



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA BIOLOGÍA

En la rata, el establecimiento del síndrome de
ovario poliquístico depende de la activación de las
fibras simpáticas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Wendy Alvarado Vargas

Directora de tesis:

Dra. Leticia Morales Ledesma

México, CDMX

Marzo, 2017





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 BIOLOGÍA

En la rata, el establecimiento del síndrome de
ovario poliquístico depende de la activación de las
fibras simpáticas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Wendy Alvarado Vargas

Directora de tesis:

Dra. Leticia Morales Ledesma

**La realización de esta tesis contó con el apoyo financiero de
UNAM-DGAPA-PAPIIT clave IN217016**



México, CDMX

Marzo, 2017

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)** por darme las bases necesarias para ser un profesionalista y una mejor persona.

A la **Dra. Leticia Morales Ledesma** por su apoyo, por transmitirme su conocimiento, por brindarme su amistad y por siempre estar a mi lado.

A mis sinodales:

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dra. María Elena Ayala Escobar

M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez

Dra. Deyra de los Angeles Ramírez Hernández

Por contribuir al enriquecimiento de esta tesis, por su tiempo y dedicación.

A la **Dra. Ely**, a la **Dra. Adriana** y al **Dr. Román** por su trabajo que realizan todos los días en el bioterio.

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

A la **Dra. Dey**, a la **Dra. Rosa**, a la **Dra. Ely** y a la **Dra. Gaby** por brindarme su amistad y su conocimiento a través de todo este tiempo juntas.

A mis amigos:

Misa, Paula, Fanny, Kike, Rodrigo, Adriana, César, Jaque, Mateo, Johen, Raquel, Mandy, Humberto, Enrique, Ari, Fernando, Marin, Ricardo, Orlando, Alfredo, Alexa, Gabriela Favila, Jovanna por esos grandes momentos que vivimos juntos a lo largo de la carrera, por todo lo que me enseñaron, por compartir alegrías y sobre todo gracias por su amistad.

A mis amigos y compañeros de Laboratorio 7:

Ivan, Misa, Azu, Liz, César, Daniel, Chío, David, Valeria, Diana, Diana T, por todas las cosas que pasamos juntos, por apoyarme siempre, por las sonrisas diarias y por hacer de laboratorio un lugar agradable.

A mi mejor amigo Misa:

Gracias por todo, por tantos años juntos, por ser tan divertido, por tus pláticas del diario, por tus enseñanzas y por tus preocupaciones. **Te quiero mucho nuez!**

A Azucena:

Amiga quiero agradecerte todo lo que me has ayudado en este camino tan largo, por tu amistad y cariño. **Te quiero Juli!**

A Aída Zapata:

Gracias por su amistad, por todo el apoyo y conocimiento que me brindo, es alguien que estimo y quiero mucho.

DEDICATORIAS

A mis hermanas:

Gracias por todo lo que me han enseñado, por todos esos consejos que me brindan, por guiarme cuando no encuentro salida, por ayudarme a lo largo de mi vida, gracias por siempre estar y hacerme feliz. **LAS AMO JENNIFER E IVONNE.**

A mis cuñados:

Por ser parte de mi familia, por comprenderme y cuidarme. **LOS QUIERO REYNIER Y RAÚL.**

A MI VIDA ENTERA:

Gracias por todo, mi amor quiero agradecerte por tu existencia, eres mi motor del día con día, mi angelito que llego en el mejor momento, gracias a ti soy inmensamente feliz. Agradezco a dios el darme la oportunidad de ser tu madre. **TE AMO MI PEQUEÑO MAXIMILIANO.**

A Ivan:

Gracias por todo el tiempo que hemos caminando juntos, gracias por tus consejos, por tus sonrisas, por esos momentos que han marcado mi persona y sobre todo por ser tal y como eres, eres una persona muy impórtate para mí. **TE AMO!**

A MIS PADRES:

No hay palabras que puedan expresar lo agradecida que estoy con ustedes y el inmenso amor que les tengo. **LOS AMO INFINITAMENTE.**

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	5
Ovario.....	5
Ciclo estral.....	6
Foliculogénesis.....	9
Desarrollo folicular en ratas.....	10
Ovulación.....	12
Atresia folicular.....	15
Cambios hormonales durante el desarrollo de la rata hembra.....	17
Biosíntesis de hormonas esteroides.....	20
Inervación simpática.....	29
Síndrome de ovario poliquístico.....	32
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
HIPÓTESIS	39
OBJETIVO GENERAL	39
OBJETIVOS PARTICULARES	39
MATERIALES Y MÉTODO	40
PRODECIMIENTO DE LA AUTOPSIA	43
RESULTADOS	45
Inducción del síndrome de ovario poliquístico.....	45
Denervación farmacológica con guanetidina.....	51

Efecto de la denervación simpática con GTD en la rata tratada con VE.....	57
Morfología ovárica.....	64
Discusión.....	66
Modelo.....	73
Conclusiones.....	74
Referencias.....	75



RESUMEN

El síndrome de ovario poliquístico (SOPQ) es un trastorno endocrino-metabólico que se caracteriza por hiperandrogenismo acompañado de anovulación o formación de quistes foliculares. Uno de los modelos experimentales para inducir el síndrome en la rata, es mediante la administración de una dosis de valerato de estradiol (VE), que resulta en el incremento del contenido y concentración de noradrenalina (NA) ovárica, y por la reducción en el número de receptores β -adrenérgicos.

Para analizar si el establecimiento del SOPQ es la consecuencia del incremento de la NA ovárica, en el presente estudio se utilizó el modelo del animal con VE al cual se le eliminó la información catecolaminérgica mediante la administración de guanetidina (simpatectomía química) y se analizó la respuesta ovárica. Para ello, se utilizaron ratas hembra de la cepa CII-ZV inyectadas vía intramuscular a los 14 días de edad con VE (2 mg/0.1 ml de aceite de sésamo) o con el vehículo (Vh). Un lote de estos animales cuando llegaron a los 29 días de edad fueron inyectados durante tres semanas vía intraperitoneal con 50 mg/kg de p.c de guanetidina (GTD) o con solución salina (SS). Los animales fueron sacrificados cuando cumplieron los 80 días de edad al presentar un estro vaginal y se evaluó la edad de apertura vaginal, el patrón del ciclo estral, la tasa de animales ovulantes, el número de ovocitos liberados, la concentración de hormonas esteroideas en suero y la morfología ovárica.



La administración del VE provocó adelanto en la apertura vaginal, aciclicidad estral, bloqueo de la ovulación e incremento en la secreción de testosterona.

La inyección con GTD resultó en la disminución de la tasa de animales ovulantes, sin cambios en la cuota ovulatoria y en la concentración de testosterona y estradiol.

En animales con SOPQ, la inyección de GTD resultó en una ovulación normal al igual que la concentración de testosterona y estradiol. En los cortes histológicos ya no se observan los quistes foliculares pero se pueden apreciar folículos en diferentes estadios de desarrollo.

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permiten concluir que en el animal con SOPQ, la NA regula de manera inhibitoria la respuesta ovulatoria, mientras que modula de manera estimulante la secreción de testosterona y estradiol.



INTRODUCCIÓN

El ovario es un órgano que cumple con dos funciones: la ovulación y la síntesis de hormonas esteroides y peptídicas. Ambas funciones son reguladas por la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH), y junto con las secreciones propias del ovario producen un óvulo maduro capaz de ser fertilizado (Chedrese, 2003).

El ovario de la rata está inervado por nervios simpáticos, sensoriales y parasimpáticos. Las fibras simpáticas del ovario se originan del segmento de la médula espinal T11 a la L4 y hacen sinapsis en el ganglio celiaco mesentérico superior (GCMS) (Dissen y Ojeda, 1999).

El desarrollo de patologías ováricas como el síndrome de ovario poliquístico (SOPQ) se ha visto asociado con alteraciones en cualquiera de las señales de regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Esta patología es un trastorno endocrino-metabólico que afecta al 6 % de las mujeres en edad reproductiva y es la principal causa de infertilidad de origen ovárico (Azziz, 2006).

El SOPQ se manifiesta clínicamente por hiperandrogenismo con anovulación crónica y un aumento en la relación LH: FSH (Yen, 2001).

En el ovario de la rata con SOPQ, inducido por valerato de estradiol (VE), incrementa el factor de crecimiento neural (NGF) y su receptor de baja afinidad, el p75. La unión del NGF con su receptor estimula, en el GCMS, el incremento en la expresión de genes que codifican para la tiroxina hidroxilasa (TH); enzima limitante en la biosíntesis de las catecolaminas. Cuando la TH aumenta también incrementa la NA que viaja por las fibras simpáticas que llegan al ovario (Lara y col., 2000).



Estas evidencias llevaron a los autores a proponer que el SOPQ es el resultado del aumento de la actividad del sistema simpático que llega al ovario. En apoyo a esta hipótesis se mostró que la eliminación del principal aporte simpático, por la sección bilateral del nervio ovárico superior (NOS), resulta en el restablecimiento de la ovulación y del patrón del ciclo estral (Barria y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003; Morales-Ledesma y col., 2010).

Sin embargo, cuando se realiza la denervación quirúrgica del NOS, se eliminan todos los neurotransmisores que llegan al ovario por esta vía los cuales son Noradrenalina (NA), Péptido intestinal vasoactivo (VIP) y Neuropeptido Y (NPY). Una herramienta farmacológica que permite eliminar sólo el componente NAérgico es la guanetidina (GTD), la cual es un agente neurotóxico que se acumula activamente en las neuronas simpáticas mediante la bomba de recaptura de las catecolaminas. Cuando se administra de manera crónica destruye las neuronas simpáticas por una respuesta autoinmune (Lara y col., 1990).

El propósito del presente estudio fue analizar si el SOPQ se produce en respuesta a la hiperactividad del sistema noradrenérgico. Para ello se eliminaron las fibras mediante la administración crónica de GTD.



MARCO TEÓRICO

OVARIO

La gónada femenina se encarga de producir óvulos maduros aptos para ser fecundados y de sintetizar hormonas esteroides (Sánchez-Criado, 1999). Ambas funciones son reguladas por la FSH y la LH (Chedrese, 2003).

Anatómicamente el ovario presenta tres regiones: la médula, la corteza y el hilio (Tresguerres, 2010), y desde el punto de vista funcional se puede dividir en tres compartimentos: el tejido intersticial, los folículos y los cuerpos lúteos (Sánchez-Criado, 1999).

La médula es la región central del ovario que se compone de fibras elásticas, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y fibras nerviosas. La corteza está compuesta por una red de tejido conectivo (estroma), que contiene células estromáticas similares a fibroblastos y folículos ováricos en diferentes estadios de desarrollo. El hilio contienen nervios, vasos sanguíneos, linfocitos, tejido conectivo de sostén y algunas células esteroidogénicas denominadas células hiliares (Sánchez-Criado, 1999; Gal, 2007).

El folículo ovárico es la unidad funcional del ovario que sintetiza hormonas y produce óvulos. El folículo está constituido por un ovocito rodeado por células de la granulosa, delimitadas por la membrana basal. Por fuera de ésta membrana se localiza a las células de la teca, las más cercanas a la lámina basal se van transformando en células epiteloideas y dan lugar a la teca interna. Las células tecaes más periféricas mantienen su estructura alargada y se unen a las células del estroma dando lugar a la teca externa. Las células de la teca y



de la granulosa constituyen una glándula productora de hormonas esteroideas en cada ciclo, que culmina con la formación del cuerpo lúteo. (Tresguerres, 2010)

En los ovarios de la mujer al momento del nacimiento, hay aproximadamente dos millones de folículos primordiales, entre el nacimiento y la pubertad gran parte de estos folículos experimentan atresia y solo unos 400 000 gametos están presentes cuando empieza su vida fértil. De éstos, sólo 400 podrán madurar por completo y pasar a las trompas de Falopio y al útero, donde serán potencialmente fecundables, mientras que el resto sufrirá atresia (Tresguerres, 2010).

En la rata la foliculogénesis se inicia después del nacimiento, es aproximadamente a las 12 horas de nacida que se empiezan a observar los primeros folículos (Malamed y col., 1992). El desarrollo folicular temprano es un fenómeno independiente de la hipófisis, y la capacidad de respuesta a las gonadotropinas se adquiere hasta el final de la primera semana de vida, cuando se empiezan a formar sus receptores (Malamed y col., 1992).

CICLO ESTRAL

En las hembras de los mamíferos existen diferencias entre el ciclo menstrual de los primates y el ciclo estral de los mamíferos no-primates. En el ciclo menstrual los cambios uterinos son más notorios, el endometrio uterino depende en mayor grado de las hormonas ováricas y la necrosis que sufre cuando las concentraciones de estas hormonas bajan al final de la fase lútea produce la degeneración del epitelio uterino acompañada de hemorragia, proceso que se le conoce como menstruación (Yen, 2001). En las hembras de



mamíferos no-primates el ciclo estral es corto y los cambios en el endometrio uterino son menos notorios, dado que la fase lútea del ciclo está atenuada. En el epitelio vaginal se producen cambios morfológicos que pueden usarse para identificar las fases del ciclo estral (Goodman y Hodgen, 1983).

El ciclo estral de la rata dura aproximadamente entre 4 y 5 días, es regulado por factores como la temperatura, la luz y sustancias químicas percibidas por el olfato. El ciclo se divide en cuatro fases: Diestro I, Diestro II, Proestro y Estro (Sánchez Criado, 1999).

Ⓞ **Diestro I.** Tiene una duración de 10 a 14 horas. Durante este periodo se forma el cuerpo lúteo (CL) que secreta progesterona y los folículos secretan estradiol, ambas hormonas inhiben la secreción de gonadotropinas. En esta etapa la vascularización y la motilidad del útero disminuye, en los frotis vaginales predominan la presencia de leucocitos y pueden observarse algunas células cornificadas.

Ⓞ **Diestro II.** Tiene una duración de 60 a 70 horas. En este periodo el CL entra en regresión. La secreción de estradiol por los folículos en crecimiento sigue aumentando y los esteroides ováricos inhiben la secreción basal de gonadotropinas, que mantienen el crecimiento folicular. El frotis vaginal se caracteriza por la presencia de leucocitos y la aparición de pocas células nucleadas.

Ⓞ **Proestro.** Dura aproximadamente 12 horas, es una preparación para el siguiente estro. Durante este periodo la hembra es receptiva al macho. Los folículos han llegado a la etapa de folículo preovulatorio y secretan grandes cantidades de estradiol. Esta hormona tiene un efecto estimulante sobre las



gonadotropinas. El útero, por la acción del estradiol, se vuelve contráctil y en el frotis vaginal se observan células epiteliales nucleadas.

ⓐ **Estro.** Dura entre 9 y 15 horas, durante este periodo tiene lugar la ovulación. El estro se encuentra bajo la influencia de la FSH y de los estrógenos. La secreción de FSH en la mañana del estro, estimula el crecimiento folicular. El pico de LH produce la ovulación y la luteinización del folículo postovulatorio. El útero se alarga y se hace edematoso en preparación para la implantación, la mucosa vaginal prolifera y las capas epiteliales superficiales se hacen escamosas y cornificadas en preparación para la cópula.

