del metabolito con su neurotransmisor **en ganglio celiaco mesentérico superior (GCMS)** de animales testigo absoluto (TA) o inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), o expuestos a los 24 días de edad a estrés por frío, durante 8 semanas. Todos los animales fueron sacrificados alrededor de los 80 días de edad, al presentar un estro vaginal.



## Concentración de NA y MHPG en ovario

En los ovarios de las hembras tratadas con VE o expuestas a estrés por frío, la concentración de NA no se modificó con respecto a su grupo control. Al comparar los dos modelos de inducción del SOPQ, se observó que en las hembras inyectadas con VE presentan mayor concentración de NA respecto a las hembras estresadas por frío. La concentración de MHPG no se modificó por la exposición a estrés por frío o por la inyección con VE respecto a sus grupos control (Figura 12).

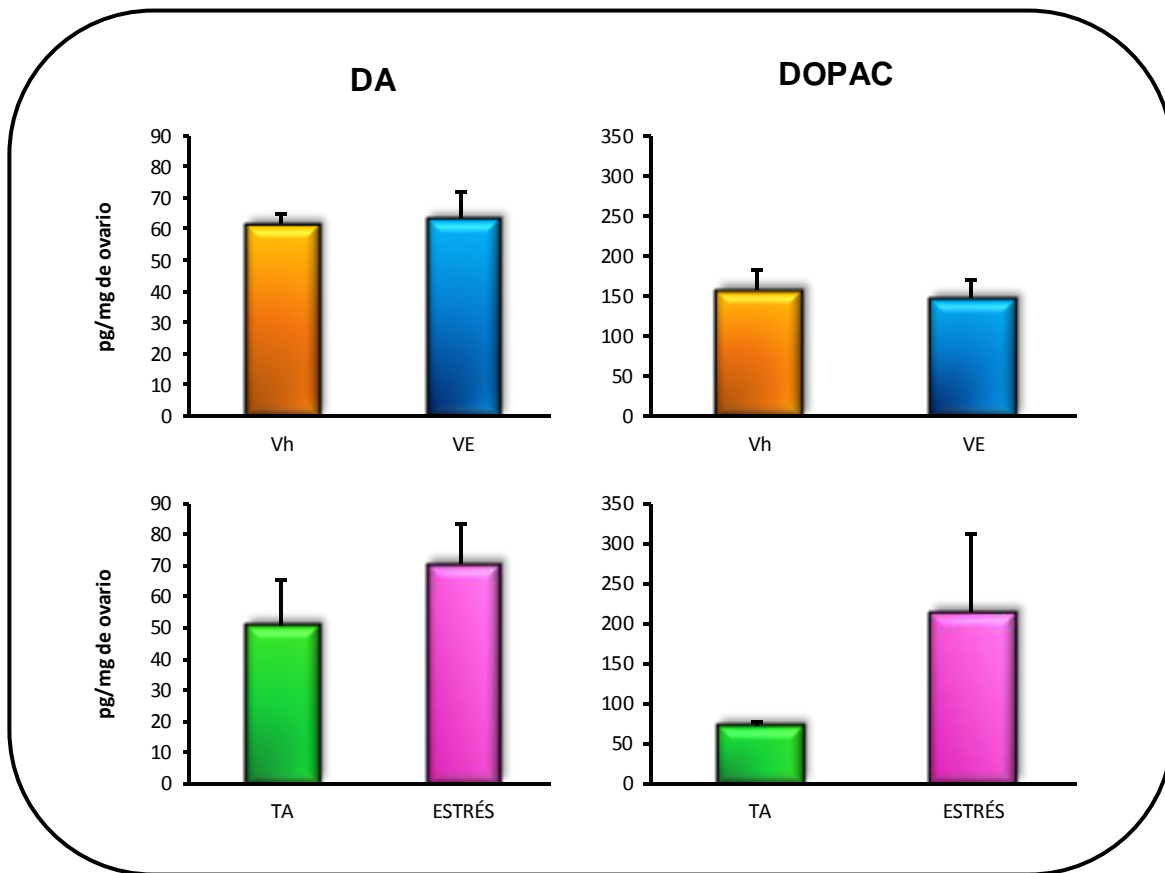
**Figura 12.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de **NA** y **MHPG en ovario** de animales testigo absoluto (TA) o inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), o expuestos a los 24 días de edad a estrés por frío, durante 8 semanas. Todos los animales fueron sacrificados alrededor de los 80 días de edad, al presentar un estro vaginal.



### Concentración de DA y DOPAC en ovario

El tratamiento con VE o la exposición a estrés por frío no modificó la concentración de DA ni de DOPAC (Figura 14).

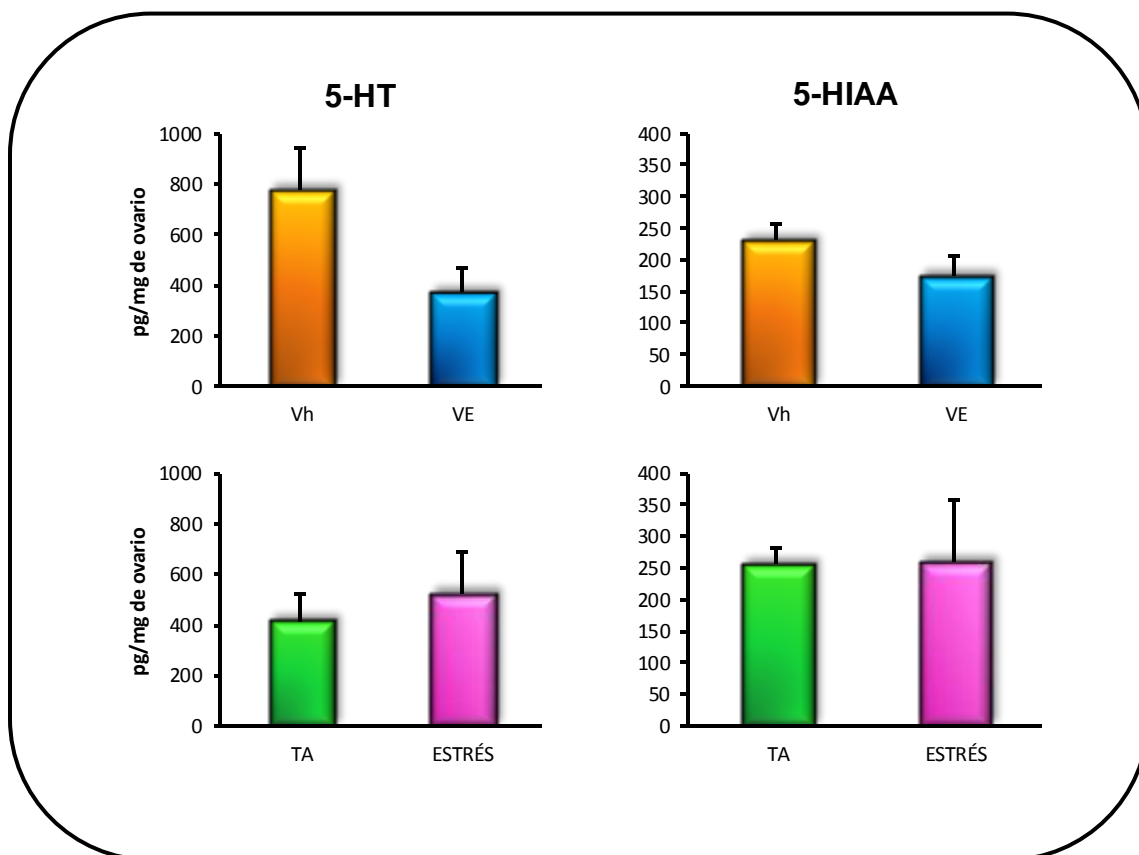
**Figura 14.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de **DA** y **DOPAC en ovario** de animales testigo absoluto (TA) o inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), o expuestos a los 24 días de edad a estrés por frío, durante 8 semanas. Todos los animales fueron sacrificados alrededor de los 80 días de edad, al presentar un estro vaginal.



### Concentración de 5-HT y 5-HIAA en ovario.

En las hembras tratadas con VE o sometidas al estrés por frío, la concentración de 5-HT en ovario no se modificó respecto a su grupo control, al igual que la concentración del metabolito (Figura 16).

