



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

CARRERA DE BIOLOGÍA

**Efectos agudos y subagudos del bloqueo de los
receptores β -adrenérgicos del ovario sobre la
ovulación y la esteroidogénesis de la rata con
Síndrome del Ovario Poliquístico**

TESIS

Que para obtener el título de Bióloga

Presenta:

Lizzbeth Yureli De León Gordillo

Directora de tesis:

Dra. Leticia Morales Ledesma



México, CDMX

Abril, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

CARRERA DE BIOLOGÍA

**Efectos agudos y subagudos del bloqueo de los
receptores β -adrenérgicos del ovario sobre la
ovulación y la esteroidogénesis de la rata con
Síndrome del Ovario Poliquístico**

TESIS

Que para obtener el título de Bióloga

Presenta:

Lizzbeth Yureli De León Gordillo

Directora de tesis:

Dra. Leticia Morales Ledesma



**Investigación realizada gracias al Programa UNAM
DGAPA-PAPIIT con clave IN217016**

México, CDMX

Abril, 2016.



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 DE LEÓN GORDILLO LIZBETH YURELI, con número de cuenta 409021916, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día 05 de abril de 2016 a las 09:00 hrs., para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE Dra. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN
- VOCAL Dra. LETICIA MORALES LEDESMA
- SECRETARIO Dra. PATRICIA ROSAS SAUCEDO
- SUPLENTE Dra. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR
- SUPLENTE M. en IBSH. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ



El título de la tesis que presenta es: Efectos agudos y subagudos del bloqueo de los receptores β -adrenérgicos del ovario sobre la ovulación y la esteroidogénesis de la rata con Síndrome del Ovario Poliquístico.

Opción de titulación: Tesis.

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

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU SANTO"
 México, D. F., a 15 de febrero de 2016.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA GÓNEZ
 DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
 "ZARAGOZA"
 DIRECCIÓN
 VU. BO.
 M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
 JEFE DE CARRERA

RECIBI
 OFICINA DE EXÁMENES
 PROFESIONALES Y DE GRADO

Agradecimientos

A mi universidad (**Universidad Nacional Autónoma de México**) y mi facultad, **Fes Zaragoza**, por darme la oportunidad de haber ingresado a esta honorable casa de estudios y por permitirme concluir mis estudios, así como los conocimientos adquiridos que me proporcionaron los profesores para mi formación profesional.

A la **Dra. Leticia Morales Ledesma**, le agradezco infinitamente que me haya brindado su amistad, apoyo, paciencia y por compartir conmigo sus conocimientos que me ayudaron a culminar mis estudios.

A los sinodales:

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dra. Leticia Morales Ledesma


Dra. María Elena Ayala Escobar

M. en C IBSH. Angélica Flores Ramírez

Por dedicar tiempo en la revisión de este estudio y por aportar sus conocimientos para una mejora en la tesis.

A la **Dra. Ely**, a la **Dra. Adriana** y al **Dr. Román** por el cuidado de los animales utilizados en este estudio.

Al **Biólogo Roberto Chavira** por su ayuda en la cuantificación de hormonas esteroides.



A mis tíos (**Sandra, Luis, Juanita, Joel, Alfredo, Carmen y Lilian**) porque siempre estuvieron dándome apoyo a lo largo de la carrera.

A mi suegra:

Doña mago, porque es una maravillosa persona, le agradezco por todo el cariño, apoyo y amor que me ha brindado. La quiero mucho.

A mis cuñadas y primos:

Josephina, Yeni, Kari, Verito, Chava, Aby, Kenia, Sulma, Cris, Jon, Andres, Karen, Karina, Alex y Michel porque son como mis hermanos, gracias por su apoyo incondicional, los quiero mucho.

A mis sobrinos:

Sophia, Ulises, David, Fridis, Fany, Ali, Alan, Pepe, Diana, Mariana, Andrea, Manuelito, Iker y Dany porque con sus sonrisas me alegraban el día. Los quiero mucho.

A mis amigos de la carrera:

Lupita, Karen, Jesus, Erick e Ivan, gracias por todos los momentos que pasamos a lo largo de carrera, porque hicieron alegres mis días en la facultad. Gracias por apoyarme y escucharme cuando más lo necesite.

A mis amigos y compañeros de laboratorio:

Azu, Wendy, Chio, Ivan, Daniel, Cesar, Misa, David, Gaby, Dey, Ely, Rosa, Nayeli, Vale y Lulu. Gracias a todos por todos los momentos agradables que pasamos. Sin ustedes mi estancia en el laboratorio no hubiera sido la misma.

A mi Dra. Gaby:

Gaby, no tengo palabras para agradecerte todo lo que hiciste por mí, porque desde que entre a laboratorio me brindaste tus conocimientos, paciencia, apoyo y no solamente fuiste mi mamá académica, también me llevo una gran amiga. Te agradezco infinitamente porque fuiste una de las personas que me motivo a seguir. Te quiero mucho Gaby.

A mi amiga Lupita:

Guadalupe, sabes que te quiero muchísimo, gracias por tú amistad y por todos esos momentos felices que pasamos a lo largo de la carrera, siempre estuviste cuando más lo necesite.

A mi amiga Azu:

Azu, a pesar del poco tiempo que nos conocemos no solo me brindaste tú amistad, también fuiste una mamá académica, gracias por todos esos momentos agradables que pasamos, así como los conocimientos que me brindaste. Te quiero mucho amiga.

Dedicatorias

A DIOS:

Por haberme permitido culminar mis estudios y por estar conmigo a cada paso que doy, cuidándome, protegiéndome y guiándome.

A mis papas:

Mamita y papito, son las personas más maravillosas que pueda conocer, porque a lo largo de mi vida siempre han creído y confiado en mí. Gracias por su apoyo incondicional y por esas palabras de aliento que me dan, porque a pesar de la distancia siempre han estado presente conmigo. Los amo con todo mi corazón y jamás los defraudare.

A mi príncipe:

Gracias **Carlitos**, este logro es principalmente por tí, porque supiste entender en aquellos momentos de estrés que pase a lo largo de la carrera. Gracias por todos esos libros y libretas con garabatos, me hacías el día cuando llegaba a clases y veía todos tus dibujos en mis notas. Porque tan solo cuando te dejaba en la escuela y me dabas una sonrisa me dabas la energía suficiente para seguir adelante. Y en los momentos difíciles, aun estando pequeño me decías: “mamita tú puedes”. Eres por quien tu papá y yo luchamos todos los días. Mi amor te amo con toda mi alma.

A mi esposo:

Carlos, te agradezco infinitamente todo el apoyo que me has brindado, porque siempre me has escuchado y me levantaste en aquellos momentos que ya no podía más, gracias corazón por que día a día con tus palabras de aliento me diste la fuerza necesaria para que terminara mis estudios. Te amo vida mía.

A mis hermanos:

Dago eres una de las personas que más me motivo a seguir estudiando, porque desde pequeños me has enseñado que las cosas se obtienen a base de esfuerzo y estudio, nada se gana de gratis. Gracias hermanito por todos esos momentos que hemos pasado, por todas las travesuras que me hacías de pequeña y que las recuerdo con gusto. A **Karen**, a pesar del poco tiempo que llevamos de conocernos sé que eres una maravillosa persona, aún tenemos muchas cosas por vivir y por compartir. Los amo hermanitos.

A la familia Alonso Gordillo:

Tía Sandra, mamita Marina, Jon y Cris porque esta tesis es por ustedes, sin su ayuda y apoyo no lo hubiera logrado. Gracias por cuidar a mi latosito cuando yo no podía. Ustedes son las principales personas que permitieron que yo concluyera mis estudios. Los quiero con todo mi corazón.

A mis sobrinos:

Sophia, Uli, David, Fridis y Fani, saben que los quiero muchísimo, porque con sus sonrisas y travesuras me alegran el día.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Contenido

ABREVIATURAS	i
RESUMEN	ii
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
Estructura del ovario.....	3
Bursa del Ovario	4
Crecimiento y Maduración Folicular.....	5
Regulación Endocrina del Desarrollo Folicular.....	9
Ovulación y su Regulación Hormonal	10
Esteroidogénesis y su Regulación Endocrina en el Ovario	12
Atresia Folicular	14
Inervación Ovárica.....	16
Participación de la Noradrenalina en la Regulación de las Funciones Ováricas	17
Síndrome del Ovario Poliquístico en la Mujer	22
Síndrome del Ovario Poliquístico en la Rata.....	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
HIPÓTESIS.....	30
OBJETIVO GENERAL.....	30
Objetivos particulares	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Bloqueo de los receptores β -adrenérgicos	32
Procedimiento de la autopsia	33
Cuantificación de hormonas esteroides.....	33
Análisis estadístico	34
RESULTADOS	35
EXPERIMENTO 1	35
Efectos de la administración del Valerato de Estradiol en ratas de 10 días de edad y sacrificadas en la etapa adulta, en el día del estro	35
EXPERIMENTO 2	40
Efectos agudos y subagudos de la inyección de PROPRANOLOL en la bursa de uno o ambos ovarios de animales CÍCLICOS	40

EXPERIMENTO 3	46
Efectos subagudos de la inyección de PROPRANOLOL en la bursa de uno o ambos ovarios, sobre la respuesta ovulatoria de animales inyectados con Vh o con VE	46
EXPERIMENTO 4	49
Efectos agudos y subagudos de la inyección de PROPRANOLOL en la bursa de uno o ambos ovarios de animales tratados con VE	49
DISCUSIÓN	55
Modelo del Animal Cíclico	61
Modelo del Animal con SOPQ	63
CONCLUSIONES	65
REFERENCIAS	66

ABREVIATURAS

▪ 3β-HSD	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
▪ 17α-OH	17 α -hidroxilasa
▪ 17β-HSD	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
▪ A	Adrenalina
▪ AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
▪ ATP	Adenosín trifosfato
▪ CGRP	Péptido relacionado con el gen que codifica la calcitocina
▪ DβH	Dopamina- β -hidroxilasa
▪ DA	Dopamina
▪ DHEA	Dehidroepiandrosterona
▪ DHEAS	Sulfato dehidroepiandrosterona
▪ DL-Propranolol	Propranolol hidroclicorado
▪ E₂	17 β -Estradiol
▪ EGF	Factor de crecimiento epidermal
▪ FNMT	Feniletanolamina N-metiltransferasa
▪ FSH	Hormona estimulante del folículo
▪ GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
▪ L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina
▪ LH	Hormona luteinizante
▪ NA	Noradrenalina
▪ NGF	Factor de crecimiento neural
▪ NOS	Nervio ovárico Superior
▪ NPO	Nervio del plexo ovárico
▪ NPY	Neuropéptido Y
▪ NV	Nervio vago
▪ OPQ	Ovario poliquístico
▪ P₄	Progesterona
▪ P450scc	22-hidroxilasa; 20-hidroxilasa; 20,22-desmolasa
▪ StAR	Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda
▪ SOPQ	Síndrome del ovario poliquístico
▪ T	Testosterona
▪ TH	Tirosina hidroxilasa
▪ VE	Valerato de estradiol
▪ VIP	Péptido intestinal vasoactivo

RESUMEN

En la rata, el Síndrome del Ovario Poliquístico (SOPQ) inducido por la administración del valerato de estradiol (VE), resulta en la alteración del ciclo estral, anovulación, formación de quistes foliculares y altas concentraciones de hormonas esteroides ováricas. Se ha planteado que estas alteraciones son el resultado del incremento en la actividad de las fibras simpáticas debido a un aumento en la liberación y contenido de noradrenalina (NA) y del péptido intestinal vasoactivo (VIP) en el ovario, así como una disminución en el número de receptores β -adrenérgicos en los compartimentos del ovario que reciben innervación catecolaminérgica.

En el presente estudio se evaluó la participación de la NA en ratas con SOPQ, sobre la ovulación y la secreción de hormonas esteroides ováricas, mediante el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos del ovario con propranolol (PRO). Para ello, se utilizaron ratas hembra de la cepa CII-ZV, algunas de las cuales fueron mantenidas como testigos absolutos y sacrificadas a aproximadamente a los 68 días de edad en la etapa del estro, otros animales fueron inyectados a los 10 días de edad con 0.1 ml de aceite de sésamo, que fungió como vehículo (Vh) o con 2 mg de VE. Aproximadamente a los 68 días de edad en el día del estro algunos animales tratados con Vh o con VE fueron inyectados con 20 μ l de PRO (10^{-4} M) o de solución salina (SS) en la bursa del ovario izquierdo, derecho o en ambos ovarios. Estos animales fueron sacrificados a los 30 minutos o al siguiente estro post-cirugía y se evaluó la tasa de animales ovulantes, el número de ovocitos liberados y la concentración de hormonas progesterona, testosterona y estradiol en suero.

La inducción de SOPQ mediante la administración del VE, provocó adelanto en la edad de apertura vaginal, irregularidad en el patrón del ciclo estral, disminución en la tasa de animales ovulantes y en el número de ovocitos liberados e incrementó la secreción de hormonas esteroides.

En los animales con Vh, la inyección de propranolol en la bursa del ovario izquierdo o derecho, incrementó la secreción de progesterona a los 30 minutos de la cirugía, mientras

que en los animales sacrificados al siguiente estro, no se modificó, independientemente del ovario tratado. Respecto a la concentración de testosterona, el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos del ovario derecho o de ambos ovarios resultó a los 30 min en el incremento de la concentración de esta hormona, mientras que en animales sacrificados al siguiente estro este efecto se presentó únicamente cuando la inyección de PRO fue en el ovario derecho. La secreción de estradiol disminuyó cuando el PRO se inyectó en el ovario derecho o en ambos ovarios de animales sacrificados a los 30 minutos.

En animales con SOPQ, el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos de animales sacrificados al siguiente estro incrementó el número de ovocitos liberados, cuando el bloqueo se realizó en el ovario derecho o en ambos ovarios. La inyección de propranolol a los 30 minutos no modificó la secreción de progesterona, mientras que al siguiente estro, la inyección en cualquier de los ovarios resultó en el incremento de la concentración de la progestina. La concentración de testosterona en suero no se modificó independientemente del ovario tratado y del tiempo en el que permanecieron bloqueados los receptores. La concentración de estradiol incrementó a los 30 minutos de la inyección con propranolol en el ovario izquierdo, mientras que en animales sacrificados al siguiente estro este efecto se presentó cuando el ovario derecho fue el inyectado.

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permiten concluir que en el animal con SOPQ, la noradrenalina regula de manera inhibitoria la respuesta ovulatoria y la secreción de progesterona y estradiol. Además, la respuesta ovulatoria y esteroideogénica dependen del ovario en estudio y del tiempo en el que permanezcan bloqueados los receptores β -adrenérgicos.

INTRODUCCIÓN

El ovario es una glándula que realiza dos funciones: la producción de óvulos maduros aptos para ser fecundados (ovulación) y la síntesis de hormonas esteroides (esteroidogénesis) y peptídicas (Sánchez-Criado, 1999). Las funciones ováricas son reguladas por señales endocrinas y nerviosas. La regulación endocrina se encuentra regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Yen, 2001; Gal y col., 2007; Keiner, 2010), mientras que las señales nerviosas que regulan las funciones del ovario provienen de tres paquetes nerviosos: el nervio ovárico superior (NOS), el nervio vago (NV) y el nervio del plexo ovárico (NPO) (Dissen y Ojeda, 1999; Klein y Burden, 1988).

El desarrollo de patologías ováricas se ha visto asociado con alteraciones en cualquiera de las señales de regulación del eje reproductivo, tal es el caso del Síndrome del Ovario Poliquístico (SOPQ). Esta patología es la principal causa de infertilidad en la mujer, que afecta entre el 5 y el 10% de las mujeres en edad reproductiva (Entterweit y Mechanick, 1988; VanDerSpuy y Dyer, 2004; Merino y col., 2009; Goodarzi y col., 2011) y que se caracteriza por hiperandrogenismo (clínico y/o bioquímico), disfunción ovulatoria, ovarios poliquísticos (OPQ), oligomenorrea, amenorrea, una elevada concentración de LH y una menor concentración de FSH en suero (Botella, 1995; Franks, 1995; Yen, 2001; Espinos y Calaf, 2007; Goodarzi y col., 2011).

Se han desarrollado diferentes modelos experimentales para el estudio del SOPQ (Franks, 2009; Shi y Vine, 2012). La administración del valerato de estradiol (VE), un estrógeno de larga actividad con una vida media de 15 días, induce en la rata anovulación, formación de quistes foliculares, hiperandrogenismo y elevadas concentraciones de estrógenos (Barria y col., 1993; Stener-Victorin y col., 2000; Rosa-E-Silva y col., 2003; Shi y Vine, 2012), semejantes a las observadas en la mujer con SOPQ.

Las ratas con SOPQ inducido por la administración del VE, presentan incremento en la actividad de las fibras simpáticas. Esto es evidenciado por un aumento en la liberación y contenido de NA en el ovario y una disminución en el número de receptores β -adrenérgicos

en los compartimentos del ovario que reciben inervación catecolaminérgica (Barria y col., 1993; Stener-Victorin y col., 2000; Rosa-E-Silva y col., 2003; Greiner y col., 2005; Shi y Vine, 2012). En el animal con SOPQ, la eliminación de la información simpática por la sección bilateral del NOS, disminuye la concentración de NA en el ovario, lo que se asocia con el restablecimiento de la capacidad ovulatoria, el patrón del ciclo estral y la secreción de andrógenos y estradiol (Barria y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003).

El grupo de Luna (2012) mostró en la rata adulta cíclica, que la estimulación crónica de los receptores β -adrenérgicos mediante la administración subcutánea de isoproterenol, agonista no selectivo de los receptores β -adrenérgicos, resulta en elevadas concentraciones de andrógenos en suero y en la formación de quistes foliculares. Estos efectos no se presentan cuando los animales son inyectados de manera simultánea con propranolol, antagonista no selectivo de los receptores β -adrenérgicos. Estos resultados indican que en la rata cíclica la esteroidogénesis ovárica es modulada por la activación de los receptores adrenérgicos.

Para analizar en el modelo de la rata con SOPQ el papel del sistema catecolaminérgico, en el presente estudio se evaluó la tasa de animales ovulantes, el número de ovocitos liberados y la secreción de hormonas esteroides, mediante el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos por la inyección de propranolol en la bursa de uno o ambos ovarios.

MARCO TEÓRICO

Estructura del ovario

El ovario es un órgano par, ovoide, que se encuentra alojado en la pelvis, sujeto a la superficie posterior del ligamento ancho por medio de un pliegue peritoneal denominado mesovario. Posee estructuras fibromusculares que mantienen al ovario en posición a la entrada de las trompas de Falopio y unido al útero (Botella, 1995; Tresguerres, 2010).

El ovario realiza dos funciones: la producción de óvulos maduros aptos para ser fecundados (ovulación) y la síntesis de hormonas esteroideas (esteroidogénesis) y peptídicas (Sánchez-Criado, 1999).

El ovario presenta tres regiones estructurales (Figura 1): la médula, la corteza y el hilio (Tresguerres, 2010). **La médula** está situada en la porción central del ovario y contiene tejido conjuntivo laxo, un conjunto de vasos sanguíneos, vasos linfáticos y fibras nerviosas. **La corteza** rodea a la médula y contiene a los folículos ováricos incluidos en tejido conjuntivo. En el estroma que rodea los folículos hay células musculares lisas dispersas. **El hilio** es la porción del ovario por donde ingresan nervios, vasos sanguíneos y linfáticos, además de que contiene tejido conectivo de sostén y algunas células esteroidogénicas denominadas células hiliares (Ross y Pawlina, 2008; Tresguerres, 2010).

El ovario está constituido por tres compartimientos funcionales: el intersticial, el folicular y el luteal. Estas estructuras se encuentran en constante transformación (Sánchez-Criado, 1999).

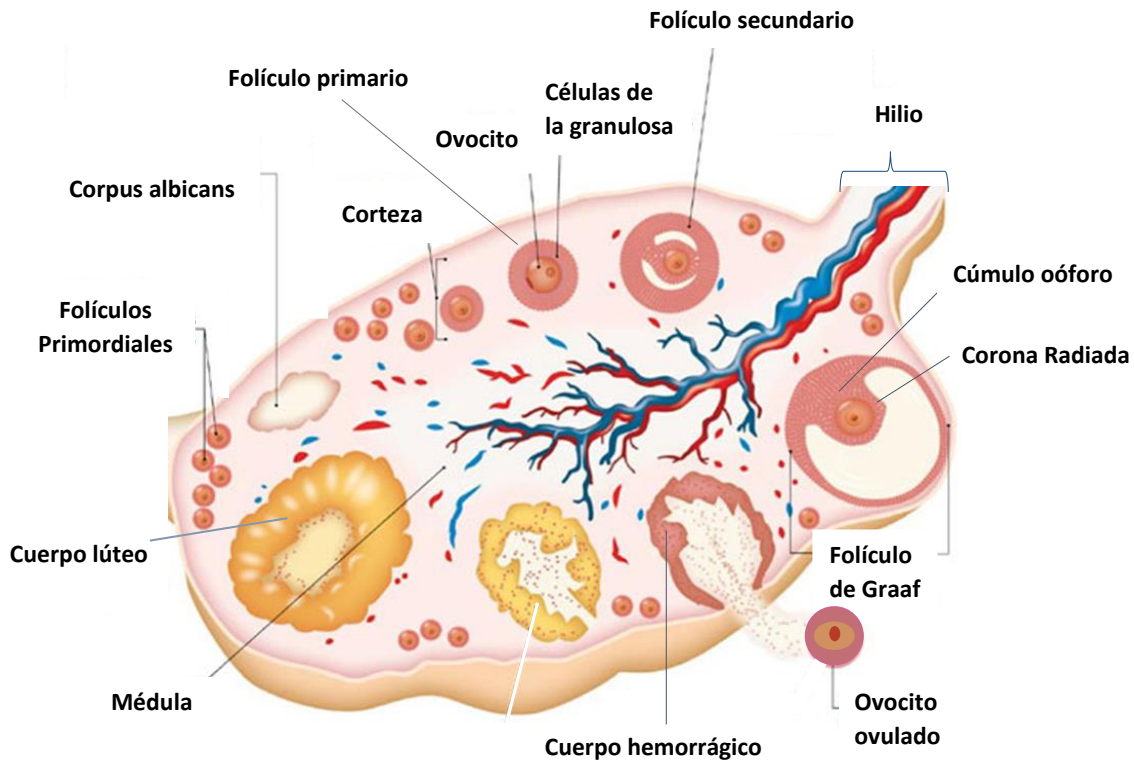


Figura 1. Estructura del ovario en la que se aprecia el crecimiento del folículo, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Tomado y modificado de Ross y Pawlina, 2008).

Bursa del Ovario

El ovario de los roedores, coneja y vaca se encuentra cubierto por un repliegue del peritoneo denominado “Bursa ovárica” (Figura 2) (Botella, 1995), la cual posee tres capas (Martin y col., 1981):

- & **La capa interna:** está formada por epitelio discontinuo situado frente al ovario.
- & **La capa intermedia:** constituida por tejido conjuntivo que contiene fibroblastos, paquetes de células de músculo liso y vasos sanguíneos.
- & **La capa externa:** Está formada por epitelio continuo que se encuentra en contacto con la cavidad peritoneal.

La bursa ovárica provee al ovocito un microambiente hormonal necesario durante el proceso de la ovulación y lo dirige hacia al oviducto, impidiendo que salgan a la cavidad abdominal (Botella, 1995; Li y col., 2007). En ratas adultas, la eliminación de la bursa ovárica resulta en un menor número de ovocitos en el oviducto (Vanderhyden y col., 1986).

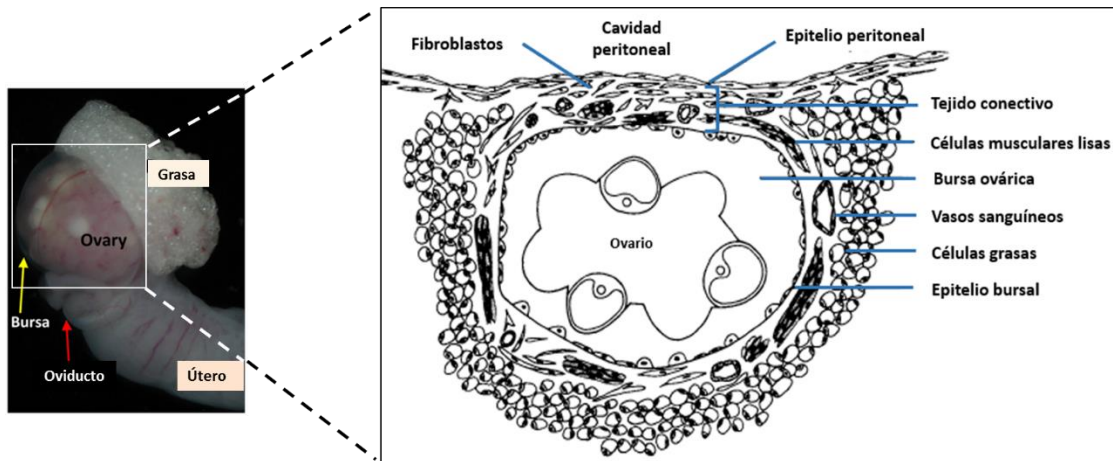


Figura 2. Esquema de la Bursa ovárica en la rata (Tomado y modificado de Martin y col., 1981; Zhang y col., 2013).