FOLICULOGÉNESIS

La foliculogénesis comprende el crecimiento de los folículos que pasan por distintos estadios de desarrollo, desde el momento que surge del grupo de folículos formado durante la ovogénesis, hasta el momento en el cual es ovulado o se transforma en atrésico (Thibault, 1993). En los mamíferos el inicio de la foliculogénesis va a depender de la especie, mientras que en la mujer es antes del nacimiento, en los roedores es posnatal (Figura 1).

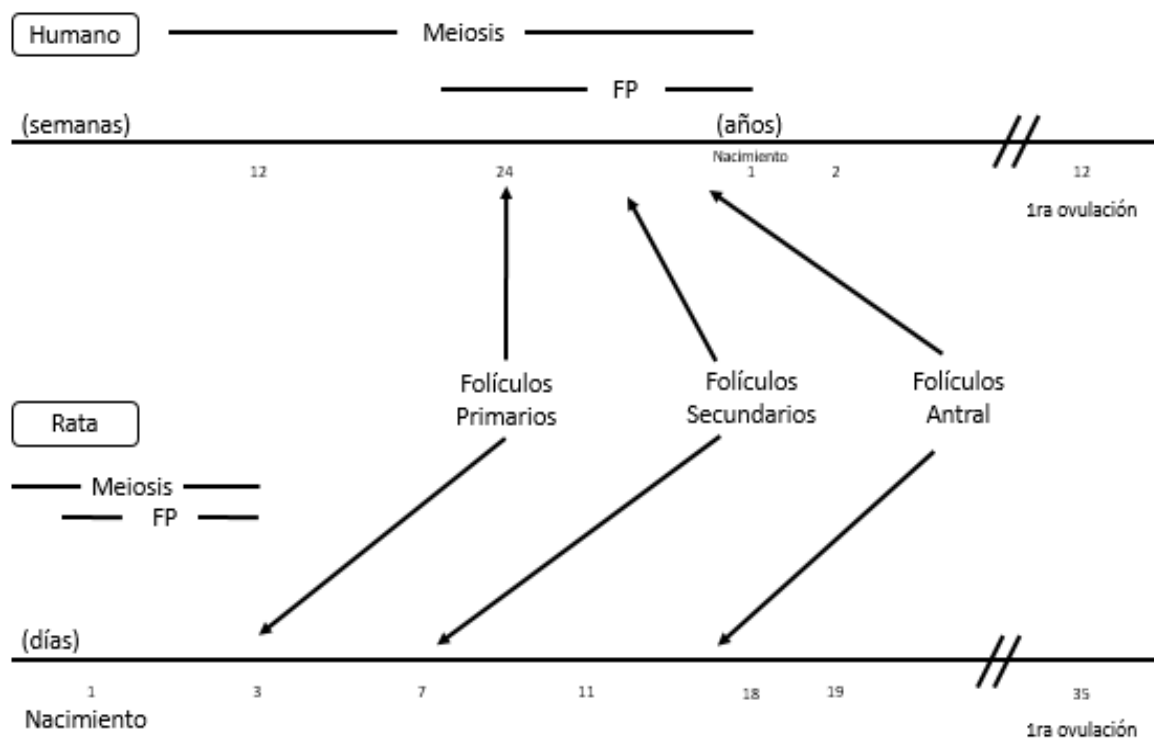


Figura 1. Desarrollo folicular durante la vida fetal y neonatal en humanos y roedores. FP: folículos primordiales (Modificado de McGee, 2000)



DESARROLLO FOLICULAR EN RATAS

El ovocito se desarrolla durante la vida fetal y permanece detenido en la etapa de la meiosis I hasta que ocurre la ovulación. Entre las 17:00 y 18:00 horas del proestro se reanuda la meiosis I, donde se produce la reducción en el número de cromosomas, pasando de 42 a 21. Durante la metafase I los cromosomas pareados se alinean a lo largo de la placa metafásica, unidos a sus centrómeros por las fibras del uso. En la anafase I, los cromosomas se empiezan a separar con la mitad del material cromosómico que se pierde por la expulsión del cuerpo polar durante la telofase I. Una vez que se expulsa el primer cuerpo polar, se produce la ovulación entre las 3:00 a 5:00 horas del estro. El ovocito recién ovulado ahora es una células haploide y sólo si es fecundado se culmina con la segunda división meiótica (Plant y Zeleznik, 2015).

Durante el desarrollo fetal tardío y el desarrollo posnatal temprano, una capa definida de células envuelve al ovocito en una capsula uniforme del epitelio folicular delimitado por la membrana basal (Plant y Zeleznik, 2015).

Los folículos con una sola capa de células epiteliales aplanadas que rodean al ovocito se denominan folículos primordiales (Figura 2). El crecimiento folicular comienza con la activación de los folículos primordiales, evento asociado con la transformación de las células epiteliales que rodean al ovocito en células de la granulosa cuboidales, en este momento se ha formado el folículo primario (Figura 2).

Las células de la granulosa proliferan formando un epitelio folicular cuboidal multilaminar, en esta etapa los folículos se denominan folículos secundarios



(Figura 2). La FSH y LH favorecen la transformación de los folículos secundarios a folículos vesiculares con la formación de múltiples espacios intracelulares llenos de líquido. Estos espacios se agrandan y se agrupan en una sola cavidad más grande denominada antro formando así al folículo terciario (Figura 2).

Las células de la granulosa que ocupaban el centro de los folículos secundarios forman el cúmulo oóforo. Las células de la granulosa que rodean el ovocito forman la corona radiada. A medida que se aproxima la ovulación incrementa el volumen del líquido folicular. Las células del estroma que rodean al folículo van a constituir las células de la teca, que se puede dividir en teca interna y teca externa. El conjunto de células de la granulosa y de la teca interna participan en la producción de esteroides durante el ciclo estral.

Independientemente del estado de desarrollo y diferenciación del folículo, el ovocito y las células de la granulosa no reciben inervación en forma directa ni suministro sanguíneo [Plant y Zeleznik, 2015](#)).

Muy pocos de los folículos presentes en el ovario en el momento del nacimiento están destinados a ovular. Arai (1920) mostró que el ovario de rata al nacimiento presenta aproximadamente unos 35,000 folículos, este número comienza a disminuir y para el día 20 de edad sólo se registran unos 11,000 folículos. Conforme avanza la edad del animal sigue disminuyendo el número de folículos pero a una velocidad menor. La pérdida de los folículos se explica por la atresia que se presenta como un proceso normal durante toda la vida de la rata ([Domínguez y col., 1991](#); [Freeman, 1994](#); [Plant y Zeleznik, 2015](#)).

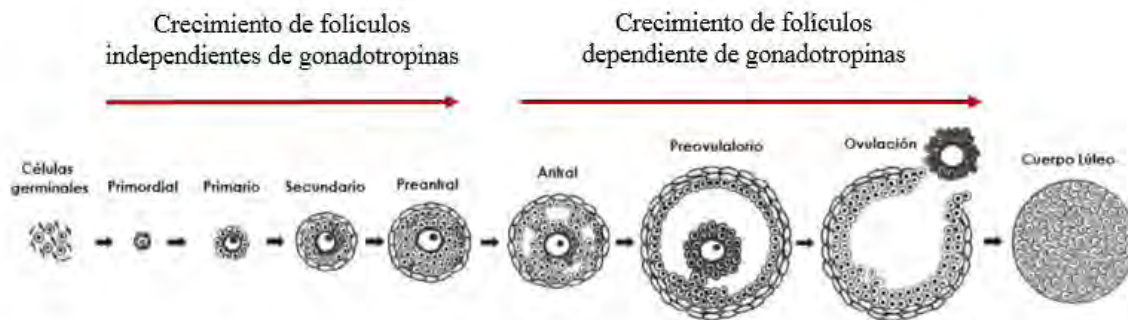


Figura 2. Etapas de desarrollo folicular en mamíferos (Modificado de Edson, 2009)

OVULACIÓN

Uno de los procesos en los que culmina el crecimiento y la diferenciación folicular es la ovulación, que consiste en la salida del ovocito que ha alcanzado el tamaño y el grado de diferenciación adecuado (Domínguez y col., 1999).

En respuesta al estímulo gonadotrópico, en el ápice del folículo preovulatorio se da la formación del estigma, lo que indica que se puede dar la liberación del ovocito. La ruptura del folículo se da por una reacción inflamatoria dependiente de histamina, por colagenasas o por la contractura folicular inducida por prostaglandinas (Tresguerres, 2010).

Inicialmente, las células de la teca externa liberan enzimas proteolíticas que inducen la disolución y debilitamiento de la matriz colágena de la pared folicular, lo que resulta en la formación del estigma. Simultáneamente se da un crecimiento de vasos sanguíneos al interior de la pared del folículo y se secretan prostaglandinas que producen la vasodilatación (Guyton, 1997). Estos eventos dan como resultado la trasudación de plasma al interior del folículo, que contribuye a que éste se “hinche” y junto con la degeneración del estigma, se produce la ruptura del folículo (Guyton, 1997) y las células de la granulosa



comienzan a salir seguidas por el ovocito y el líquido folicular (Plant y Zeleznik, 2015).

El ovocito que ha sido liberado se encuentra rodeado por las células del cúmulo progesterona y de la corona radiada. Se dirige hacia los oviductos, donde puede o no ocurrir la fecundación (Domínguez y col., 1999).

Tras la ruptura del folículo, los capilares y los fibroblastos de la teca interna proliferan y penetran la lámina basal. Las células de la granulosa experimentan cambios morfológicos, que en su conjunto determinan el proceso de luteinización. Las células de la granulosa y de la teca luteinizadas son irrigadas por una red de vasos para dar lugar al cuerpo lúteo (Tresguerres, 2010).

El cuerpo lúteo es un órgano endocrino temporal con la maquinaria bioquímica para producir esteroides, especialmente progesterona, que caracteriza a la fase luteal (Chedrese, 2003).

Durante el ciclo estral de la rata, tres o más generaciones de cuerpos lúteos puede estar presentes en el ovario, mientras que en los primates dura aproximadamente 14 ± 2 días (Plant y Zeleznik, 2015).

Cuando se produce la fecundación, esta fase lútea persiste durante todo el período de embarazo. La placenta podría secretar una luteotropina, que mantiene el cuerpo lúteo (Plant y Zeleznik, 2015).

El desarrollo folicular se iniciará nuevamente al final de la fase luteal, cuando las secreciones luteales declinan y comienza la nueva descarga gonadotrófica (Zeleznik y col., 1980).



El desarrollo de los folículos va aparejado con la capacidad esteroidogénica que presentan, conforme los folículos van madurando incrementa la concentración de estradiol, el cual estimula la capacidad de respuesta de la adenohipófisis a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Cuando se alcanza la máxima concentración de 17β -estradiol en sangre la hipófisis responde con un pico preovulatorio de LH y FSH. Asociado con el incremento gradual del 17β -estradiol se produce una caída en las concentraciones circulantes de FSH, debido a la retroalimentación negativa ejercida por los estrógenos, y probablemente por la acción de la inhibina sobre el hipotálamo y la hipófisis (Karsch y col., 1973 y Bassett y col., 1990).

La LH estimula la síntesis del adenosín monofosfato cíclico (AMPC), que actúa como segundo mensajero, por lo que es posible que el folículo dominante reduzca su dependencia a la FSH (Couse y col., 1997).

La LH es necesaria para el crecimiento final de los folículos y la ovulación, sin esta hormona aunque existan grandes cantidades de FSH, el folículo no es capaz de liberar el ovocito. La LH y la FSH actúan de manera conjunta para lograr que el folículo crezca rápidamente antes de la ovulación. La LH favorece la transformación de las células de la granulosa y de la teca en células secretoras de progesterona en mayor cantidad y menos estrógenos. La tasa de secreción de estrógeno disminuye y se inicia la secreción de pequeñas cantidades de progesterona.



ATRESIA FOLICULAR

El proceso por el cual los folículos son eliminados, se denomina atresia. Aunque algunos folículos primordiales y primarios experimentan la atresia, ésta es más visible en los folículos vesiculares durante cada ciclo. Este evento se produce por apoptosis y tiene lugar en células de la granulosa y en el ovocito. Si la atresia afecta al ovocito, éste pierde la capacidad de mantener el control metabólico del folículo, además en el folículo disminuye el número de receptores a FSH y LH, lo que ocasiona una menor aromatización de andrógenos a estrógenos. La atresia se puede considerar como una ventaja evolutiva, ya que se seleccionan aquellos folículos que contienen un ovocito apto para ser ovulado y fecundado (Domínguez y col., 1991; Tilly y col., 1991; Foghi y col., 1998).

En los folículos antrales los primeros signos reconocibles de atresia se encuentran en las células epiteliales que recubren el límite del antro y en las células externas de la corona radiada. En estos tipos celulares se observa la presencia de células picnóticas, que se forman por la contracción del núcleo y la condensación de la masa de la cromatina de las células de la granulosa. En los folículos las células picnóticas tienden a desprenderse y flotar en el licor folicular. En la rata, también se ha observado que en un folículo atrésico degenera la zona pelúcida seguida por la del ovocito. De manera más tardía, las células de la teca también pueden ir a la atresia y constituir parte de la glándula intersticial, encargada de sintetizar andrógenos (Plant y Zeleznik, 2015). (Tilly y col., 1991; Foghi y col., 1998).



Los andrógenos, la NA, interleucinas, factor de crecimiento tumoral α y la GnRH son factores que estimulan la atresia folicular, mientras que las gonadotropinas son consideradas como factores de supervivencia. Esto se apoya en el hecho de que los folículos que inician la atresia pueden ser rescatados por la administración de gonadotropinas. De igual modo, en ratas inmaduras hipofisectomizadas la administración de FSH disminuye la apoptosis de las células de la granulosa (Braw y col., 1980; Chun y col., 1994).



CAMBIOS HORMONALES DURANTE EL DESARROLLO DE LA RATA HEMBRA

En la rata, el desarrollo de los mecanismos involucrados en la reproducción se produce en un lapso de cinco semanas (Becú-Villalobos y col., 1990). El desarrollo prepuberal de la rata hembra se ha clasificado en cuatro etapas, para lo cual se consideran parámetros morfológicos y fisiológicos relacionados con los distintos componentes del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Ojeda y col., 1980).

Neonata (0 a 7 días de edad)

En este periodo el crecimiento folicular se inicia de forma independiente a las gonadotropinas. Es a partir del quinto día de vida que la FSH comienza a estimular en el ovario la producción de estradiol a partir de testosterona. El control negativo de la secreción gonadotrófica por estradiol es ineficiente debido a la presencia en el suero de α -feto proteína que se une fuertemente a los estrógenos tornándolos biológicamente inactivos. Al final de esta etapa se produce la esteroidogénesis del ovario en respuesta a las gonadotropinas (Becú-Villalobos y col., 1990).