**Figura 16.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de **5-HT** y **5-HIAA en ovario** de animales testigo absoluto (TA) o inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), o expuestos a los 24 días de edad a estrés por frío, durante 8 semanas. Todos los animales fueron sacrificados alrededor de los 80 días de edad, al presentar un estro vaginal.

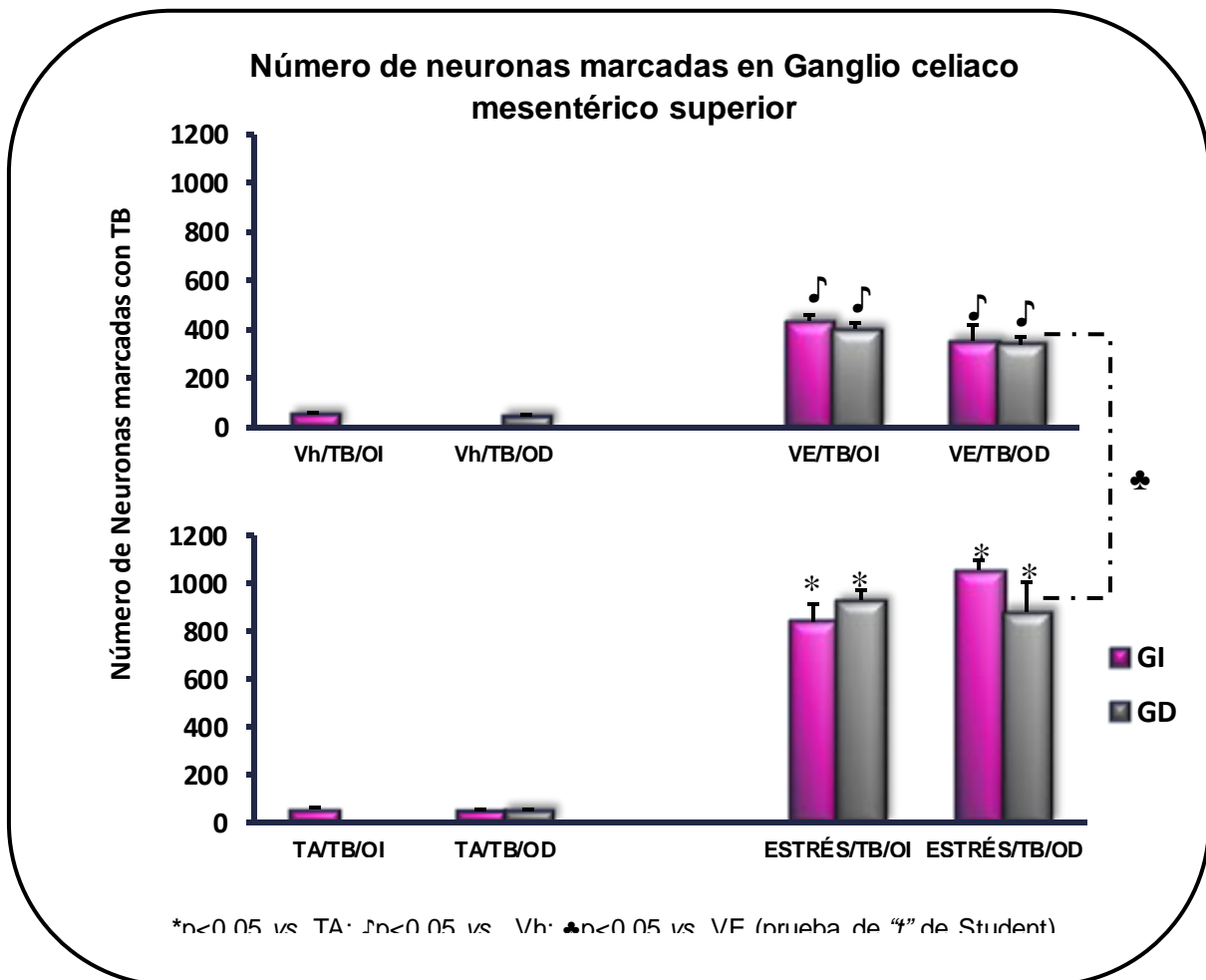




## Número de neuronas marcadas con True Blue (TB)

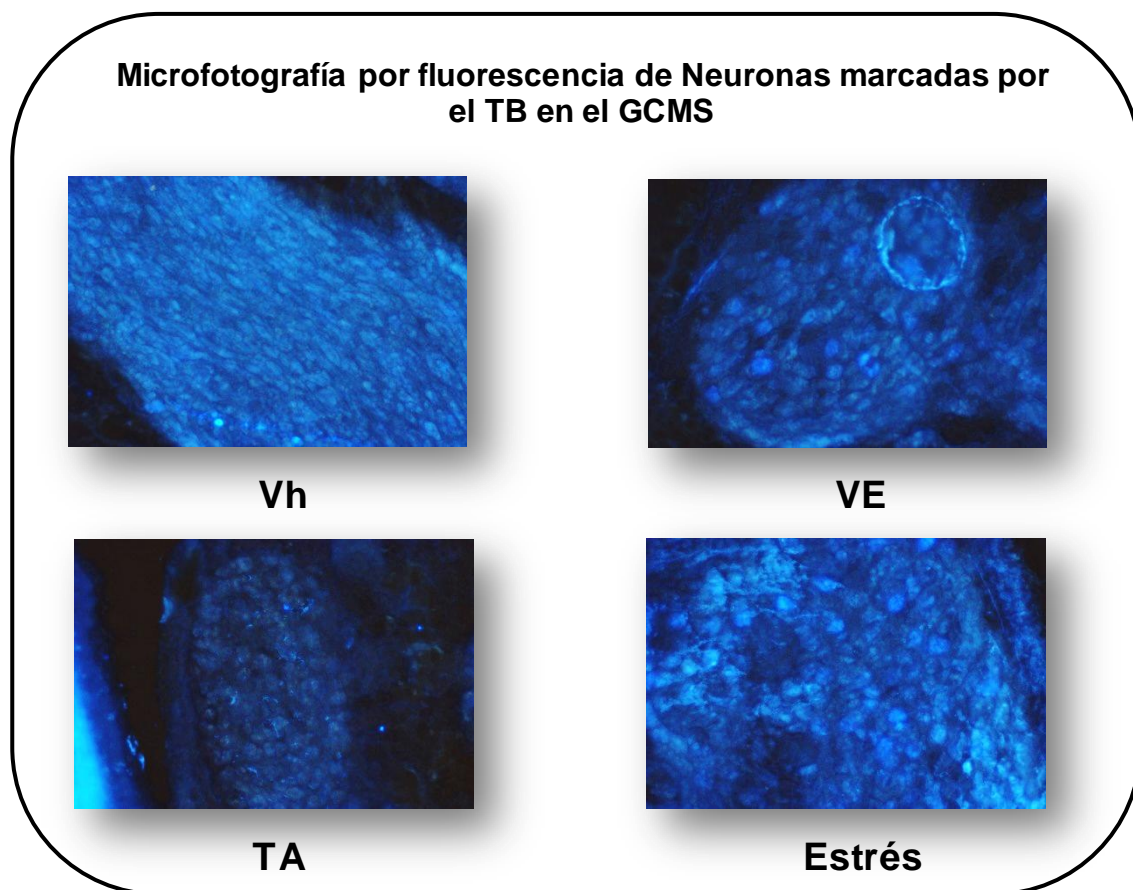
En los animales tratados con VE se observa que la cantidad de neuronas marcadas con TB es mayor con respecto a su grupo control. En los animales sometidos a estrés por frío éste número es aún mayor en comparación con los animales con VE (Figura 17).

**Figura 17. Número de neuronas** marcadas con True blue (TB) en **ganglio izquierdo** (GI) o **ganglio derecho** (GD) cuando se inyectó el trazador en el ovario izquierdo (OI) o en el ovario derecho (OD) a los 76 días de vida de animales testigo absoluto (TA) o inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), o expuestos a los 24 días de edad a estrés por frío, durante 8 semanas. Todos los animales fueron sacrificados alrededor de los 80 días de edad, al presentar un estro vaginal.