Crecimiento y Maduración Folicular

El folículo ovárico constituye la unidad funcional del ovario (Yeh y Adashi, 2001). Se encarga de proteger, nutrir, madurar y suministrar al ovocito un ambiente hormonal adecuado (Gal y col., 2007). Además, libera al ovocito capaz de ser fecundado y secreta hormonas que estimulan el crecimiento y la diferenciación de los órganos del aparato reproductor femenino (Domínguez y col., 1991).

De acuerdo a su complejidad morfológica, los folículos se clasifican en:

Folículo primordial: Constituyen el conjunto de folículos en reposo. Se encuentran formados por un ovocito diploide primario detenido en estadio de diploteno (9 a 25 μm de diámetro) rodeado por una sola capa de células aplanadas denominadas pregranulosas y por la **membrana basal** (Figura 3), que actúa como una barrera semipermeable (Domínguez y col., 1991). El ovocito mide aproximadamente 30 μm de diámetro y posee un núcleo grande, excéntrico y voluminoso provisto de eucromatina dispersa (Ross y Pawlina, 2008).

En la mujer aproximadamente 400 000 folículos primordiales persisten al comienzo de la pubertad y solo alrededor de 400 folículos completarán su desarrollo hasta la ovulación y el resto degenerarán por atresia (Arias, 2003; Sadler, 2007; Carlson, 2009).

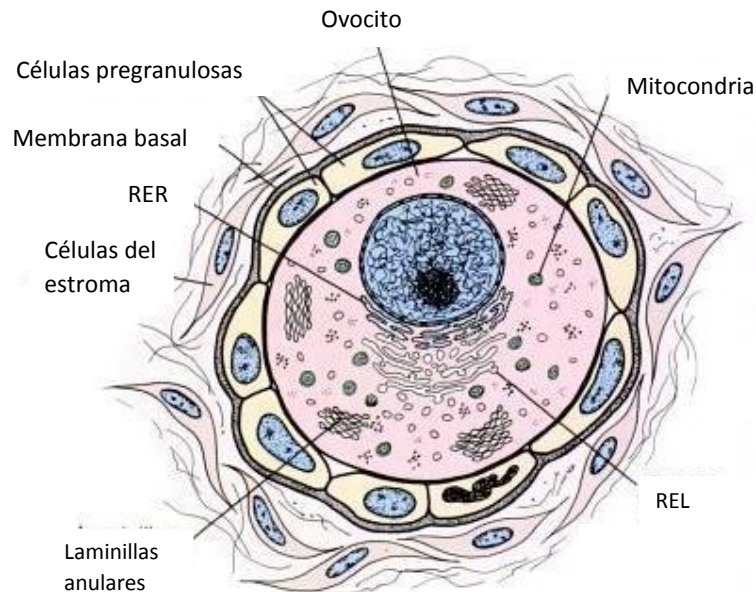


Figura 3. Esquema de un folículo primordial en la mujer. RER; Retículo endoplásmico rugoso; REL, Retículo endoplásmico liso (Tomado y modificado de Ross y Pawlina, 2008).

El primer signo de crecimiento folicular es el aumento del tamaño del ovocito, seguido por la proliferación de las células de la granulosa. Una vez iniciado el crecimiento folicular culmina en uno de dos eventos: la ovulación o la atresia (Domínguez y col., 1991).

Al inicio de cada ciclo reproductivo los folículos primordiales comienzan a crecer y durante su maduración pueden apreciarse tres estadios: primario, secundario o antral y preovulatorio (Sadler, 2004).

Folículo Primario: Está formado por un ovocito primario rodeado por una capa de células de la granulosa (originadas a partir de las células pregranulosas) y la membrana basal (Yen y col., 2001; Sadler, 2004; Carlson, 2009). Las células de la granulosa y el ovocito secretan una capa de glicoproteínas que se deposita sobre la superficie del ovocito, formando la **zona pelúcida** que protege y suministra nutrimentos al ovocito (Sadler, 2004). En este estadio, las células del estroma cortical migran alrededor de la membrana basal, dando lugar a la formación de la **teca folicular** (Figura 4) (Sadler, 2007; Ross y Pawlina, 2008; Tresguerres, 2010).

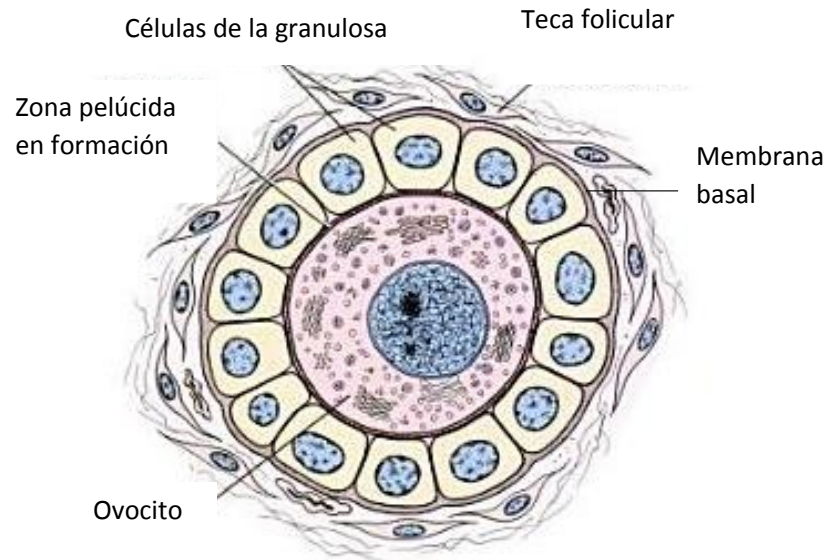


Figura 4. Esquema de un folículo primario en la mujer (Modificado de Ross y Pawlina, 2008).

Folículo secundario: Presenta un ovocito primario rodeado por 6 a 12 capas de células de la granulosa (Figura 5). En estos folículos se aprecian pequeñas cavidades llenas de líquido folicular, denominadas cuerpos de **Call-Exner** (Yen y col., 2001; Alberto, 2004), que se originan por extravasación de componentes plasmáticos y por secreción de las células foliculares. El líquido folicular contiene proteínas, polipéptidos, FSH (Hormona estimulante del folículo), LH (Hormona luteinizante), prolactina, estrógenos, progesterona y noradrenalina (NA) (Domínguez y col, 1991; Ross y Pawlina, 2008).

Las células de la teca proliferan y se diferencian en dos capas, la **interna:** es la capa más cercana a la membrana basal formada por vasos sanguíneos y células inervadas por el sistema nervioso autónomo, que adquieren características de células productoras de esteroides. La **teca externa** es la capa más superficial, que posee haces de fibras de colágeno y células musculares lisas implicadas en la contracción del folículo que precede a la ovulación (Domínguez y col., 1991; Sánchez-Criado, 1999; Casabiell, 2006; Ross y Pawlina, 2008; Keiner, 2010).

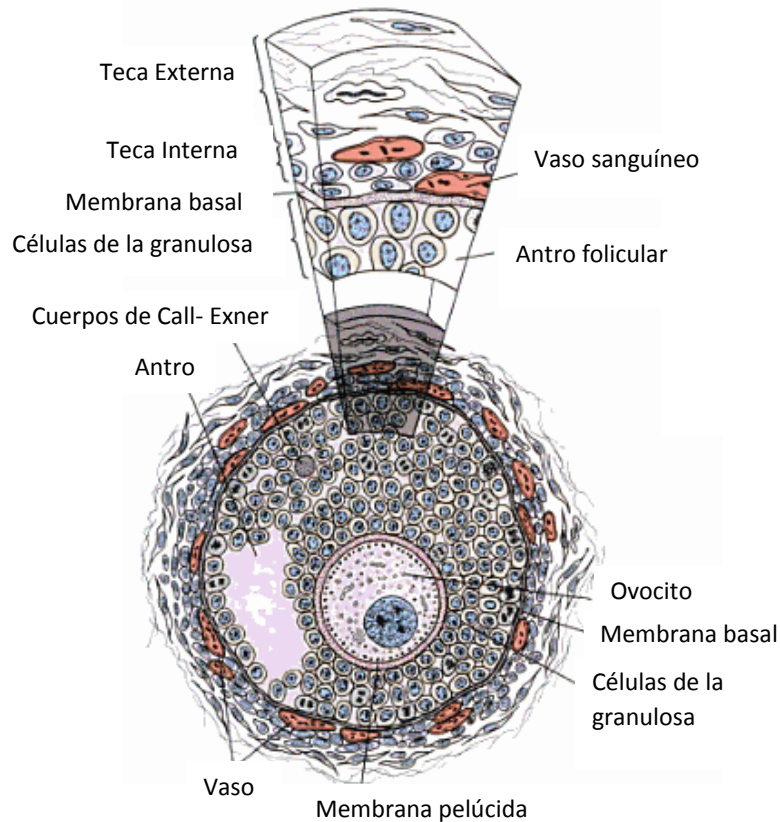


Figura 5. Esquema de un folículo secundario en la mujer (Tomado y modificado de Ross y Pawlina, 2008).

Folículo preovulatorio: Constituye el estadio final del desarrollo folicular. La fusión de los cuerpos de Call-Exner da lugar a la formación del antro folicular. A medida que el folículo se acerca a su tamaño máximo, la actividad mitótica de las células de la granulosa disminuye (Ross y Pawlina, 2008). El ovocito primario es desplazado a una posición excéntrica. En este estadio del desarrollo folicular se aprecia un montículo de células de la granulosa denominado **cúmulo oóforo**, que mantiene unido al ovocito con el resto del compartimiento granuloso (Figura 6). Las células que rodean al ovocito reciben el nombre de **corona radiada**. Las células del cúmulo oóforo y la corona radiada le proporcionan al ovocito nutrientes y factores necesarios para su crecimiento final (Domínguez y col., 1991; Sánchez-Criado, 1999; Gal y col., 2007).

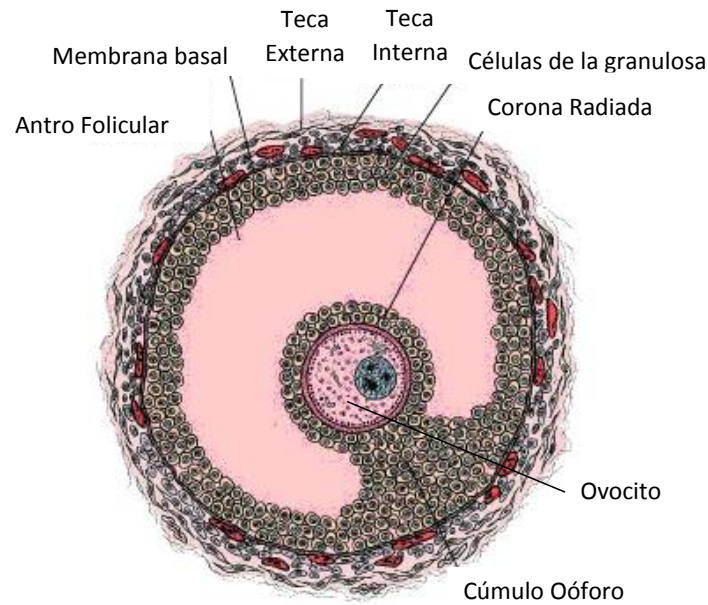


Figura 6. Esquema de un folículo preovulatorio en la mujer (Tomado y modificado de Ross y Pawlina, 2008).

Regulación Endocrina del Desarrollo Folicular

El inicio del crecimiento folicular es independiente de la concentración plasmática de las gonadotropinas (FSH y LH) (Domínguez y col., 1999; Yen y col., 2001; Alberto, 2004). Es a partir del estadio de folículo secundario cuando el desarrollo folicular se hace dependiente de la FSH y la LH (Dissen y col., 2002; Rosales y col., 2006).

Las gonadotropinas son glicoproteínas producidas en las células gonadotropas de la adenohipófisis. Su secreción es regulada por acción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), un decapeptido secretado en el hipotálamo (Yen, 2001; Gal y col., 2007; Keiner, 2010). En el estrato granuloso, la FSH estimula la división mitótica de las células, el aumento del tamaño folicular e induce en forma dosis dependiente la síntesis de las aromatasas (Botella, 1995).

En el ovario, las hormonas esteroideas (progestinas, andrógenos y estrógenos) participan en la regulación del crecimiento y desarrollo folicular. El estradiol (17β -estradiol) induce la mitosis de las células de la granulosa, evento que resulta en el crecimiento del

folículo (Febres y col., 2009). Asimismo, estimula la formación de receptores a FSH a partir del estadio de folículo primario (Dicken y col., 2010) y los de LH cuando el folículo alcanza el estadio preovulatorio (Chedrese, 2003; Carlson, 2009). En las células de la granulosa, los andrógenos estimulan el número de receptores a FSH (Erickson y Danforth, 1995; González-Merlo y González, 2003). Asimismo, la progesterona inhibe la proliferación de las células de la granulosa mediante el bloqueo del factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés) (Erickson y Danforth, 1995).

Las células de la granulosa sintetizan inhibina, activina y folistatina que son hormonas glucoproteicas. La inhibina es un heterodímero compuesto por subunidades α y β (Sánchez-Criado, 1999). En los gonadotropos, la inhibina disminuye la sensibilidad a la GnRH y la secreción de FSH (Sánchez-Criado, 1999; Terán y col., 2008), mientras que en las células de la teca, estimula la producción de andrógenos (Hillier y Miró, 1993; Terán y col., 2008; Dicken y col., 2010). La secreción de la inhibina es regulada de manera estimulante por acción de la FSH (Sánchez-Criado, 1999).

La activina es un heterodímero compuestos por tres subunidades beta de la inhibina (Sánchez-Criado, 1999; Dicken y col., 2010). Esta glucoproteína ejerce un efecto estimulante sobre la secreción de FSH en la adenohipófisis. También actúa de manera autocrina sobre las células de la granulosa donde estimula la formación de receptores a FSH, y aumenta la actividad de las aromatasas inducida por la FSH (Hillier y Miró, 1993).

La folistatina es una proteína de unión a la activina, mecanismo a través del cual regula de manera inhibitoria la acción de la activina. Su síntesis es estimulada por la activina y bloqueada por la inhibina (Dicken y col., 2010).

Ovulación y su Regulación Hormonal

La ovulación es el proceso de expulsión de un ovocito secundario viable. Se produce una vez que el folículo ha alcanzado el estadio de preovulatorio. Este proceso va acompañado de edema en la teca interna, muerte celular y aumento de las prostaglandinas (Domínguez y col., 1991).

En las últimas etapas del desarrollo folicular, el incremento en la concentración plasmática de los estrógenos estimula en la hipófisis la liberación preovulatoria de gonadotropinas, proceso denominado “feedback” o retroalimentación positiva (Botella, 1995; Sánchez-Criado, 1999; Carlson, 2009).

La liberación masiva de LH denominada como “pico preovulatorio” desencadena diversos eventos en el folículo preovulatorio, tales como:

- 1) El ovocito primario reinicia y completa la meiosis I e inicia la segunda división meiótica, momento a partir del cual se le denomina ovocito secundario. La maduración del ovocito queda detenida en metafase. Una vez expulsado, el ovocito solo completará su división meiótica en caso de ocurrir la fecundación (Domínguez y col., 1991; Carlson, 2009).
- 2) El aumento de la concentración del monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) en la pared folicular inhibe la división de las células de la granulosa (Sánchez-Criado, 1999).
- 3) El estrato granuloso sintetiza fibrinolisisina (enzima estimulada además por la FSH), enzima proteolítica que degrada los desmosomas presentes en las células de la granulosa y de la teca, así como las fibras de colágeno que rodean al folículo. Los productos generados de esta degradación ocasionan una reacción inflamatoria, que atrae leucocitos que secretan prostaglandinas hacia el interior del folículo. Estas prostaglandinas causan la contracción de las células musculares que rodean la teca externa, provocando la ruptura de la pared del folículo (Domínguez y col., 1999; Gal y col., 2007).

El ovocito es liberado junto con las células del cúmulo oóforo y de la corona radiada hacia las trompas de Falopio u oviductos, donde puede o no ocurrir la fecundación (Domínguez y col., 1999; Gal y col., 2007).

Tras la ovulación, la pared del folículo se colapsa, las células de la teca migran al espacio antral y junto con la granulosa rellenan la cavidad, evento estimulado por la acción de la LH (Tresguerres y castillo., 2005). Las células de la granulosa y de la teca se luteinizan y forman el **cuerpo lúteo** (Gal y col., 2007). Estas células luteinizadas acumulan gotas

lipídicas y gránulos de glucógeno en su citoplasma y comienzan a secretar progesterona y en menor concentración estrógenos (Gal y col., 2007; Moore y col., 2013).

Esteroidogénesis y su Regulación Endocrina en el Ovario

El ovario sintetiza tres tipos de hormonas esteroideas: progestágenos, andrógenos y estrógenos. Además de ser secretadas a la circulación sistémica, estas hormonas ejercen su acción de manera directa en el ovario (Sánchez-Criado, 1999; Cardinali, 2003). La esteroidogénesis es un conjunto de vías biosintéticas (Miller y Styne, 2001) que ocurren en el compartimiento folicular, luteal e intersticial del ovario (Fernández y Mangel, 1983).

El colesterol es el precursor de las hormonas esteroideas y se pueden obtener del plasma, donde circula en forma de lipoproteínas de alta o baja densidad; el producido de *novo*, a partir del acetato; y del que se produce por los depósitos de ésteres del colesterol, que se encuentran en las vacuolas lipídicas intracelulares (Fernández y Mangel, 1983; Sánchez-Criado, 1999; González-Merlo y González, 2003; Jácome, 2005).

En células de la teca, el colesterol intracelular es transportado de la membrana mitocondrial externa a la interna por medio de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR). Por acción del complejo enzimático P450_{scc} (22-hidroxiolasa; 20-hidroxiolasa; 20,22-desmolasa), el colesterol es metabolizado a pregnenolona (C₂₁) (Miller y Styne, 2001; González-Merlo y González, 2003).

Una vez sintetizada la pregnenolona, puede seguir dos vías: la Δ^4 o la Δ^5 . En la vía Δ^4 la pregnenolona es transformada en progesterona por la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD). Por acción de la 17 α -hidroxiolasa (17 α -OH) y 17,20-desmolasa, la progesterona es metabolizada en androstenediona. La 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) transforma a la androstenediona en testosterona (Figura 7). Esta ruta predomina en el tejido lúteo y se lleva a cabo en el retículo endoplasmático liso (Fernández y Mangel, 1983; Gore-Langton y Armstrong, 1994; Norman y Litwack, 1997; González-Merlo y González, 2003).

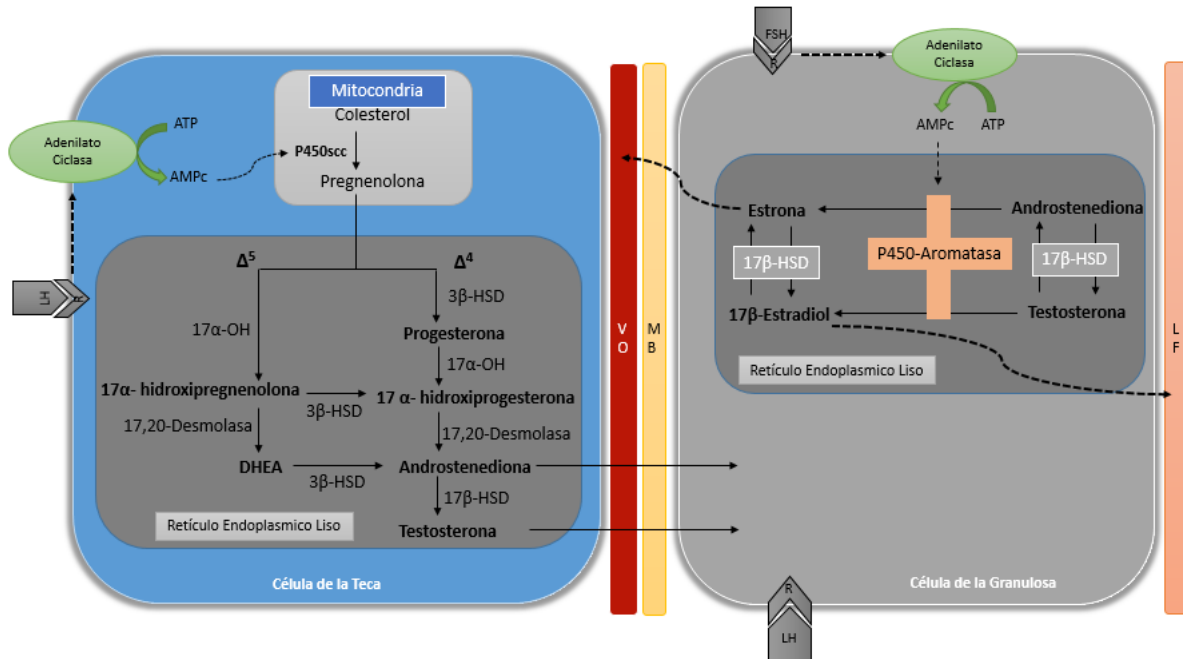


Figura 7. Biosíntesis y regulación de las hormonas esteroides ováricas. LH, hormona luteinizante; FSH, hormona estimulante del fólculo; R, receptor; ATP, trifosfato de adenosina; AMPc, monofosfato de adenosina cíclico; VO, Vena ovárica; MB, Membrana basal; LF, Líquido folicular (Modificado de Cardinali, 2003; González-Merlo y González, 2003).

La vía Δ^5 se lleva a cabo en las células de la teca y de la glándula intersticial. En esta vía la pregnenolona es convertida a dehidroepiandrosterona (DHEA) por acción de las enzimas 17 α -OH y 17,20-desmolasa (Figura 7). Por actividad de la 3 β -HSD, la DHEA es convertida en androstenediona (Fernández y Mangel, 1983; Gore-Langton y Armstrong, 1994; Norman y Litwack, 1997; Sánchez-Criado, 1999; González-Merlo y González, 2003).

En el retículo endoplasmático liso de las células de la granulosa, el citocromo P450-aromatasa transforma a la androstenediona y a la testosterona en estrona y 17 β -estradiol respectivamente. Por acción de la enzima 17 β -HSD la estrona es transformada en estradiol y la androstenediona en testosterona. La enzima 17 β -HSD posee la capacidad de catalizar la reacción inversa (Figura 7) (Miller y Styne, 2001).

En el fólculo ovárico, la secreción de estradiol es regulada por la acción conjunta de las gonadotropinas. Las células de la teca interna y de la granulosa poseen receptores transmembranales a la FSH y a la LH (González-Merlo y González, 2003). La interacción de

las hormonas gonadotrópicas con sus receptores induce la activación del adenilato ciclasa, que cataliza la formación de AMPc a partir de ATP (Figura 7). El AMPc estimula la expresión de genes que codifican para las enzimas esteroideogénicas (Gómez-Chang y col., 2012).

Las células de la teca interna, en respuesta a la estimulación de la LH, secretan androstenediona y testosterona que difunden a través de la membrana basal del folículo y son captados por las células de la granulosa, donde la FSH estimula la síntesis y actividad de las aromatasas (Fernández y Mangel, 1983; González-Merlo y González, 2003). Los estrógenos sintetizados son secretados al líquido folicular o atraviesan la membrana basal del folículo para ser vertidos a la vena ovárica (Figura 7) (Sánchez-Criado, 1999).

Atresia Folicular

La atresia folicular es un proceso que consiste en la pérdida o eliminación del folículo ovárico que habiendo iniciado el proceso de crecimiento y diferenciación, no ovula (Domínguez y col., 1991; Yeh y Adashi, 2001; Irusta, 2008).