Infantil (8 a 21 días de edad)

Se caracteriza por concentraciones muy altas de FSH en suero y por la presencia de picos esporádicos de LH. Las altas concentraciones de FSH son fundamentales para el reclutamiento y crecimiento de los folículos que llegarán a ovular en la pubertad. A partir del día 15 de vida disminuye la FSH y los picos de LH desaparecen. La α -feto proteína disminuye hasta valores



prácticamente no detectables, lo que facilita la retroalimentación negativa que ejerce el estradiol sobre las gonadotropinas (Becú-Villalobos y col., 1990).

Juvenil (21 a 30 días de edad)

La LH comienza a secretarse en forma pulsátil, incrementa sus valores basales y la amplitud de sus pulsos, estableciéndose un ritmo de secreción circadiano. En el ovario se da un aumento de receptores a LH, que junto con el patrón de secreción de LH por la hipófisis se favorece una mayor Esteroidogénesis (Becú-Villalobos y col., 1990).

Peripuberal (del día 31 al inicio de la pubertad)

El establecimiento de los pulsos de secreción de LH es responsable de estimular al ovario para una mayor producción de estradiol. En esta etapa se registra en el ovario el máximo número de receptores para FSH y LH, lo que se traduce en una máxima respuesta esteroidogénica. El inicio de la pubertad, evaluado por la edad de la canalización de la vagina, se produce en respuesta al aumento en la concentración de testosterona. La alta concentración de esteroides estimula al hipotálamo para que comience la descarga de la hormona liberadora de LH (GnRH) que culmina con el pico preovulatorio de gonadotropinas y la consecuente primera ovulación (Becú-Villalobos y col., 1990).

La edad en la que se produce la canalización de la vagina puede ser influenciada por factores como la alimentación, el fotoperiodo y la presencia o no de un macho.

En la figura 3 se muestra el perfil hormonal que se presenta en la rata desde el nacimiento hasta los 47 días de edad

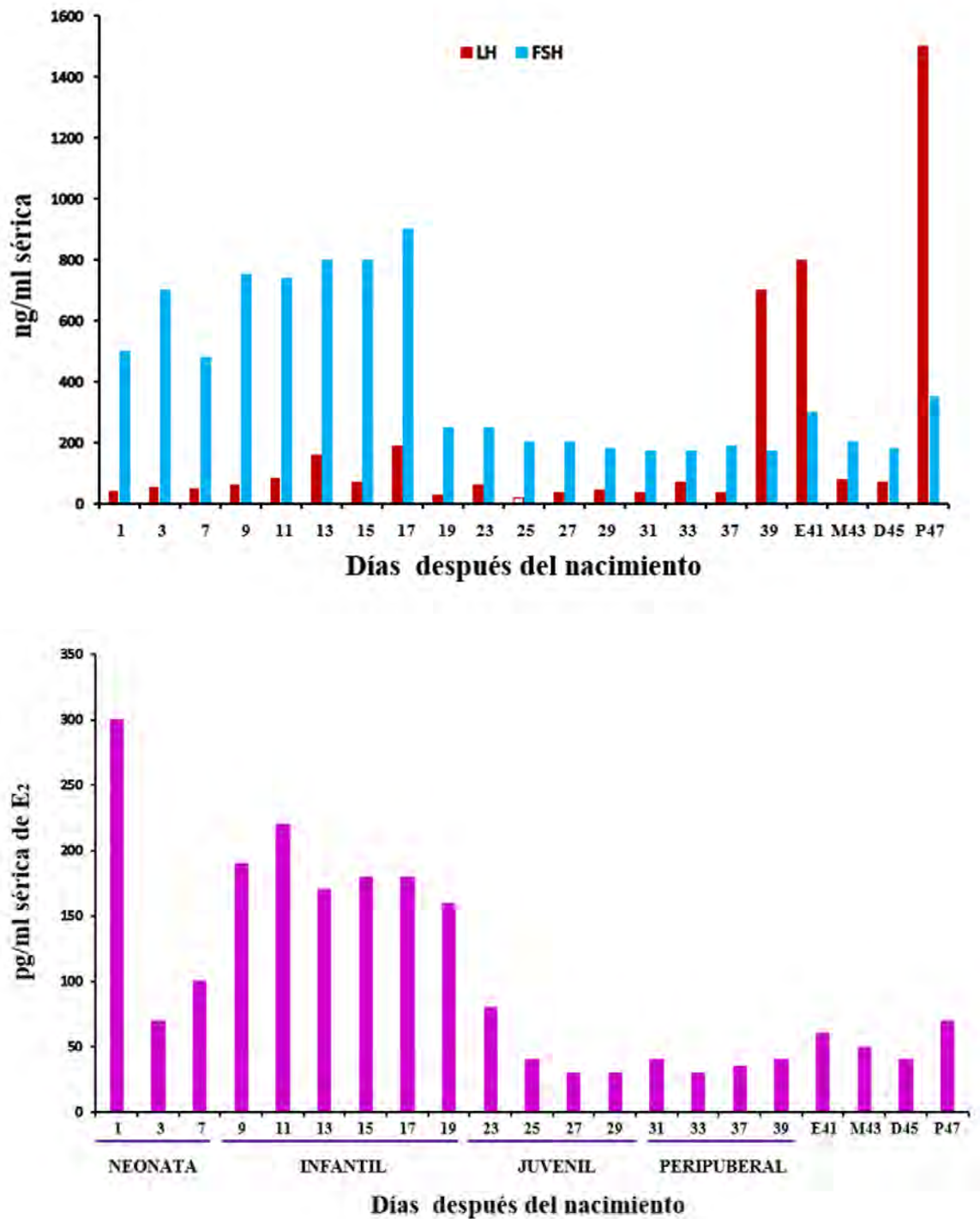


Figura 3. Perfil hormonal en suero de la Hormona Estimulante del Folículo (FSH), de la Luteinizante (LH) y el Estradiol (E2). Los niveles hormonales del primer E (día de apertura vaginal), M (primer metaestro), D (primer D) y P (siguiente Proestro). Tomado y modificado de Dohler, 1975.



BIOSÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES

Las hormonas esteroides secretadas por el ovario incluyen progestágenos (progesterona y 16α -OH progesterona), estrógenos (estradiol, estrona y estriol) y andrógenos (androstenediona y testosterona). Estos últimos además de ser liberados a la circulación, parte se queda en el folículo y son transformados a estrógenos (Díaz, 2004). La síntesis de estas hormonas no es exclusivo de las gónadas, ya que también se sintetizan en las glándulas suprarrenales (Díaz, 2004).

La síntesis de hormonas sexuales se da a partir del colesterol, este se puede obtener de tres maneras diferentes: el que circula en la sangre en forma de lipoproteínas, el que se sintetiza de *novo* dentro del ovario por medio de la acetilcoenzima A y el que se libera de los ésteres de colesterol almacenados en gotas lipídicas. El colesterol, independiente de su origen se transporta después a las membranas mitocondriales, donde comienza la biosíntesis esteroidea (Díaz, 2004).

Las células de la teca y de la granulosa tienen funciones complementarias en la síntesis de estrógenos (Figura 4). La LH se une a sus receptores en las células de la teca donde estimula la producción del AMPc, que actúa como segundo mensajero y estimula las enzimas que transforma el colesterol en testosterona. Las células de la granulosa expresan los receptores a FSH y responden a ella incrementando la síntesis de AMPc, que activa a la aromatasa, enzima que convierte la testosterona en estradiol. El folículo dominante expresa receptores a LH, que incrementa la síntesis de aromatasa y

activa la conversión de la testosterona aportada por las células tecales, en estradiol (Díaz, 2004).

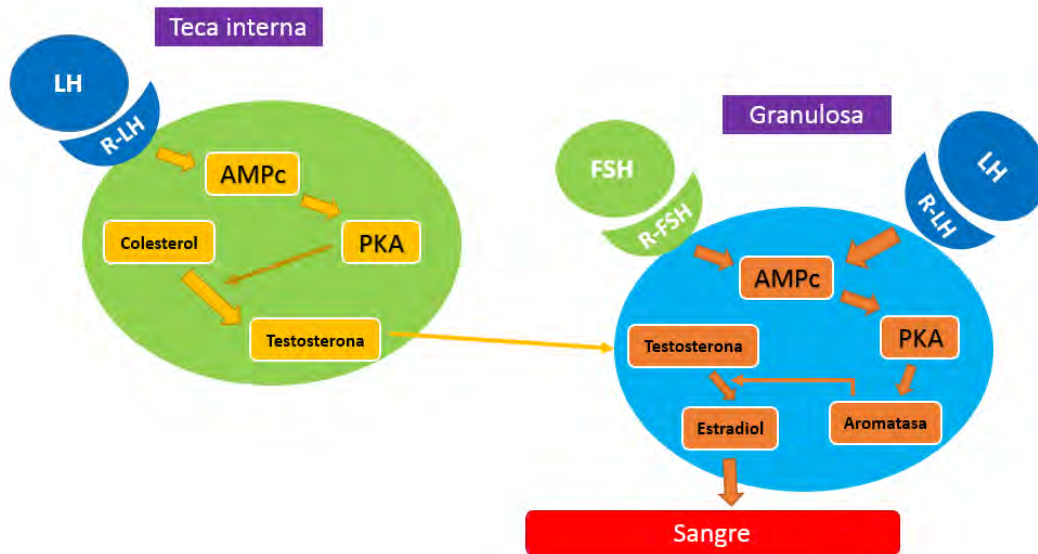


Figura 4. Representación esquemática de la teoría de la doble célula, doble hormona. Adenosin monofosfato (AMPc), Proteína cinasa (PKA), Receptor de FSH (R-FSH), Receptor de LH (R-LH) (Tomado y modificado de Díaz, 2004).



Colesterol: el origen de las hormonas esteroideas

Las células esteroideogénicas (corteza suprarrenal, placenta, teca interna y granulosa en el ovario; Sertoli y Leydig en el testículo) captan el colesterol desde las lipoproteínas plasmáticas, y lo utilizan como sustrato para la síntesis de esteroides. Las que transportan colesterol son las lipoproteínas de baja densidad (LDL), para cuyas proteínas existen receptores de membrana en las células del ovario. Estos receptores median la endocitosis de las LDL, que en el interior de las células se fusionan con los lisosomas, degradan las proteínas y desesterifican el colesterol. El colesterol libre procedente de las LDL bloquea la síntesis de colesterol por la propia célula ovárica. El colesterol libre es reesterificado y acumulado en gotas lipídicas en el citoplasma celular (Díaz, 2004).

La proteína transportadora, del inglés sterol carrier protein (SCP), traslada el colesterol a través del citoesqueleto a la mitocondria, donde se inicia la síntesis hormonal (Díaz, 2004).

El primer paso de la síntesis de las hormonas esteroideas comienza en la membrana interna de las mitocondrias, existe un proceso de reducción la cual se produce por oxidaciones catalizadas por enzimas de la familia del citocromo P450 (Díaz, 2004).

La enzima que actúa en primer lugar es la P450scc (desmolasa), que corta la cadena lateral de 6 carbonos del colesterol, produciendo ácido isocaproico y pregnenolona (Figura 5). Esta transformación incluye 3 enzimas: P450scc, adrenoxina, la adrenoxinreductasa y los fosfolípidos para crear la interacción entre el colesterol y las enzimas. El proceso consume NADPH+H y oxígeno molecular. El producto que se forma es la pregnenolona, precursora de las hormonas esteroideas (Díaz, 2004).

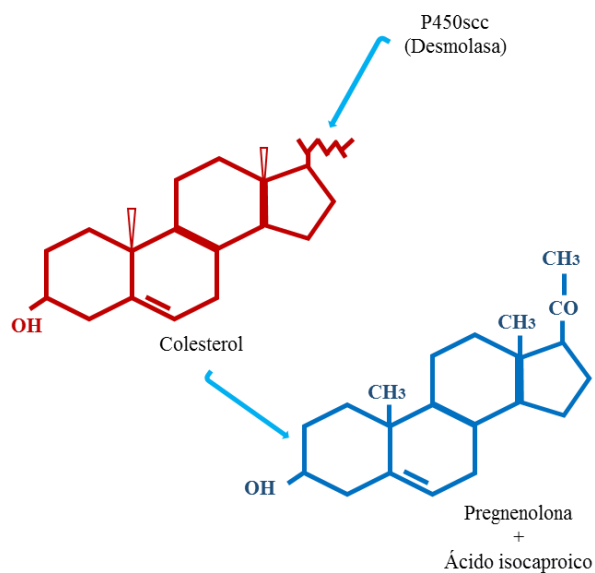


Figura 5. Síntesis de pregnenolona (Tomado y modificado de Díaz, 2004).

La 3 β -HSD en la síntesis de progesterona

La pregnenolona puede tomar dos rutas: la 3 β -Hidroxiesteroideshidrogenasa (3 β -HSD), que la convierte en progesterona, o la 17 α -hidroxilasa (P450c17), que la convierte en 17 α -hidroxi-pregnenolona (Figura 6). Tanto la 3 β -HSD como la 17 α -hidroxilasa se encuentran en el retículo endoplásmico, por lo que la pregnenolona sale de la mitocondria. La progesterona se secreta por células luteales, por lo que la 3 β -HSD es la ruta dominante en estas células; en células de la teca interna, la ruta dominante en la síntesis de andrógenos es mediante la actividad de la 17 α -hidroxilasa (Díaz, 2004).

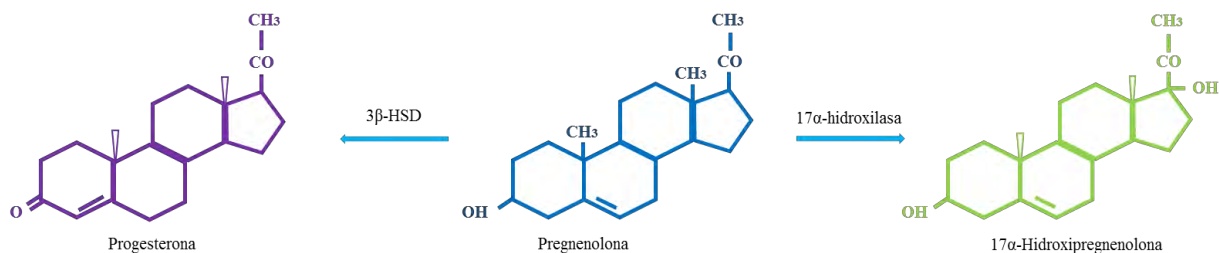


Figura 6. Síntesis de progesterona y 17 α -hidroxipregnenolona (Tomado y modificado de Díaz, 2004).



La 17 α -hidroxilación de esteroides

La pregnenolona y progesterona son sustratos de la 17 α -hidroxilasa (enzima del retículo endoplásmico que cataliza la formación de andrógenos C19). Esta enzima está compuesta por el citocromo específico P450c17 y por NADPH-citocromo P450 reductasa. Este complejo comprende dos actividades enzimáticas, primero convierte el sustrato en su forma 17 α -hidroxi ya sea de pregnenolona o de progesterona, después desprende la cadena lateral (actividad 17,20 liasa) dejando un grupo ceto en C17 (Díaz, 2004).