## Neuronas del GCMS marcadas con TB

La administración de VE incrementó la cantidad de neuronas marcadas con el trazador en comparación con los animales inyectados con vehículo. En los animales sometidos a estrés por frío el número de neuronas marcadas con TB fue mayor que el grupo de animales sin inyección. Al hacer la comparación entre los dos modelos de inducción de SOPQ se observó que la cantidad de neuronas marcadas en GCMS fue mayor en las hembras sometidas a estrés por frío que en las inyectadas con VE.



**Figura 18.** En los animales testigo absoluto (TA) o inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), o expuestos a los 24 días de edad a estrés por frío, durante 8 semanas, se inyectó el TB en el ovario izquierdo (OI) o en el ovario derecho (OD) a los 76 días de edad. Todos los animales fueron sacrificados alrededor de los 80 días de edad al presentar un estro vaginal.

## DISCUSIÓN

En la rata con SOPQ, inducido por la administración de VE, el bloqueo de la ovulación se puede explicar por el incremento en la concentración de NA en GCMS. Esta idea se ve apoyada por el hecho de que en las hembras expuestas al estrés por frío, la respuesta ovulatoria y la concentración del neurotransmisor en el ganglio fue similar a la del animal sin la patología.

La administración de VE a ratas neonatas (Sotomayor y col., 2008) o juveniles (Rosa-E-Silva y col., 2003) resulta en el adelanto de la edad de apertura vaginal. Dado que la vida media del VE es de 15 días, los autores proponen que la canalización de la vagina se produce en respuesta a los estrógenos que permanecen en el plasma después de la administración del fármaco. En el presente estudio, la administración de VE a los 10 días de edad resultó en el adelanto de la pubertad, probablemente en respuesta al incremento en la concentración de E<sub>2</sub> que se produce previo al inicio de la pubertad. En apoyo a esta idea, se cuenta con el hecho de que en las hembras tratadas con VE aumenta la concentración de E<sub>2</sub> pocas horas antes de la canalización de la vagina (Rosas, 2006). También se propone que la T participa en los eventos que conllevan a la canalización del epitelio vaginal (Becu-Villalobos, 1990), por lo que no podemos descartar que el adelanto de la pubertad sea en respuesta al incremento de T inducido por el VE.

Al momento, no contamos con evidencias sobre el efecto de la exposición al estrés por frío, sobre los mecanismos que culminan con la canalización de la vagina. En el presente estudio la exposición al frío se realizó a partir de los 24 días de edad, sin que se modificara la edad de apertura vaginal. Resultados que nos permiten sugerir que ante el frío no se modificó la concentración de E<sub>2</sub> o T, por lo menos hasta antes de iniciar la pubertad.

Se ha reportado que la administración de VE a ratas prepúberes (Rosa-E-Silva y col., 2003; Sotomayor y col., 2008; Cruz y col., 2012) o adultas (Barria y col., 1993) modifica el patrón del ciclo estral con periodos de estro constante, lo cual se ha relacionado con la alta concentración de E<sub>2</sub> en plasma, que mantiene el efecto de feedback negativo (Barria y col., 1993). Se descarta que la aciclicidad vaginal sea resultado del efecto del fármaco, por su vida media,

sino más bien se postula que es el resultado de la alteración del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Rosa-E-Silva y col., 2003). En el presente estudio, el VE provocó la pérdida del ciclo estral, caracterizado por diestro persistente, lo cual podría deberse al incremento en la concentración de T. En apoyo a esta interpretación, tenemos el hecho de que la administración de DHT (un andrógeno no aromatizable) o letrozol (inhibidor de las aromatasas) modifica el ciclo estral, caracterizado por la presencia de diestros constantes (Manneras y col., 2007). Mientras que la inyección de un andrógeno aromatizable, como es el propionato de testosterona (PT), induce el estro persistente (Díaz, 2010).

En el presente estudio, los animales expuestos a estrés por frío presentaron modificaciones en su ciclo estral, caracterizados por la presencia de dos proestros continuos. En mujeres sometidas a un alto estrés psicosocial se produce alteraciones en la función ovárica en respuesta a la alteración del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Kalantaridou y col., 2004). Evidencia que podría ayudar a explicar la pérdida del ciclo estral, en animales sometidos a estrés por frío.

En células de la teca se encuentra la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y su receptor, la unión del ligando al receptor resulta en una menor actividad esteroidogénica del ovario, por lo que es posible que el ciclo estral de los animales sometidos a estrés por frío se haya modificado por el exceso de CRH (Kalantaridou y col., 2004).

La ovulación depende de la integración de señales neurales y endócrinas provenientes del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. La administración de VE en la rata prepúber o adulta bloquea la ovulación (Brawer y col., 1986; Rosa-E-Silva y col., 2003; Morales y col., 2010). Resultados similares fueron observados en el presente estudio. Se ha propuesto que la falta de ovulación es el resultado de la disminución en la concentración de LH (Brawer y col., 1986). Sin embargo, resultados previos de nuestro laboratorio muestran que no depende de las concentraciones plasmáticas de las gonadotropinas, ya que tanto la concentración de FSH como de LH son similares al grupo control (Morales y col., 2010).

Al inyectar por vía sistémica el VE se produce en el ovario incremento de la concentración del factor de crecimiento neural y de su receptor de baja afinidad. La unión del ligando a su receptor activa una cascada de señalización que viaja a través de las fibras nerviosas que inervan el ovario y llega al GCMS, donde estimula la secreción de TH, provocando así, el aumento en la secreción de NA, la cual viaja por el NOS hasta el ovario. Se postula que este mecanismo se produce previo a la formación de quistes ováricos y por ende el bloqueo de la ovulación (Lara y col., 2000). En el presente estudio se observó que la administración de VE resulta en el incremento de la concentración de NA en el GCMS, con lo que apoyamos la idea de que la falta de ovulación sea el resultado de la hiperactividad de las fibras simpáticas.

En la rata infantil sometida a estrés por frío no se modificó el número de animales que ovularon ni el número de ovocitos liberados por ambos ovarios. Esta respuesta difiere a la reportada por el grupo de Bernuci (2008), quienes señalan que en la rata adulta sometida a estrés por frío durante 8 semanas disminuye el número de ovocitos liberados. La discrepancia de los resultados podría estar dada por la edad del animal en la que inició el estrés.

Es posible que en los animales expuestos al frío, la respuesta ovulatoria dependa además, del período al que son expuestas. Cuando la rata adulta es expuesta por 3 semanas al frío ovulan el 28% de ellas, mientras que si se extiende el período a 11 semanas lo hace el 45%, aunque no se reportó si los animales que ovulan lo hacen con una cuota normal (Paredes y col., 1998).

La administración de VE induce disminución en la masa ovárica, que se refleja por un menor crecimiento de los folículos y por la ausencia de cuerpos lúteos (Lara y col., 1993), presumiblemente como consecuencia de la disminución en la concentración de gonadotropinas (Brawer y col., 1986). En el presente estudio observamos disminución de la masa ovárica, sin embargo, por resultados previos no podemos explicar éste cambio por alteraciones en la concentración de las gonadotropinas (Morales y col., 2010). Dado que los ovarios de nuestros animales carecen de cuerpos lúteos, y presentan un menor número de folículos, es posible que la disminución del peso ovárico se deba en parte a la modificación de estos compartimientos del ovario.

Dado que se ha sugerido que el SOPQ resulta de una mayor actividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario por el NOS, es posible que la hiperactividad de éstas fibras resulten en la disminución del compartimiento folicular. En apoyo a esta idea tenemos el hecho que la denervación farmacológica con guanetidina resulta en la disminución del total de folículos (Lara y col., 1990). De igual manera, en la rata prepúber, la eliminación del NOS trae aparejado cambios en la dinámica del crecimiento folicular (Morán y col., 2000).

En las ratas sometidas a estrés por frío disminuyó el número de folículos totales por ambos ovarios, sin embargo, no se modificó el peso de las gónadas. Este resultado es similar a lo reportado en ratas adultas sometidas a estrés por frío por un período de 3 u 11 semanas donde el peso de los ovarios tampoco se modifica (Paredes y col, 1998).