La atresia se presenta en cualquier etapa del desarrollo, desde la vida fetal y durante la etapa prepuberal, puberal y la vida adulta (Domínguez y col., 1991). Su incidencia se encuentra relacionada con el tamaño de los folículos, siendo los folículos en estadio antral los más susceptibles a la atresia debido a su alto índice proliferativo (Rosales, 2008). Se estima que el 99.9% de los folículos en la mujer experimentan cambios degenerativos durante el funcionamiento normal ovárico y en la rata alrededor del 77% de folículos degeneran por atresia (Greenwald y Roy, 1994; Irusta, 2008).

La atresia se produce como resultado de la muerte celular programada, proceso denominado apoptosis, que es inducida por factores reguladores extrínsecos de la misma célula (Rosales, 1998). Este proceso tiene lugar en las células de la granulosa y en el ovocito (Flores-Pérez y col., 2005; Irusta, 2008).

Durante la atresia se presentan cambios morfológicos e histológicos en el folículo como la fragmentación nuclear del ovocito, picnosis de las células de la granulosa, descamación de éstas en el antro folicular, desprendimiento del complejo cúmulo-ovocito

y en algunos casos hipertrofia de las células de la teca interna (Greenwald y Roy, 1994; Rosales, 1998; Rodríguez, 2005). La teca de los folículos que degeneran por atresia forma parte de la glándula intersticial (Rodríguez, 2005).

De acuerdo a las alteraciones morfológicas que presentan los folículos, se les clasifica en las siguientes etapas de atresia (Rosales, 1998):

Atresia I: Son aquellos folículos con un estrato granuloso uniforme e íntegro, que posee menos del 5% de núcleos picnóticos. Presentan células de la teca con aspecto uniforme y la membrana basal se encuentra intacta.

Atresia II: Del 6 al 20% de las células de la granulosa presentan núcleos picnóticos generalmente adyacentes a la cavidad antral. La membrana basal se encuentra intacta.

Atresia III: Se presenta descamación de las células de la granulosa hacia el antro folicular, la membrana basal se fragmenta y la teca interna se observa hipertrofiada.

Atresia IV: Se hacen evidentes los núcleos picnóticos en la capa de las células de la teca. El ovocito comienza a separarse de la pared folicular y las células de la granulosa se desprenden de la lámina basal.

Atresia V: Los fragmentos residuales de la granulosa están totalmente separados de la teca. Los capilares de la teca desaparecen. En esta etapa el folículo y el ovocito degeneran.

El proceso de atresia folicular es regulado de manera inhibitoria o estimulante por hormonas hipofisarias y esteroideas, entre otras (Flores-Pérez y col., 2005). La progesterona y los estrógenos inhiben la apoptosis, favoreciendo el crecimiento folicular y el índice mitótico de las células de la granulosa (Rosales, 1998). Las gonadotropinas son factores de supervivencia folicular. En particular, el mecanismo de selección depende de la exposición a la FSH, así los folículos que reciben un menor aporte de la FSH durante cierto periodo, son destinados a la atresia (Rosales, 1998). Se ha demostrado que los folículos atrésicos tipo V en el animal prepúber, son rescatados por la administración exógena de gonadotropinas, semejante a lo observado ante la administración de FSH en ratas

inmaduras hipofisectomizadas en las que disminuye la apoptosis en células de la granulosa (Irusta, 2008).

Durante el proceso de atresia el número de receptores a FSH y LH en las células de la granulosa disminuye de manera gradual, lo que ocasiona una menor aromatización de los andrógenos a estrógenos. Una mayor concentración de andrógenos dentro y alrededor del folículo induce atresia (Domínguez y col., 1991; Rosales, 1998; Gonzáles-Merlo y González., 2006).

Inervación Ovárica

El ovario de los mamíferos posee inervación extrínseca e intrínseca. La **inervación extrínseca** se encuentra principalmente compuesta por fibras simpáticas, sensoriales, y en menor proporción por fibras parasimpáticas (Burden, 1978; Dissen y Ojeda, 1999).

Las fibras simpáticas del ovario se originan de los segmentos T11 a L4 de la médula espinal y hace sinapsis con el ganglio celiaco mesentérico superior (GCMS). Las fibras sensoriales se originan del ganglio nodoso y del ganglio dorsal localizados entre el segmento torácico caudal (T9-T11) y el segmento lumbar craneal de la médula espinal (L2-L4). Las fibras parasimpáticas del ovario se originan en la médula espinal (segmentos S2-S4) (Dissen y Ojeda, 1999).

Las señales nerviosas ingresan al ovario a través de tres paquetes nerviosos (Burden, 1978; Dissen y Ojeda, 1999):

Nervio Ovárico Superior (NOS): Se encuentra asociado al ligamento suspensorio. Está constituido por fibras simpáticas que llegan al ovario, al oviducto y al útero (Dissen y Ojeda, 1999). Aporta al ovario NA, péptido intestinal vasoactivo (VIP) y neuropéptido Y (NPY) (Aguado, 2002). En el ovario, las fibras del NOS se encuentran asociadas a los vasos sanguíneos, a las células de la teca y a la glándula intersticial (Dissen y Ojeda, 1999).

Nervio del Plexo Ovárico (NPO): Está constituido en su mayoría por fibras sensoriales y en menor proporción simpáticas. Sus fibras viajan a lo largo de la arteria del ovario y se encuentran asociadas a los vasos sanguíneos. El componente sensorial del NPO

aporta al ovario sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen que codifica la calcitonina (CGRP) (Klein y Burden, 1988; Dissen y Ojeda, 1999), mientras que las fibras simpáticas liberan NA y NPY (Lawrence y Burden, 1980).

Nervio Vago: Se encuentra constituido en su mayoría por fibras parasimpáticas (Dissen y Ojeda, 1999). Estas fibras aportan al ovario neuropéptidos como la somatostatina, la SP, la gastrina y el VIP (Ojeda y col., 1983 y Dissen y Ojeda, 1999). El soma de las neuronas que dan origen al nervio vago se localizan en el núcleo ambiguo, el núcleo cardioneumoentérico, el núcleo dorsal del vago y la parte inferior del núcleo del fascículo solitario (Bouchet y Willeret, 1978; Upledger y Vredevoogd, 2004).

La **inervación intrínseca** del ovario ha sido descrita en diferentes especies de mamíferos como ratas, monos y humanos. Está compuesta por un conjunto de neuronas presentes en la gónada femenina. En el ovario de las ratas Wistar se ha observado la presencia de un grupo de neuronas formando un plexo ganglionar localizado en el hilio, el mesoovario, la corteza y la médula (D'Albora y col., 2002). Algunas de estas neuronas son de naturaleza catecolaminérgica y de NPY (D'Albora y col., 2000; D'Albora y col., 2002). La presencia de neuronas intrínsecas en el ovario de la rata parece ser dependiente de la cepa, puesto que, a diferencia de las Wistar, en el ovario de las ratas Sprague-Dawley no han sido observadas neuronas intrínsecas (D'Albora y col., 2000).

Se han observado neuronas en el ovario de la rata a partir de la etapa infantil del desarrollo (D'Albora y col., 2002). Las neuronas se encuentran presentes en la gónada antes que la glándula presente receptores a gonadotropinas y de que los primeros folículos primordiales se formen (D'Albora y col., 2002; Domínguez y Cruz-Morales, 2011).

Participación de la Noradrenalina en la Regulación de las Funciones Ováricas

La NA es una catecolamina endógena que se caracteriza por poseer en su estructura química un grupo aromático catecol (Abad-Santos y col., 2009). Esta catecolamina se encuentra presente en el sistema nervioso central (SNC), en los nervios simpáticos postganglionares y

en la médula suprarrenal la cual la libera al torrente sanguíneo (Kruk y Pycoc, 1991; Page y col., 1998). La biosíntesis de las catecolaminas se lleva a cabo mediante cuatro reacciones químicas (López y col., 2008) (Figura 8):

- 1) La *hidroxilación* del aminoácido L-tirosina, que por acción de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) da lugar a la formación de la L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA).
- 2) La *descarboxilación* de la L-DOPA, catalizada por la enzima dopa-descarboxilasa, lo que da origen a la síntesis de dopamina (DA).
- 3) La *hidroxilación* de la DA, que por acción de la enzima dopamina- β -hidroxilasa (D β H) da lugar a la formación de la NA.
- 4) La *metilación* de la NA, catalizada por la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa (FNMT), lo que resulta en la síntesis de adrenalina (A).

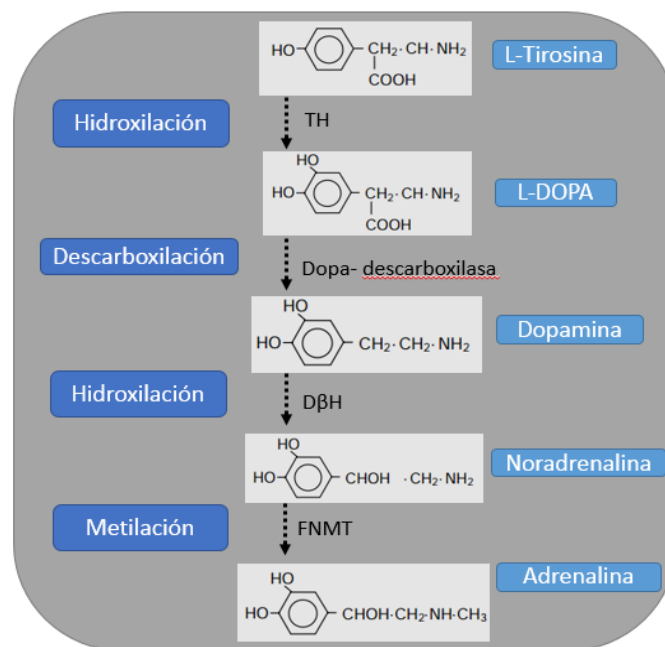


Figura 8. Reacciones químicas de la biosíntesis de catecolaminas. TH, tirosina hidroxilasa; L-DOPA, L-dihidroxifenilalanina; D β H, dopamina- β -hidroxilasa; FNMT, feniletanolamina N-metiltransferasa (Tomado y modificado de López y col., 2008).

La NA presente en el ovario proviene de tres fuentes: la secretada por las terminales nerviosas adrenérgicas procedentes del NOS y del NPO; la sintetizada por las células de la granulosa; y la producida en las células cromafines de la médula suprarrenal, que es vertida

al torrente sanguíneo y transportada al ovario (Domínguez y col., 1991; Aguado, 2002; De Bortoli y col., 2002).

En el ovario, la NA participa en la regulación de procesos como: el crecimiento y la diferenciación folicular, la ovulación y la secreción de hormonas esteroides (Aguado y Ojeda., 1984; Dyer y Erickson, 1985; Domínguez y col., 1991; Mayerhofer y col., 1998; Aguado, 2002; Acuña y col., 2009; Bronzi y col., 2011). Los efectos de la NA sobre sus células blanco son mediados por la interacción con dos tipos de receptores: los α -adrenérgicos (α_1 y α_2) y los β -adrenérgicos (β_1 y β_2) (Kruk y Pycoc, 1991; Abad-Santos y col., 2009; López-Muñoz y Álamo, 2010). Estos receptores poseen 7 dominios helicoidales transmembranales asociados a las proteínas G (Gi, Gs, Gq/11) (González y col., 2008; López-Muñoz y Álamo, 2010).

En el ovario, los receptores α_1 se encuentran presentes en las células de la teca, de la granulosa, del cuerpo lúteo y de la glándula intersticial (Itoh y Ishizuka, 2005). Las células de la teca folicular también poseen receptores α_2 -adrenérgicos asociados a la proteína Gi. La activación de estos receptores inhibe al adenilato ciclasa y la síntesis del AMPc, por lo que la activación del receptor α_2 en las terminales nerviosas modula de manera inhibitoria la liberación de noradrenalina (Kruk y Pycoc, 1991; González y col., 2008; Conti, 2010; López-Muñoz y Álamo, 2010).

Los receptores β -adrenérgicos del ovario se expresan en las células de la granulosa, de la teca y del cuerpo lúteo (Dyer y Erickson, 1985; Ferruz y col., 1991; De Bortoli y col., 2002). Los receptores β -adrenérgicos se encuentran asociados con proteínas Gs por lo que su activación resulta en la estimulación del adenilato ciclasa y en la generación de AMPc como segundo mensajero (Gajewski y col., 2006; González y col., 2008). En el ovario, el subtipo de receptor que predomina es el β_2 (Adashi y Hsueh, 1981; Fernandois y col., 2014).

Se ha mostrado que antes de la primera ovulación, el ovario de la rata contiene receptores β -adrenérgicos del tipo β_2 . El incremento en la concentración de estos receptores se da entre el anaestro y el proestro tardío de la fase peripuberal. La concentración de estos receptores varía en relación al primer pico preovulatorio de LH y el

inicio de la función luteal (Aguado y col., 1982); mientras que en la rata adulta, la concentración de los receptores β -adrenérgicos varía en función del día del ciclo estral, siendo mayor en el día del diestro y del proestro, y menor en la mañana del estro (Ferruz y col., 1991).

En las células de la granulosa de la rata, la administración de gonadotropinas estimula un aumento en el número de receptores β -adrenérgicos y en el contenido de NA (Adashi y Hsueh, 1981; Sheela y col., 1983). La sección bilateral del NOS en ratas de 24 días de edad, resulta en un aumento del número de receptores β -adrenérgicos y una menor concentración de NA en las células de la granulosa (Aguado y Ojeda, 1984).

Los receptores adrenérgicos pueden ser activados o bloqueados por fármacos agonistas o antagonistas, respectivamente (González y col., 2008). Los agonistas son agentes químicos con afinidad para algún receptor biológico, sobre el que provocan una modificación en su actividad, simulando por ejemplo, la función de las catecolaminas endógenas. Los antagonistas no poseen actividad intrínseca ya que compiten con los ligandos naturales o con los agonistas por el sitio de unión al receptor y bloquean su efecto (González y col., 2008; Repetto y Repetto, 2009). De acuerdo a la selectividad con que se unen al receptor adrenérgico, estos fármacos se clasifican en selectivos y no selectivos. Los agonistas o antagonistas selectivos son aquellos que presentan alta afinidad por un receptor en particular ya sea α_1 , α_2 , β_1 o β_2 (López-Muñoz y Álamo, 2010), mientras que, los agonistas o antagonistas no selectivos actúan indistintamente sobre los diferentes subtipos de receptores adrenérgico, entre los cuales se encuentran los α o los β (González y col., 2008; López-Muñoz y Álamo, 2010).

El propranolol hidroclicorado (DL-propranolol) es un fármaco antagonista no selectivo para los subtipos de receptores β -adrenérgicos, soluble en agua y alcohol. Su estructura química es una mezcla racémica de dos isómeros (levógiro y dextrógiro). Este fármaco es un antagonista competitivo de la A y la NA endógenas y es un inhibidor de la proteína cinasa C (González y col., 2008).

El propranolol presenta afinidad a los lípidos y se absorbe casi por completo cuando se administra de manera oral, posee una gran distribución (4 L/kg) y es captado por todo el organismo, penetra con facilidad en el SNC, cerca del 90% se encuentra en la circulación unido a proteínas plasmáticas, se metaboliza de manera extensa y la mayoría de sus metabolitos aparecen en la orina (Brunton y col., 2012). En mujeres puede ser administrado 2 veces al día, debido a que tiene una vida media de 4 horas (Brunton y col., 2012), en roedores puede ser administrado de manera crónica una vez al día (Fernandois y col., 2012; Luna y col., 2012).

Los receptores β -adrenérgicos participan en la regulación de la secreción de hormonas esteroides. De Bortoli y colaboradores (2002), mostraron en ratas adultas que la inyección intracerebro-ventricular con isoproterenol (agonista β -adrenérgico no selectivo) o propranolol, resulta en una disminución o incremento en la concentración en suero de progesterona respectivamente, y la inyección de fenilefrina (agonista α -adrenérgico) o fentolamina (antagonista α -adrenérgico) parece no estimular la secreción de esta hormona.

En el ovario de la rata, durante la senescencia reproductiva incrementa la concentración de NA, evento que se asocia con un aumento en el número de prequistes y quistes foliculares, y con la disminución del número de cuerpos lúteos (Acuña y col., 2009). El grupo de Fernandois (2012) mostró que la administración i.p. de propranolol a ratas en la senescencia reproductiva, inhibe la acción de la NA durante el envejecimiento reproductivo lo que resulta en la reactivación del desarrollo folicular, el aumento en la tasa de ovulación, en la concentración de androstenediona, testosterona y estradiol en suero, así como en la disminución del número de quistes y prequistes foliculares.

En las células teco-intersticiales, la activación de los receptores β -adrenérgicos con isoproterenol, resulta en una mayor secreción de progesterona y andrógenos (Dyer y Erickson, 1985). Weiss y colaboradores en 1982, mostraron en la rata que el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos mediante la administración de propranolol resulta en una menor secreción de progesterona.

El grupo de Selvaraj en el 2000, mostró en cultivo de células de la granulosa mediante una curva dosis-respuesta, que la administración de propranolol a una concentración de 10^{-4} M, revierte los efectos del isoproterenol, es decir, disminuye la concentración de AMPc y de progesterona.

Síndrome del Ovario Poliquístico en la Mujer

El Síndrome del Ovario Poliquístico (SOPQ) es un trastorno endocrino caracterizado por una disfunción reproductiva y desorden metabólico. Este síndrome afecta entre el 5 y el 10% de las mujeres en edad reproductiva (Entterweit y Mechanick, 1988; VanDerSpuy y Dyer, 2004; Merino y col., 2009; Goodarzi y col., 2011).

El SOPQ es un trastorno heterogéneo que se caracteriza por presentar exceso de andrógenos (clínico y/o bioquímico), disfunción ovulatoria, ovarios poliquísticos (OPQ), irregularidad menstrual, amenorrea, una elevada concentración de LH y una menor concentración de FSH en suero. Comúnmente, el SOPQ se acompaña por la presencia de hirsutismo, obesidad y en la mayoría de los casos, por infertilidad (Botella, 1995; Franks, 1995; Yen y col., 2001; Espinos y Calaf, 2007; Goodarzi y col., 2011). Las mujeres con SOPQ tienen mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y resistencia a la insulina, asociada con hiperinsulinemia y diabetes mellitus tipo 2 (Botella, 1995; Goodarzi y col., 2011; Sir y col., 2013).

En 1935 se describió el síndrome de Stein y Leventhal caracterizado por ovarios de mayor tamaño, esterilidad, oligomenorrea (presencia de menstruación irregular), amenorrea (ausencia de menstruación), hirsutismo y obesidad (Yen y col., 2001; Dolz, 2010; Sir y col., 2013).

El National Institutes of Health (NIH) de Estados Unidos de Norteamérica en el año 1990 definió por primera vez al SOPQ como un trastorno que se caracteriza por hiperandrogenismo asociado a anovulación crónica. Sin embargo, esta definición no consideró el aspecto morfológico de los ovarios. Posteriormente, en el año 2003, en Rotterdam se propuso una nueva definición del síndrome que incorporó la presencia de

OPQ. En el año 2006, la Sociedad del Exceso de Andrógenos (AES), propuso que el SOPQ podía ser diagnosticado en pacientes que presentaran hiperandrogenismo asociado con alguna de las siguientes características: anovulación o presencia de OPQ (Merino y col., 2009; Dolz, 2010; Rodríguez-Flores, 2011; Sir y col., 2013).

Hiperandrogenismo bioquímico: Es el aumento en la concentración de andrógenos circulantes, como testosterona, androstenediona, DHEA o sulfato dehidroepiandrosterona (DHEAS). La presencia de hiperandrogenismo bioquímico tiene una prevalencia del 60 al 80% en las pacientes con el síndrome (Merino y col., 2009).

Hiperandrogenismo clínico: Se define como un exceso de andrógenos o una hipersensibilidad a ellos. Sus manifestaciones clínicas incluyen: el hirsutismo, que se define como la presencia excesiva de vello corporal con tendencia hacia el patrón de crecimiento masculino; aumento en la producción de sebo en el cuero cabelludo y las regiones de la cara; el acné; y la alopecia dependiente de los andrógenos, asociados con un aumento en las concentraciones de testosterona y androstenediona en suero (Yen y col., 2001; Merino y col., 2009).

Oligo-anovulación: La mayoría de las mujeres con SOPQ presentan algún grado de trastorno menstrual. En la mayoría de los casos corresponde a oligomenorrea o amenorrea. La presencia de ciclos regulares en mujeres sin hiperandrogenismo puede ser usado como evidencia de ovulación normal. Sin embargo, la presencia de ciclos menstruales regulares en mujeres con hiperandrogenismo no asegura la presencia de ovulación (Yen y col., 2001; Merino y col., 2009).

Morfología del OPQ: Se caracterizan por un aumento de tamaño de los ovarios debido al aumento en el número de folículos primarios, secundarios y antrales, y por la presencia de una cápsula regular engrosada desprovista de vascularización. En el SOPQ existe un aumento en el reclutamiento folicular pero su desarrollo es detenido en el estadio antral (Yen y col., 2001; Merino y col., 2009), donde forman los quistes foliculares, caracterizados por ausencia de ovocitos, con una gran cavidad antral, una delgada capa de células de la granulosa e hipertrófica de la célula de la teca (Luna y col., 2012).

ETIOLOGÍA

Las causas primarias del SOPQ se desconocen, sin embargo, se han propuesto algunas hipótesis para explicar su origen (Dolz, 2010):

& Hipótesis del eje hipotálamo-hipófisis

En el hipotálamo aumenta la frecuencia y amplitud de los pulsos de liberación de GnRH, que al actuar en la hipófisis estimula una mayor secreción de LH, lo que trae como consecuencia el incremento de la relación LH: FSH. La LH en las células de la teca interna estimula una mayor síntesis de andrógenos (Espinós y Calaf, 2007; Kazlauskas y col., 2009).

& Hipótesis de la resistencia a la insulina

En el SOPQ incrementa la concentración plasmática de insulina como resultado de una mutación del gen que codifica el receptor de la insulina o por un defecto post-receptor que resulta en la incapacidad de utilizar la glucosa por los tejidos periféricos (hiperinsulinemia) (Ramírez, 2013). La hiperinsulinemia resultante desencadena disminución de la proteína ligadora del factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF1-BP), lo que incrementa la concentración circulante de andrógenos y de IGF1 libres. El IGF1 actúa a su vez estimulando la producción de andrógenos en las células de la teca y el estroma ovárico, ya sea por la estimulación de la actividad de la P450c17 o por la secreción de LH (Dolz, 2010; Vivas y col., 2011; Ramírez, 2013).

& Hipótesis de la esteroidogénesis ovárica

En las células de la teca se ha observado alteración en el metabolismo de los andrógenos, debido a un incremento en la LH, que en consecuencia provoca aumento en la actividad de la enzima P450c17 α que induce la hidroxilación de pregnenolona a progesterona y que permite el paso de DHEA a androstenediona, lo que resulta en una mayor síntesis de andrógenos. Este aumento de las concentraciones intraováricas de androstenediona y

testosterona conduce a la atresia folicular, aparición de hirsutismo, oligomenorrea y acné, que son típicos del SOPQ (Dolz, 2010).

& Hipótesis de la inervación

Por datos experimentales en roedores se ha sugerido que la hiperactividad de las fibras simpáticas juega un papel estimulante en la etiología del SOPQ. Un incremento en el contenido y liberación de NA por las terminales nerviosas que llegan al ovario, resulta en una mayor secreción de andrógenos y estradiol, así como modificaciones del crecimiento folicular (formación de quistes foliculares) (Lara y col., 2002; Morales-Ledesma y col., 2010; Luna y col., 2012).

TRATAMIENTOS

La ausencia de un mecanismo que explique el origen del SOPQ ha llevado a desarrollar múltiples tratamientos orientados a corregir los síntomas teniendo en cuenta las necesidades del paciente y la situación clínica (Ramírez, 2013).

Anovulación. El citrato de clomifeno es un antiestrógeno utilizado en la clínica para inducir la ovulación. Este fármaco se une y bloquea los receptores hipotalámicos del estradiol, con lo que disminuye el mecanismo de feedback negativo ejercido por los estrógenos endógenos. Como resultado aumenta la secreción de GnRH y la secreción de LH y FSH. En las pacientes en las que el citrato de clomifeno no induce la ovulación se utiliza como tratamiento alternativo la administración de glucocorticoides a bajas dosis, esto implica la supresión de la síntesis de andrógenos suprarrenales y provoca reducción de hasta el 40% del total de andrógenos circulantes. Además, las dosis bajas de glucocorticoides pueden aumentar la secreción de FSH (Vargas-Carrillo y col., 2003).