La ruta de la 3 β -HSD conduce a la síntesis de progesterona mientras que la ruta de la 17 α hidroxilasa conduce a la síntesis de andrógenos y estrógenos. Cuando el sustrato de la 17 α -hidroxilasa es la pregnenolona, los productos que aparecen es la 17 α -hidroxipregnenolona y la dehidroepiandrosterona (DHEA), un andrógeno débil producido por el ovario y las suprarrenales. Este andrógeno requiere una transformación por la 3 β -HSD para dar lugar a la androstendiona (Figura 7).

La 17 α -hidroxiprogesterona secretada por el ovario es finalmente convertida en androstenediona (Figura 8), precursor de andrógenos y estrógenos (Díaz, 2004).

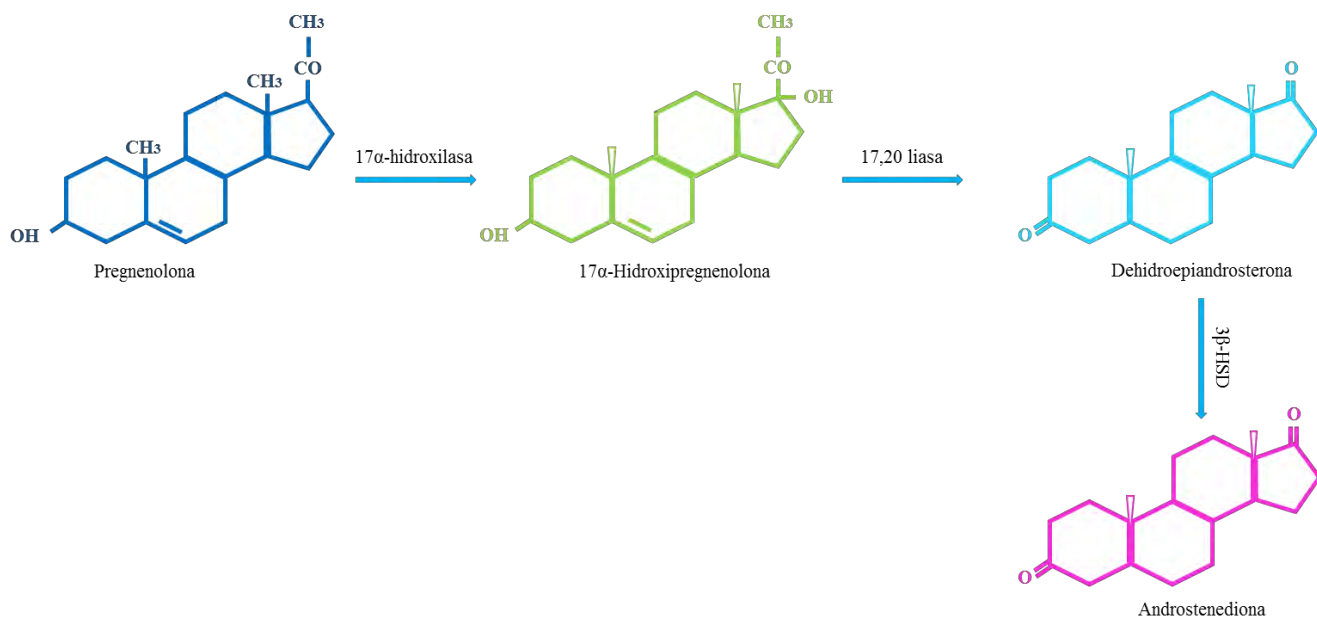


Figura 7. Síntesis de Androstenediona (Tomado y modificado de Díaz, 2004).

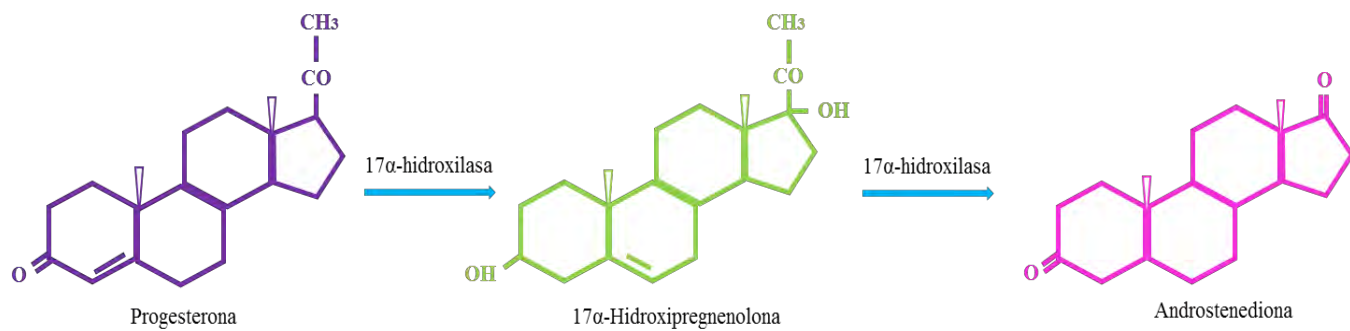


Figura 8. Síntesis de Androstenediona (Tomado y modificado de Díaz, 2004).



La 17 β -deshidrogenación de andrógenos

La androstendiona es convertida en testosterona por la 17 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa, una enzima que también convierte la estrona a estradiol (Figura 9).

Se da una reducción del grupo ceto en C17, paso crucial para la síntesis de testosterona y estradiol, pero no para la de estrona (Díaz, 2004).

La 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa está en el retículo endoplásmico, y cataliza la reacción en ambos sentidos: hidroxilo C19 a ceto o contrariamente. La testosterona es el precursor del estradiol, sale de las células de la teca interna donde tiene su origen y pasa a células de la granulosa en donde está la actividad aromatasa (Díaz, 2004).

La androstenediona que es precursor de la estrona, es mayoritariamente convertida a testosterona en el ovario (Figura 9), y escasamente pasa a la granulosa (Díaz, 2004).

Reacciones de aromatización

La aromatasa es un complejo enzimático que contiene un citocromo P450-CYP19AROM, proteína que contiene un grupo hemo y cataliza reacciones de oxidación de esteroides y la NADPH citocromo P450 reductasa. La aromatasa cataliza tres hidroxilaciones separadas que permiten la transformación de testosterona a estradiol (Figura 9) (Díaz, 2004).

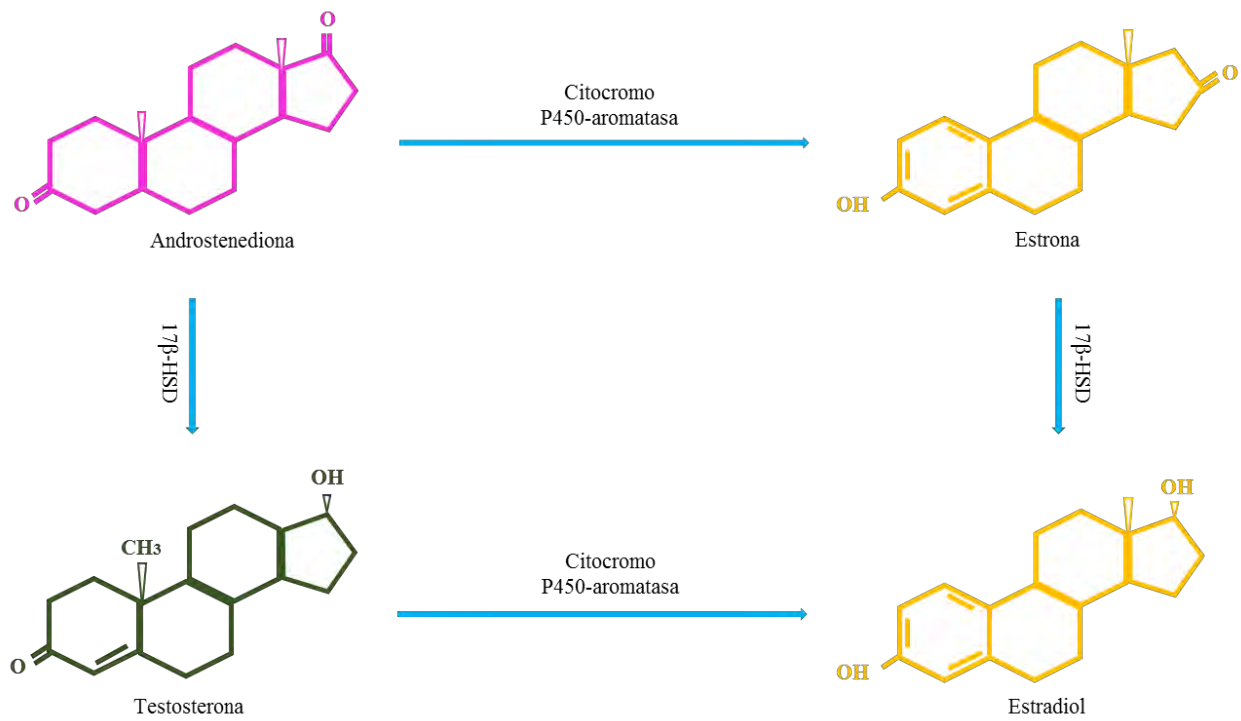


Figura 9. Síntesis de Estrona, Testosterona y Estradiol (Tomado y modificado de Díaz, 2004).



INERVACIÓN SIMPÁTICA

El ovario es inervado por neuronas del sistema nervioso periférico. El ovario de la rata esta inervado por nervios simpáticos, sensoriales y parasimpáticos. Las fibras simpáticas del ovario se originan del segmento de la médula espinal T11 a la L4 y hace sinapsis en el ganglio celiaco mesentérico superior (GCMS). Las fibras sensoriales se originan del ganglio nodoso y del ganglio de la raíz dorsal localizado 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 en los segmentos S2-S4 (Dissen y Ojeda, 1999).

Las vías nerviosas simpáticas están compuestas por neuronas que contienen NA, neuropéptido- Y (NPY) y péptido intestinal vasoactivo (VIP). Las vías sensoriales están compuestas por fibras que contienen sustancia P (SP) y péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). Las vías parasimpáticas están compuestas por somatostatina, la SP, la gastrina, el VIP y acetilcolina (ACh) (Lawrence y Burden 1980; Klein y Burden 1988).

El ovario de la rata recibe inervación simpática por dos rutas: el plexo ovárico (PO) que acompaña a la arteria ovárica e inerva principalmente a la vasculatura, y el nervio ovárico superior (NOS) que corre junto con el ligamento suspensorio e inerva los vasos sanguíneos, células de la glándula intersticial y células de la teca interna (Lawrence y Burden, 1980).



La NA que actúa en el ovario proviene de tres fuentes: la secretada por terminales nerviosas adrenérgicas, la sintetizada por las células de la granulosa y la secretada por las células cromafines de la médula suprarrenal (Domínguez y col., 1991).

En el ovario, la NA participa en la regulación del crecimiento y la diferenciación folicular y la secreción de hormonas esteroides (Domínguez y col., 1991; Mayerhofer y col., 1997; Aguado, 2002). En el ovario de la rata, la concentración de NA aumenta moderadamente del día 5-7 de vida, incrementa abruptamente durante la etapa juvenil del día 26-30 de vida y continua aumentando conforme se acerca a la pubertad (Nira y col., 1984 y Ricu y col., 2008).

Desde que los ovarios se forman son inervados por fibras nerviosas que contienen NA y VIP los cuales estimulan la formación de AMPc en células ováricas y receptores a FSH (Mayerhofer y col., 1997). La inervación NAérgica modula la respuesta de las células de la teca y de la granulosa a las gonadotropinas (Domínguez y col., 1991; Ricu y col., 2008).

En la rata prepúber la información neural que transcurre por el NOS participa en la regulación de la secreción de hormonas esteroides. De manera que la sección bilateral del nervio, resulta en la disminución de la concentración de progesterona a los 30 minutos de realizada la denervación, mientras que a los 60 minutos la que incrementa es la de testosterona (Morales-Ledesma y col., 2012). Cuando la sección bilateral del NOS se practica en la rata adulta la concentración de progesterona y estradiol disminuye desde los primeros cuatro minutos y se mantiene así hasta los 24 minutos (Aguado 1984).



Animales senescentes (12 o 18 meses de edad) muestran una reducción progresiva de la capacidad ovulatoria, que se correlaciona con el aumento en el contenido y concentración de NA ovárica y con la presencia de un número mayor de folículos atrésicos. Cuando a estos animales se les eliminan las fibras NAérgicas con la administración de GTD (20 mg/kg de p.c), durante 8 días y sacrificados después de la última inyección, los animales son capaces de ovular, tienen reducción en el número de folículos atrésicos y de la concentración y contenido de NA ovárica. Estas evidencias permitieron a los autores sugerir que en la rata senescente, la información noradrenérgica participa de manera inhibitoria en la regulación de los eventos que conllevan a la ovulación (Chávez, 2007).

El grupo de Acuña (2009) mostró que en la rata senescente (12 o 14 meses de edad) el incremento en la concentración de NA ovárica se asocia con el desarrollo de quistes foliculares y la desaparición de cuerpos lúteos.



SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO

El síndrome de ovario poliquístico (SOPQ) es un trastorno endocrino-metabólico que afecta al 6 % de las mujeres en edad reproductiva, siendo la principal causa de infertilidad de origen ovárico (Azziz, 2006).

DIAGNÓSTICO

A lo largo del tiempo se han venido precisado los criterios para diagnosticar el SOPQ.

❶ El primero surge en 1990, y proviene de la conferencia del Instituto Nacional de la Salud (NIH) de los EE.UU. Aquí, se establece la presencia simultánea de hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico y anovulación. Se excluyen patologías como: hiperplasia suprarrenal congénita, hiperprolactinemia, síndrome de Cushing y disfunción tiroidea (Zawadski, 1992).

❷ El segundo proviene de la conferencia organizada en Rotterdam (Criterios de Rotterdam, 2003). Se determinó que el diagnóstico del SOPQ debe tener la presencia de dos de los tres criterios: oligo o anovulación, hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico, la presencia de ovarios poliquísticos y la exclusión de enfermedades relacionadas como son: hiperplasia suprarrenal congénita, hiperprolactinemia, síndrome de Cushing y disfunción tiroidea.

❸ El hecho de que se deba o no incluir la presencia de ovarios poliquísticos como criterio de diagnóstico, llevó a la Sociedad del Exceso de Andrógenos (AES) a realizar una revisión sistemática de los trabajos de investigación, de la cual se origina el criterio, que a la fecha se utiliza, para el diagnóstico del



síndrome y en el cual se establece que se requiere la presencia de hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico acompañado o no de anovulación y la presencia de quistes ováricos. Considerando la exclusión de hiperplasia suprarrenal congénita, hiperprolactinemia, síndrome de Cushing y disfunción tiroidea (Azziz, 2006).