En el presente estudio, la administración de VE no modificó el peso del útero ni de las adrenales. El grupo de Sotomayor en el 2008 mostró que después de la administración de VE a ratas neonatas aumenta el peso del útero por una mayor incidencia de úteros balonados. Los autores no reportan si incrementa el peso de las adrenales, pero sí que se produce mayor actividad de las catecolaminas de origen adrenal. El hecho de que en nuestros animales no se hayan observado cambios en el peso del útero y adrenales podría deberse a que la administración del VE se realizó en la etapa infantil, mientras que el de Sotomayor se efectuó en la etapa neonata.

Diferentes tipos de estresores afectan de manera directa la actividad nerviosa, y al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, estimulando la secreción de A, NA y de la ACTH. La exposición a estrés por frío por un periodo largo resulta en la adaptación del animal al factor estresante, tal y como lo demuestra el grupo de Paredes, quienes colocaron ratas adultas por 3 u 11 semanas al frío, y observaron que a las 3 semanas aumenta el peso y actividad de las adrenales, efecto que desaparece a las 11 semanas (Paredes y col, 1998). En nuestros animales sometidos a estrés por frío, no se observaron modificaciones en el peso de las adrenales ni del útero. Estos resultados podrían indicar que

después de 8 semanas de estrés los animales llegan a un periodo de adaptación.

La respuesta esteroideogénica del ovario a la administración subcutánea de VE depende de la etapa de desarrollo del animal. Cuando se inyecta a ratas de 1 ó 7 días de vida, la concentración de  $P_4$  disminuye al alcanzar la etapa adulta (Sotomayor y col., 2008; Cruz y col., 2012), mientras que si se inyecta el fármaco a los 14, 21 ó 30 de vida, la concentración de  $P_4$  no se modifica (Cruz y col., 2012); resultados que llevan a sugerir que existe un período crítico a la respuesta ovárica. En el presente estudio observamos que la inyección del VE a los 10 días de edad resulta en el incremento de la concentración de  $P_4$ , que no llegó a ser significativo, tal y como lo mostramos previamente (Morales y col., 2010).

Se ha reportado que en la rata, la exposición a estrés por frío durante cuatro semanas incrementa la concentración de  $P_4$ , y no la modifica si los animales son expuestos sólo por tres semanas (Dorfman y col., 2003). En los animales con alta concentración de  $P_4$  se observaron folículos antrales con una teca hipertrofiada, los autores sugieren que la  $P_4$  se pudo originar por este tipo de folículos que se luteinizan y no ovulan (Dorfman y col., 2003). En nuestros animales, la exposición al frío durante ocho semanas tiende a disminuir la concentración de  $P_4$ , aunque no de manera significativa. Al comparar el modelo del SOPQ inducido por VE o por estrés por frío, con sus respectivos grupos testigo, los cambios en la concentración de  $P_4$  no son significativos, sin embargo, es evidente que los mecanismos de regulación en la secreción de la hormona son diferentes, ya que entre los dos modelos, el ovario del animal expuesto al frío sintetiza menos  $P_4$  que el de VE. En mujeres que están sometidas a un estrés psicosocial incrementa en el ovario la concentración de CRH, el cual ejerce un efecto inhibitorio en el proceso esteroideogénico. Esta evidencia podría ayudar a explicar el hecho de que ante el estrés por frío la concentración de  $P_4$  haya sido menor (Kalantaridou y col., 2004).

En el animal con SOPQ inducido por la administración de VE la secreción de LH en la hipófisis es mayor, aunado a esto, los folículos ováricos de estos animales están rodeados por más capas de células de la teca que los

folículos normales (Erickson y Yen, 1984), todo esto conlleva a la producción excesiva de andrógenos ováricos (Rebar y col., 1976). En el presente estudio se encontró que el 94% de los folículos de los animales inyectados con VE tenían algún grado de atresia y que el 23% de estos folículos atrésicos tenían hipertrofia en células de la teca, por lo que es posible que el aumento de T sea debido a la sobreproducción por parte de estas células.

En la rata adulta expuesta al frío durante 8 semanas incrementa la concentración de T (Bernuci y col., 2008), y se mantiene hasta las 11 semanas si el animal además de estar expuesto al frío se le somete a la restricción de movimiento (Paredes y col., 1998). Por el contrario, se ha reportado que sí el estrés por frío es por 4 semanas, la concentración de androstenediona disminuye (Dorfman y col., 2003). Estos resultados apuntan a que la respuesta del animal al frío va a depender del tiempo al que es expuesto. En el presente estudio se observó que en los animales sometidos a estrés por frío no se modificó la concentración de T. Resultados que nos llevan a sugerir que dado a que no se observó la presencia de quistes foliculares, que se caracterizan por tener la teca hipertrofiada, la secreción de T fue normal.

En la rata prepúber o adulta la administración de VE induce aumento en la concentración de  $E_2$  (Barria y col., 1993; Cruz y col., 2012). Los autores proponen que estos estrógenos son los responsables de establecer por un tiempo prolongado el feedback negativo que induce la alteración en la secreción de gonadotropinas (Barria y col., 1993). En el presente estudio la concentración de  $E_2$  no se modificó, resultado similar a lo previamente reportado por nuestro grupo (Morales y col., 2010). En los animales con VE la secreción de  $E_2$  es modulada por la información que lleva el NOS, esto se sustenta en el hecho de que en hembras con ovario poliquístico sometidas a la sección bilateral del NOS, disminuye la concentración de  $E_2$  por debajo de lo que se registra en un animal intacto sin la patología (Morales y col., 2010).

En el presente estudio se observó que la exposición al frío disminuyó la concentración de  $E_2$ , posiblemente como resultado de un menor número de folículos medianos, aunque no se puede descartar que en estos animales haya disminuido la actividad de las aromatasas, encargadas de transformar T a  $E_2$ .



Sí bien la concentración de  $E_2$  en el animal inyectado con VE es similar a la de su grupo control, es posible que la falta de ovulación se deba a que la concentración de  $E_2$  se mantuvo constante y no se dio la caída brusca que se requiere para estimular la liberación de gonadotropinas, mientras que los animales expuestos a estrés por frío presentan menor concentración de  $E_2$  que los animales con VE, lo que podría explicar por qué estos animales si ovulan.

La administración de VE induce en el ovario aumento en la concentración de NA (Lara y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003; Sotomayor y col., 2008; Morales y col., 2010; Cruz y col., 2012) en respuesta al incremento del NGF (Lara y col., 2000). En el presente estudio, en los animales inyectados con VE se observó incremento en la concentración de NA en el GCMS y en los ovarios, aunque en éstos últimos no llegó a ser estadísticamente significativo respecto al grupo control. Esto nos lleva a la necesidad de volver a medir la amina en los animales inyectados con aceite de maíz, ya que en esta ocasión reportamos una concentración mucho más alta que en trabajos anteriores (Morales y col., 2010; Linares, 2013). El grupo de Sotomayor (2008) mostró que el efecto del VE es preferencial sobre las fibras del ovario y no sobre el sistema simpático central. Esto a partir del hecho de que en la rata neonata la administración del fármaco no modifica la concentración de NA en el GCMS e incrementa en el ovario. Sin embargo, el mismo grupo de trabajo años más tarde señala que después de la inyección de VE se produce aumento en la concentración de NA en el núcleo ventromedial (Sotomayor y col., 2011). Con estas evidencias, no descartamos que en nuestros animales el VE haya tenido una acción sobre el ovario y el sistema nervioso central.

El grupo de Paredes (1998) mostró que en ratas adultas después de 3 semanas de exposición al frío aunado a la restricción del movimiento, produce incremento en la concentración de NA en ganglio celiaco, y es hasta después de 11 semanas de estar sometidas al estrés que se registra el incremento de la amina en el ovario y en el ganglio. Los autores plantean que el aumento de la amina puede ser el resultado de una mayor actividad del sistema simpático, inducido por el frío, sin embargo, no descartan que el incremento de NA en el ovario se deba a la acción de LH y PRL, dos hormonas que experimentan cambios en situaciones de estrés, o bien que se haya dado como consecuencia

del aumento en la concentración de la amina en ganglio celiaco (Paredes y col., 1998). En el presente estudio no observamos cambios en la concentración de NA en el GCMS ni en ovario. Resultados que nos hacen pensar que el haber iniciado la exposición al frío en la etapa juvenil, permite que el animal experimente más fácilmente la adaptación al estrés que cuando se inicia en la etapa adulta, tal y como lo realizó el grupo de Paredes (1998).