Hirsutismo. Los tratamientos utilizados combinan la eliminación mecánica del vello y la administración de anticonceptivos orales, antiandrógenos (acetato de ciproterona, espironolactona, flutamida, finasterida), análogos a la GnRH de liberación prolongada y glucocorticoides (Rodríguez-Flores, 2011; Ramírez, 2013). La administración de espironolactona inhibe la enzima del citocromo P450c17 necesaria para la biosíntesis de

andrógenos. Así disminuye el diámetro y densidad capilar y del vello facial (Yen y col., 2001; Zulian y col., 2005).

Síndrome del Ovario Poliquístico en la Rata

Se han desarrollado diferentes modelos experimentales para el estudio del SOPQ. La rata es un modelo animal útil debido a su menor tamaño, a su corto tiempo de vida, a su alto índice reproductivo y debido a que presenta diferentes cepas genéticas (Franks, 2009; Shi y Vine, 2012).

La **DHEA**, un andrógeno de corta actividad, se ha utilizado para inducir el desarrollo del SOPQ. En ratas prepúberes, la administración diaria de 6mg/100 g de peso corporal con DHEA a partir del día 20 al 27 de vida, provoca aumento en la síntesis de andrógenos, aciclicidad, un estado anovulatorio y presencia de OPQ (Shi y Vine, 2012).

Otro modelo utilizado para el estudio del SOPQ es la rata tratada con una dosis de 2 mg de valerato de estradiol (VE) (Brawer y col., 1978; Lara y col., 1993). Este fármaco es un estrógeno de larga duración con una vida media de 15 días, que provoca alteración del ciclo estral, cornificación vaginal persistente, anovulación, formación de quistes foliculares, altas concentraciones de testosterona y estradiol en suero, sin modificar la de progesterona (Barria y col., 1993; Morales y col., 2010). Además, causa alteraciones a nivel hipotalámico-hipofisario, provocando irregularidad en la secreción de GnRH, así como en las concentraciones basales y pulsátiles de LH y FSH (Schulster y col., 1984; Stener-Victorin y col., 2000; Gonzalo y col., 2012; Shi y Vine, 2012).

Las ratas con SOPQ inducido por la administración del VE, presentan incremento en la actividad de las fibras simpáticas. Esto es evidenciado por el aumento en la liberación y contenido de NA en el ovario, y una disminución en el número de receptores β -adrenérgicos en los compartimentos del ovario que reciben inervación catecolaminérgica (Barria y col., 1993; Stener-Victorin y col., 2000; Rosa-E-Silva y col., 2003; Greiner y col., 2005; Shi y Vine, 2012).

El aumento en la actividad simpática se ha explicado como resultado del incremento en el factor de crecimiento neural (NGF) y de su receptor de baja afinidad, el p75 (Lara y col., 1990; Dissen y col., 2000; Lara y col., 2000). Se ha planteado que el mecanismo a través del cual actúa el NGF, es mediante la unión a su receptor en el botón terminal de las fibras del NOS, que viaja de manera retrograda hasta el soma de las neuronas, localizado en el GCMS, donde estimula un incremento en la actividad de la enzima limitante de las catecolaminas, la tirosina hidroxilasa, resultando en una mayor liberación de NA al ovario (Dissen y col., 2000; Lara y col., 2000). El grupo de Lara (2000) mostró que después de la administración del VE, el bloqueo intraovárico de los receptores a NGF disminuye el número de quistes foliculares, restaura la población de folículos antrales, la ciclicidad estral y la capacidad ovulatoria.

En el modelo del animal tratado con VE incrementa la concentración ovárica de VIP. La estimulación *in vitro* del ovario de estos animales con VIP resulta en la amplificación de la secreción de andrógenos y estrógenos, lo que ha llevado a sugerir que además de la NA, el VIP podría participar en la etiología del SOPQ (Parra y col., 2007).

En la rata con SOPQ, la eliminación de la información simpática del NOS por la sección bilateral de este paquete nervioso, disminuye la concentración de NA en el ovario, lo que se asocia con el restablecimiento de la capacidad ovulatoria, el patrón del ciclo estral y la secreción de andrógenos y estradiol (Barria y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003). El grupo de Morales-Ledesma (2010) mostró que la sección unilateral del NOS en ratas con SOPQ restaura la ovulación del ovario inervado y normaliza la concentración de testosterona y estradiol en suero, evidencias que llevaron a sugerir que en el SOPQ existen otras vías neurales que podrían estimular las funciones ováricas.

El grupo de Luna en el 2012 mostró que en la rata adulta sin la patología del SOPQ, la estimulación crónica de los receptores β -adrenérgico mediante la administración subcutánea de isoproterenol resulta en elevadas concentraciones de andrógenos y en la formación de quistes foliculares. Estos efectos se normalizan cuando los animales son inyectados de manera simultánea con isoproterenol y propranolol (antagonista no selectivo

de los receptores β -adrenérgico). Estas evidencias han llevado a postular que la hiperactividad simpática del NOS es uno de los factores que participan en la etiología del SOPQ.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El SOPQ es un trastorno endocrino que afecta a mujeres en edad reproductiva, que se caracteriza por presentar exceso de andrógenos, disfunción ovulatoria y ovarios poliquísticos. Se desconocen las causas de la patología, sin embargo, se ha relacionado con factores como el hiperandrogenismo e hiperactividad de las fibras simpáticas del ovario.

La rata con SOPQ inducido por la inyección de VE, presenta anovulación y mayor secreción de testosterona y estradiol. Se ha postulado que estas alteraciones son el resultado del incremento en la actividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario, lo que resulta en altas concentraciones de NA y de VIP, así como una disminución en el número de receptores β -adrenérgicos en el ovario, eventos que se normalizan mediante una disminución del tono noradrenérgico por la sección bilateral del NOS.

Por ello, en el presente estudio en la rata con SOPQ se analizaron en el día del estro, los efectos agudos (30 minutos) y subagudos (siguiente estro) del bloqueo de los receptores β -adrenérgicos con propranolol en la bursa del ovario izquierdo, derecho o en ambos, sobre la capacidad ovulatoria y la secreción de progesterona, testosterona y estradiol.

HIPÓTESIS

Dado que en la rata con SOPQ el incremento en la actividad de las fibras noradrenérgicas del NOS resulta en anovulación y mayor secreción de andrógenos y estradiol, entonces el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos en el ovario normalizará la respuesta ovulatoria y la secreción de hormonas esteroides. Tales eventos dependerán del ovario en estudio y del periodo de exposición al fármaco.

OBJETIVO GENERAL

Analizar en el modelo de la rata con Síndrome del Ovario Poliquístico los efectos agudos y subagudos del bloqueo de los receptores β -adrenérgicos de uno o de ambos ovarios, sobre la respuesta ovulatoria y esteroidogénica.

Objetivos particulares

- & Evaluar en la rata con Síndrome del Ovario Poliquístico el ciclo estral, la respuesta ovulatoria y la concentración de progesterona, testosterona y estradiol en suero.
- & Analizar en el día del estro en ratas cíclicas, los efectos agudos (30 minutos) y sub-agudos (siguiente estro) del bloqueo de los receptores β -adrenérgicos de uno o de ambos ovarios, sobre la concentración de hormonas esteroides.
- & Analizar en el día del estro en ratas con SOPQ, los efectos agudos (30 minutos) del bloqueo de los receptores β -adrenérgicos de uno o de ambos ovarios, sobre la concentración de hormonas esteroides.
- & Evaluar en el día del estro en ratas con SOPQ, los efectos sub-agudos (siguiente estro vaginal) del bloqueo de los receptores β de uno o de ambos ovarios, sobre la tasa de animales ovulantes, el número de ovocitos liberados y la concentración de hormonas esteroides.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras de la cepa CII-ZV que al momento del nacimiento (día cero) fueron sexadas y colocadas en camadas de cinco hembras y un macho. Las crías tuvieron acceso a la madre hasta los 24 días de vida (día de destete), posteriormente libre acceso al agua y al alimento hasta el día de la autopsia. Se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e iluminación, con 14 horas de luz por 10 de oscuridad (luces encendidas de las 05:00 a las 19:00 h). El manejo de los animales se realizó siguiendo las normas establecidas 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).

Las ratas fueron divididas al azar en diferentes grupos experimentales, cada uno de los cuales estuvo conformado por 10 animales. Todas las cirugías se realizaron bajo anestesia con éter entre las 10:30 y 11:30 horas.

A los 10 días de edad, las ratas fueron inyectadas vía intramuscular (i.m.) con 2.0 mg de VE (Sigma Chemical Co., St Louis Mo. USA), dosis recomendada por Brawer y col., 1978; disueltos en 0.1 ml de aceite de sésamo (Sigma-Aldrich, Co., St Lous. USA), que fungió como el vehículo (Vh). Como grupos de comparación se utilizaron animales que fueron inyectados vía i.m. con el Vh y otros que se mantuvieron como testigos absolutos (TA), es decir, que no fueron sometidos a ningún tipo de manipulación.

En los animales TA y Vh, el monitoreo de la apertura vaginal se realizó a partir de los 30 días de vida, mientras que en los animales tratados con el VE, se inició un día después de la administración del fármaco. El ciclo estral de los animales fue evaluado mediante el análisis de la citología vaginal, para lo cual, una vez que los animales canalizaron vagina se realizó la toma de frotis vaginal por un periodo de ocho días. A los animales que presentaron dos ciclos estrales regulares, se les denominó cíclicos. Cuando los animales cumplieron 60 días de edad, se reinició la toma de frotis vaginal durante ocho días.

Bloqueo de los receptores β -adrenérgicos

Alrededor de los 68 días de edad al presentar el estro vaginal, las ratas fueron anestesiadas con éter entre las 10:30 y 11:30 h y se les realizó una incisión dorso-lateral de piel, músculo y peritoneo. Se exteriorizó uno (izquierdo o derecho) o ambos ovarios y se inyectaron en la bursa ovárica 20 μ l de DL- propranolol hidrociorado (Sigma Chemical Co, USA), antagonista no selectivo de los receptores β -adrenérgicos, a una concentración de 10^{-4} M, dosis óptima para obtener una disminución máxima en la secreción de progesterona (Selvaraj y col., 2000). La aguja de insulina (31Gx8mm) se mantuvo dentro de la bursa ovárica por 1 minuto con la finalidad de asegurar que el fármaco difundiera al tejido. Posteriormente, el ovario fue regresado a la cavidad abdominal y se suturó la herida. Los animales fueron sacrificados a los 30 minutos o al siguiente estro de realizado el procedimiento quirúrgico para evaluar los efectos del bloqueo de los receptores β -adrenérgicos en el ovario sobre la secreción de hormonas esteroides o para analizar la respuesta ovulatoria, respectivamente.

Como grupos de comparación se utilizaron animales que alrededor de los 68 días de edad, en el día del estro, fueron inyectados con 20 μ l de solución salina (SS) en la bursa de uno o ambos ovarios (Figura 9).

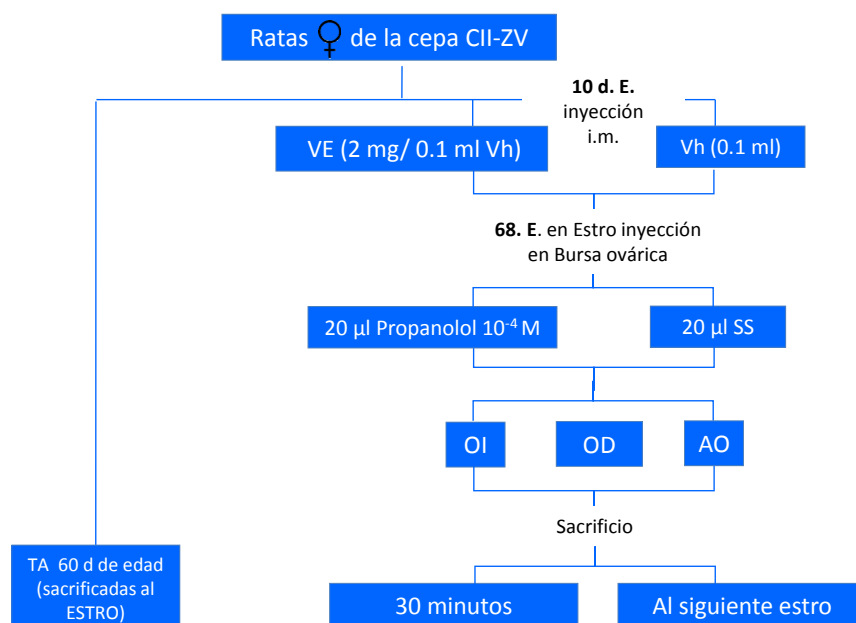


Figura 9. Esquema representativo de los grupos experimentales que fueron utilizados para evaluar los efectos del bloqueo de los receptores β -adrenérgicos en el ovario. TA, testigo absoluto; Vh, vehículo; VE, valerato de estradiol; SS, solución salina; OI, ovario izquierdo; OD, ovario derecho; AO, ambos ovarios.

Procedimiento de la autopsia

Todos los animales fueron pesados, y sacrificados por decapitación. La sangre del tronco fue colectada en tubos de ensaye, se dejó coagular por 30 minutos a temperatura ambiente y fue centrifugada por 15 minutos a 3500 rpm. El suero fue separado del botón celular y dividido en cinco alícuotas de 150 μ l e inmediatamente fue almacenado a -20 °C hasta el momento de la cuantificación de hormonas esteroideas por radioinmunoanálisis (RIA).

Los oviductos fueron disecados y mediante el uso de un microscopio estereoscópico se examinó la presencia de ovocitos y se realizó el conteo de los mismos.

Cuantificación de hormonas esteroideas

La concentración de hormonas esteroideas (progesterona, testosterona y estradiol) fue cuantificada en suero mediante la técnica de RIA de fase sólida con un kit Coat-A-Count (Diagnostic Products, Los Ángeles, CA, USA). En tubos de polipropileno impregnados con un anticuerpo específico anti-progesterona, anti-testosterona y anti-estradiol se adicionaron 100 μ l de la muestra problema (excepto para la cuantificación de testosterona, donde sólo se adicionó 50 μ l) y 1 ml de la hormona radioactiva. Para incrementar la velocidad de reacción, la mezcla se agitó en un vortex durante un minuto y se incubó por tres horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la muestra fue decantada y los tubos se colocaron en un contador de centelleo (modelo Cobra 5005, PackardTM), para la determinación de la concentración de la hormona en la muestra problema, en función de las cuentas por minuto y de una curva de calibración. La concentración de progesterona fue expresada en ng/ml de suero, y la de testosterona y estradiol fue expresada en pg/ml de suero. Los coeficientes de variación intra e interespecíficos para progesterona fueron de 8.35 y 9.45%, para testosterona de 9.65 y 10.2% y para estradiol de 8.12 y 9.28%.

La cuantificación de progesterona, testosterona y estradiol fue realizada en el Laboratorio de Hormonas Esteroideas del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Análisis estadístico

Los resultados de la concentración de hormonas esteroides en suero fueron analizados por la prueba de Análisis de Varianza Multifactorial (ANDEVA) seguida por la prueba de Tukey-Kramer. Cuando se compararon dos grupos se utilizó la prueba de “t” de Student.

El número de ovocitos liberados, la edad de apertura vaginal y del primer estro se analizaron por la prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de Dunn. Cuando se compararon dos grupos se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney.

La tasa de animales ovulantes (número de animales que ovulan/número total de animales por 100) fue analizado por la prueba de Ji^2 .

Las diferencias cuya probabilidad fue menor o igual a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas.

RESULTADOS

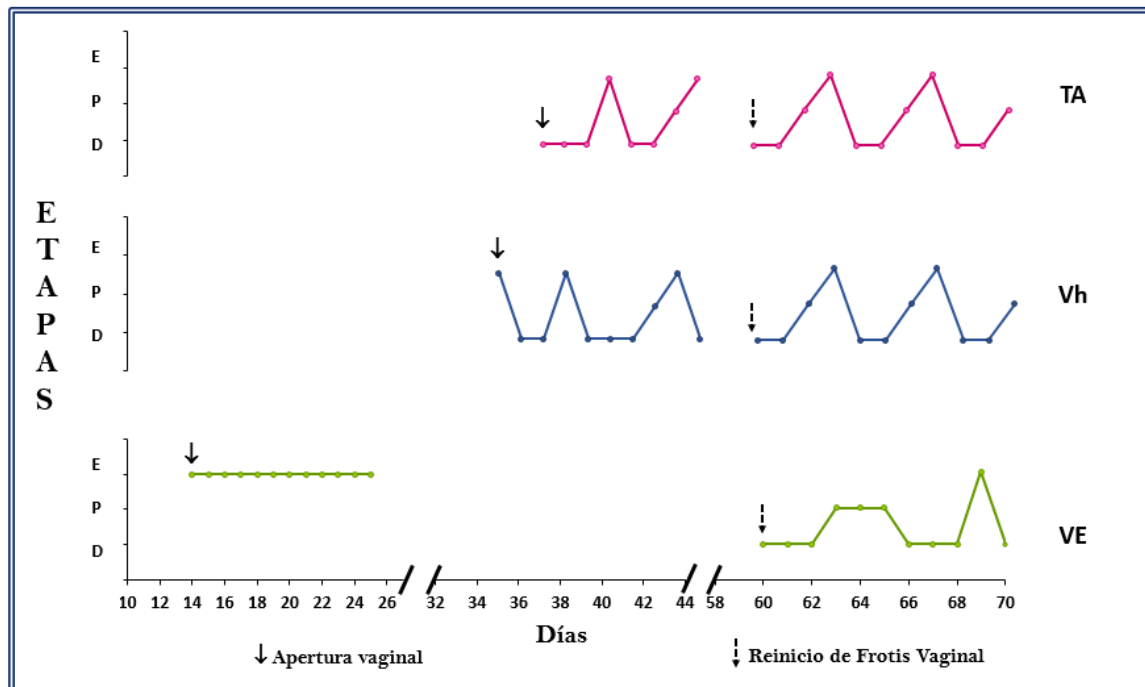
EXPERIMENTO 1

Efectos de la administración del Valerato de Estradiol en ratas de 10 días de edad y sacrificadas en la etapa adulta, en el día del estro

Apertura vaginal y ciclo estral

Los animales inyectados con VE a los 10 días de edad mostraron un adelanto en la edad de apertura vaginal (Figura 10), en comparación con los animales tratados con Vh o testigo absoluto (14.0 ± 0.0 vs. 35.1 ± 1.2; 38.5 ± 0.7, respectivamente).

La inyección de Vh a los 10 días de edad, no modificó el patrón del ciclo estral, en comparación con los animales intactos (TA). Mientras que los animales inyectados con VE, mostraron un patrón de ciclo estral irregular, caracterizado por diestros y proestros consecutivos (Figura 10).



D: Diestro; P: Proestro; E: Estro.

Figura 10. Patrón representativo del ciclo estral de los animales testigo absoluto (TA), y de los animales inyectados con vehículo (Vh) o con valerato de estradiol (VE) a los 10 días de edad y sacrificados entre los 68 y 72 días de edad en la etapa del estro.

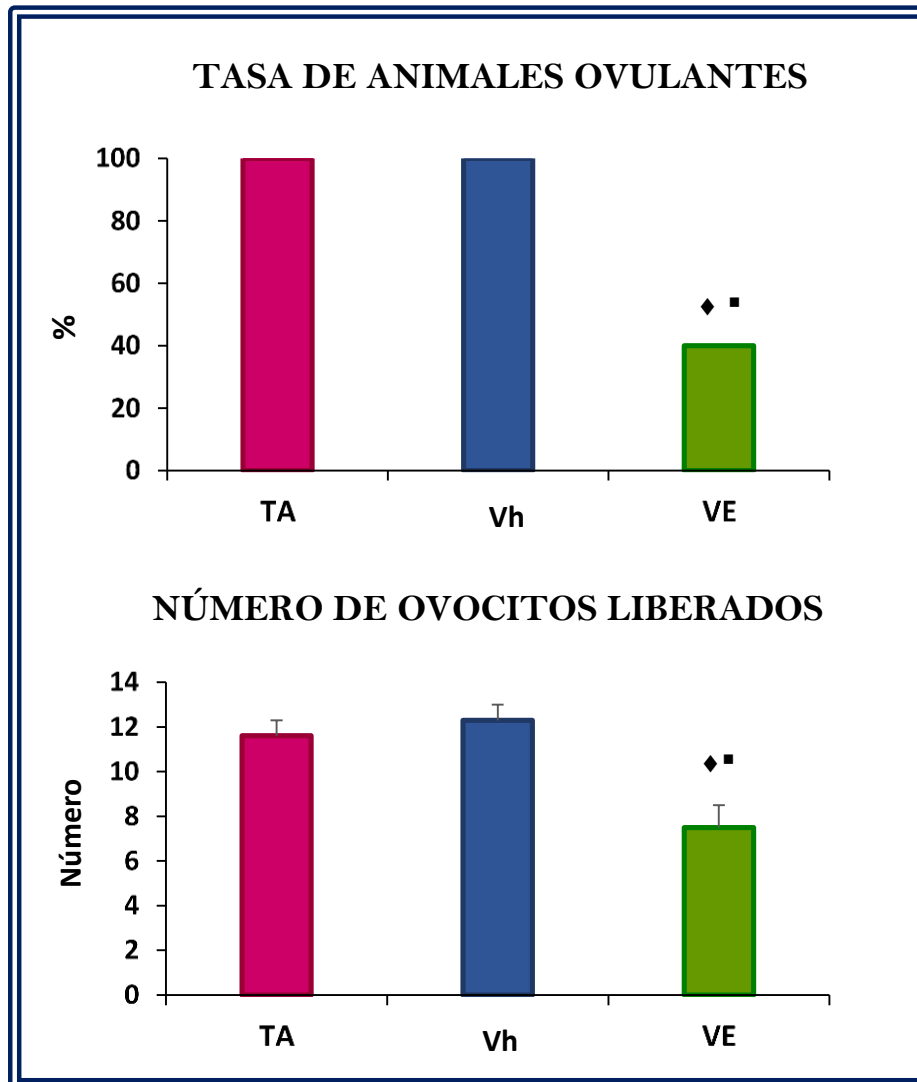
RESPUESTA OVULATORIA

Tasa de animales ovulantes

La inyección del Vh no modificó la tasa de animales ovulantes respecto al grupo TA, mientras que el tratamiento con VE, resultó en la disminución de este parámetro comparado con su grupo TA y Vh (Figura 11).

Número de ovocitos liberados

La inyección del Vh no modificó el número de ovocitos liberados respecto al grupo TA. La inyección de VE, resultó en la disminución del número de ovocitos liberados en comparación al grupo TA y Vh (Figura 11).



◆ $p < 0.05$ vs. su grupo TA; ■ $p < 0.05$ vs. su grupo Vh (Prueba de J_i^2 para tasa de animales ovulantes) y prueba de U de Mann-Whitney para número de ovocitos liberados.