PATOGENIA

La causa del síndrome se desconoce, sin embargo, se toman en cuenta los siguientes aspectos:

- Resistencia a la insulina
- Desregulación del generador de pulsos de GnRH
- Desregulación de la actividad de la enzima P450c17

Estos factores pueden participar en la patogenia del síndrome aunque se desconoce la interacción exacta de estas alteraciones en el desarrollo del síndrome (Yen, 2001).

El SOPQ se manifiesta clínicamente por hiperandrogenismo con anovulación crónica y aumento en la relación LH:FSH. El hiperandrogenismo se traduce en hirsutismo, acné y en algunos casos en alopecia dependiente de andrógenos asociados al incremento de testosterona y androstenediona sérica. La anovulación crónica se asocia con oligomenorrea y la presencia de ovarios poliquísticos (Yen, 2001).



A la fecha se desconoce la etiología del SOPQ, por lo que se han planteado algunas hipótesis que podrían explicar su origen. Entre ellas se encuentran:

❶ **Hipótesis neuroendócrina.** En la década de los 70's se descubrió una serie de alteraciones funcionales en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario responsables del cuadro clínico del SOPQ. Se detectó una secreción inapropiada de gonadotropinas, caracterizado por el incremento en la frecuencia de liberación de los pulsos de LH asociados a concentraciones normales o reducidas de FSH. El incremento en la LH estimula a las células de la teca y aumenta la producción de andrógenos, mientras que la secreción irregular de la FSH resulta en la hipofunción de las células de la granulosa lo que conduce a la interrupción en el desarrollo folicular y la disminución en la producción de estrógenos. El mecanismo de esta alteración estaría originado por una disfunción hipotalámica, explicado por el incremento en la frecuencia de los pulsos de liberación de la GnRH. Aun no es claro si esta alteración se debe a alguna anomalía intrínseca en el generador de pulsos en el hipotálamo o es causado por las concentraciones relativamente bajas de P4 presentes en el síndrome (Yen, 2001).

La pulsatilidad de la GnRH está fuertemente controlada por los esteroides gonadales y se ha postulado una acción inhibitoria de la P4 a nivel central, tanto hipotalámico como hipofisario. Las mujeres con SOPQ al padecer anovulación por periodos prolongados, presentan concentraciones séricas de P4 bajas y esto favorece no solo el aumento en la actividad hipotalámica del generador de pulsos, sino además, a nivel hipofisario en el aumento en la sensibilidad del gonadotropo a la



GnRH y como consecuencia aumento en la liberación de LH (Yen, 2001).

❶ **Hipótesis ovárica.** Esta hipótesis se ha explicado por dos vertientes. La primera postula que hay una alteración en la enzima P450c17, que tiene actividad 17α hiroxilasa y 17, 20 liasa. Esta es codificada por el mismo gen en ovario y en adrenal. En células de la teca se observa una alteración en el metabolismo de andrógenos debido a un aumento de LH, que como consecuencia provoca aumento de la actividad de la enzima P450c17 que permite el paso de pregnenolona a progesterona y el paso de DHEA a androstendiona, que resulta en una mayor síntesis de andrógenos. El aumento en androstenediona y testosterona resulta en atresia folicular, aparición de hirsutismo, oligomenorrea y acné que son típicos del SOPQ (Dolz, 2010).

La segunda vertiente explica que el SOPQ puede originarse por la mayor actividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario. Esta hipótesis ha sido analizada mediante modelos experimentales utilizando a la rata hembra tratada con VE que es un estrógeno de larga actividad (Lara y col, 2000; Morales-Ledesma y col., 2010).

En la rata con SOPQ, inducido por la administración de VE, se han reportado cambios en la actividad catecolaminérgica del ovario, que están dados por el incremento en el contenido y concentración de NA, por la capacidad del ovario para liberar NA ante un estímulo eléctrico, y por la reducción en el número de receptores β -adrenérgicos (Lara y col, 1993).

En el modelo del animal tratado con VE, incrementa en el ovario el factor de crecimiento neural (NGF), que participa en el desarrollo ovárico, proliferación



y diferenciación de células somáticas y esteroideas, junto con su receptor de baja afinidad, el p75, la unión del NGF con su receptor estimula en el GCMS el incremento en la expresión de genes que codifican para la tiroxina hidroxilasa (TH), la cual es la enzima limitante en la biosíntesis de las catecolaminas. Cuando la TH aumenta también incrementa la concentración de NA que viaja por las fibras simpáticas que llegan al ovario (Lara y col, 2000). Todos estos eventos ocurren antes de que formen quistes ováricos, lo cual requiere de al menos 56 días (Brawer y col, 1986). Estas evidencias llevaron a los autores a proponer que el SOPQ es el resultado del aumento de la actividad del sistema simpático que llega al ovario. En apoyo a esta hipótesis se mostró que la eliminación del principal aporte simpático, por la sección bilateral del NOS, resulta en el restablecimiento de la ovulación y del patrón del ciclo estral (Barria y col., 1993).

Sin embargo, cuando se realiza la denervación quirúrgica del NOS, se eliminan todos los neurotransmisores que llegan al ovario a través de esta vía (NA, VIP y NPY). Una herramienta farmacológica que nos permite eliminar sólo el componente NAérgico es la guanetidina (GTD), agente neurotóxico que se acumula en las neuronas simpáticas mediante la bomba de recaptura de las catecolaminas, y que administrado de manera crónica destruye las neuronas simpáticas por medio de una reacción autoinmune (Lara y col, 1990).

La GTD produce una intensa depleción de NA en los gránulos adrenérgicos. Este fármaco es captado por el mecanismo de transporte activo de catecolaminas en la membrana axonal. Prácticamente ocupa la bomba de catecolaminas, luego se liga a la membrana granular e ingresa al granulo desplazando progresivamente a la NA de los depósitos. Se convierte en un



falso neurotransmisor que se libera al espacio intersináptico durante la excitación. Inicialmente la GTD inhibe también la liberación de NA posiblemente por su acción anestésica local y estabilizadora de membranas neuronales (Malgor-Valsencia, 2000).



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El SOPQ es un trastorno endocrino-metabólico que se caracteriza por hiperandrogenismo clínico o bioquímico acompañado de anovulación o formación de quistes foliculares. Uno de los modelos experimentales utilizados para inducir el síndrome en la rata, es mediante la administración de una dosis de VE, el cual incrementa la actividad noradrenérgica del ovario. En este modelo se ha observado que la sección bilateral del NOS restablece las funciones del ovario, lo cual es explicado por el decremento en la concentración de NA. Sin embargo, además de NA, el NOS aporta al ovario péptidos como el VIP y NPY y mediante la denervación quirúrgica no es posible discernir si los efectos son el resultado de la disminución de la NA o de los péptidos que recibe la gónada por este nervio. Para probar que el restablecimiento en las funciones del ovario se debe exclusivamente a la disminución del tono noradrenérgico, en el presente trabajo se analizó si la eliminación de las fibras noradrenérgicas por la administración crónica de GTD evita el desarrollo del SOPQ.



HIPÓTESIS

Si el SOPQ es caracterizado por el aumento en la actividad de los nervios simpáticos que llegan al ovario, dado por el incremento en la concentración de NA, entonces la denervación farmacológica de las fibras noradrenérgicas con GTD, restablecerá las funciones ováricas.

OBJETIVO GENERAL

Analizar en el modelo de la rata con SOPQ el papel de la NA en el desarrollo del síndrome.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ① Analizar si en la rata tratada con VE a los 14 días de edad se producen las características que definen al síndrome de ovario poliquístico.
- ① Analizar el efecto de la denervación, inducida con GTD, sobre las funciones ováricas.
- ① Analizar en la rata con VE, el efecto de la denervación noradrenérgica sobre la ovulación, la concentración de hormonas esteroides y la morfología ovárica.



MATERIALES Y MÉTODO

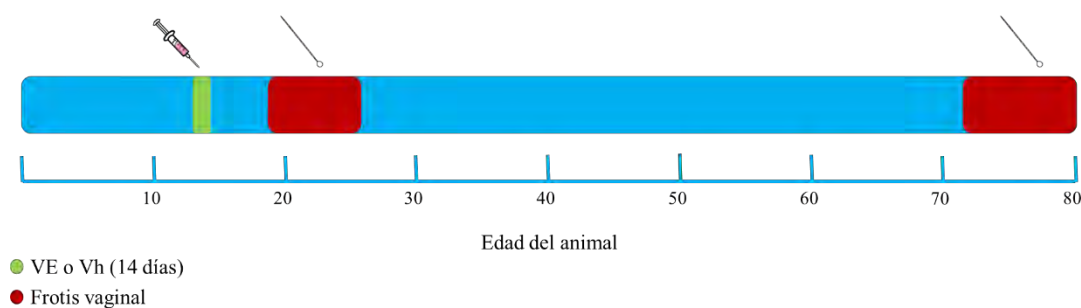
Procedimientos generales

Se utilizaron ratas hembra de la cepa CII-ZV recién nacidas, las cuales fueron mantenidas en condiciones controladas de iluminación con 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad (luces encendidas de las 5:00 a las 19:00 horas) y temperatura de 22 ± 2 °C. En todos los casos se siguió lo establecido por la Norma Mexicana de Protección Animal para el Uso de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999), especificaciones técnicas para la protección, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

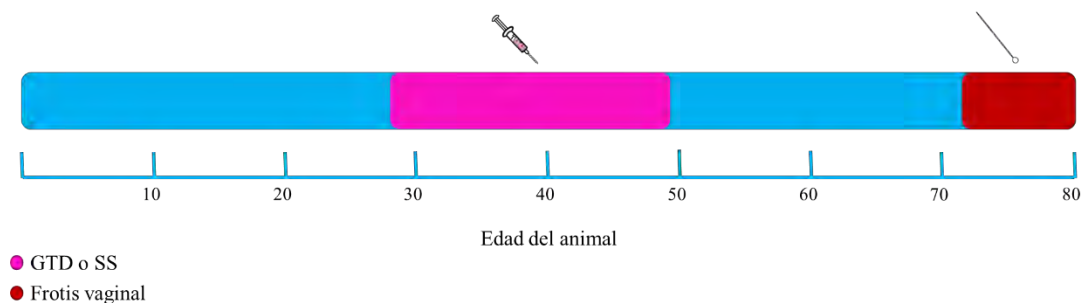
Los animales fueron colocados en camadas de siete individuos por caja (seis hembras y un macho), y tuvieron libre acceso a la madre hasta los 24 días de edad, a partir de ese momento se les proporcionó pellet purina y agua *ad libitum*. Los frotis vaginales y los tratamientos farmacológicos se realizaron entre las 9:00 y 11:00 horas.

Los experimentos fueron divididos en los siguientes grupos experimentales:

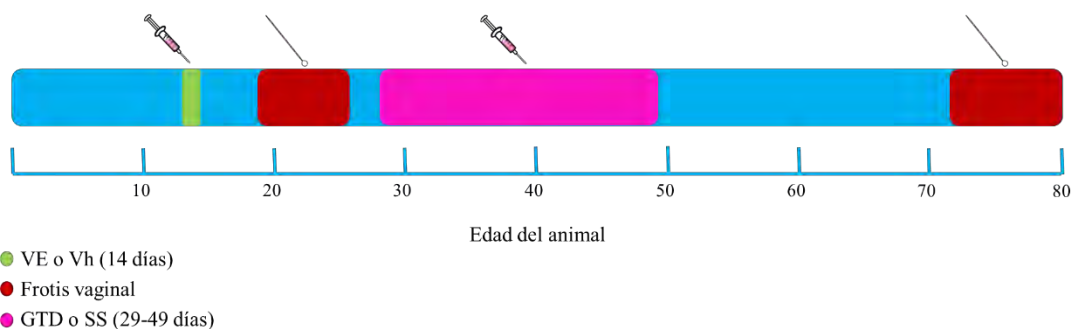
ⓐ **Inducción del Síndrome de ovario poliquístico.** Dieciocho animales de 14 días de edad fueron inyectados intramuscular con 2 mg de VE disuelto en 0.1 ml de aceite de sésamo. Como grupos de comparación se utilizaron animales inyectados con 0.1 ml de aceite de sésamo [Vehículo (Vh)] o animales testigo absoluto (TA).



ⓑ **Denervación farmacológica con guanetidina.** Diez animales de 29 días de edad fueron inyectados intraperitoneal con 50 mg/kg de p.c. de GTD, cinco días por semana durante 3 semanas (del día 29 al 49 de vida). Como grupos de comparación se utilizaron animales inyectados con solución salina (SS) en la misma secuencia, o animales TA.



❶ **Efecto de la denervación farmacológica con GTD** en ratas tratadas con VE. Once animales de 14 días de edad fueron inyectados intramuscular con 2 mg de VE, se dejó transcurrir el tiempo de vida media del fármaco (15 días) y a los 29 días de edad se inició la administración de GTD, cinco días por semana durante tres semanas. Como grupo de comparación se utilizaron animales inyectados con el Vh a los 14 días de vida y a los 29 días de edad se inició la administración con SS siguiendo el esquema de administración de la GTD.





PROCEDIMIENTO DE LA AUTOPSIA

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación al cumplir los 80 días de edad y presentar un estro vaginal. Se colectó la sangre del tronco y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos. El suero fue separado del botón celular y dividido en tres alícuotas de 150 μ l e inmediatamente fue almacenado a -20°C hasta el momento de la cuantificación de hormonas esteroideas por ELISA. Los coeficientes de variación intra e interespecíficos fueron para progesterona 7.52 y 8.41%, para testosterona 6.42 y 7.32% y para estradiol de 8.5 y 9.3%.

Al momento de la autopsia se extrajeron los ovarios y en los oviductos se buscó la presencia de ovocitos con la ayuda de un microscopio estereoscópico, siguiendo la metodología habitual de laboratorio. Los ovarios de cada grupo experimental fueron fijados en solución de Bouin por 24 horas, se deshidrataron en alcohol al 70, 80 y 96% y en cloroformo, posteriormente se incluyeron en paraplast. Después se realizaron cortes histológicos seriados de 10 μ m de grosor y fueron teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina.

En los cortes histológicos de ovario se buscó la presencia de cuerpos lúteos y de quistes foliculares. Se consideraron quistes foliculares aquellos que tuvieron una cavidad antral alargada, una capa de células de la granulosa fina, un número mayor de capas de células de la teca y la ausencia del ovocito. Los prequistes fueron aquellos que presentaron en las capas de las células de la granulosa invaginaciones y puede observarse el ovocito.



Cálculo de la Tasa de Animales Ovulantes

El cálculo de la tasa de animales ovulantes (TAO) se realizó con la siguiente fórmula:

$$TAO = \frac{\text{Número de animales ovulantes}}{\text{Número de total de animales por grupo}} \times 100$$

Análisis Estadístico

Los resultados de la concentración de hormonas esteroideas 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.