El ovario recibe fibras nerviosas que transportan noradrenalina (Lara y col., 2002), aunque también se ha detectado la presencia de A y DA pero en menor concentración (Greiner y col., 2005). La concentración de DA en el ovario varía dependiendo de la especie, por ejemplo, en el ovario de la mujer la concentración del neurotransmisor es mayor que en el de la rata (Lara y col., 2001). Al momento, no contamos con reportes que indiquen que el VE provoque cambios en la síntesis de DA ovárica, mientras sí lo hace con la NA. En el presente estudio, la concentración de DA en el ovario y en el GCMS no se modificó por la inyección con VE, mientras que la concentración en el ganglio de DOPAC y la relación metabolito/neurotransmisor aumentó. Este hecho podría indicar que en GCMS hay mayor degradación del neurotransmisor y de la actividad de las neuronas. Dado que la información que se genera en el GCMS es llevada hacia el ovario, y que las células de la granulosa presentan receptores D<sub>1</sub>-dopaminérgicos (Araya y col., 2004; Greiner y col., 2005), es evidente que se requieren estudios que analicen la participación de este sistema en las funciones ováricas en diversos modelos experimentales, entre ellos el del SOPQ.

Hasta el momento, no se cuenta con evidencia de que la secreción de DA o de DOPAC se modifique en animales sometidos a estrés por frío. En el presente estudio, las ratas sometidas a estrés por frío no presentaron modificaciones en la concentración de DA ni de su metabolito, probablemente, este factor estresante no es capaz de alterar la secreción del neurotransmisor.

La administración de VE a ratas neonatas aumenta la concentración de 5-HT en el núcleo arcuato del hipotálamo ventromedial (VMH-AN, por sus siglas en inglés), los autores explican que este aumento podría ser el resultado de la acción del VE sobre la diferenciación hipotalámica, por lo que se

producen cambios permanentes en la actividad de las neuronas, lo que modifica la síntesis y liberación de 5-HT (Sotomayor-Zárate y col., 2011). El grupo de Domínguez (2003) encontró que la administración de benzoato de estradiol a ratas neonatas aumenta la concentración de 5-HT en la corteza prefrontal, mientras que si es administrado PT la concentración del neurotransmisor no se modifica (Domínguez y col., 2003). En el presente trabajo, la administración de VE a ratas infantiles no modificó la concentración de 5-HT en GCMS ni en ovario. Estos resultados nos hacen pensar que los efectos dependen por un lado, de la naturaleza del fármaco inyectado, y por otro, de la edad en la que se administra.

El efecto del estrés crónico en las funciones del animal depende del tipo de estresor utilizado, de la magnitud y duración del estrés. La activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal durante un evento estresante prepara al organismo para una adecuada respuesta de sobrevivencia (Cruz-Morales y col., 2012). Al someter ratas hembras adultas a restricción de movimiento durante 180 minutos, se observa que la concentración de 5-HT disminuye con respecto su grupo control, mientras que la concentración de NA aumenta, los autores explican que este resultado es debido a que el sistema noradrenérgico es más sensible al estrés que el sistema serotoninérgico en el corteza prefrontal (Cruz-Morales y col., 2012). En el presente estudio la concentración de 5-HT en GCMS de ratas sometidas a estrés por frío fue mayor que en los animales testigo absoluto, y aún es más alta que los animales inyectados con VE. Hasta el momento, no se ha relacionado al sistema serotoninérgico con el desarrollo del SOPQ. Si bien, en nuestro modelo experimental no se mostraron todas las características que definen al síndrome, sí fue evidente que se produce hiperactivación de este sistema de neurotransmisión, por lo que se requiere de más estudios que ayuden a explicar la participación que tiene 5-HT en el SOPQ.

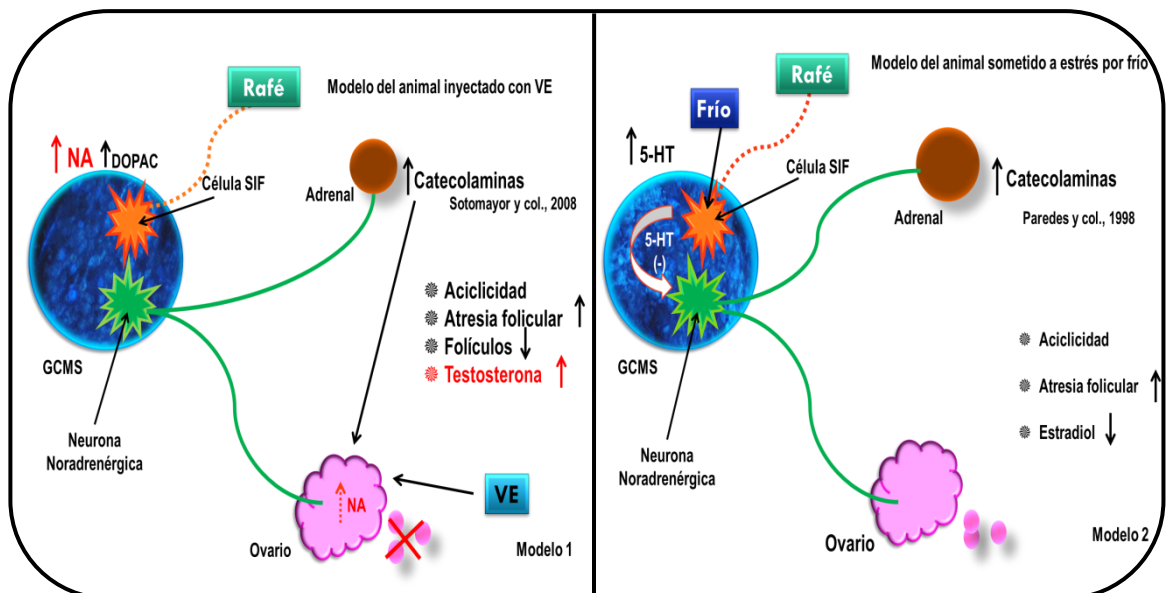
En la hembra tratada con VE, la administración en la bursa ovárica de TB, un marcador retrogrado, resultó en una gran actividad neural a nivel del GCMS, la cual es aún más marcada cuando los animales fueron expuestos al estrés por frío. Se ha mostrado que el ovario recibe información neural del GCMS a través del NOS (Morán y col., 2008). Con los resultados obtenidos no

podemos indicar la naturaleza de las neuronas, por lo que es importante realizar estudios de inmunofluorescencia que permitan determinar el tipo de neuronas que se activan en cada modelo experimental. Nuestros resultados permiten sugerir que los dos modelos de inducción que utilizamos en el presente estudio, activan diferentes mecanismos.

Con base a los resultados presentados en este trabajo, planteamos el posible mecanismo del VE y de la exposición a estrés por frío en la rata prepúber.

En el modelo 1 se observa que en la rata infantil la administración de VE induce incremento en la concentración de NA en el GCMS y en el ovario, aunque no de manera significativa en éste último. El bloqueo de la ovulación se puede explicar por la mayor actividad noradrenérgica del ganglio, del ovario y probablemente por la propia adrenal, tal y como ya ha sido reportado.

En el modelo 2 se plantea como el estrés por frío incrementa en el GCMS la concentración de 5-HT, probablemente por una mayor actividad de las células SIF. El aumento de 5-HT puede inhibir la acción de las neuronas catecolaminérgicas, lo que explicaría porqué en este modelo no se produce el SOPQ.



Las células SIF, presentes en el GCMS contienen gránulos de NA, DA y 5-HT. Los parámetros en rojos son aquellos que se utilizan para definir el SOPQ en la rata.

En línea punteada se plantea la posibilidad de que el núcleo del rafé (núcleo serotoninérgico) aporte información al GCMS.

## **CONCLUSIONES**

La administración de VE a ratas infantiles fue capaz de inducir el SOPQ, evaluado por aciclicidad, anovulación, hiperandrogenismo, incremento en la concentración de NA en GCMS y ovario.

Las ratas que fueron sometidas a estrés por frío durante 8 semanas presentaron alteración del ciclo estral disminución en la secreción de hormonas esteroides y mayor actividad neural a nivel de GCMS, sin desarrollar hiperandrogenismo ni anovulación.