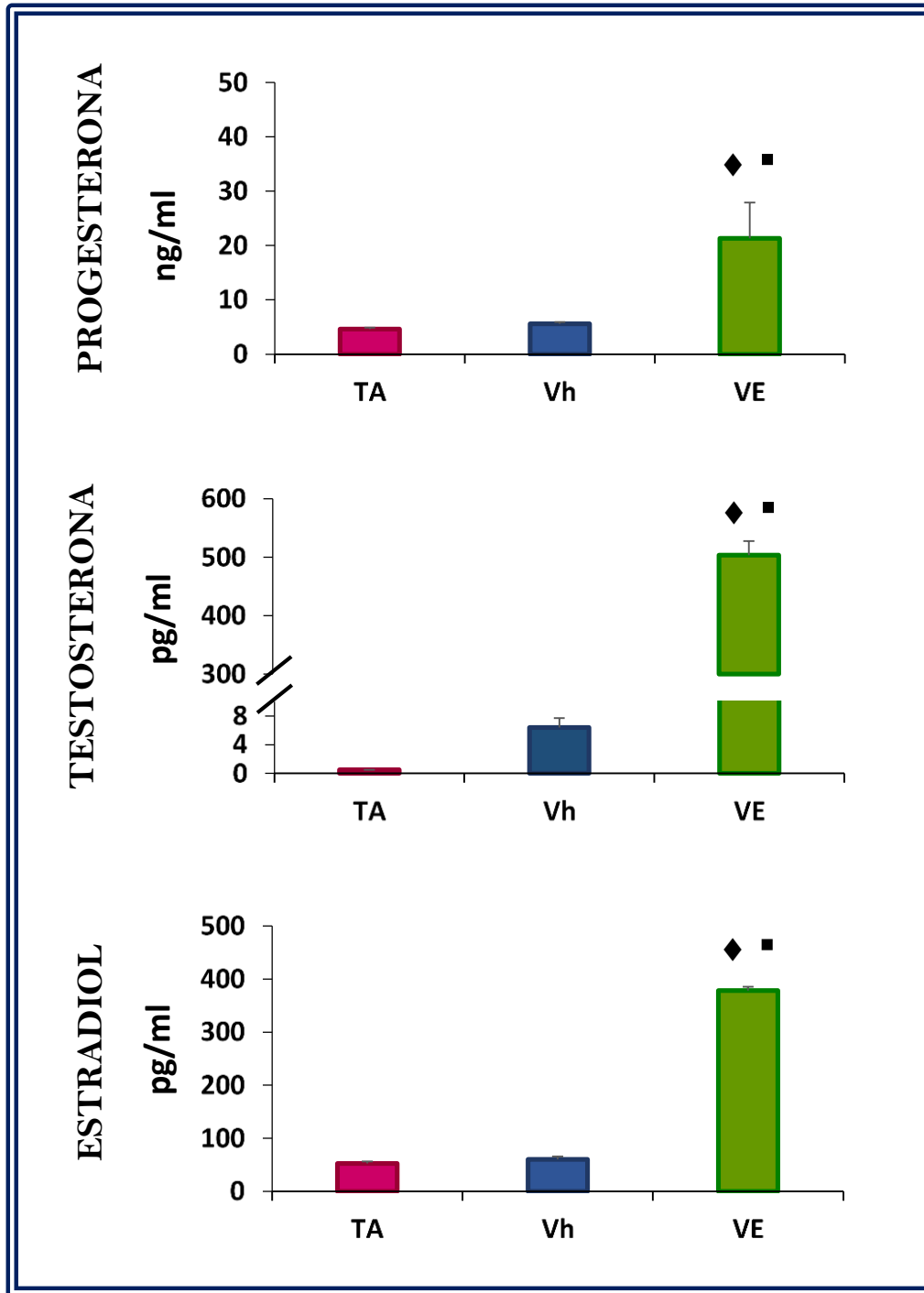
Figura 11. Porcentaje de animales ovulantes y media \pm eem del número de ovocitos liberados de animales testigo absoluto (TA), inyectados con vehículo (Vh) o con valerato de estradiol (VE) a los 10 días de edad y sacrificados entre los 68 y 72 días de edad en la etapa del estro.

Concentración de hormonas esteroides

La inyección de Vh no modificó la concentración de **progesterona**, en comparación con los animales intactos. El tratamiento con el VE resultó en un incremento de la concentración de la hormona, en comparación al grupo TA y Vh (Figura 12).

En los animales inyectados con Vh, la concentración de **testosterona** no se modificó respecto al grupo TA, mientras que, en los animales tratados con VE la concentración de testosterona fue mayor en comparación a su grupo TA y Vh (Figura 12).

La inyección con Vh no modificó la concentración de **estradiol** respecto al grupo TA, mientras que, el tratamiento con VE provocó un incremento en la concentración de estradiol en comparación a su grupo TA y Vh (Figura 12).



◆ $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo TA; ■ $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo Vh (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer).

Figura 12. Media \pm eem de la concentración de progesterona, testosterona y estradiol en suero de animales testigo absoluto (TA), inyectados con vehículo (Vh) o con valerato de estradiol (VE) a los 10 días de edad y sacrificados entre los 68 y 72 días de edad en la etapa del estro.

EXPERIMENTO 2

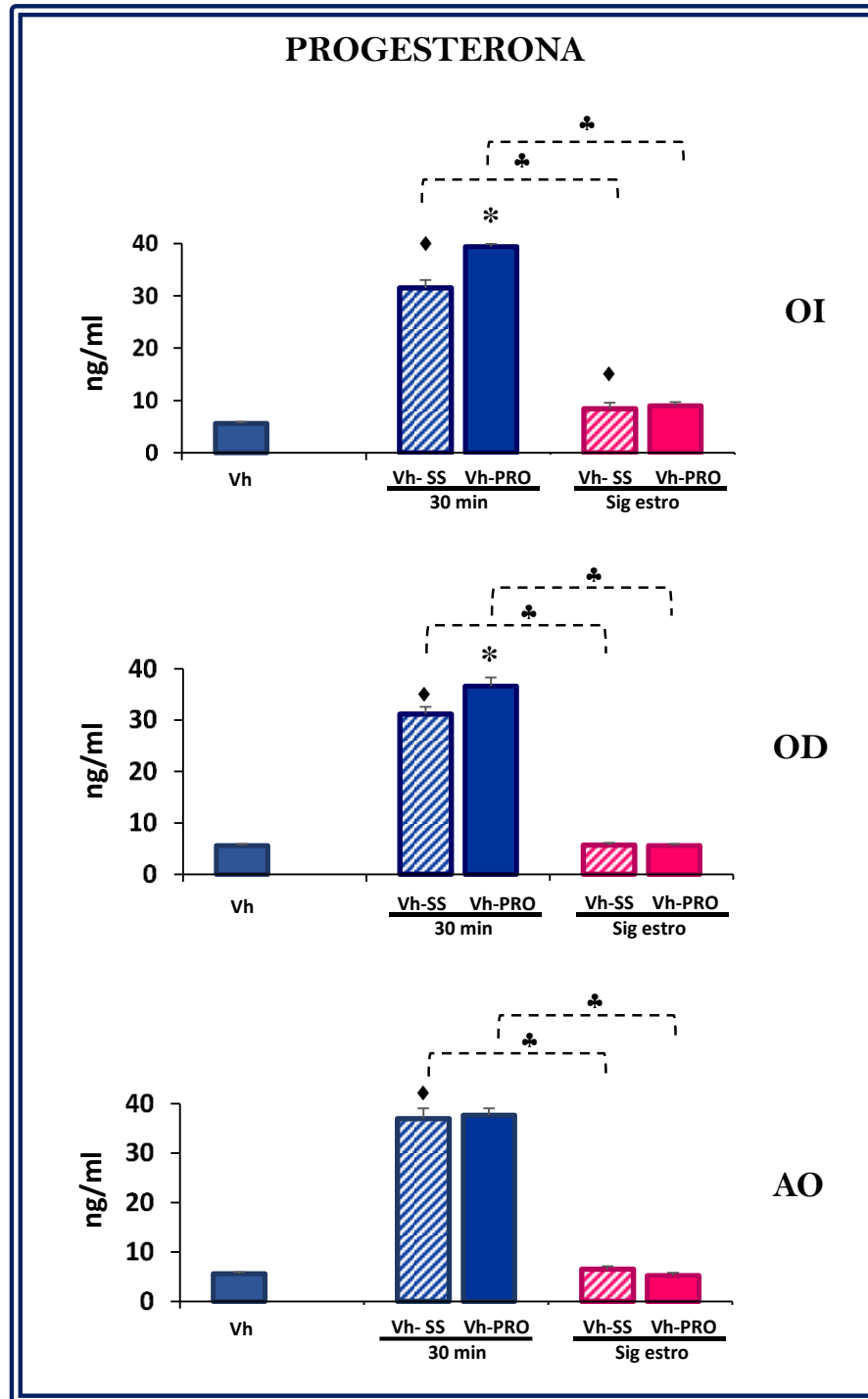
Efectos agudos y subagudos de la inyección de PROPRANOLOL en la bursa de uno o ambos ovarios de animales CÍCLICOS

Concentración de progesterona

En animales tratados con Vh, la inyección de solución salina en animales sacrificados a los **30 minutos** de la cirugía, resultó en un incremento en la concentración de **progesterona**, independientemente del ovario tratado, respecto a los animales inyectados únicamente con Vh. En contraste, en los animales sacrificados al **siguiente estro**, la inyección de solución salina en la bursa del ovario izquierdo, incrementó la concentración de esta hormona, respecto al grupo con Vh. Este efecto no se presentó cuando la inyección se realizó en el ovario derecho o en ambos ovarios (Figura 13).

En comparación al grupo con solución salina, los animales con inyección en el ovario izquierdo o derecho con **propranolol**, presentaron incremento en la concentración de **progesterona** a los **30 minutos**, este efecto no se presentó ante la inyección de propranolol en ambos ovarios, mientras que en los animales sacrificados al siguiente estro, la inyección en uno o en ambos ovarios de propranolol, no modificó la concentración de **progesterona** (Figura 13).

En comparación a los animales sacrificados a los 30 minutos, en animales inyectados con Vh y sacrificados al **siguiente estro** de la cirugía, la inyección en uno o en ambos ovarios de solución salina o propranolol resultó en una disminución de la concentración de **progesterona** (Figura 13).



♦ $p < 0.05$ vs. el grupo Vh; * $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo con SS; ♣ $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo sacrificado a los 30 minutos (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer).

Figura 13. Media \pm eem de la concentración de progesterona en suero de animales tratados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) e inyectados entre los 68 y 72 días de edad, en la etapa del estro, con solución salina (SS) o con propranolol (PRO) en la bursa del ovario izquierdo (OI), derecho (OD) o de ambos ovarios (AO) y sacrificados a los 30 minutos o al siguiente estro de la cirugía.

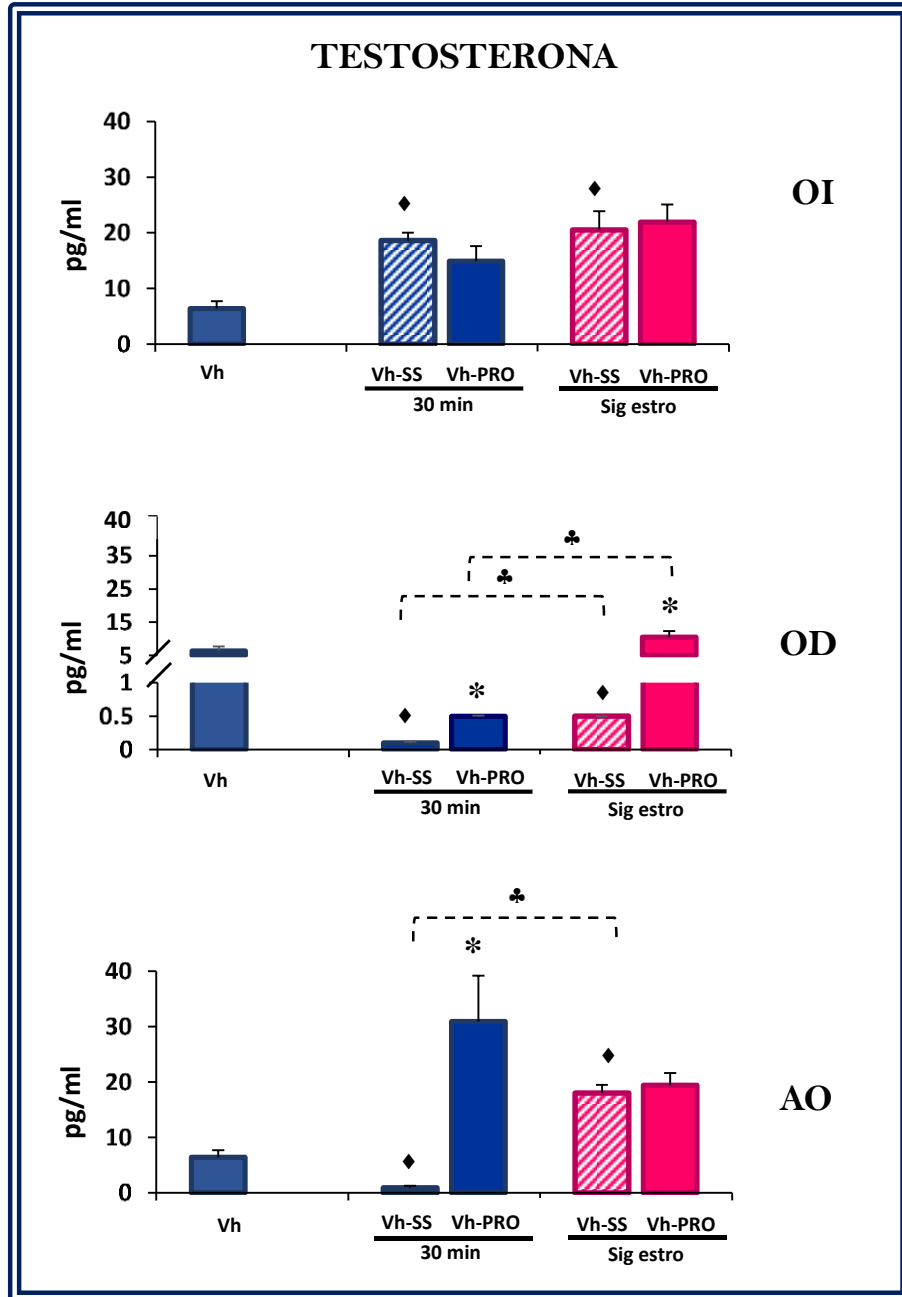
Concentración de testosterona

A los **30 minutos**, la inyección de solución salina en la bursa del ovario derecho o en ambos ovarios, resultó en una disminución en la concentración de **testosterona**, efecto contrario se observó ante la inyección de solución salina en el ovario izquierdo respecto a los animales inyectados únicamente con Vh (Figura 14).

En los animales sacrificados al **siguiente estro** e inyectados con solución salina en el ovario izquierdo o en ambos ovarios, incrementó la concentración de **testosterona**, efecto contrario se observó cuando la solución salina se inyectó en la bursa del ovario derecho, respecto a los animales inyectados únicamente con Vh (Figura 14).

A los **30 minutos**, al comparar con el grupo con SS, la inyección de propranolol en el ovario derecho o en ambos ovarios, resultó en un incremento de la concentración de **testosterona**, mientras que en animales sacrificados al **siguiente estro**, la inyección de propranolol en el ovario derecho, provocó incremento de la concentración de **testosterona**, este efecto no se presentó ante la inyección en el ovario izquierdo o en ambos ovarios (Figura 14).

En comparación a los animales sacrificados a los 30 minutos, en animales inyectados con Vh y sacrificados al **siguiente estro** de la cirugía, la inyección de SS en el ovario derecho o en ambos ovarios, provocó aumento en la concentración de **testosterona**. La inyección de propranolol en la bursa del ovario derecho incrementó la concentración de la hormona, mientras que en los inyectados con propranolol en la bursa del ovario izquierdo o de ambos ovarios no se modificó la concentración (Figura 14).



♦ $p < 0.05$ vs. el grupo Vh; * $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo con SS; ♣ $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo sacrificado a los 30 min (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer).

Figura 14. Media \pm eem de la concentración de testosterona en suero de animales tratados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) e inyectados entre los 68 y 72 días de edad, en la etapa del estro, con solución salina (SS) o con propranolol (PRO) en la bursa del ovario izquierdo (OI), derecho (OD) o de ambos ovarios (AO) y sacrificados a los 30 minutos o al siguiente estro de la cirugía.

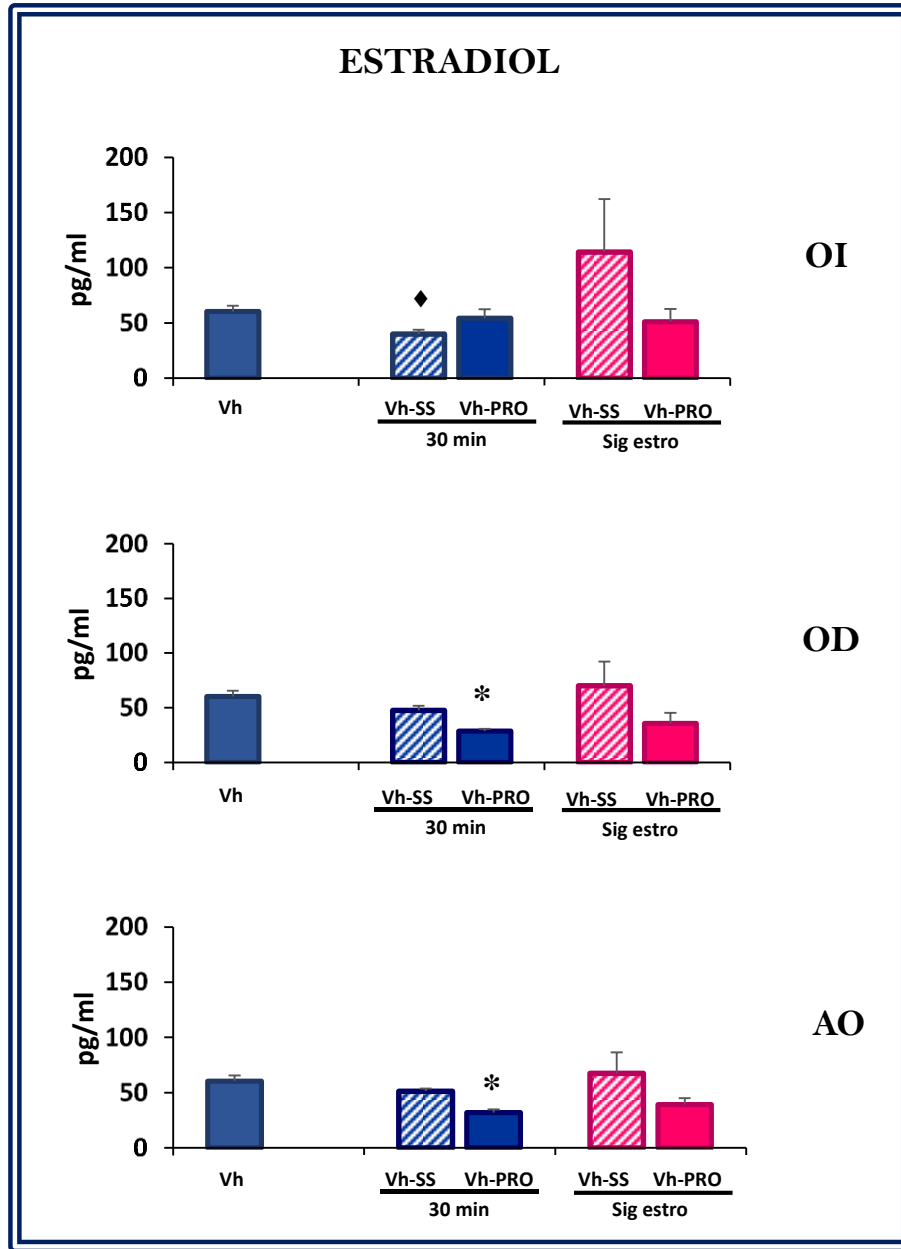
Concentración de estradiol

A los **30 minutos** de la inyección de solución salina en la bursa del ovario izquierdo disminuyó la concentración de **estradiol** respecto a los animales inyectados únicamente con Vh (Figura 15).

En los animales sacrificados al **siguiente estro**, la inyección en uno o en ambos ovarios con solución salina no modificó la concentración de **estradiol**, respecto a los animales inyectados únicamente con Vh (Figura 15).

En comparación al grupo con SS, a los **30 minutos** de la cirugía, la inyección de propranolol en el ovario derecho o en ambos ovarios, resultó en una disminución de la concentración de **estradiol**, mientras que en los animales sacrificados al **siguiente estro**, la inyección de propranolol no modificó la concentración de **estradiol** (Figura 15).

En comparación a los animales sacrificados a los 30 minutos, en animales inyectados con Vh y sacrificados al **siguiente estro**, la inyección de solución salina o de propranolol no modificó la secreción de **estradiol** (Figura 15).



◆ $p < 0.05$ vs. el grupo Vh; * $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo con SS (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer).

Figura 15. Media \pm eem de la concentración de estradiol en suero de animales tratados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) e inyectados entre los 68 y 72 días de edad, en la etapa del estro, con solución salina (SS) o con propranolol (PRO) en la bursa del ovario izquierdo (OI), derecho (OD) o de ambos ovarios (AO) y sacrificados a los 30 minutos o al siguiente estro de la cirugía.

EXPERIMENTO 3

Efectos subagudos de la inyección de PROPRANOLOL en la bursa de uno o ambos ovarios, sobre la respuesta ovulatoria de animales inyectados con Vh o con VE

Tasa de animales ovulantes

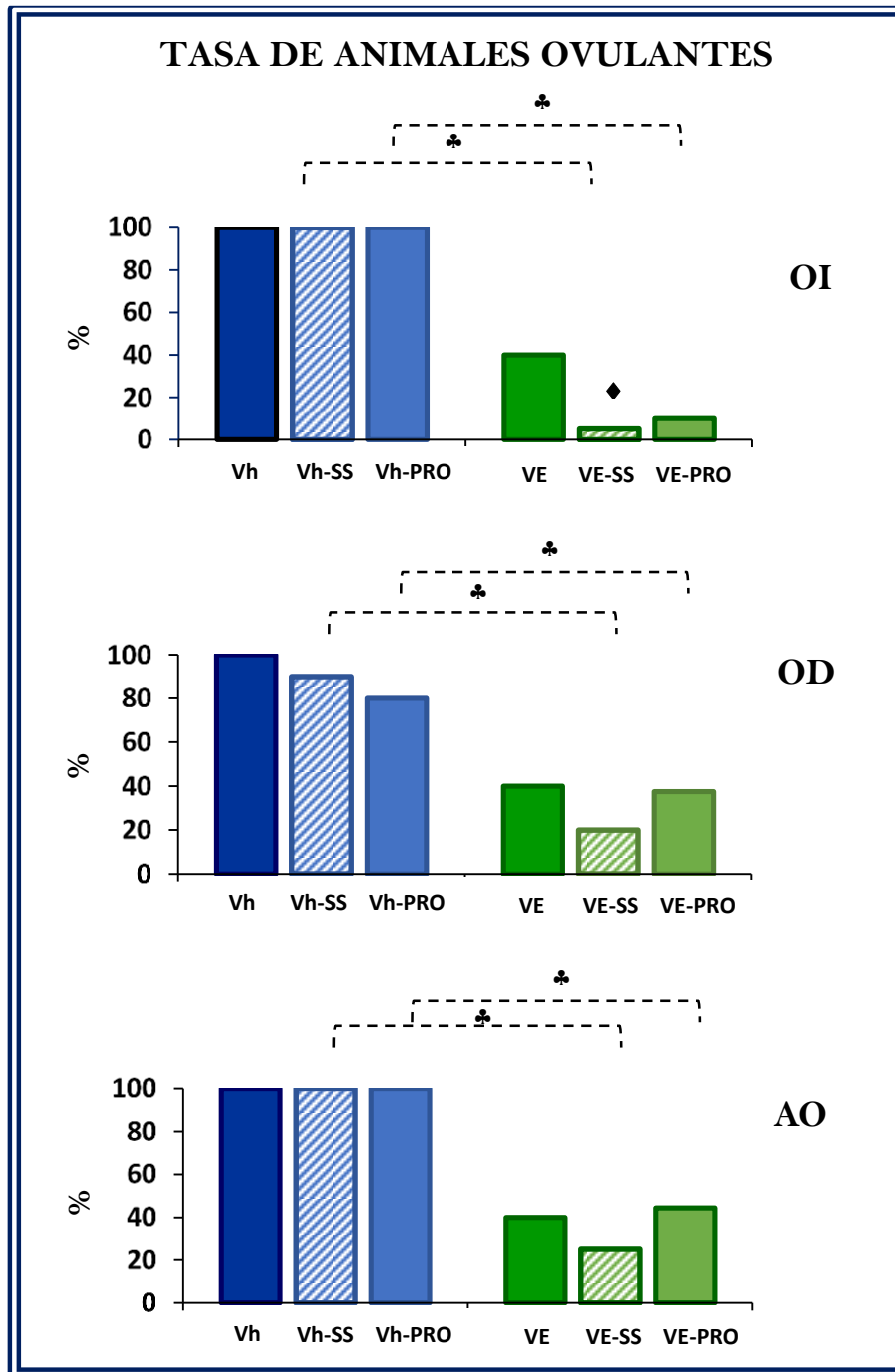
En los animales inyectados con Vh, la inyección en uno o en ambos ovarios de solución salina no modificó la tasa de animales ovulantes, respecto a su grupo control (Figura 16).

En los animales inyectados con Vh, la inyección de propranolol en uno o ambos ovarios no modificó la tasa de animales ovulantes en comparación al grupo Vh-SS (Figura 16).

En los animales inyectados con VE, la inyección de solución salina en el ovario izquierdo, resultó en una disminución en la tasa de animales ovulantes, respecto a su grupo control. Este efecto no se presentó en el ovario derecho o en ambos ovarios (Figura 16).

En comparación al grupo con VE-SS, en los animales VE-PRO no se modificó la tasa de animales ovulantes, independientemente del ovario tratado (Figura 16).

En comparación a los grupos Vh-SS o Vh-PRO, en animales tratados con VE, la inyección de solución salina o propranolol resultó en la disminución de la tasa de animales ovulantes (Figura 16).