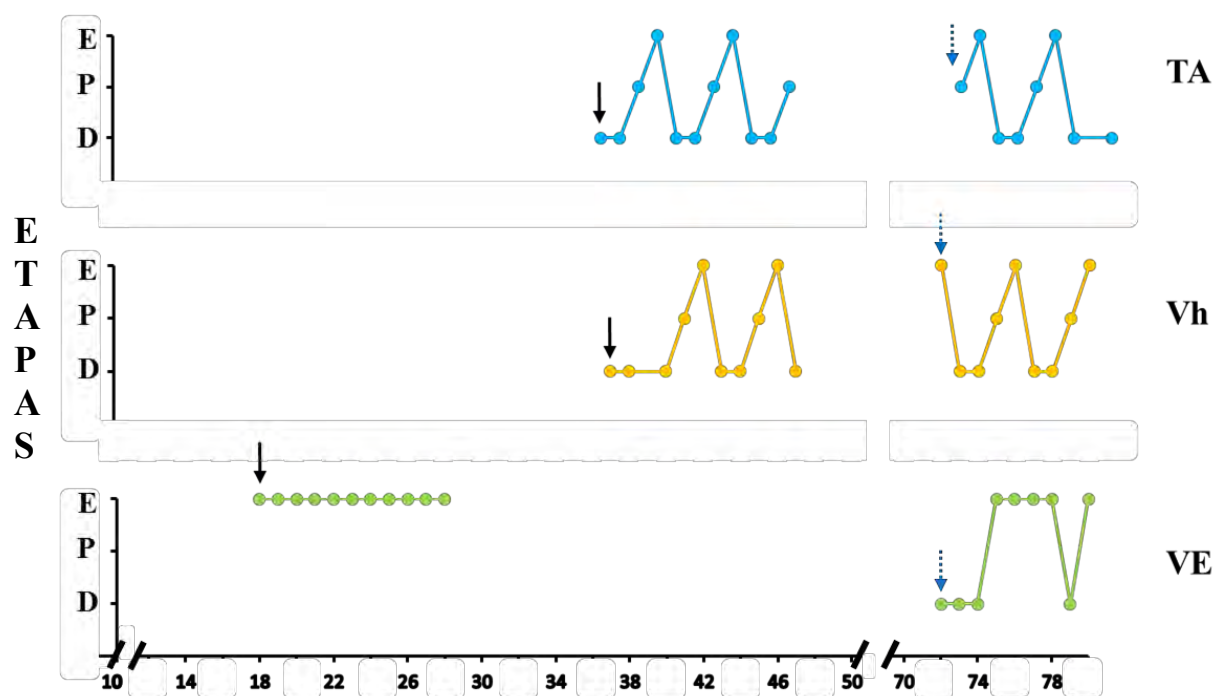
La tasa de animales ovulantes (TAO) se analizó por la prueba de la probabilidad exacta de Fisher o de Ji² para proporciones. El número de ovocitos liberados fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la prueba de Dunn. Cuando se realizó la comparación entre dos grupos se utilizó la prueba de U de Mann Whitney. En todos los casos fueron consideradas como estadísticamente significativas, aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor a 0.05.

RESULTADOS

EXPERIMENTO 1

Modelo de inducción del SOPQ mediante la administración de valerato de estradiol en la rata hembra a los 14 días de vida

La inyección de Vh a los 14 días de edad, no modificó el patrón del ciclo estral, en comparación al de los animales TA, mientras que los animales inyectados con VE, mostraron un patrón de ciclo estral irregular, caracterizado por diestros y estros consecutivos (Figura 10).



D: Diestro; P: Proestro; E: Estro. La flecha sólida indica la edad de apertura vaginal y la flecha punteada el momento en que se reinició la toma de frotis vaginales

Figura 10. Patrón representativo del ciclo estral de los animales testigo absoluto (TA), inyectados con aceite de sésamo (Vh) o con valerato de estradiol (VE) en el día 14 de edad y sacrificados a los 80 días de edad al presentar un estro vaginal.

Los animales inyectados con VE en el día 14 de vida, mostraron un adelanto en la edad de apertura vaginal (18 ± 0.0 días de edad), en comparación con los animales tratados con Vh (35.9 ± 0.34) o testigo absoluto (36.1 ± 0.17).

Respuesta ovulatoria

La inyección de Vh no modificó la tasa de **animales ovulantes** respecto a la del grupo TA, mientras que ninguno de los animales inyectados con VE ovuló (Figura 11).

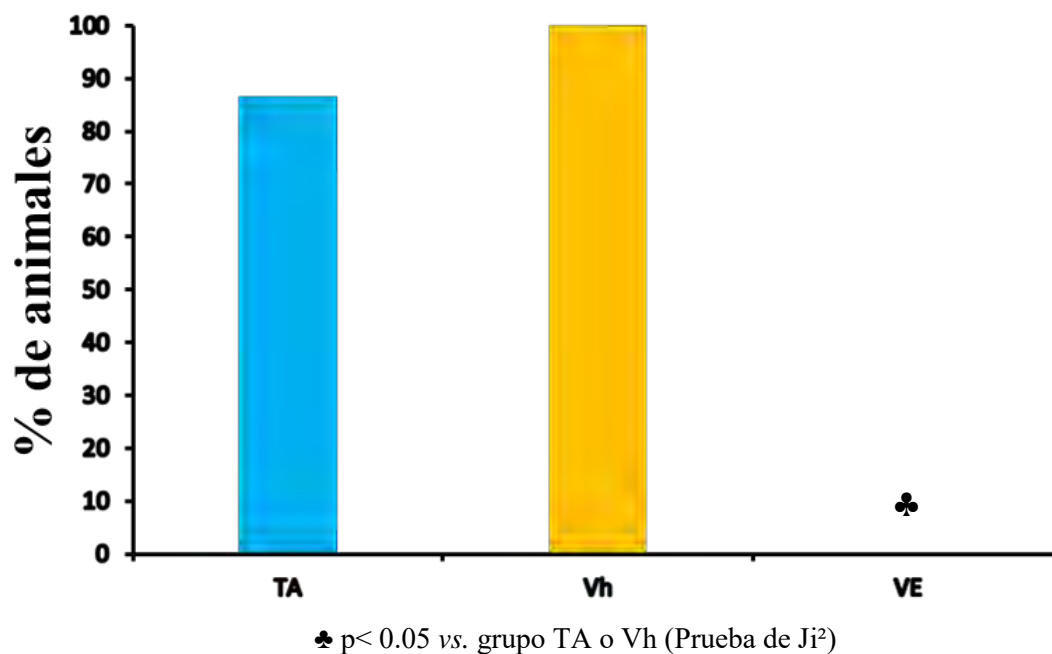
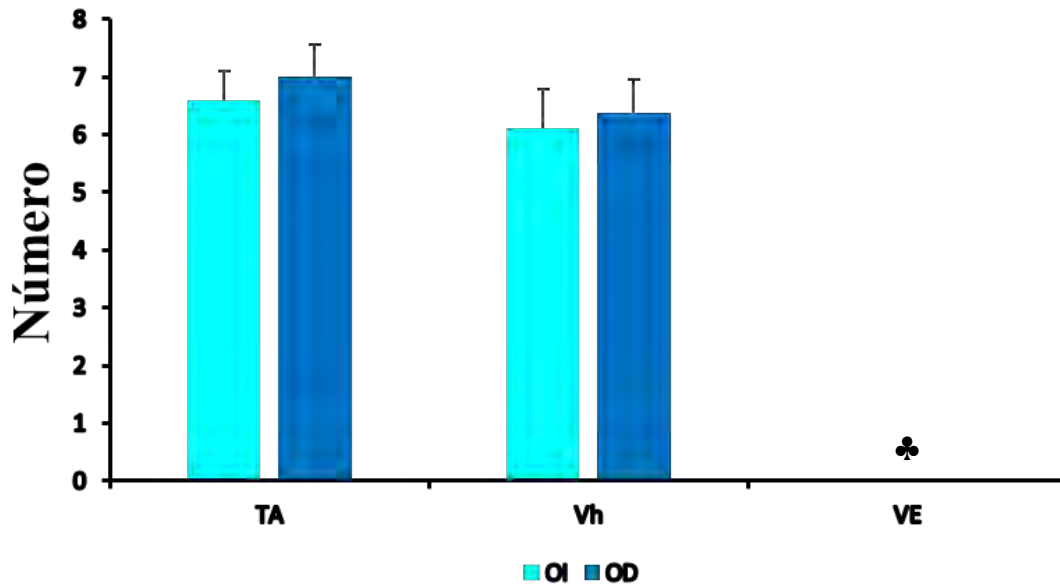


Figura 11. Porcentaje de **animales ovulantes** de ratas testigo absoluto (TA), inyectadas con aceite de sésamo (Vh) o con valerato de estradiol (VE) en el día 14 de vida y sacrificadas a los 80 días de vida al presentar un estro vaginal.

La inyección de Vh no modificó el número de ovocitos liberados respecto al grupo TA, mientras que la inyección con valerato de estradiol resultó en el bloqueo de la ovulación (Figura 12).



♣ $p < 0.05$ vs. grupo TA o Vh (Prueba de U de Mann-Whitney)

Figura 12. Media \pm eem del **número de ovocitos liberados** por el ovario izquierdo o derecho de animales testigo absoluto (TA), inyectados con aceite de sésamo (Vh) o con valerato de estradiol (VE) en el día 14 de vida y sacrificados a los 80 días de vida al presentar un estro vaginal.

Concentración de hormonas esteroides

La inyección de VE no modificó la concentración de **progesterona** sérica respecto al grupo de animales intactos o inyectados con Vh (Figura 13).

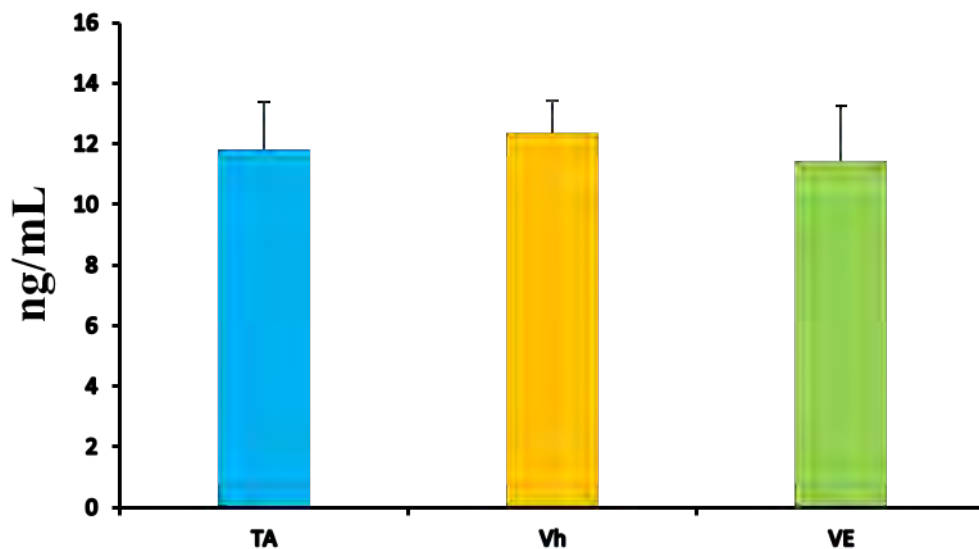
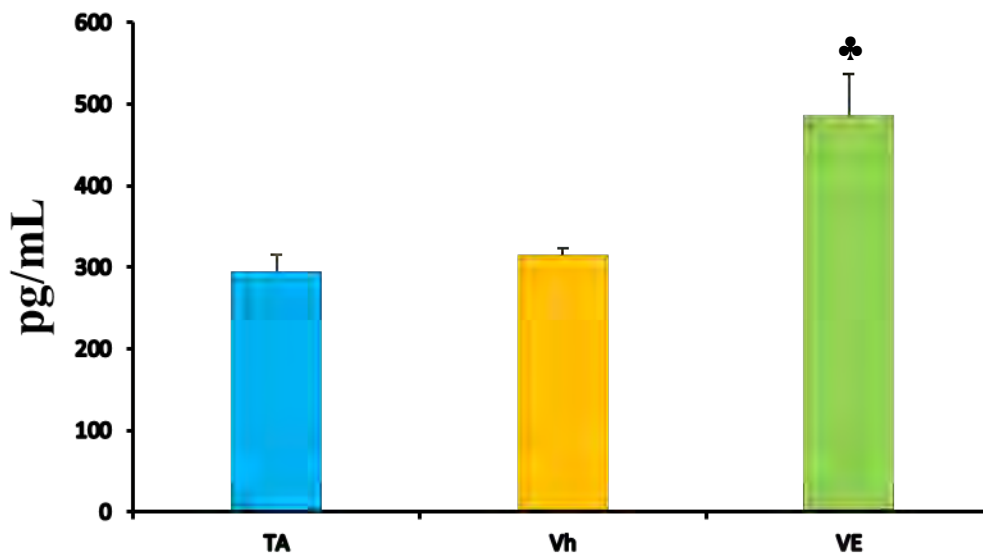


Figura 13. Media \pm eem de la concentración de **progesterona** en el suero de animales testigo absoluto (TA), inyectados con aceite de sésamo (Vh) o con valerato de estradiol (VE) en el día 14 de vida y sacrificado a los 80 días de vida al presentar un estro vaginal.



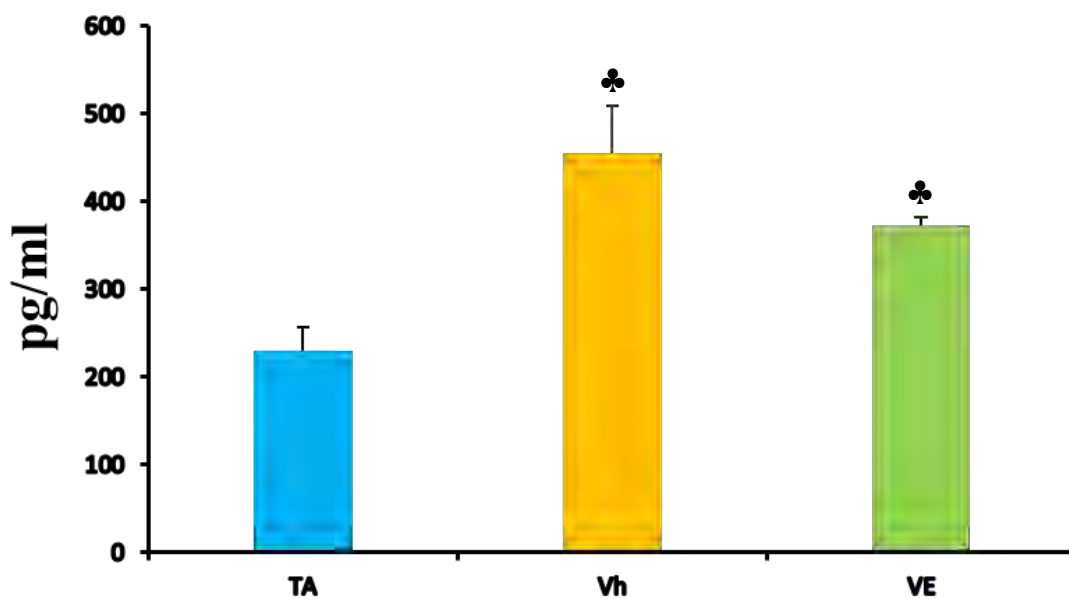
En los animales inyectados con Vh, la concentración de **testosterona** sérica no se modificó respecto al grupo de animales intactos, mientras que, en los animales tratados con VE la concentración de testosterona fue mayor en comparación a su grupo TA y Vh (Figura 14).