El modelo de exposición al frío no reproduce las características que definen al SOPQ.

Debido a que la administración de VE o la exposición a estrés por frío modifican de manera diferente las funciones ováricas y el contenido de monoaminas y sus metabolitos en GCMS y ovario, sugerimos que estos son dos modelos no comparables para inducir el síndrome.

## BIBLIOGRAFÍA

- 🌀 Acuña E, Fornes R, Fernandois D, Garrido M, Greiner M, Lara H, Paredes A. (2009) "Increases in norepinephrine release and ovarian cyst formation during ageing in the rat". *Reproductive Biology and Endocrinology*. 7:1-13.
- 🌀 Aguado L I, Ojeda S R. (1984) "Prepubertal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. Role of noradrenergic innervation". *Endocrinology*. 114:1845-1853.
- 🌀 Alcaraz R. (2001) "Estructura y función del sistema nervioso. Recepción sensorial y estados del organismo". 2ª edición. Ed. El manual moderno. Pp. 22-29.
- 🌀 Ahumada V, Santana F, Serrano M. (2002) "Farmacología práctica para las diplomaturas en ciencias de la salud". Ed. Días de Santos. Pp. 333-339.
- 🌀 Andrews W W, Ojeda S R. (1981) "A detailed analysis of the serum luteinizing hormone secretory profile in conscious, free-moving female rats during the time of puberty". *Endocrinology*. 109:2032-2039.
- 🌀 Araya V, Jara P, Lara H E. (2004) "Cerebro, estrés y ovario poliquístico. Participación de la inervación simpática en el desarrollo de ovario poliquístico". *Endocrinol. Nutr.* 51:473-480.
- 🌀 Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale H F, Futterweit W. (2009) "The androgen excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report". *Fertil Steril*. 91:456-488.
- 🌀 Barria A, Leyton V, Ojeda S R, Lara H E. (1993) "Ovarian steroidal response to gonadotropins and  $\beta$ -adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation". *The Endocrine Society*. 133:2696-2703.
- 🌀 Beck L R. (1972) "Comparative observation on the morphology of the mammalian periovarial sac". *Morphology*. 139:247-254.

- ☉ Becú-Villalobos D, Lacau-Mengido M. (1990) "Control hormonal del desarrollo puberal en la rata hembra". *Acta Physiology Pharmacology. Latinoamerican.* 40:1-17.
- ☉ Berne R, Levy M. (2006) "Fisiología". 4ta. Edición. Ed. Elsevier-Science. Pp. 50-52.
- ☉ Bernuci M P, Szawka E R, Helena C V, Leite C M, Lara H E, Anselmo-Franci J A. (2008) "Locus coeruleus mediates cold stress-induced polycystic ovary in rats". *Endocrinology.* 149:2907-2916.
- ☉ Botella L I J. (1995) "EL OVARIO: fisiología y patología". Ed. Díaz de Santos. Pp. 49-55.
- ☉ Brawer J R, Naftolin F, Martin J, Sonnenschein C. (1978) "Effects of a single injection of estradiol valerate on the hypothalamic arcuate nucleus and on reproductive function in the female rat". *Endocrinology.* 103:501-512.
- ☉ Brawer J R, Muñoz M, Farookhi R. (1986) "Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate treated rat". *Biology of Reproduction.* 35:647-655.
- ☉ Brown R. (1994) "An introduction to neuroendocrinology". Ed. Cambridge University Press. Pp. 88-108.
- ☉ Bremer A A. (2010) "Polycystic ovary syndrome in the pediatric population". *Metabolic Syndrome and Related Disorders.* 8:375-394.
- ☉ Bukovski A, Pres J, Holub M. (1984) "The ovarian follicle as a model for the cell-mediated control of tissue growth". *Cell Tissue Res.* 236:717-724.
- ☉ Bukovski A, Pres J, Zidovsky J. (1979) "Migration of lymphoid cells into the granulosa of rat ovarian follicles". *Med Sci.* 7:603-604.
- ☉ Byskov A G. (1978) "Follicular atresia". En: Jones R E. Editor. The vertebrate ovary: comparative biology and evolution. Ed. Plenum. Pp. 533-562.
- ☉ Carabatsos M J, Sellito C, Goodenough D A, Albertini D F. (2002) "Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence". *Developmental Biology.* 226:167-179.

- ☉ Cardinali D, Jordá J, Sánchez E. (1994) “Introducción a la cronobiología. Fisiología de los ritmos biológicos”. Ed. Universidad de Cantabria. D. L. Pp. 73-98.
- ☉ Cariño C, Díaz L, Méndez I. (2001) “Antígenos de la zona pelúcida en el ovocito humano: su importancia en las estrategias anticonceptivas”. *La Revista de Investigación Clínica*. 53:174-180.
- ☉ Cruz G, Barra R, González D, Sotomayor-Zárate R, Lara H E. (2012) “Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats”. *Reproductive Biology*. 3:1-8.
- ☉ Cruz-Morales S E, Domínguez R, García-Saldivar N L, González-López M. (2012) “Stress animal models”. *Behavioral Animal Models*. 2:1-18.
- ☉ Danni S, Donna F. (2012) “Animal models of polycystic ovary syndrome: a focused review of rodent models in relationship to clinical phenotypes and cardiometabolic risk”. *Fertility and Sterility*. 98:185-193.
- ☉ Daud A I, Bumpus F M, Husain A. (1988) “Evidence for selective expression of angiotensin II receptors on atretic follicles in the rat ovary: an autoradiographic study”. *Endocrinology*. 122:2727-2734.
- ☉ Diaz J A. (2010) “Participación del nervio ovárico superior en el modelo del animal con SOPQ inducido con propionato de testosterona al nacimiento”. Tesis de licenciatura. UNAM. FES Zaragoza.
- ☉ Dohler K D, Wuttke W. (1974) “Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats”. *Endocrinology*. 94:1003-1008.
- ☉ Domínguez R, Chávez R, Cruz M. (1991) “La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico”. En: Tópicos selectos de biología de la reproducción. Miguel Ángel Porrúa. Pp. 161-192.
- ☉ Domínguez R, Cruz-Morales S E, Carvalho M C, Xavier M, Brandao M L. (2003) “Effect of steroid injection to newborn rats on serotonin activity in frontal cortex and raphe”. *Neuroreport*. 14:597-606.



- ☉ Dorfman M, Arancibia S, Fiedler J L, Lara H E. (2003) "Chronic intermittent cold stress activates ovarian sympathetic nerves and modifies ovarian follicular development in the rat". *Biology of Reproduction*. 68:2038-2043.
- ☉ Erickson G F, Yen S S. (1984) "New data on follicle cells in polycystic ovaries: a proposed mechanism for the genesis of cystic follicles". *Endocrinology*. 2:231-243.
- ☉ Espey L. (1999) "Ovulation". En: Knobil E, Neill, J. Editores. Encyclopedia of reproduction. Academic Press. Vol. 3. Pp. 605-614.
- ☉ Florez J, Armijo J, Mediavilla A. (1987) "Farmacología humana". 1:1-8.
- ☉ Franks S. (1995) "Polycystic ovary syndrome". *Med*. 333:853-8561.
- ☉ Franks S, Gharani N, Waterworth D, Batty S, White D, Williamson R, McCarthy M. (1998) "Current development in the molecular genetics of the polycystic ovary syndrome". *Trends. Endocr. metab*. 9:51-56.
- ☉ Freeman M E. (1994) "The Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat". En: Knobil E, Nelly J D. Editores. The Physiology of Reproduction. 2ª edición. Ed. Raven Press. Vol. 2. Cap. 46. Pp. 615-620.
- ☉ Ganong M W. (1996) "Gónadas: Desarrollo y funciones del aparato reproductor". En: Fisiología médica. 15ª edición. Ed. El manual moderno Pp. 482-493
- ☉ Gartner P, Hiatt L. (2007) "Texto Atlas de Histología". 3ª edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana, Pp. 218-225.
- ☉ Geneser F. (2000) "Órganos de la reproducción. En: histología sobre bases moleculares". 3ª edición. Ed. Médica Panamericana. Cap. 22. Pp. 613-638
- ☉ Gibbins I, Teo E, Jobling P, Morris J. (2003) "Synaptic density, convergence and dendritic complexity of prevertebral sympathetic neurons". *Comp Neurol*. 455:285-298.
- ☉ Goldfien A, Monroe S E. (2000) "Ovarios". En: Greenspan F S, Strewler G J. Editores. Endocrinología Básica y Clínica. 4ª edición. Ed. El Manual Moderno. Cap. 13. Pp. 497-554