◆ $p < 0.05$ vs. su grupo control; ♣ $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo Vh (Prueba de J_i^2).

Figura 16. Porcentaje de animales ovulantes tratados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o con valerato de estradiol (VE) e inyectados entre los 68 y 72 días de edad, en la etapa del estro, con solución salina (SS) o con propranolol (PRO) en la bursa del ovario izquierdo (OI), derecho (OD) o de ambos ovarios (AO) y sacrificados al siguiente estro de la cirugía.

Número de ovocitos liberados

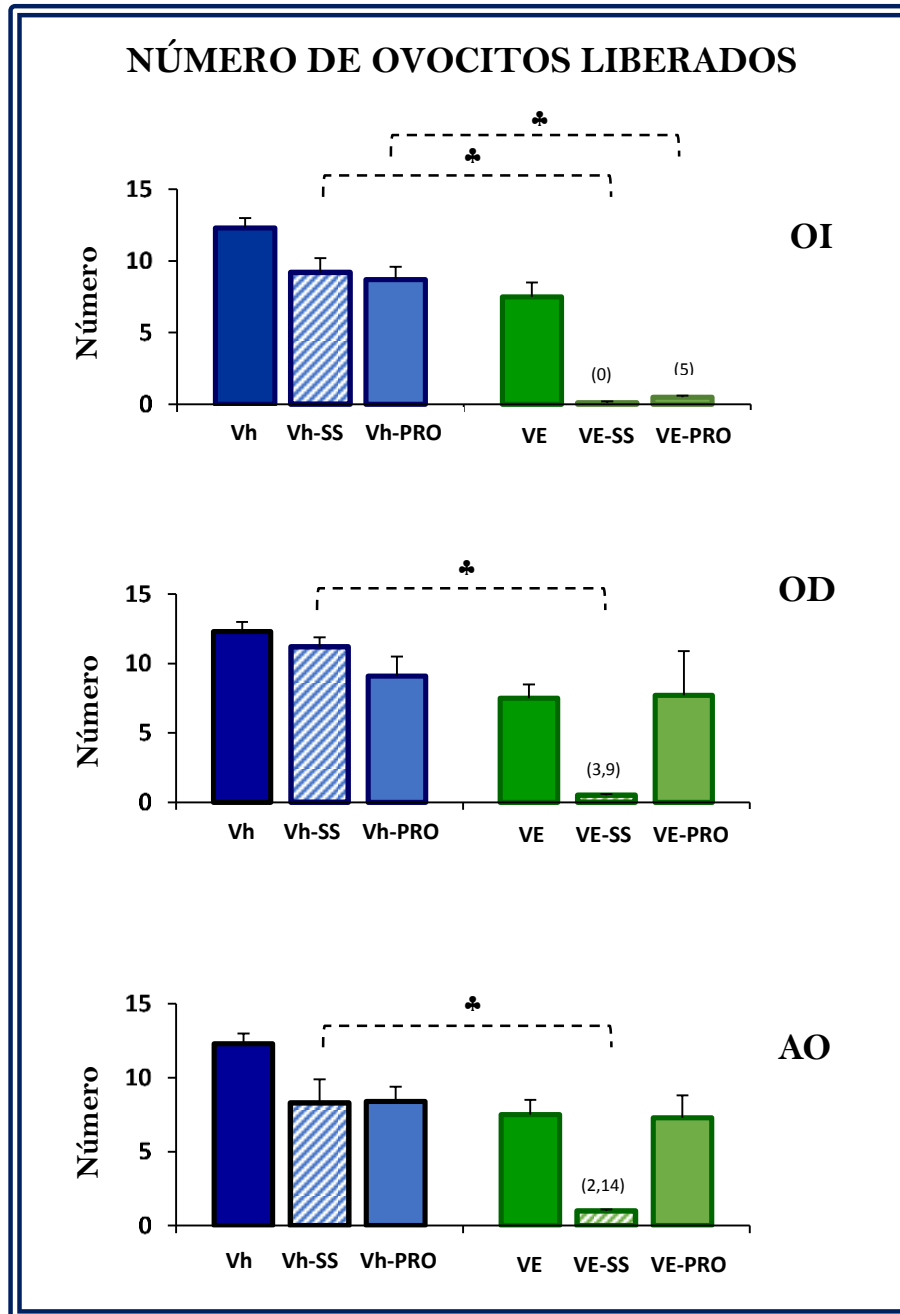
En los animales tratados con Vh, la inyección en uno o en ambos ovarios con solución salina, no modificó el número de ovocitos liberados, respecto a su grupo control (Figura 17).

En animales inyectados con Vh, la inyección de propranolol no modificó el número de ovocitos liberados, independientemente del ovario tratado, en comparación al grupo Vh-SS (Figura 17).

Sólo dos de los animales tratados con VE e inyectados en el ovario derecho con solución salina ovularon tres y nueve ovocitos respectivamente. Cuando la solución salina se inyectó en ambos ovarios también ovularon dos animales con una cuota de dos y 14 ovocitos cada uno (Figura 17).

En comparación al grupo con VE-SS, en animales tratados con VE e inyectados con propranolol en la bursa del ovario derecho o de ambos ovarios se observó un incremento en el número de ovocitos liberados (Figura 17).

En comparación a los grupos inyectados con Vh-SS, en animales tratados con VE, la inyección de solución salina en uno o ambos ovarios resultó en un menor número de ovocitos liberados. La inyección de propranolol en el ovario izquierdo de animales tratados con VE disminuyó este parámetro, respecto a los animales inyectados con Vh-PRO (Figura 17).



♣ $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo Vh (prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de U de Mann-Whitney).

Figura 17. Media \pm eem de número de ovocitos liberados de animales tratados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o con valerato de estradiol (VE) e inyectados entre los 68 y 72 días de edad, en la etapa del estro, con solución salina (SS) o con propranolol (PRO) en la bursa del ovario izquierdo (OI), derecho (OD) o de ambos ovarios (AO) y sacrificados al siguiente estro de la cirugía.

EXPERIMENTO 4

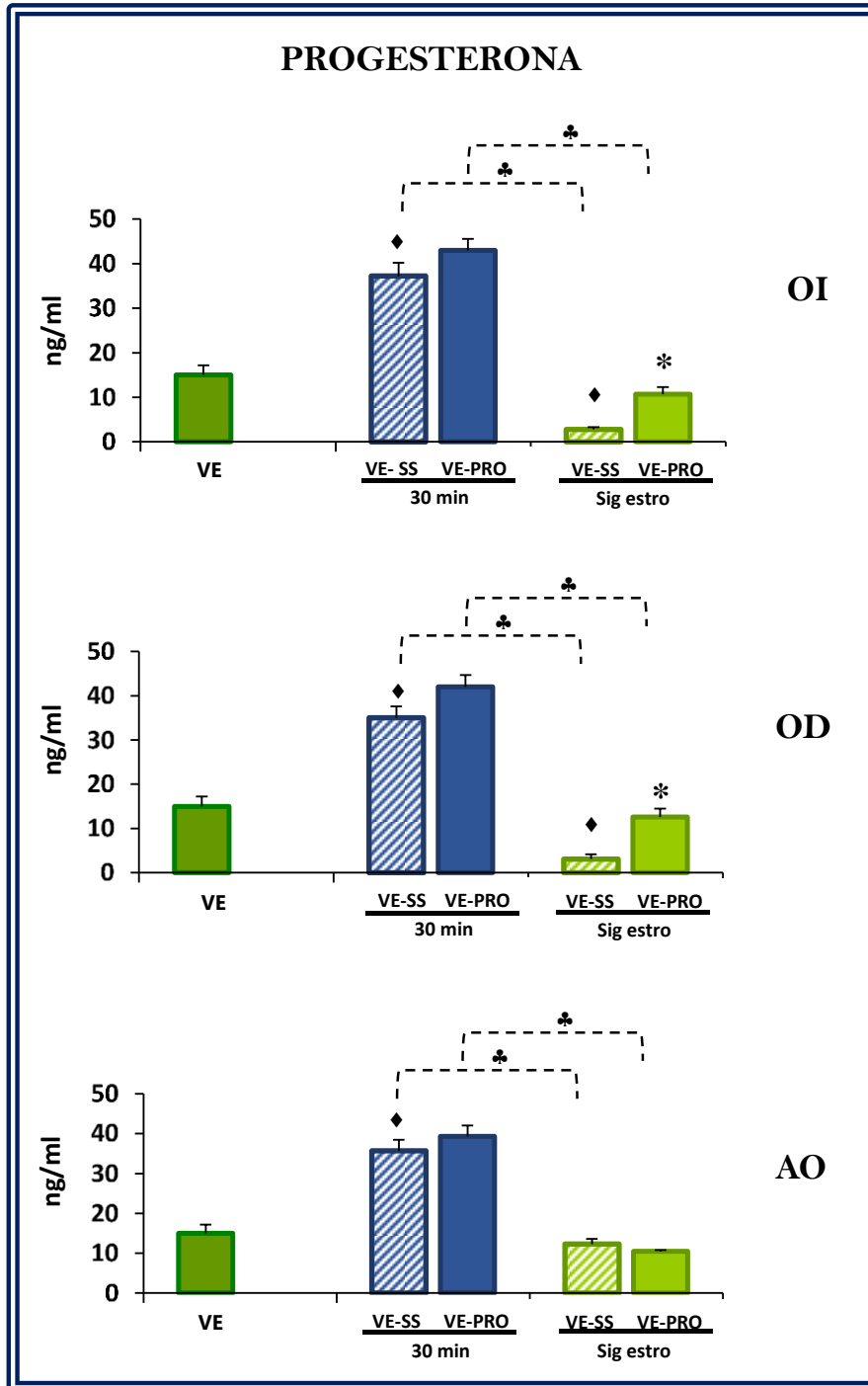
Efectos agudos y subagudos de la inyección de PROPRANOLOL en la bursa de uno o ambos ovarios de animales tratados con VE

Concentración de progesterona

A los **30 minutos** de la inyección de solución salina en uno o en ambos ovarios se observó un incremento de la concentración de **progesterona**, respecto a su grupo con VE. Un efecto opuesto se observó en animales sacrificados **al siguiente estro** con la inyección de solución salina en el ovario izquierdo o derecho (Figura 18).

En comparación al grupo con VE-SS y sacrificados a los **30 minutos**, la inyección en uno o en ambos ovarios de propranolol no modificó la concentración de esta hormona, mientras que en animales sacrificados **al siguiente estro**, la inyección en el ovario izquierdo o derecho de propranolol resultó en un aumento de la concentración de **progesterona**, este efecto no se presentó cuando se inyectó en ambos ovarios (Figura 18).

En comparación a los animales sacrificados a los 30 minutos, en animales inyectados con VE y sacrificados **al siguiente estro** de la cirugía, la inyección en uno o en ambos ovarios de solución salina o de propranolol resultó en la disminución de la concentración de **progesterona** (Figura 18).



♦ $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo VE; * $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo con SS; ♣ $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo sacrificado a los 30 min (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer).

Figura 18. Media \pm eem de la concentración de progesterona en suero de animales tratados a los 10 días de edad con valerato de estradiol (VE) e inyectados entre los 68 y 72 días de edad, en la etapa del estro, con solución salina (SS) o con propranolol (PRO), en la bursa del ovario izquierdo (OI), derecho (OD) o de ambos ovarios (AO) y sacrificados a los 30 minutos o al siguiente estro de la cirugía.

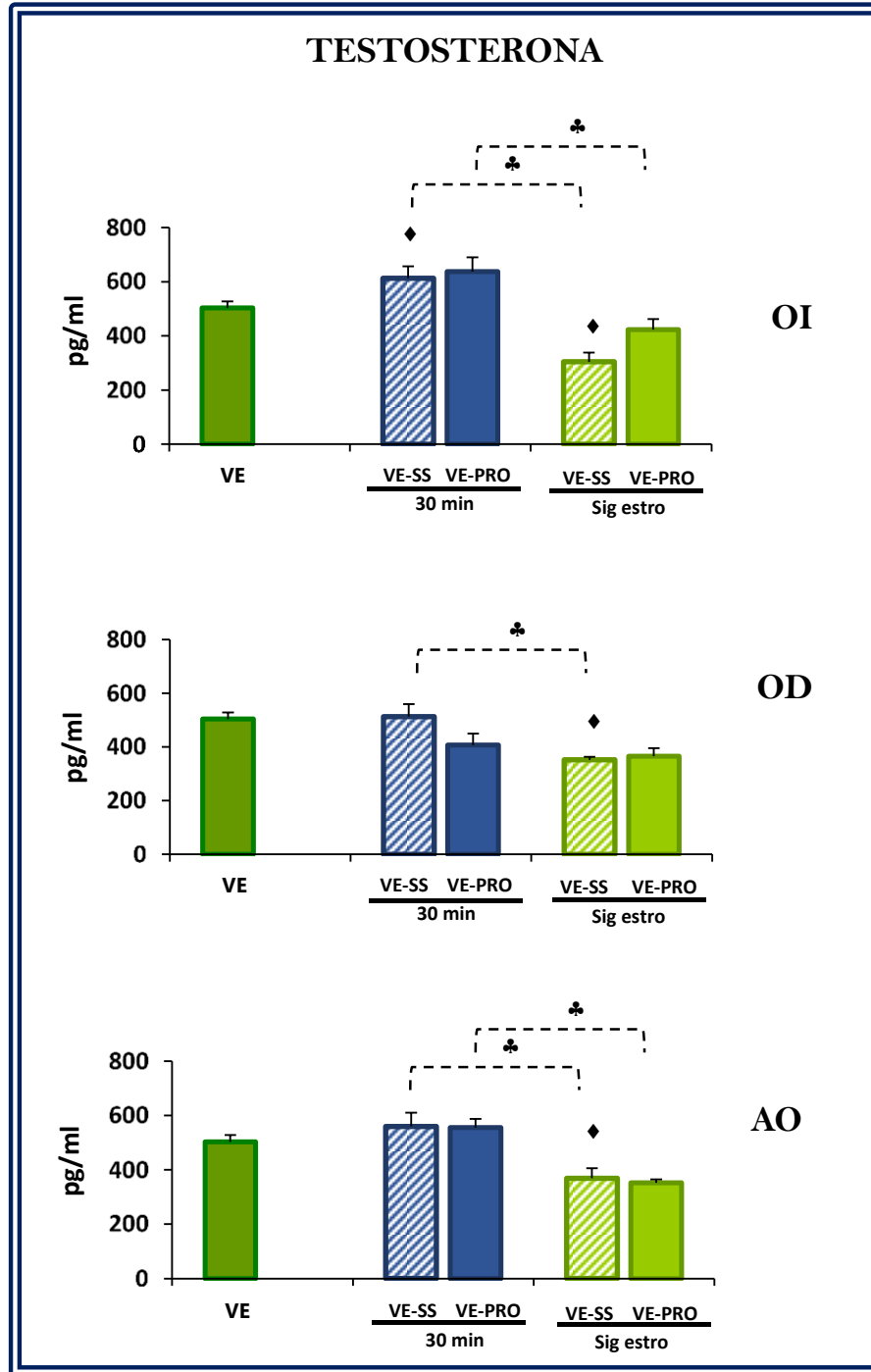
Concentración de testosterona

La inyección de solución salina en el ovario izquierdo resultó en una mayor concentración de **testosterona** a los **30 minutos** de la cirugía, respecto a los animales inyectados con VE (Figura 19).

En los animales sacrificados al **siguiente estro**, la inyección de solución salina en uno o en ambos ovarios resultó en menor concentración de **testosterona** respecto a los animales inyectados con VE (Figura 19).

En comparación al grupo con SS, en animales inyectados con VE y sacrificados a los **30 minutos o al siguiente estro**, la inyección de propranolol no modificó la concentración de **testosterona**, independientemente del ovario tratado (Figura 19).

En comparación a los animales sacrificados a los 30 minutos, en animales tratados con VE y sacrificados al **siguiente estro**, la inyección de solución salina en uno o en ambos ovarios resultó en una menor concentración de **testosterona**. Efecto similar se observó ante la inyección de propranolol en la bursa del ovario izquierdo o de ambos ovarios (Figura 19).



♦ p < 0.05 vs. su respectivo grupo VE; * p < 0.05 vs. su respectivo grupo con SS; ♣ p < 0.05 vs. su respectivo grupo sacrificado a los 30 min (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer).

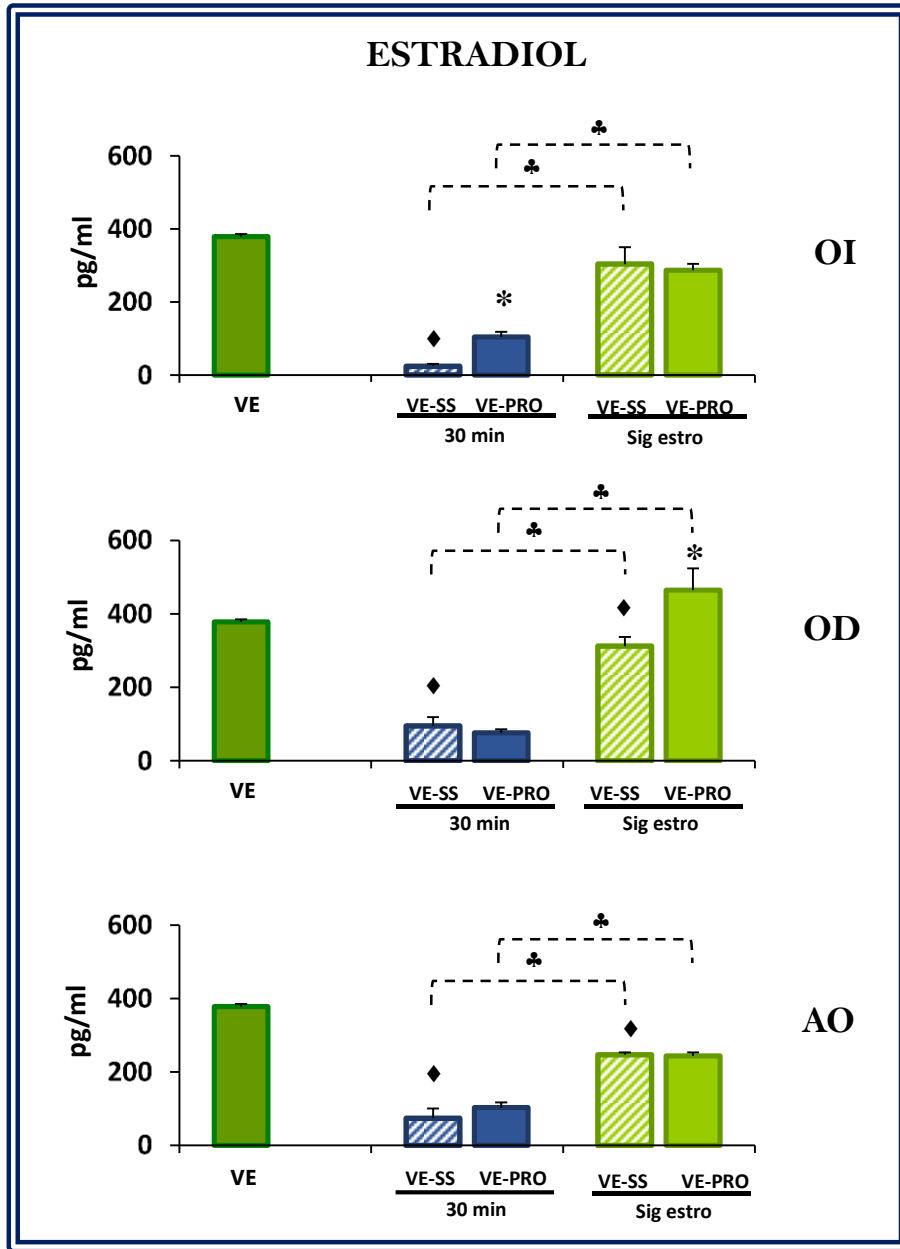
Figura 19. Media ± eem de la concentración de testosterona en suero de animales tratados a los 10 días de edad con valerato de estradiol (VE) e inyectados entre los 68 y 72 días de edad, en la etapa del estro, con solución salina (SS) o con propranolol (PRO), en la bursa del ovario izquierdo (OI), derecho (OD) o de ambos ovarios (AO) y sacrificados a los 30 minutos o al siguiente estro de la cirugía.

Concentración de estradiol

Respecto a los animales inyectados con VE, la inyección en uno o en ambos ovarios de **solución salina**, resultó en una menor concentración de **estradiol** a los **30 minutos** de la cirugía. En los animales sacrificados al **siguiente estro**, el grupo inyectado con solución salina en el ovario derecho o en ambos ovarios presentó una menor concentración de **estradiol** respecto al grupo con VE (Figura 20).

En comparación al grupo con VE-SS y sacrificados a los **30 minutos**, la inyección de propranolol en la bursa del ovario izquierdo resultó en un aumento de la concentración de **estradiol**. En los animales sacrificados al **siguiente estro**, la inyección de propranolol en la bursa del ovario derecho resultó en un incremento en la concentración de estradiol (Figura 20).

En comparación a los animales sacrificados a los 30 minutos, en animales sacrificados al **siguiente estro**, la inyección en uno o en ambos ovarios de solución salina o de propranolol resultó en un aumento en la concentración de **estradiol** (Figura 20).



♦ p < 0.05 vs. su respectivo grupo VE; *p < 0.05 vs. su respectivo grupo con SS; ♣ p < 0.05 vs. su respectivo grupo sacrificado a los 30 min (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer).

Figura 20. Media ± eem de la concentración de estradiol en suero de animales tratados a los 10 días de edad con valerato de estradiol (VE) e inyectados entre los 68 y 72 días de edad, en la etapa del estro, con solución salina (SS) o con propranolol (PRO) en la bursa del ovario izquierdo (OI), derecho (OD) o de ambos ovarios (AO) y sacrificados a los 30 minutos o al siguiente estro de la cirugía.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que en el modelo del animal con SOPQ se facilitó la respuesta ovulatoria y la secreción de progesterona y estradiol cuando se encuentran bloqueados los receptores β -adrenérgicos. Esta respuesta es diferente en el animal cíclico. En ambos modelos animales, la respuesta depende del ovario y del tiempo que permanezcan bloqueados los receptores β -adrenérgicos.

En este estudio se observó que la administración de una dosis de VE en la etapa infantil, resulta en el desarrollo del SOPQ, que se caracteriza por incremento en las concentraciones de hormonas esteroides y una disminución en la respuesta ovulatoria, tal como se ha reportado en la literatura (Barria y col., 1993; Morales-Ledesma y col., 2010; Linares y col., 2013; Ramírez, 2014).

La administración de VE induce adelanto en la edad de apertura vaginal (Rosa-E-Silva y col., 2003; Morales-Ledesma y col., 2010; Ramírez, 2014), efectos similares se observan en nuestro estudio, donde el tratamiento con el estrógeno provoca la canalización de la vagina cuatro días después de su administración. Este evento se puede explicar por el incremento en las concentraciones de estradiol, que al actuar sobre la membrana vaginal, culmina con su ruptura, lo que se considera como un indicador del inicio de la pubertad. Este mecanismo de acción de los estrógenos ha sido propuesto por Ojeda y Urbanski (1994) y Rosa-E-Silva y colaboradores (2003).

En el presente estudio se muestra que la inducción del SOPQ mediante la administración del VE, resulta en una irregularidad en el patrón del ciclo estral cuando los animales alcanzan la etapa adulta, donde se observan un mayor número de diestros y proestros consecutivos, tal como se ha reportado en la literatura (Barria y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003). Se ha sugerido que la alteración en el patrón del ciclo estral se asocia con el incremento en las concentraciones NA y de hormonas esteroides (Barria y col., 1993). Esta idea se apoya en el hecho de que al quitar el mayor aporte NAérgico a través de la sección bilateral del nervio ovárico superior se restaura el patrón de ciclo estral, así como la concentración de hormonas esteroides (Barria y col., 1993).

Otra alternativa para explicar la irregularidad en el patrón del ciclo estral en el animal con SOPQ, es por un incremento en la concentración de testosterona. En apoyo a esta interpretación se ha mostrado que los implantes con letrozol, un inhibidor de las aromatasas, resulta en un incremento de la concentración de testosterona que se relaciona con una irregularidad en el patrón del ciclo estral caracterizado por presentar etapas prolongadas en diestros (Maneras y col., 2007).