♣ $p < 0.05$ vs. grupo TA y el grupo Vh (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer)

Figura 14. Media \pm eem de la concentración de **testosterona** en el suero de animales testigo absoluto (TA), inyectados con aceite de sésamo (Vh) o con valerato de estradiol (VE) en el día 14 de vida y sacrificados a los 80 días de vida al presentar un estro vaginal.

La inyección con Vh o VE aumentó la concentración de **estradiol** sérico respecto al grupo de animales intactos (Figura 15).



♣ $p < 0.05$ vs. grupo TA (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer)

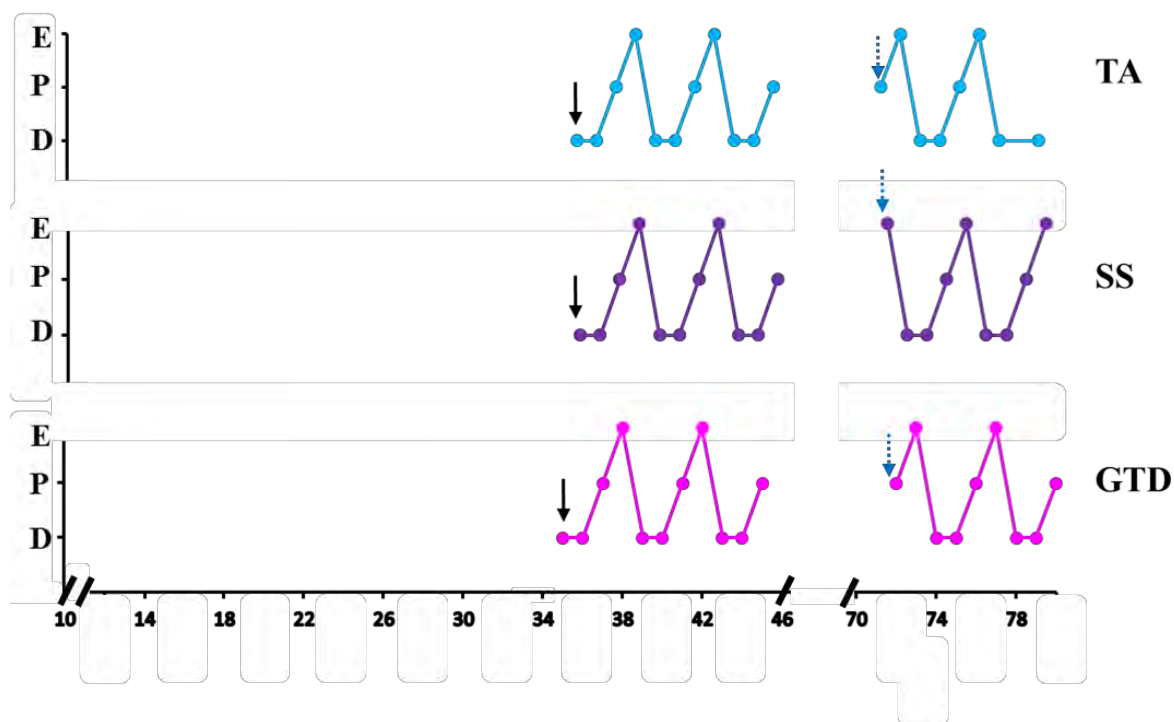
Figura 15. Media \pm eem de la concentración de **estradiol** en el suero de animales testigo absoluto (TA), inyectados con aceite de sésamo (Vh) o con valerato de estradiol (VE) en el día 14 de vida y sacrificados a los 80 días de vida al presentar un estro vaginal.

EXPERIMENTO 2

Efecto de la denervación simpática con GTD del día 29 al 49 en la rata hembra adulta

Apertura vaginal y ciclo estral

El tratamiento con GTD del día 29 al 49 de vida, no modificó la edad de apertura vaginal respecto al grupo con SS (36.3 ± 0.21 vs. 36.4 ± 0.16) ni la ciclicidad estral (Figura 16).



D: Diestro; P: Proestro; E: Estro. La flecha sólida indica la edad de apertura vaginal y la flecha punteada el momento en que se reinició la toma de frotis vaginales

Figura 16. Patrón representativo del ciclo estral de los animales testigo absoluto (TA), inyectados con solución salina (SS) o con guanetidina (GTD) del día 29 al 49 de vida y sacrificados a los 80 días al presentar un estro vaginal.

Respuesta ovulatoria

La inyección con GTD disminuyó la **tasa de animales ovulantes** respecto a los animales inyectados con SS o su grupo TA (Figura 17).

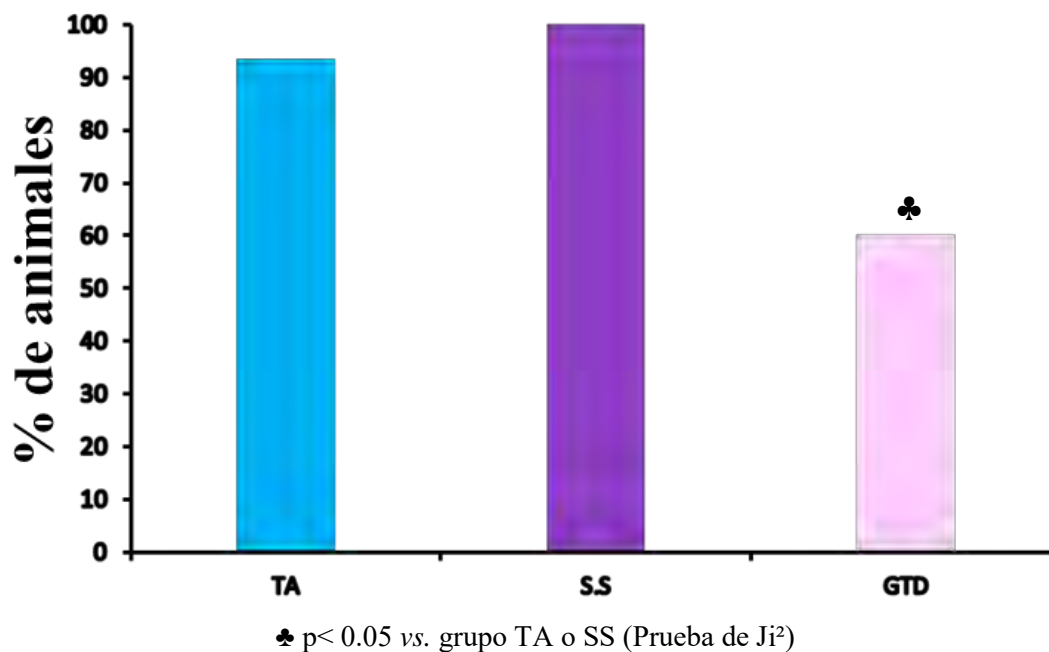


Figura 17. Porcentaje de **animales ovulantes** de los animales testigo absoluto (TA), inyectados con solución salina (SS) o con guanetidina (GTD) del día 29-49 de vida y sacrificados a los 80 días de vida al presentar un estro vaginal.

La inyección de GTD no modificó el **número de ovocitos liberados** respecto al grupo de animales intactos o inyectados con SS (Figura 18)

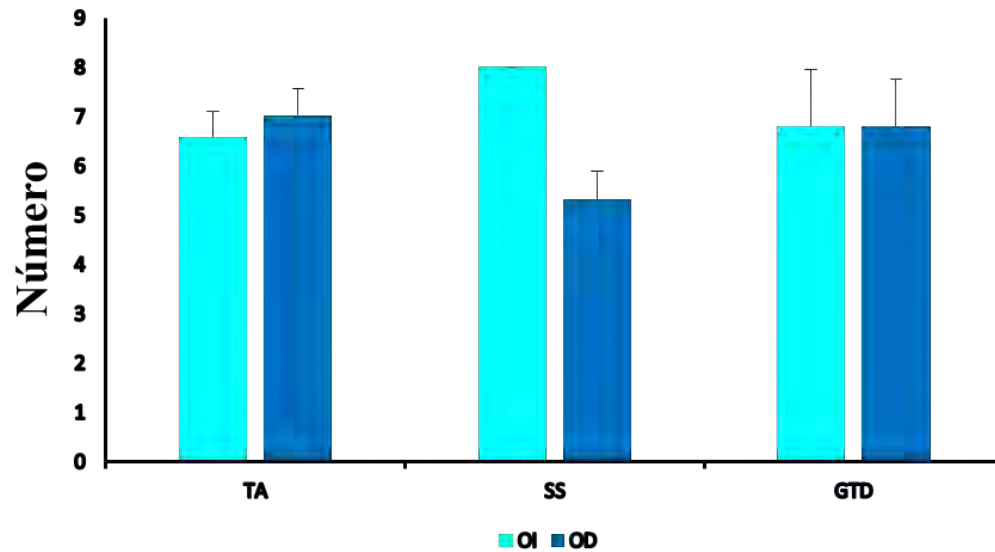


Figura 18. Media \pm eem del **número de ovocitos liberados** por el ovario izquierdo o derecho de animales testigo absoluto (TA), inyectados con solución salina (SS) o con guanetidina (GTD) del día 29 al 49 de vida y sacrificados a los 80 días de vida al presentar un estro vaginal.

Concentración de hormonas esteroides

La inyección de GTD no modificó la concentración de **progesterona** sérica respecto al grupo de animales intactos o inyectados con SS (Figura 19).

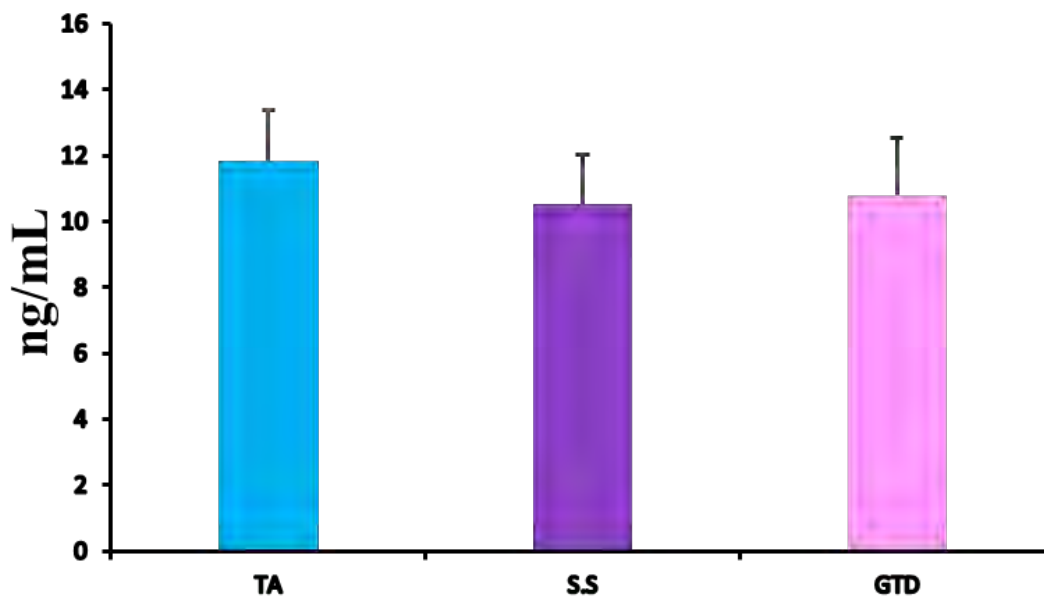
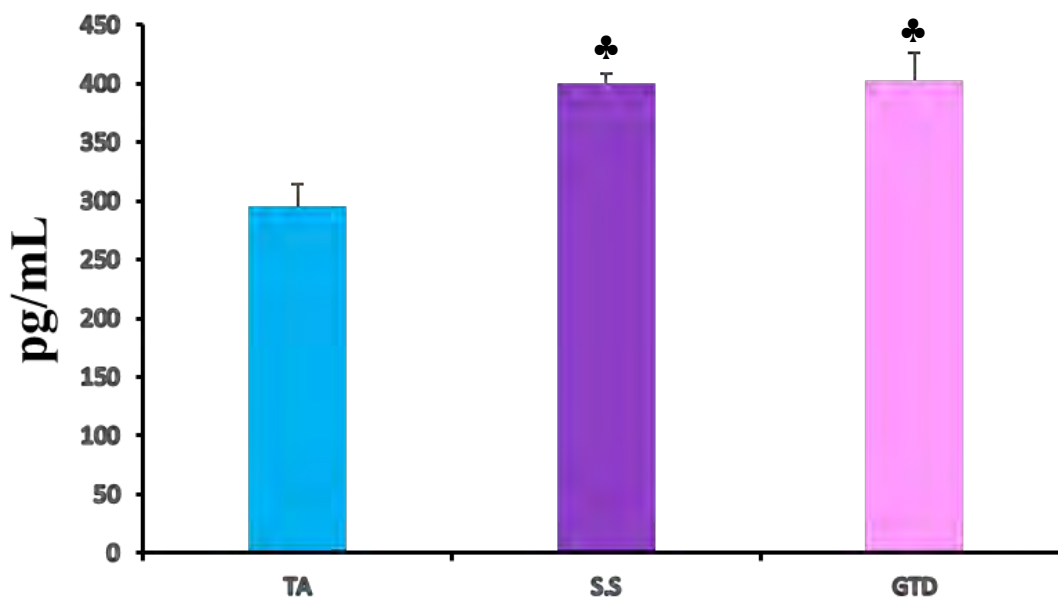


Figura 19. Media \pm eem de la concentración de **progesterona** en el suero de animales testigo absoluto (TA), inyectados con solución salina (SS) o con guanetidina (GTD) del día 29 al 49 de vida y sacrificados a los 80 días de vida al presentar un estro vaginal.