- ☉ Goodarzi M O, Dumesic D A, Chazenbalk G, Azziz R. (2011) "Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis". *Endocrinology*. 7:219-231.
- ☉ Gore-Langton R E, Armstrong D T. (1994) "Follicular steroidogenesis and its control. The physiology of reproduction". En: Knobil, Neill J D, Editores. Editorial Raven press. Pp. 571-628
- ☉ Greiner M, Paredes A, Araya V, Lara H E. (2005) "Role of stress and sympathetic innervation in the development of polycystic ovary syndrome". *Endocrine*. 3:319-324.
- ☉ Hade A J, Groen-Klevant A C, Welschen R. (1978) "Follicle growth in the immature rat ovary". *Acta Endocr. Copenh*. 88:375-382
- ☉ Hafez E, Hafez B. (2000) "Reproducción e inseminación artificial en animales". 7ª edición. Ed. McGraw-Hill. Pp. 251-254.
- ☉ Hsueh A J W, Billig H, Tsafriri A. (1994) "Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process". *Endocrinology*. 15:707-724.
- ☉ Jubiz W. (1998) "Endocrinología clínica". 2ª edición. Ed. El manual moderno. Pp. 345-350.
- ☉ Kalantaridou S N, Makrigiannakis A, Zoumakis E, Chrousos G P. (2004) "Stress and the female reproductive system". *Reproductive Immunology*. 62:61-68.
- ☉ Krishna B. (2005) "Persistent estrus rat models of polycystic ovary disease: an update". *Fertility and Sterility*. 84:1228-1234.
- ☉ Lambert H. (1975) "Continuous red light induces P E without retinal degeneration in the albino rat". *Endocrinology*. 97:208-210.
- ☉ Lamprecht S A, Kohen F, Ausher J, Zor U, Lindner H R. (1976) "Hormonal stimulation of oestradiol-17 $\beta$  release from the rat ovary during early postnatal development". *Endocrinology*. 68:313-344.
- ☉ Lara H E, Belmar J. (1991) "Release of norepinephrine from the cat ovary: changes after ovulation". *Biol. Reprod*. 44:752-759.
- ☉ Lara H E, Dorfman M, Venegas M, Luza S, Mayerhofer A. (2002) "Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal

estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: studies on norepinephrine release". *Microsc. Res. Tech.* 59:495-502.

- 🌀 Lara H E, Ferruz J L, Luza S, Bustamante D A, Borges Y, Ojeda S R. (1993) "Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome". *Endocrinology.* 133:1-7.
- 🌀 Lara H E, Hill D F, Katz K H, Ojeda S R. (1990) "The gen encoding nerve growth factor is expressed in the immature rat ovary: effect of denervation and hormonal treatment". *Endocrinology.* 126:357-363.
- 🌀 Lara H E, Porcile A, Espinoza J, Romero C, Luza S M, Fuhrer J, Miranda C, Roblero L. (2001) "Release of norepinephrine from human ovary". *Endocrine.* 15:187-192.
- 🌀 Lawrence I E, Burden H W. (1980) "The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary". *Anat. Rec.* 1:51-59.
- 🌀 Li M, Zhou T, Gao Y, Zhang N, Li J C. (2007) "Ultrastructure and estrogen regulation of the lymphatic stomata of ovarian bursa in mice". *The anatomical record.* 290:1195-1202.
- 🌀 Linares R, Rosas G, Navarrete M I, Ayala M E, Morán C, Domínguez R, Morales L. (2013) "Ovulatory response and monoamines concentration in the celiac-superior mesenteric ganglia and ovaries in rats with polycystic ovarian syndrome". *Congreso Internaciona "Neurociencia"*.
- 🌀 Lobo R. (1991) "In fertility, contraception and reproductive endocrinology". 3ª edición. Ed. Blackwell Scientific Publications. Pp. 349-352
- 🌀 Mackinnon P C B, Mattock J M, Ter. Haar. M B. (1976) "Serum gonadotrophin levels during development in male, female and androgenized female rats and the effect of general disturbance on high luteinizing hormone levels". *Endocrinology.* 70:361-371.
- 🌀 Mahajan D. (1988) "Polycystic ovarian disease: animal models". *Endocrinology.* 17:705-732.
- 🌀 Malamed S, Gibney J A, Ojeda S R. (1992) "Ovarian Innervation Develops Before Initiation of Folliculogenesis in the Rat". *Cell and Tissue Research.* 270:87-93

- ☉ Manneras L, Cajander S, Holmang A, Seleskovic Z, Lystig T, Lonn M, Stener-Victorin E. (2007) "A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome". *Endocrinology*. 148:3781-3791.
- ☉ Mardomingo S. (1994) "Psiquiatría del niño y del adolescente". Ed. Díaz de Santos. Pp. 105-141.
- ☉ Matalliotakis I, Kourtis A, Koukoura O, Panidis D. (2006) "Polycystic ovary syndrome: etiology and pathogenesis". *Archgynecolobstet*. 274:187-197.
- ☉ Mathews D, Andrews W W, Parker R, Ojeda S R. (1987) "A role for aromatizable androgens in female puberty". *Biol. Reprod*. 36:836-843.
- ☉ Meijs-Roelofs H M A, Kramer P, Sander H J. (1983) "Changes in serum concentrations of luteinizing hormone in the female rat approaching puberty". *Endocrinology*. 98:241-249.
- ☉ Miller S, Hanani M, Kuntz S, Schmalz P, Szurszewski J. (1996) "Light electron, and confocal microscopic study of the mouse superior mesenteric ganglion". *Comp. Neurol*. 3:427-444.
- ☉ Morales L L, Linares R, Rosas G, Morán C, Chavira R, Cardenas M, Domínguez R. (2010) "Unilateral sectioning of the superior ovarian nerve of rats with polycystic ovarian syndrome restores ovulation in the innervated ovary". *Reproductive Biology and Endocrinology*. 8:1-7.
- ☉ Morán V C. (2006) "Síndrome de ovario poliquístico". En: Lombardía PJ, Fernández P M. Editores. Ginecología y reproducción humana. Especialistas en ginecología y obstetricia. México. Art. 35. Pp. 313-318.
- ☉ Morán C, Morales L, Quiroz U, Domínguez R. (2000) "Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in infantile rats on follicular growth". *Endocrinology*. 166:205-211.
- ☉ Morán C, Zárate F, Morán J L, Handal A, Domínguez R. (2008) "Lateralization of the connections of the ovary to the celiac ganglia in juvenile rats". *Reproductive Biology and Endocrinology*. 7:1-7.
- ☉ Nestler E, Hyman S, Melenka K. (2001) "Mood and emotion". Ed. McGraw-Hill. Cap. 9. Pp. 191-200.

- ☉ Norris R P, Ratzan W J, Freudzon M, Mehlmann L M, Krall J, Mousesian M A, Wang H, Ke H, Nicolaev V O, Jaffe L A. (2009) "Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte". *Development*. 138:1869-1878.
- ☉ O'Conner J L, Lapp C A, Mahesh V B. (1984) "Peptidase activity in the hypothalamus and pituitary of the rat: fluctuations and possible regulatory role of luteinizing hormone releasing hormone-degrading activity during the estrous cycle". *Biol. Reprod.* 36:855-862.
- ☉ Ojeda S R, Andrews W W, Advis J P, Smith White S. (1980) "Recent advances in the endocrinology of puberty". *Endocrine*. 1:228-257.
- ☉ Ojeda S R, Urbanski H F. (1988) "Puberty in rat". En: Knobil, E., Neill, J., et al. Editores. The physiology of reproduction. Ed. Raven Press Ltd. Pp. 1699-1737.
- ☉ Ojeda S R, Urbanski H F, Ahmed C E. (1986) "The onset of female puberty: studies in the rat". *Recent Prog. Horm. Res.* 42:385-442.
- ☉ Paredes A, Galvez A, Leyton V, Aravena G, Fiedler J, Bustamante D. (1998) "Stress promotes development of ovarian cystic in rats: the possible role of sympathetic nerve activation". *Endocrine*. 8:309-315.
- ☉ Parker C R, Mahesh V B. (1976) "Hormonal events surrounding the natural onset of puberty in female rats". *Biol. Reprod.* 14:347-353.
- ☉ Peter H, Midgley A R, Sadler W A. (1970) "Some aspects of early follicular development". En: Ress M A, Sadler W A, editores. Ovarian follicular development and function. Ed. Raver press. Pp. 1-3.
- ☉ Quinson N, Robbins H, Clark M, Furness J. (2001) "Location and innervation of cell bodies of sympathetic neurons projecting to the gastrointestinal tract in the rat". *Arch. Histol. Cytol.* 3:281-294.
- ☉ Ramírez H D. (2011) "¿La participación del nervio ovárico superior en la regulación de la ovulación y la esteroidogénesis depende del ciclo circádico? La rata adulta como modelo de estudio". Tesis de maestría en Ciencias biológicas (Biología experimental). UNAM. FES Zaragoza.