La perforación del peritoneo modifica la secreción de hormonas esteroides (Barco y col., 2003; Flores y col., 2006). Este hecho ha sido atribuido a la existencia de vías neurales que se proyectan hacia el ovario y hacia las adrenales. La activación de cualquiera de estas fibras nerviosas podría estar modificando la secreción de estas hormonas (Barco y col., 2003). Estos hechos nos permiten pensar que la inyección de solución salina en la bursa ovárica puede resultar en la activación de las fibras simpáticas que recibe la gónada, donde la información neural que transcurre por estos nervios modula de manera diferencial la secreción de hormonas esteroides. Así, en el animal cíclico estimula la secreción de progesterona y testosterona e inhibe la de estradiol. Este comportamiento es similar en el modelo del animal con SOPQ. La respuesta de los ovarios a la activación de las fibras por la inyección de solución salina depende además del tiempo transcurrido desde la estimulación.

No se puede descartar que las alteraciones en la secreción de las hormonas esteroides se deban al hecho de que la laparotomía haya inducido **estrés**. Lo que resulta en la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, donde en el hipotálamo incrementa el factor liberador de corticotropinas (CRF) el cual llega a la adenohipófisis y estimula la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que trae consigo un incremento en la secreción de corticoides, adrenalina, noradrenalina y hormonas esteroides por las adrenales (Barco y col., 2003; Flores y col., 2006; López-Calderon, 2005). Las catecolaminas podrían estar participando en la regulación de la secreción de hormonas de origen ovárico y adrenal mediante la activación de sus receptores adrenérgicos, donde podrían estimular las concentraciones de AMPc y como resultado la secreción de progesterona, testosterona y estradiol.

En el presente estudio mostramos que en la rata cíclica, 30 minutos después del bloqueo de los receptores β -adrenérgicos incrementó la concentración de progesterona, este efecto no se presentó en los animales sacrificados al siguiente estro. Resultados semejantes fueron reportados por el grupo de Piccinato (2012), donde muestran que a bajas concentraciones de NA, el posterior bloqueo de los receptores β -adrenérgicos con propranolol resulta en un aumento en la secreción de progesterona. Dado que en el ovario los receptores β están ocupados por el antagonista, pensamos que la mayor secreción de progesterona es a través de la activación de los receptores α -adrenérgicos (Modelo 1). En apoyo a esta interpretación tenemos el hecho de que la estimulación de los receptores α_1 -adrenérgicos mediante la administración de fenilefrina (agonista selectivo α -adrenérgico) resulta en una mayor concentración de progesterona (Wasilewka-Dziubińska y col., 2002).

En la literatura se ha señalado que la secreción de testosterona es regulada por los receptores α y β adrenérgicos (Aguado y col., 1982; Delgado y col., 2006; Fernandois y col., 2012), donde la activación de los receptores α resulta en un incremento en la secreción de testosterona (Delgado y col., 2006). Al momento existe controversia sobre la participación de los receptores β en la regulación de esta hormona, ya que en un modelo *in vivo*, la administración intraperitoneal de propranolol aumenta la concentración de testosterona que se acompaña por un ligero incremento en el número de receptores β (Fernandois y col., 2012), mientras que la estimulación de los receptores β_2 por la administración de zinterol no modifica la concentración de la hormona al primer estro vaginal (Aguado y col., 1982).

En un modelo *ex vivo*, donde se aísla el complejo GCMS-NOS-ovario, el bloqueo de los receptores β a nivel del ganglio, resulta en la disminución de la concentración de testosterona por parte del ovario (Delgado y col., 2006). Los resultados del presente estudio aportan evidencias de que la respuesta del ovario al bloqueo de los receptores β también depende del ovario en estudio, ya que 30 minutos después de la administración de propranolol en el ovario derecho, resulta en una mayor secreción de esta hormona, mientras que si el ovario estimulado es el izquierdo no se produce respuesta. En los animales sacrificados al siguiente estro, este efecto sólo se presentó cuando el bloqueo fue

en el ovario derecho. Lo que nos permite sugerir que en el animal cíclico, la respuesta del ovario a la NA va a depender del número de receptores β -adrenérgicos, así como de su afinidad. Además, no descartamos que el incremento en la secreción de testosterona sea estimulada por la activación de los receptores α -adrenérgicos (Modelo 1).

Para que se lleve a cabo la síntesis de estradiol es necesaria la presencia de testosterona y del complejo enzimático P450-aromatasa, ésta última es la que se encarga de transformar la testosterona en estradiol (Miller y Styne, 2001). El AMPc estimula la expresión de genes que codifican para las enzimas esteroideogénicas (Gómez-Chang y col., 2012). Por estudios *in vitro* se ha visto que en células de la granulosa la administración de propranolol en presencia de catecolaminas, disminuye la acumulación de AMPc (Kliachcko y Zor., 1981; Selvaraj y col., 2000). Estas evidencias podrían indicar que el bloqueo de los receptores β resultó en la disminución de la enzima P450-aromatasa lo que se traduce en una disminución en la secreción de estradiol (Modelo 1).

El bloqueo de los receptores β -adrenérgicos por un período prolongado (48 horas consecutivas o por 10 días) mediante la administración de propranolol, resulta en la disminución de la secreción de progesterona y andrógenos (Selvaraj y col., 2000; Luna y col., 2012). Estos antecedentes indican que se puede requerir de una exposición prolongada al propranolol para observar cambios en la respuesta ovárica. Lo que podría ayudarnos a explicar el por qué en los animales cíclicos sacrificados al siguiente estro, la administración de una dosis de propranolol no tiene efectos sobre la concentración de progesterona y estradiol.

En la literatura se reporta que la NA y las hormonas gonadotrópicas estimulan el desarrollo folicular y la ovulación, evento que ha sido explicado por la unión de la NA con sus receptores β -adrenérgicos, este mecanismo desencadena que la NA module la respuesta del folículo ovárico a las gonadotropinas (Dyer y Erickson, 1985).

En el animal con SOPQ, la falta de la respuesta ovulatoria no se explica por alteraciones en la concentración de las gonadotropinas (Morales-Ledesma y col., 2010), sino más bien como resultado de una mayor actividad de las fibras simpáticas que llegan al

ovario (Barria y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003). En el presente estudio se observó que en el animal con SOPQ, el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos en animales sacrificados al siguiente estro incrementó el número de ovocitos liberados, cuando el bloqueador fue inyectado en el ovario derecho o en ambos ovarios. Estas evidencias nos llevan a sugerir que una disminución en el tono NAérgico, mediante el bloqueo de los receptores β con propranolol, incrementa la respuesta ovulatoria. Esta respuesta también se observa en la rata senescente, con altas concentraciones de NA, donde el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos, mediante la administración de propranolol, incrementa el porcentaje de animales ovulantes y el número de cuerpos lúteos (Fernandois y col., 2012).

La inyección de VE incrementa la concentración de NA y de VIP en el ovario, lo que ha llevado a sugerir que estos neurotransmisores podrían ser los responsables del desarrollo de las características que tipifican al SOPQ (Parra y col., 2007; Ramírez, 2014).

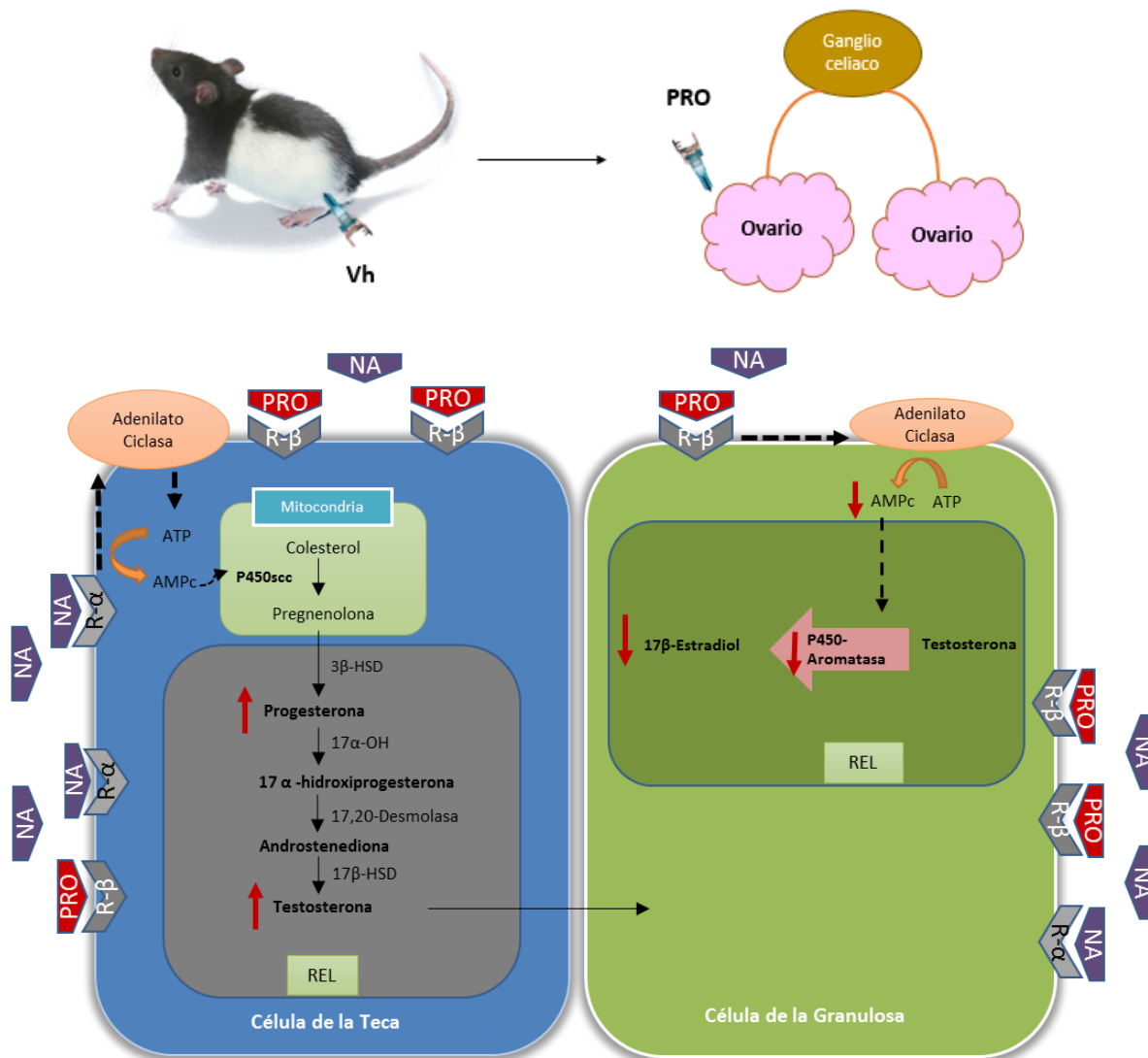
Se menciona que en la rata tratada con VE, la NA ejerce un efecto estimulante en la secreción de la progesterona, ya que la eliminación del principal aporte de NA al ovario por la sección bilateral del NOS disminuye la concentración de la progestina (Morales-Ledesma y col., 2010). En el presente estudio, mostramos que en la rata con SOPQ los efectos del bloqueo de los receptores β -adrenérgicos sobre la secreción de progesterona son asimétricos en función del tiempo en el que permanezcan bloqueados, ya que en animales sacrificados a los 30 minutos no se modificó las concentraciones de progesterona, independientemente del ovario tratado, mientras que en el animal sacrificado al siguiente estro, el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos del ovario izquierdo o derecho incrementa las concentraciones de la progesterona. Estos resultados nos permiten sugerir que el aumento en la secreción de esta hormona, podría estar dada además por la acción de VIP en el ovario (Modelo 2). En apoyo a esta interpretación contamos con el estudio del grupo de Garranza (2004), quienes mediante un sistema *ex vivo* del GCMS-NOS-ovario, la adición de VIP en el GCMS incrementó la secreción de progesterona por el ovario de manera tiempo dependiente. Este mismo comportamiento se observa cuando el VIP es inyectado en la bursa ovárica (Rosas y col., 2015).

En animales con SOPQ, el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos con propranolol no modificó la secreción de testosterona, es decir, permaneció igual que la concentración de un animal inyectado únicamente con VE. Con estos resultados no descartamos que la NA esté participando en la regulación de la secreción de testosterona, ya que se ha evidenciado que en el animal tratado con VE, al quitar el mayor aporte simpático mediante la sección bilateral del NOS disminuye la secreción de testosterona (Morales-Ledesma y col., 2010).

El grupo de Barria (1993) mostró que cuando los ovarios de ratas tratadas con VE son mantenidos *in vitro* se incrementa la concentración de estradiol en condiciones basales, resultados que permiten sugerir que en la rata con SOPQ la NA ejerce un efecto estimulante en la secreción de estradiol. Con estas evidencias esperábamos que al impedir la acción de la NA por el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos mediante la inyección de propranolol en la bursa ovárica se produjera una disminución en la concentración de la hormona, sin embargo, se observó que incrementó a los 30 minutos de la inyección del propranolol en el ovario izquierdo, mientras que en animales sacrificados al siguiente día este efecto sólo se presentó cuando el ovario derecho fue el inyectado. Resultados que nos permiten postular que el aumento de estradiol es dado por la respuesta compensadora del ovario al cual no se le inyectó el bloqueador. Otra posibilidad es que se haya incrementado la actividad de las aromatasas por acción del VIP, el cual no es afectado por el bloqueador adrenérgico (Modelo 2).

La respuesta de los ovarios al bloqueo de los receptores β -adrenérgicos es asimétrica, es probable que esta respuesta este dada por la información neural que ingresa al ovario a través del NOS. En la rata, se ha mostrado que cada ovario recibe diferente número de fibras nerviosas, donde al ovario derecho se proyecta un mayor número de fibras simpáticas (Klein y Burden, 1988).

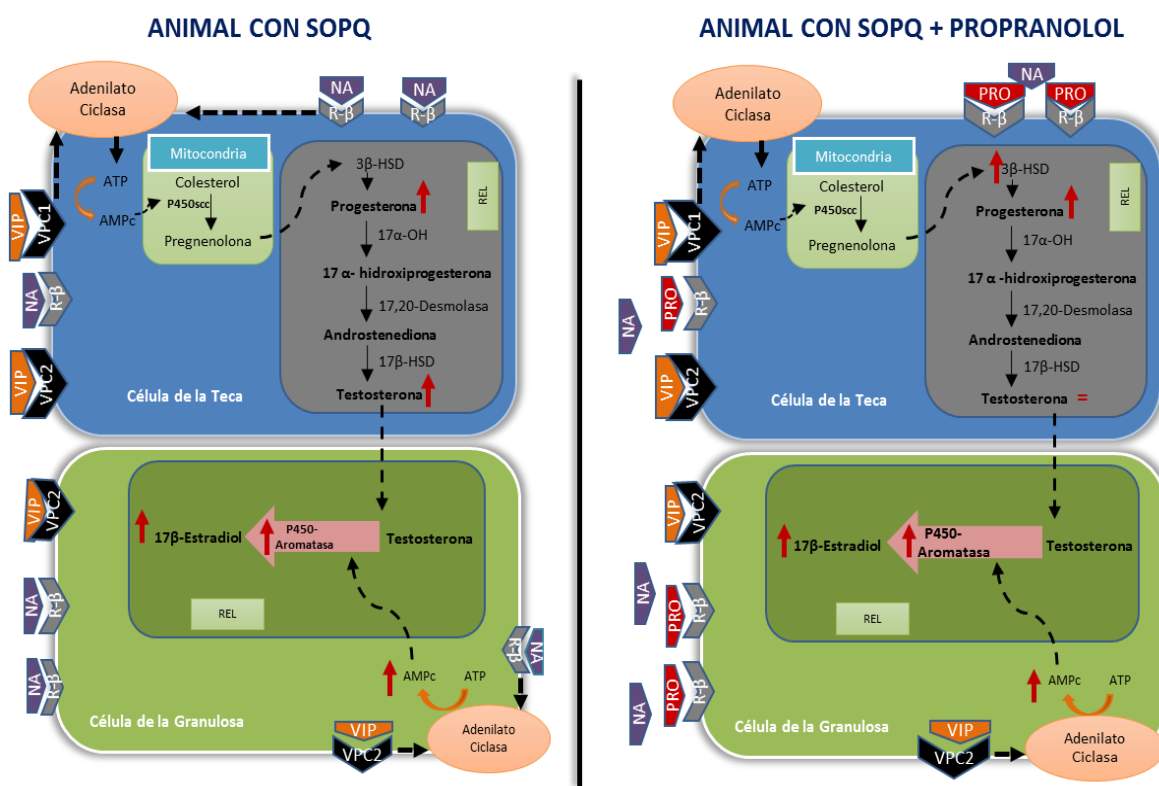
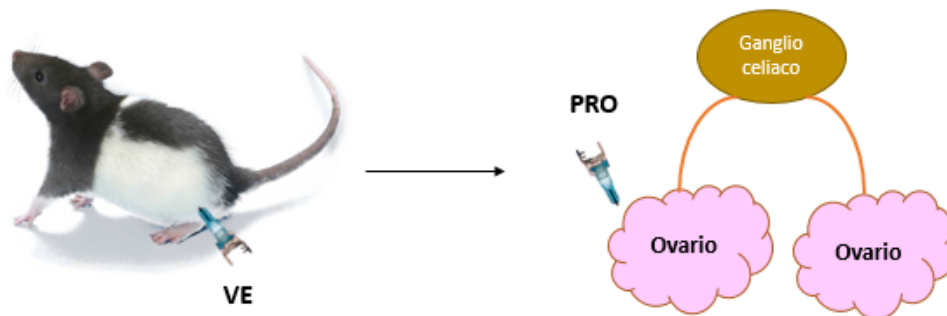
Modelo del Animal Cíclico



Modelo 1. En la rata infantil tratada con Vh se describen los efectos de la inyección de propranolol en la bursa del ovario, a los 68 días de edad en la etapa de estro, sobre la secreción de hormonas esteroides. Vh, Vehículo; PRO, propranolol; NA, noradrenalina; VIP, péptido intestinal vasoactivo; R- β , receptor β -adrenérgico; R- α , receptor α -adrenérgico; ATP, trifosfato de adenosina; AMPc, monofosfato de adenosina cíclico; REL, retículo endoplásmico liso.

En el modelo se muestra que en los animales cíclicos, cuando se bloquean los receptores β -adrenérgicos de las células de la teca, la activación de los receptores α -adrenérgicos por la unión con la NA, resulta en el incremento de progesterona y testosterona. La disminución de la secreción de estradiol por parte de las células de la granulosa se explica como resultado de la disminución en el AMPc en respuesta al propranolol, lo que induce una menor actividad de las aromatasas.

Modelo del Animal con SOPQ



Modelo 2. En la rata infantil tratada con VE se describen los efectos de la inyección de propranolol en la bursa del ovario, a los 68 días de edad en la etapa de estro, sobre la secreción de hormonas esteroides. VE, valerato de estradiol; PRO, propranolol; NA, noradrenalina; VIP, péptido intestinal vasoactivo; R-β, receptor β-adrenérgico; VPAC1, receptor de VIP tipo 1; VPAC2, receptor de VIP tipo 2; ATP, trifosfato de adenosina; AMPc, monofosfato de adenosina cíclico; REL, retículo endoplasmico liso.

En el modelo se muestra que la administración de VE induce incremento en la secreción de NA y de VIP. La unión de estos neurotransmisores con sus receptores en las células de la teca y de la granulosa resulta en un incremento de la secreción de hormonas esteroides. En el animal inyectado con VE cuando se bloquean los receptores β con propranolol, en las células de la teca incrementa la secreción de progesterona, sin modificar la de testosterona, e incrementa la secreción de estradiol por las células de granulosa, estos efectos se explican como resultado de un incremento en las enzimas esteroideogénicas estimuladas por la acción de VIP en el ovario.

CONCLUSIONES

- & En el animal adulto cíclico en el día del estro, la noradrenalina regula de manera inhibitoria la secreción de progesterona y testosterona, y estimula la secreción de estradiol.
- & En el animal con SOPQ en el día del estro, la noradrenalina regula de manera inhibitoria la respuesta ovulatoria.
- & El animal con SOPQ, la noradrenalina regula de manera inhibitoria la secreción de progesterona y de estradiol, mientras que no participa en la regulación de la secreción de testosterona.
- & En el animal cíclico o con SOPQ, la respuesta ovulatoria y esteroidogénica dependen del ovario en estudio y del tiempo en el que permanezcan bloqueados los receptores β -adrenérgicos.

REFERENCIAS

- ♣ Abad-Santos F, Novalbos J, García AG. (2009) **Sistema nervioso simpático: fármacos simpaticolíticos**. Cap. 9. pp. 163-169.
- ♣ Acuña E, Fornes R, Fernandois D, Garrido MP, Greiner M, Lara HE, Paredes AH. (2009) "Increases in norepinephrine release and ovarian cyst formation during ageing in the rat". **Reproductive Biology and Endocrinology**. 64(7): 1-13.
- ♣ Adashi EY, Hsueh AJ. (1981) "Stimulation of β_2 -adrenergic responsiveness by follicle stimulating hormone in rat granulosa cells in vitro and in vivo". **Endocrinology**. 257(11): 6477-6083.
- ♣ Aguado LI, Petrovic SL, Ojeda SR (1982) "Ovarian β -Adrenergic Receptors during the Onset of Puberty: Characterization, Distribution, and Coupling to Steroidogenic Responses". **Endocrinology**. 4(110):1124-1132.
- ♣ Aguado LI, Ojeda SR. (1984) "Effect of Selective Removal of the Adrenal Medulla on Female Sexual Development" **Biology of Reproduction**. 31 (3): 605-618.
- ♣ Aguado LI. (2002) "Role of the Central and Peripheral Nervous System in the Ovarian Function". **Microscopy Research and Technique**. 59(6):462-473.
- ♣ Alberto CB. (2004) "Ciclo Ovárico". En: Comino DR, López GG. (Coord.). **Obstetricia y Ginecología**. Editorial Ariel, S. A. Barcelona, España. pp. 13-16.
- ♣ Arias P. (2003) "Endocrinología de la reproducción". En: Dvorkin MA, Cardinali DP (Eds). **Bases Fisiológicas de la Práctica Médica**. 13ª Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Cap. 38. pp. 659-664.
- ♣ Barco A, Flores A, Chavira R, Damián-Matsumura P, Domínguez R, Cruz M. (2003) "Asymmetric Effects of Acute Hemiovariectomy on Steroid Hormone Secretion by the In Situ Ovary". **Endocrine**. 21 (3): 209-215.
- ♣ Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE. (1993) "Ovarian Steroidal Response to Gonadotropins and β -Adrenergic Stimulation Is Enhanced in Polycystic Ovary Syndrome: Role of Sympathetic Innervation". **Endocrinology**. 133(6): 2696-2703.

- ♣ Botella LJ. (1995) "El ovario en los vertebrados". En: Botella LJ. (Coord.). **El ovario: Fisiología y Patología**. Ediciones Díaz de Santos, S.A. Madrid, España. Cap. 1. pp. 1-22.
- ♣ Botella LJ. (1995) "Síndrome del Ovario Poliquístico". En: Botella LJ. (Coord.). **El ovario: Fisiología y Patología**. Ediciones Díaz de Santos, S.A. Madrid, España Cap.13. pp. 255-267.
- ♣ Brawer JR, Naftolin F, Martin J, Sonnenschein C. (1978) "Effects of a single injection of estradiol valerate on the hypothalamic arcuate nucleus and on reproductive function in the female rat. **Endocrinology**. 103: 501-512.
- ♣ Bronzi D, Vega OA, Delgado SM, Casais M, Rastrilla AM, Sosa ZY. (2011) "Modulation of the noradrenergic activity index by neural stimulus, and its participation in ovarian androstenedione release during the luteal phase" **Fertility and Sterility**. 95(4): 1211-1216.
- ♣ Brunton LL, Chabner BA, Knollman BC. (2012) **Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica**. 12^{va} Edición, Editorial McGraw-Hill Interamericana, China. Cap. 2. pp 320-325.
- ♣ Bouchet A, Willeret J. (1978). "Anatomía descriptiva, topográfica y funcional". **Sistema Nervioso Central**. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 123-126.
- ♣ Burden HW. (1978) "Ovarian Innervation". En: Jones R.E. (ed). **The Vertebrate Ovary Comparative Biology**. Plenum Press. New York. pp. 615-628.
- ♣ Cardinali DP. (2003) "Sistema Nervioso Autónomo": En: Dvorkin MA, Cardinali DP (Eds.). **Bases Fisiológicas de la Práctica Médica**. 13^a Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Cap. 50. pp. 1017-1022.
- ♣ Carlson BM. (2009) **Embriología Humana y Biología del Desarrollo**. 4^{ta} Edición. Editorial Elsevier, Ámsterdam. Barcelona, España. Cap. 1. pp. 3-13.