- 🌀 Raynaud J P. (1973) "Influence of rat estradiol binding plasma protein (EBP) on utero trophic activity". *Steroids*. 21:249-258.
- 🌀 Rebar R, Judd H L, Yen S S, Rakoff J, Vandenberg G, Naftolin F (1976) "Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome". *Clin. Invest*. 57:1320-1329.
- 🌀 Richards J S. (1980) "Maturation of ovarian follicle: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones of follicular cell differentiation". *Physiology*. 60:51-89.
- 🌀 Rodríguez J. (1993) "Manual de clases prácticas de fisiología animal". Ed. Secretariado de publicaciones. Pp. 147-148.
- 🌀 Rosa-E-Silva A, Guimaraes M A, Padmanabhan V, Lara H E. (2003) "Prepubertal administration of estradiol valerate disrupts cyclicity and leads to cystic ovarian morphology during adult life in the rat: role of sympathetic innervation". *Endocrinology*. 144:4289-4297.
- 🌀 Rosas G G. (2006) "Efecto de la inducción del síndrome del ovario poliquístico en la rata infantil, sobre la dinámica del crecimiento folicular y la secreción". Tesis de licenciatura. UNAM. FES Zaragoza.
- 🌀 Ruiz M F. (1988) "Fundamentos de embriología y fisiología de la reproducción". Ed. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 95-99.
- 🌀 Saidapur S K. (1978) "Follicular atresia in the ovaries of nonmammalian vertebrates". *Cytol*. 5:225-244.
- 🌀 Salas M, Torrero C, Pulido S, Pérez H. (1991) "Acciones neurotrópicas de las Hormonas Tiroideas durante la Ontogenia Neural". En: Ontogenia Neuronal, Aspectos Corporativos y Mecanismos de Regulación. Pp. 177-198.
- 🌀 Sánchez Criado J E. (1999) "Fisiología del Ovario". En: Tresguerres JA. Ed. "Fisiología Humana". 2da. Edición. Ed. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid. Pp. 1020-1032.
- 🌀 Sánchez Criado J E, Sánchez A, Ruiz A, Gaytan F. (1993) "Endocrine and morphological features of cystic ovarian condition in antiprogestosterone RU486 treated rats". *Endocrinology*. 129:237-245.

- 🐼 Sasahara T H, de Souza R R, Machado M R, da Silva R A, Guidi W L, Ribeiro A A. (2003) "Macro and microstructural organization of the rabbit's celiac-mesenteric ganglion complex (*Oryctolagus cuniculus*)". *Ann. Anat.* 185:441-448.
- 🐼 Semak I, Korik E, Naumova M, Wortsman J, Slominski A. (2004) "Serotonin metabolism in rat skin: characterization by liquid chromatography mass spectrometry". *Arch. Biochembiophys.* 421:61-67.
- 🐼 Shinohara H, Nakatani T, Matsuda T. (1985) "The presence of lymphatic stomata in the ovarian bursa of the golden hamster". *The anatomical record.* 213:44-52.
- 🐼 Singh K B. (2005) "Persistent estrus rat models of polycystic ovary disease: an update". *Fertility and Sterily.* 84:1228-1234.
- 🐼 Sisu A, Petrescu C, Cebzan C, Motoc A, Bolintineanu S, Vaida A, Niculescu M, Rusu M. (2008) "The adult coeliac ganglion: a morphologic study". *Rumánica de Morfología y Embriología.* 49:491-494.
- 🐼 Slominski A, Gomez-Sánchez C, Foecking M, Wortsman J. (2000) "Active steroidogenesis in the normal rat skin". *Biochimbiophysacta.* 1474:1-4.
- 🐼 Smith-White S, Ojeda S R. (1981) "Change in ovarian luteinizing (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) receptor content and in gonadotropin-induced ornithine decarboxylase activity during prepubertal and pubertal development of the rat". *Endocrinology.*109:152-161.
- 🐼 Sotomayor-Zárate R, Dorfman M, Paredes A, Lara H E. (2008) "Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat". *Biology of Reproduction.* 78:673-689.
- 🐼 Sotomayor-Zárate R, Tiszavari M, Cruz G, Lara H E. (2011) "Neonatal exposure to single doses of estradiol or testosterone programs ovarian follicular development-modified hypothalamic neurotransmitters and causes polycystic ovary during adulthood in the rat". *Fertility and Sterility.* 96:1490-1496.

- ☉ Spanel-Borowski K. (1981) "Morphological investigation on follicular atresia in canine ovaries". *Cell tissue*. 214:155-168.
- ☉ Stener-Victorin E, Lindholm C. (2004) "Immunity and beta-endorphin concentrations in hypothalamus and plasma in rats with steroid-induced polycystic ovaries: effects of low-frequency electroacupuncture". *Biology of Reproduction*. 70:329-333.
- ☉ Suckow M, Weisbroth S, Franklin C. (2006) "The laboratory rat". 2a edición. Ed. Elsevier. Pp. 711-720
- ☉ Takeo Y. (1984) "Influence of continuous illumination on estrous cycle of rats: time course of change in levels of gonadotropins and ovarian steroids until occurrence of persistent estrus". *Neuroendocrinology*. 39:97-104.
- ☉ Tresguerres J A F. (2003) "Fisiología humana". 2ª edición. Ed. McGraw-Hill. Pp. 1036-1048.
- ☉ Urbanski H F, Ojeda S R. (1983) "The juvenile-peripubertal transition period in the female rat: establishment of a diurnal pattern of pulsatile luteinizing hormone secretion". *Endocrinology*. 117:644-649.
- ☉ Urbanski H F, Ojeda S R. (1986) "Development of afternoon mini surges of luteinizing hormone secretion in prepubertal female rats is ovary independent". *Endocrinology*. 118:1187-1193.
- ☉ Vallcaneras S, Casais M, Anzulovich A, Delgado S, Sosa Z, Telleria C, Rastrilla A. (2011) "Androstenedione acts on the celiac ganglion and modulates luteal function via the superior ovarian nerve in the postpartum rat". *Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 125:243-250.
- ☉ Vanderhyden B C, Rouleau A, Armstrong D T. (1986). "Effect of removal of the ovarian bursa of the rat on infundibular retrieval and subsequent development of ovulated oocytes". *Reprod. Fertil*. 77:393-399.
- ☉ Viso R. (1998) "Nomenclatura anatómica moderna". Ed. Universidad central de Venezuela. Consejo de desarrollo científico y humanístico. Pp. 311-315.
- ☉ Weber A, Adler N. (1979) "Delay of constant light induced persistent vaginal estrus by 24 hour time cues in rats". *Science*. 204:323-325.



- 🌐 Welsch U, Sobotta J. (2008) "Histología". Ed. Médica panamericana. Pp. 501-511.
- 🌐 Wuttke W, Homma K, Lamberts J, Hohn K G. (1980) "The role of monoamines in female puberty". *Fed. Proc.* 39:2378-2383.
- 🌐 Yen S S C. (2001) "Síndrome del ovario poliquístico: Anovulación crónica Hiperandrogénica". En: Yen S S C, Jaffe R B, Barbieri R L, editores. *Endocrinología de la reproducción fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. 4ta. Edición. Ed. Médica panamericana. Pp. 465-510.