- ♣ Casabiell X. (2006) "Eje Hipotálamo-Hipófiso-Ovárico". En: Arce VM, Catalina PF, Mallo F. (Coord.). **Endocrinología**. Ediciones Universidad de Santiago Compostela. Cap. 12. pp. 95-100.
- ♣ Chedrese J. (2003) "Regulación autocrina y paracrina del desarrollo folicular I: efecto de los esteroides". **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**. 16:171-182.
- ♣ Conti F. (2010) "Sistema nervioso vegetativo: organización, función y mecanismos de control". En: **Fisiología médica**. México. Cap. 35. pp. 671-711.
- ♣ D'Albora H, Lombide P, Ojeda SR. (2000) "Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study". **Cell Tissue Res**. 300(1):47-56.
- ♣ D'albora H, Anesetti G, Lombide P, Less DW, Ojeda SR. (2002) "Intrinsic Neurons in the Mammalian Ovary". **Microscopy Research and Technique**. 59:484-489.
- ♣ De Bortoli MA, Garraza MH, Aguado LI. (2002) "Involvement of Beta-adrenoceptors in a Central Regulation of the Ovarian Progesterone Release in Rats". **Neuroendocrinology Letters**. 23(1):27-31.
- ♣ Delgado M, Casais M, Sosa Z, Rastrilla A. (2006) "Ganglionic Adrenergic Action Modulates Ovarian Steroids and Nitric Oxide in Prepubertal Rat". **Endocrine Journal**. 53(4): 547-554.
- ♣ Dissen GA, Ojeda S (1999). "Ovarian Innervation". En: **Enciclopedia of Reproduction**. 3:583-589.
- ♣ Dissen GA, Lara HE, Leyton V, Paredes A, Hill DF, Costa ME, Martinez-Serrano A, Ojeda SR. (2000) "Intraovarian excess of nerve growth factor increases androgen secretion and disrupts estrus cyclicity in the rat". **Endocrinology**. 141(3): 1073-1082.
- ♣ Dissen GA, Romero C, Paredes A, Ojeda SR. (2002) "Neurotrophic Control of Ovarian Development". **Microscopy Research and Technique**. 59(6):509-515.
- ♣ Dicken C, Menke M, Neal-Perry G. (2010) "The Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis". En: Santoro NF, Neal-Perry G (Eds.). **Amenorrhea: A case-Based, Clinical**

- Guide, Contemporary Endocrinology.** Editorial Springer Science. USA. Cap. 1. pp. 1-19.
- ♣ Dolz M. (2010) “Síndrome de Ovarios Poliquísticos 1. Fisiopatología y Diagnóstico”. En: Bonilla-Musoles F, Dolz M, Moreno D, Raga F (Eds.). **Reproducción Asistida. Abordaje en la práctica clínica.** Editorial Médica Panamericana. España. Cap. 11. pp. 109-102.
 - ♣ Domínguez R, Cruz ME, Chávez R. (1988) “Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation”. In **Growth Factors and the Ovary.** 39(2): 321-325.
 - ♣ Domínguez R, Chávez R, Cruz ME. (1991) “La regulación del crecimiento y del Desarrollo del Folículo Ovárico”. En: Domínguez R (Ed.) **Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción.** Miguel Ángel Porrúa. México. pp. 163-191.
 - ♣ Domínguez R, Cruz-Morales SE. (2011) “The Ovarian Innervation Participates in the Regulation of ovarian Functions”. **Endocrinology Metabolic Syndrome.** doi:10.4172/2161-1017.S4-001.
 - ♣ Dyer CA, Erickson GF. (1985) “Norepinephrine Amplifies Human Chorionic Gonadotropin Stimulated Androgen Biosynthesis by Ovarian Theca-Interstitial Cells”. **Endocrinology.** 116(4): 1645-1652.
 - ♣ Entterweit W, Mechanick JL. (1988) “Polycystic ovarian disease: etiology, diagnosis, and treatment”. **Comp Therapeut.** 14(11):12–20.
 - ♣ Espinos GJ, Calaf A. (2007) “Diagnostico”. En: Checa VM, Espinós GJ, Matorras WR (Eds.). **Síndrome del Ovario Poliquístico.** Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. Cap.6. pp.83-95.
 - ♣ Erickson GF, Danforth RD. (1995) “Ovarian control of follicle development” **Obstetrics and Gynaecology.** 172(2): 736-747.
 - ♣ Febres BF, Terán DJ, Fébres AC. (2009) “Ovogénesis, foliculogénesis, síntesis de esteroides ováricos y reserva folicular”. En: Urbina TM, Biber L (Eds.) **Fertilidad y Reproducción Asistida.** Editorial Médica Panamericana. Venezuela. Cap. 5. pp. 83-91.

- ♣ Fernández M, Mangel TL. (1983). "Esteroidogénesis". **Acta Médica Costarricense**. 26: 144-149.
- ♣ Fernandois D, Lara HE, Paredes H. (2012) "Blocking of β -adrenergic receptors during the subfertile period inhibits spontaneous ovarian cyst formation in rats". **Hormone and Metabolic Research**. 44(9):682-687.
- ♣ Ferruz AJ, Barria X, Galleguillos, Lara HE. (1991) "Release of Norapinephrine from the Rat Ovary: Local Modulation by Gonadotropins". **Biology of Reproduction**. 45:592-597.
- ♣ Flores-Pérez F, Rosas-Velasco C, Romano M, Pérez-Martínez M. (2005). Apoptosis and follicular atresia: An essential binomial for ovarian development. **Today's Veterinary Practice**. 36 (1): 87-103.
- ♣ Flores A, Rodríguez J, Palafox M, Meléndez G, Barco A, Chavira R, Cruz M, Domínguez R. (2006) " The acute asymmetric effects of hemiovariectomy on testosterone secretion vary along the estrous cycle. The participation of the cholinergic system". **Reproductive Biology and Endocrinology**. 4(11): 1-11.
- ♣ Franks S. (1995) "Polycystic ovary syndrome". **Medical Progress Through Technology**. 333: 853-861.
- ♣ Franks S. (2009) "Do animal models of polycystic ovary syndrome help to understand its pathogenesis and management? Yes, but their limitations should be recognized". **Endocrinology**. 150 (9): 3983-3985.
- ♣ Gajewski Z, Faundez R, Thun R, Pawlinski B. (2006) "Adrenergic Stimulation and blocking of hormonal secretion activity of cultured cow granulosa cells". **Journal of Physiology and Pharmacology**. 57(8): 125-137.
- ♣ Gal IB, López GM, Martín V, Prieto MJ. (2007) **Bases de la Fisiología**. 2^{da} Edición. Editorial Tebar, S.L. Madrid, España. Cap.11. pp.488-490.
- ♣ Garraza MH, Aguado LI, De Bortoli MA. (2004) "In vitro effect of neuropeptides on ovary or celiac ganglion affects the release of progesterone from ovaries in the rat". **Medical Science Monitor**. 10(12): 440-446.

- ♣ Greenwald GS, Roy SK. (1994) "Follicular Development and its control". En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) **The physiology of Reproduction**. 2ns edition. Editorial Raven Press. New York. Vol.2. Cap.12. pp. 629-724.

- ♣ Greiner M, Paredes A, Araya V, Lara H. (2005) "Role of Stress and Sympathetic Innervation in the Development of Polycystic Ovary Syndrome". **Endocrine**. 28 (3): 319-324.

- ♣ Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, Azziz R. (2011) "Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis". **Nature Reviews. Endocrinology**. 7: 219-231.

- ♣ González AA, Cabrera WA, Velasco VM. (2008) "Antiadrenérgicos". En: Mendoza PN (Ed). **Farmacología médica**. Editorial Médica Panamericana. México. Cap. 2. pp.256-262.

- ♣ González-Merlo J, González BE. (2003) "Regulación neuroendocrina de la función ovárica". En: González-Merlo J, Lailla VJ, Fabres GE, González BE. **Ginecología**. 8ª Edición. Editorial Masson, S.A. Barcelona, España. Cap.3. pp. 55-61.

- ♣ Gonzáles-Merlo J, González BE (2006)"Regulación neuroendocrina de la función ovárica". En: González-Merlo J, Lailla VJ, Fabre GE, Gonzáles BE (Eds.). **Obstetricia**. 5ª Edición. Editorial Masson, S.A. Barcelona, España.

- ♣ Gonzalo C, Barra R, Gonzalez D, Sotomayor-Zarate R, Lara H (2012) "Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats". **Fertility and Sterility**. 98 (5): 1283-1290.

- ♣ Gómez-Chang E, Larrea F, Martínez-Montes F. (2012). "Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis". **Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**. 15(1):24-36.

- ♣ Gore-Langton RE, Armstrong DT. (1994) "Follicular Steroidogenesis and Its Control". En: Knobil E, Neill JD. **The Physiology of Reproduction**. 2ª Edición. Editorial Raven Press. New York. Cap. 11. pp. 471-610.

- ♣ Hillier SG, Miró F. (1993) "Inhibin, Activin, and Follistatin: Potential Roles in Ovarian Physiology". **Annals of the New York Academy of Sciences**. 687:29-38.
- ♣ Irusta G. (2008) "Mecanismos involucrados en la atresia del folículo ovárico: relación entre esteroidogénesis, angiogénesis y apoptosis". Tesis Doctoral. Buenos Aires. Facultad de ciencias exactas y naturales.
- ♣ Itoh MT, Ishizuka B. (2005) "Alpha 1-Adrenergic receptor in rat ovary: presence and localization". **Molecular and Cellular Endocrinology**. 240(1-2): 58-63.
- ♣ Jácome RA. (2005) **Fisiología endocrina**. 3ª Edición. Editorial Kimpres Ltda. Bogotá, Colombia. Cap. 6. pp. 79-90.
- ♣ Kazlauskas S, Lucas V, Herrero S. (2009) "Anovulación: Síndrome ovarios poliquísticos" En: Bajo AJ, Lailla VJ, Xercavins MJ (Eds). **Fundamentos de Ginecología**. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. Cap. 6. pp. 71-78.
- ♣ Keiner M. (2010) "Mecanismos y mediadores químicos involucrados en la ovulación en animales domésticos". **Revista FAVE**. 9(1):39-48.
- ♣ Klein CM, Burden HW. (1988). "Anatomical localization of efferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary". **Neuroscience Letters**. 85:217-222.
- ♣ Kliachko S, Zor U. (1981) "Increase in catecholamine-stimulated cyclic AMP and progesterone synthesis in rat granulosa cell during culture". **Molecular and Cellular Endocrinology**. 23(1):23-32.
- ♣ Kruk ZL, Pycock CJ. (1991) **Neurotransmitters and Drugs**. 3ª Edición. Editorial Chapman and Hall. London. Cap. 3. pp. 51-86.
- ♣ Lara HE, McDonald JK, Ojeda SR. (1990) "Involvement of nerve growth factor in female sexual development". **Endocrinology**. 126(1):364-375.
- ♣ Lara HE, Ferruz JL, Lusa S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR. (1993) "Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome". **Endocrinology**. 6(133): 2690-2695.

- ♣ Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, Ojeda SR. (2000) "An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat". **Endocrinology**. 141(3):1059–1072.

- ♣ Lara HE, Dorfman M, Venegas M, Luza SM, Luna SL, Mayerhofer A, Guimaraes MA, Rosa ESAA, Ramirez VD. (2002) "Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary síndrome: Studies on norepinephrine release". **Microscopy Research and Technique**. 59(6):495-502.

- ♣ Lawrence IE, Burden HW. (1980) "The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary". **The Anatomical Record**. 196(1): 51-59.

- ♣ Li M, Zhou T, Gao Y, Zhang N, Li J. (2007) "Ultrastructure and estrogen regulation of the lymphatic stomata of ovarian bursa in mice". **The Anatomical Record**. 290(10): 1195-1202.

- ♣ López-Calderón BA. (2005) "Glándula suprarrenal". En: Tresguerres JA, Ariznavarreta C, Cachofeiro V, Cardinali D, Escrich E, Loyzaga PG, Juliá LV, Teruel MF, Paro MR, Menéndez JT (Eds.). **Fisiología humana**. 3^{ra} Edición. Editorial McGraw-Hill. Cap.73. pp. 913-918.

- ♣ López AG, Villarroya M, García AG. (2008) "Neurotransmisión adrenérgica. Sistema nervioso simpático: fármacos simpaticomiméticos". En: Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza JC, Moro MA, Portolés A. (Coord.). **Velázquez Farmacología Básica y Clínica**. 18^a Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Madrid. Cap. 8. pp. 145-157.

- ♣ López-Muñoz F, Álamo GC. (2010) "Agonistas y antagonistas adrenérgicos". En: Salazar M, Peralta C, Pastor FJ (Eds). **Tratado de Psicofarmacología: Bases y aplicación clínica**. 2^a Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. Cap. 19. pp. 281-287.

- ♣ Luna SL, Neuman S, Aguilera J, Brown DI, Lara HE. (2012) "In vivo β -Adrenergic blockade by propranolol prevents isoproterenol-induced Polycystic Ovary in Adult Rats". **Hormone and Metabolic Research**. 44(9):676-681.

- ♣ Manneras L, Cajander S, Holmang A, Sleskovic 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(8): 3781-3791.
- ♣ Martin CG, Sack M, Talbot P. (1981) "Structure of bursae ovaricae surrounding the ovaries of Golden hamster". **The Anatomical Record**. 201(3): 485-498.
- ♣ Mayerhofer A, Smith G, Danilchik M, Levine JE, Wolf DP, Dissen GA, Ojeda SR. (1998). "Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary: Evidence for a cell-cell regulatory loop". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 95(18): 10990-10995.
- ♣ Merino P, Schulin-Zeuthen C, Codner E. (2009) "Diagnóstico del Síndrome de Ovario Poliquístico: nuevos fenotipos, nuevas incógnitas". **Revista Médica de Chile**. 137: 1071-1080.
- ♣ Miller WL, Styne DM. (2001) "Pubertad femenina y sus trastornos". En: Yen, Jaffe, Barbieri. (Eds.) **Endocrinología de la Reproducción: Fisiología, Fisiopatología y Manejo Clínico**. 4ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Cap. 15. pp. 412-415.
- ♣ Moore KL, Persaud TV, Torchia MG. (2013) **Embriología clínica**. 9ª Edición. Editorial Elsevier España. Barcelona, España. Cap. 2. pp. 23-25.
- ♣ Morales-Ledesma L, Linares R, Rosas G, Morán C, Chavira R, Cardenas M, Domínguez R. (2010) "Unilateral sectioning of the superior ovarian syndrome restores ovulation in the innervated ovary". **Reproductive Biology and Endocrinology**. 8(9):1-7.
- ♣ Norman AW, Litwack G. (1997) **Hormones**. 2ª Edición. Academic Press. San Diego, California. Cap. 2. pp. 57-67.
- ♣ Ojeda SR, Smith WS, Aguado LL, Advis JP, Andersen JM. (1983). "Abdominal vagotomy delays onset of puberty and inhibits ovarian function in the female rat". **Neuroendocrinology**. 36(4): 261-267.
- ♣ Ojeda SR, Urbanski HF. (1994) **Puberty in the rat**. In: Knobil E, Neill JD, (Eds.) The physiology of reproduction. New York: Raven Press, vol 2: 362-409.

- ♣ Page CP, Curtis MJ, Sutter MC, Walker MJ, Hoffman BB. (1998) **Farmacología Integrada**. Editorial Elsevier España. Cap. 3. pp. 44-47.
- ♣ Parra C, Fiedler J, Luna S, Greiner M, Padmanabhan V, Lara H. (2007) "Participation of Vasoactive Intestinal Polipeptide in Ovarian Steroids Production During the rat Estrous Cycle and in the Development of Estradiol Valerate-induced Polycystic ovary". **Reproduction**. 133(1): 147-154.
- ♣ Piccinato C, Montrezor L, Collares C, Vireque A, Rosa-E-Silva A. (2012) "Norepinephrine stimulates progesterone production in highly estrogenic bovine granulosa cells cultured under serum-free, chemically defined conditions". **Reproductive Biology and Endocrinology**. 10(1):2-10.
- ♣ Ramírez SM. (2014) Tesis de Licenciatura: "Efecto del bloqueo de los receptores del Péptido Intestinal Vasoactivo en el ovario de la rata con Síndrome del Ovario Poliquístico, sobre la regulación de la secreción de progesterona y estradiol". **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM**. México, DF.
- ♣ Ramírez RM. (2013) "Síndrome de ovario poliquístico. Grados de recomendación de la terapéutica". **Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Guayaquil**. 16(1): 22-31.
- ♣ Repetto JM, Repetto KG. (2009) **Toxicología Fundamental**. 4ª Edición. Ediciones Díaz de Santos. Cap. 10. pp. 387-391.
- ♣ Rodríguez SA. (2005) **Guía de laboratorio de histología**. 1ª Edición. Editorial Universidad de Costa Rica. Costa Rica. pp. 111-113.
- ♣ Rodríguez-Flores M. (2011) "Síndrome de ovario poliquístico, el enfoque del internista". **Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social**. 49 (6):611-620.
- ♣ Rosa-E-Silva A, Guimaraes MA, Padmanabhan V, Lara HE. (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(0): 4289-4297.

- ♣ Rosales TA. (1998) "Atresia Folicular". En: Velázquez MJ (Coord.) **Biología de la Reproducción**. 1ª Edición. México. pp. 222-249.
- ♣ Rosales JC, Prado MI, Camejo. (2006) Infertilidad: Fisiología diagnóstico y tratamiento. FERTILILAB. **Unidad de Reproducción Humana**. Caracas. pp. 37-54.
- ♣ Rosas GG. (2011). Tesis de maestría: "Participación del Péptido Intestinal Vasoactivo en la Regulación de la Ovulación y la Secreción Hormonal. La Rata con Síndrome del Ovario Poliquístico como Modelos de Estudio". **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM**. México, DF.
- ♣ Rosas G, Ramírez MI, Linares R, Trujillo A, Domínguez R, Morales-Ledesma L. (2015) "Asymmetric steroidogenic response by the ovaries to the vasoactive intestinal peptide". **Endocrine**. 48(3): 968-977.
- ♣ Rosales TA, Guzmán SA. (2008) "Apoptosis en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo". **Revisión Técnica Pecuaria en México**. 46(2):159-182.
- ♣ Ross HM, Pawlina W. (2008) **Histología: Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular**. 5ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina. pp. 828-836.
- ♣ Sánchez-Criado JE. (1999) "Fisiología del Ovario". En: Tresguerres JA. (Eds.) **Fisiología Humana**. 2ª Edición. Editorial McGraw-Hill-Interamericana. Madrid, España. Cap. 75. pp. 1040-1055.
- ♣ Sadler TW. (2004). **Langman Embriología Médica: con orientación clínica**. 9ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Cap.1 pp.1-30.
- ♣ Sadler TW. (2007) **Langman Embriología Médica: con orientación clínica**. 10ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Cap. 2. pp. 24-27.
- ♣ Selvaraj N, Dantes A, Amsterdam A. (2000) "Establishment and characterization of steroidogenic granulosa cells expressing b2-adrenergic receptor: regulation of adrenodoxin and steroidogenic acute regulatory protein by adrenergic agents". **Molecular and Cellular Endocrinology**. 168 (1-2): 53-63.

- ♣ Sir PT, Preisler RJ, Magendzo NA. (2013) “Síndrome de ovario poliquístico. Diagnóstico y manejo”. **Revista Médica Clínica las Condes**. 24(5) 818-826.
- ♣ Schulster A, Farookhi R, Brawer JR. (1984) “Polycystic ovarian condition in estradiol valerate-treated rats: Spontaneous changes in characteristic endocrine features”. **Reproductive Biology**. 31(3):587-593.
- ♣ Sheela RC, Nordenstrom K, Norjavaara E, Ahren K. (1983) “Development of catecholamine responsiveness in granulosa cells from preovulatory rat follicles-dependence on preovulatory luteinizing hormone surge”. **Reproductive Biology**. 28(5):1021-1031.
- ♣ Shi D, Vine DF. (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(1): 185-193.
- ♣ Stener-Victorin E, Lundebird T, Waldenström, Manni L, Gunnarsson S, Janson PO. (2000) “Effects of electro-acupuncture on nerve growth factor and ovarian morphology in rats with experimentally induced polycystic ovaries”. **Biology of Reproduction**. 63(5): 1497-1503.
- ♣ Terán DJ, Teppa GA, Febres BF. (2008) “Regulación psicoimmunoneuroendocrinología y vascular del ciclo menstrual”. En: Urbina, Biber L (Eds.) **Fertilidad y reproducción asistida**. Editorial Médica Panamericana. Caracas, Venezuela. Cap. 4. pp.69-79.
- ♣ Tresguerres JA, Castillo C. (2005) “Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico”. En: Tresguerres JA, Ariznavarreta C, Cachofeiro V, Cardinali D, Escrich E, Loyzaga PG, Juliá LV, Teruel MF, Paro MR, Menéndez JT (Eds.). **Fisiología humana**. 3^{ra} Edición. Editorial McGraw-Hill. Cap.79. pp. 1007-1024.
- ♣ Tresguerres HF. (2010) “Fisiología del ovario”. En: Tresguerres HF (Eds.). **Fisiología Humana**. 4^a Edición. Editorial McGraw-Hill. Madrid, España. Cap. 75. pp. 1020-1030.
- ♣ Yeh J, Adashi Y. (2001) “Ciclo Ovárico”. En: Yen SS, Jaffe RB, Barbieri RL. (Eds.) **Endocrinología de la reproducción: Fisiología, fisiopatología y manejo clínico**. 4^{ta} Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Cap. 6. pp. 164-173.

- ♣ Yen SS. (2001) "Ciclo Menstrual Humano: Regulación Neuroendocrina". En Yen SS, Jaffe RB, Barbieri RL. (Eds.) **Endocrinología de la reproducción: Fisiología, fisiopatología y manejo clínico**. 4^{ta} Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Cap. 7. pp. 203-212.
- ♣ Yen SS. (2001) "Síndrome del ovario poliquístico (Anovulación crónica hiperandrogénica)". En: Yen SS, Jaffe RB, Barbieri RL. (Eds.) **Endocrinología de la reproducción: Fisiología, fisiopatología y manejo clínico**. 4^{ta} Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Cap. 17. pp. 465-490.
- ♣ Vargas-Carrillo MA, Sánchez-Buenfil G, Herrea-Polanco J. (2003) "Síndrome de ovarios poliquísticos: abordaje diagnóstico y terapéutico". **Revista Biomed**. 14:191-203.
- ♣ Vanderhyden BC, Rouleau A, Armstrong DT. (1986) "Effect of removal of the ovarian bursa of the rat on infundibular retrieval and subsequent development of ovulated oocytes". **Journal of Reproduction and Fertility**. 77(2):393-9.
- ♣ VanderSpuy ZM, Dyer S. (2004) "The pathogenesis of infertility and early pregnancy loss in polycystic ovary syndrome". **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology**. 18(5): 755-771.
- ♣ Vivas CA, Castaño-Trujillo P, García-Trujillo G, Ospina-Gutiérrez ML. (2011) "Síndrome de ovario poliquístico. Fisiopatología en mujeres obesas y no obesas". **Rev CES Medicine**. 25(2):169-180.
- ♣ Wasilewska-Dzilewska E, Borowiec M, Chmielow M, Wolinska-Witort E, Baranowska B. (2002) "Alfa 1 Adrenergic Potentiation of Progesterone Accumulation Stimulated by Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) and Pituitary Adenylate Cyclase- Activating Polypeptide (PACAP) in Cultured Rat Granulosa Cells". **Neuroendocrinology**. 23(2): 141-148.
- ♣ Weiss GK, Dail G, Ratner A. (1982) "Evidence for direct neural control of ovarian steroidogenesis in rats". **Journals of Reproduction and Fertily**. 65(2):507-511.
- ♣ Upledger JE, Vredevoogd JD. (2004) "Terapia craneosacra I". Ed. Paidotribo. Barcelona. pp. 130-132.

- ♣ Zhang H, Zhang Y, Zhao H, Zhang Y, Chen Q, Peng H, Lei L, Qiao J, Shi J, Cao Z, Duan E, Jin Y. (2013) "Hormonal Regulation of Ovarian Bursa Fluid in Mice and Involvement of Aquaporins". **Ploss One.** 8(5): 23-27.
- ♣ Zulian E, Sartorato P, Benedini S, Baro G, Armani D, Mantero F. (2005) "Spironolactone in the treatment of polycystic ovary syndrome: effects on clinical features, insulin sensitivity and lipid profile". **Journal of Endocrinological Investigation.** 28(1): 49-53.