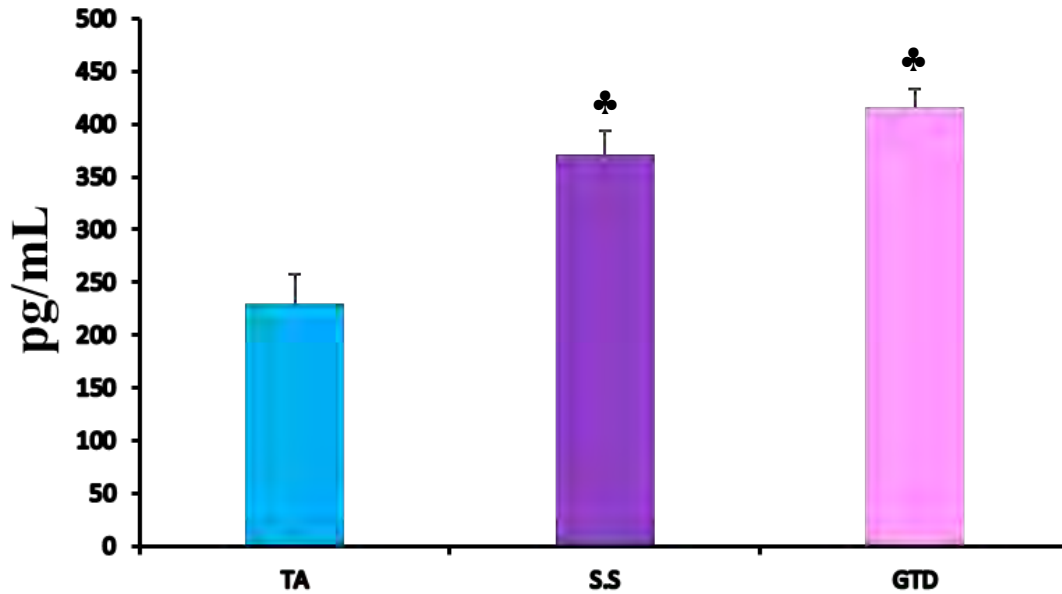
La inyección de SS o de GTD aumentó la concentración de **testosterona** sérica respecto al grupo de animales intactos (Figura 20).



♣ $p < 0.05$ vs. grupo TA (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer)

Figura 20. Media \pm eem de la concentración de **testosterona** en el suero de animales testigo absoluto (TA), inyectados con solución salina (SS) o con guanetidina (GTD) del día 29 al 49 de vida y sacrificados a los 80 días de vida al presentar un estro vaginal.

La inyección con S.S o GTD aumentó la concentración de **estradiol** sérico respecto al grupo de animales intactos (Figura 21)



♣ $p < 0.05$ vs. grupo TA (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer)

Figura 21. Media \pm eem de la concentración de **estradiol** en el suero de animales testigo absoluto (TA), inyectados con solución salina (S.S) o con guanetidina (GTD) del día 29 al 49 de vida y sacrificado a los 80 días de vida al presentar un estro vaginal.



EXPERIMENTO 3

Efecto de la denervación simpática con GTD del día 29 al 49 de vida en la rata tratada con Vh o VE

Apertura vaginal y ciclo estral

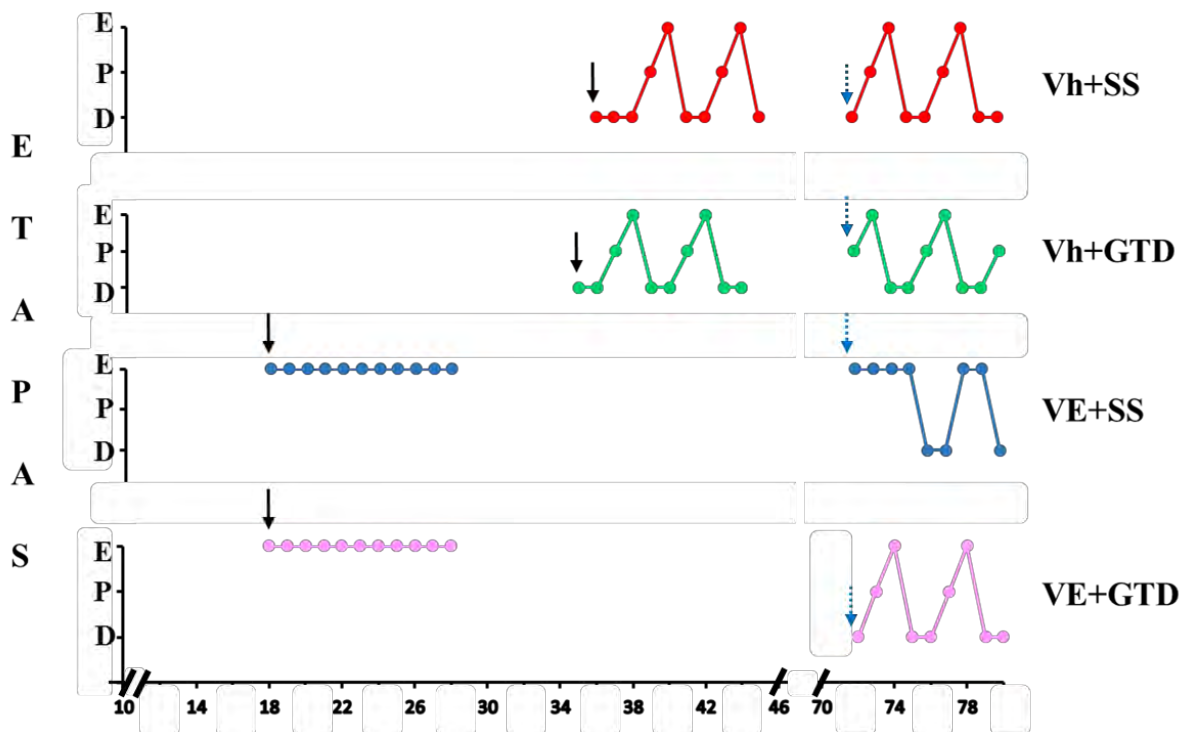
Los animales inyectados con VE y posteriormente inyectados con SS o con GTD mostraron adelanto en la edad de apertura vaginal, en comparación con los animales tratados con Vh y posteriormente inyectados con SS o con GTD (Tabla 1).

Grupos	Edad de apertura vaginal
Vh+SS	36.5±0.22
Vh+GTD	36.1±0.87
VE+SS	18±0*
VE+GTD	18±0*

* $p < 0.05$ vs. grupo Vh+SS o Vh+GTD

Tabla 1. Media \pm eem de la edad de apertura vaginal de animales inyectados con Vh a los 14 días de vida y del día 29 al 49 con solución salina (Vh+SS) o guanetidina (Vh+GTD), o inyectados con VE y con solución salina (VE+SS) o guanetidina (VE+GTD). Sacrificados a los 80 días al presentar un estro vaginal.

El grupo con VE y posteriormente inyectados con SS (VE+SS) mostraron un patrón de ciclo estral irregular, caracterizado por diestros y estros consecutivos, mientras que en los animales inyectados con VE y posteriormente con GTD se restableció el patrón del ciclo estral (Figura 22).

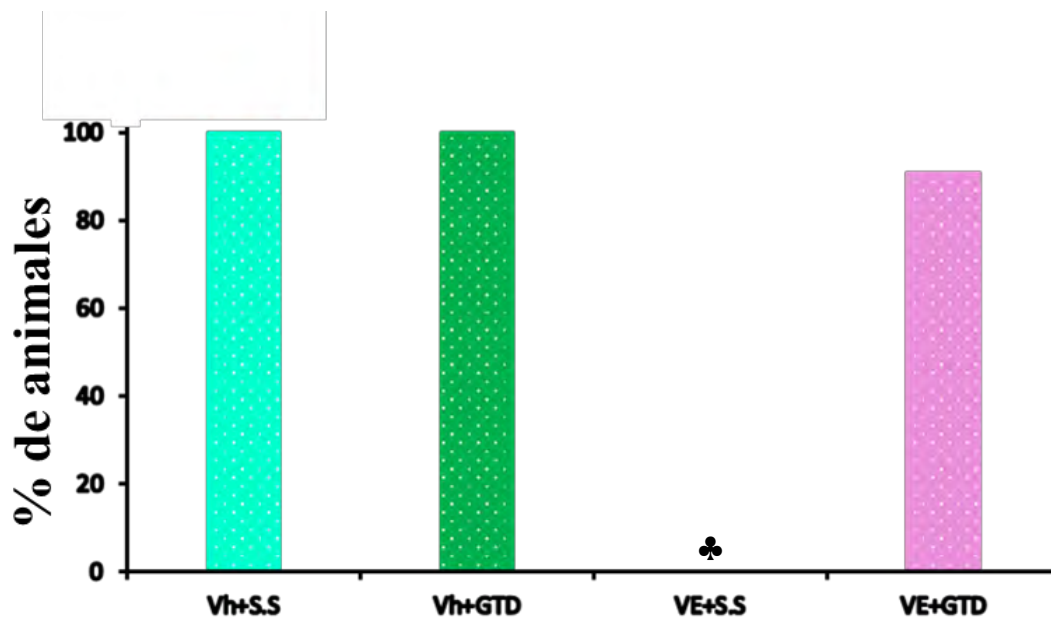


D: Diestro; P: Proestro; E: Estro. La flecha sólida indica la edad de apertura vaginal y la flecha punteada el momento en que se reinició la toma de frotis vaginales

Figura 22. Patrón representativo del ciclo estral de los animales inyectados con Vh a los 14 días de vida y posteriormente con solución salina (Vh+S.S) o con guanetidina (Vh+GTD), o de animales inyectados con VE a los 14 días de vida y posteriormente con solución salina (VE+S.S) o con guanetidina (VE+GTD) del día 29 al 49 de vida y sacrificados a los 80 días al presentar un estro vaginal.

Respuesta ovulatoria

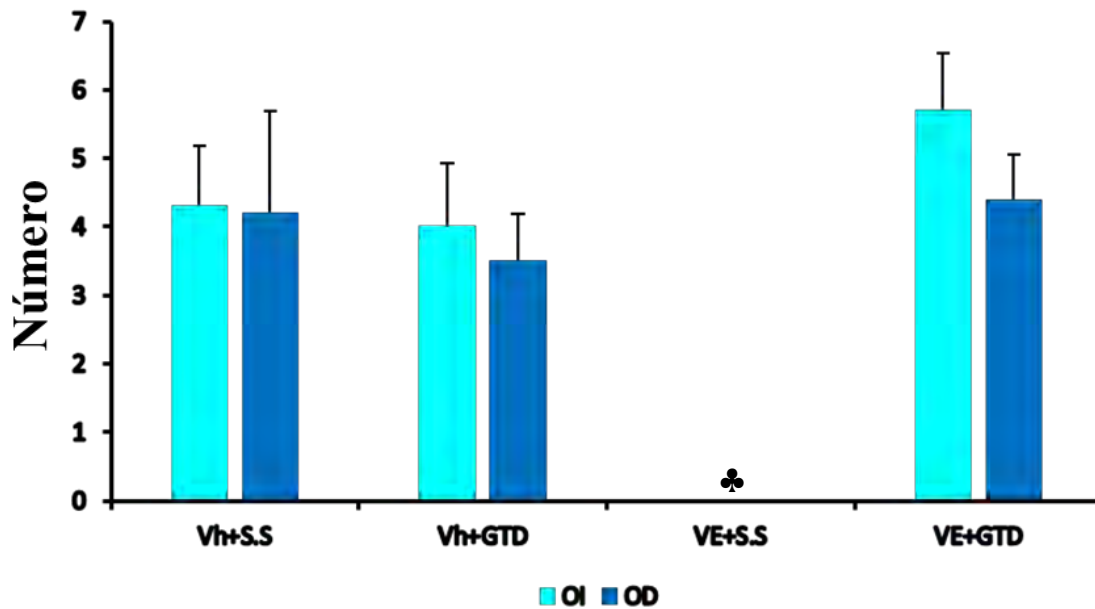
Los animales tratados con VE+ SS mostraron un bloqueo en la ovulación, mientras que los animales con VE+GTD el 90% de los animales ovularon (Figura 23).



♣ $p < 0.05$ vs. grupo VE+GTD (Prueba de J_i^2)

Figura 23. Porcentaje de **animales ovulantes** de los animales inyectados con Vh a los 14 días de vida y posteriormente con solución salina (Vh+SS) o con guanetidina (Vh+GTD) del día 29 al 49 de vida o animales inyectados con VE a los 14 días de vida y posteriormente con solución salina (VE+SS) o con guanetidina (VE+GTD) del día 29 al 49 de vida. Todos fueron sacrificados a los 80 días al presentar un estro vaginal.

En los animales con VE la denervación con GTD facilitó la liberación de un número de ovocitos semejante al de los grupos tratados con el vehículo (Figura 24).



♣ $p < 0.05$ vs su grupo VE+GTD (Prueba de U de Mann-Whitney)

Figura 24. Media \pm eem del **número de ovocitos liberados** por el ovario izquierdo o derecho de animales inyectados con Vh a los 14 días de vida y posteriormente con solución salina (Vh+SS) o con guanetidina (Vh+GTD) del día 29 al 49 de vida o animales inyectados con VE a los 14 días de vida y posteriormente con solución salina (VE+SS) o con guanetidina (VE+GTD) del día 29 al 49 de vida y sacrificados a los 80 días al presentar un estro vaginal.

Concentración de hormonas esteroides

La inyección con GTD en el animal tratado con Vh no modificó la concentración de **progesterona** sérica. Este mismo efecto se observó en el grupo con VE y denervado con GTD (Figura 25).

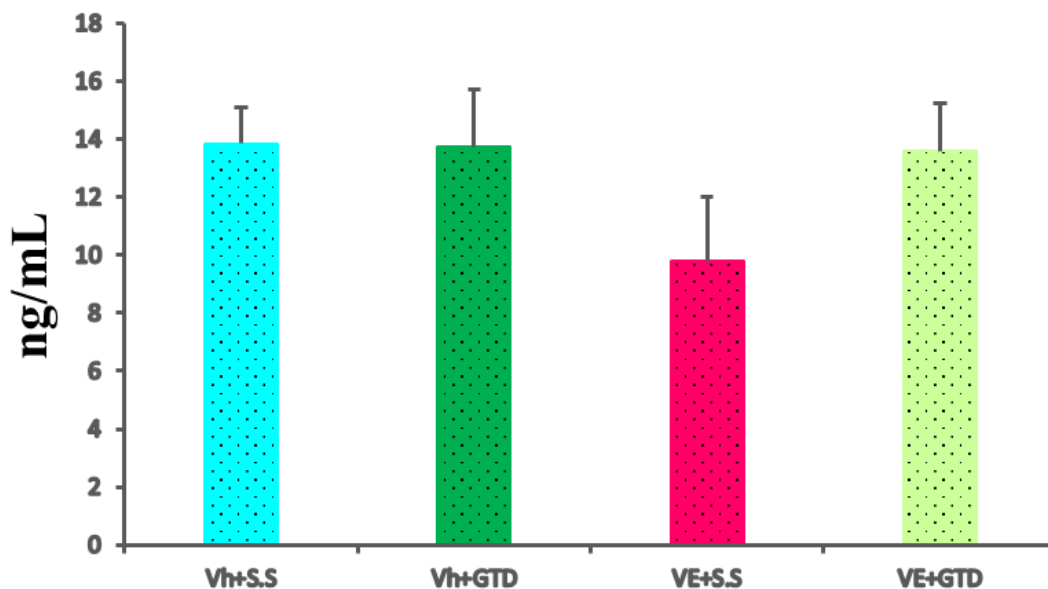
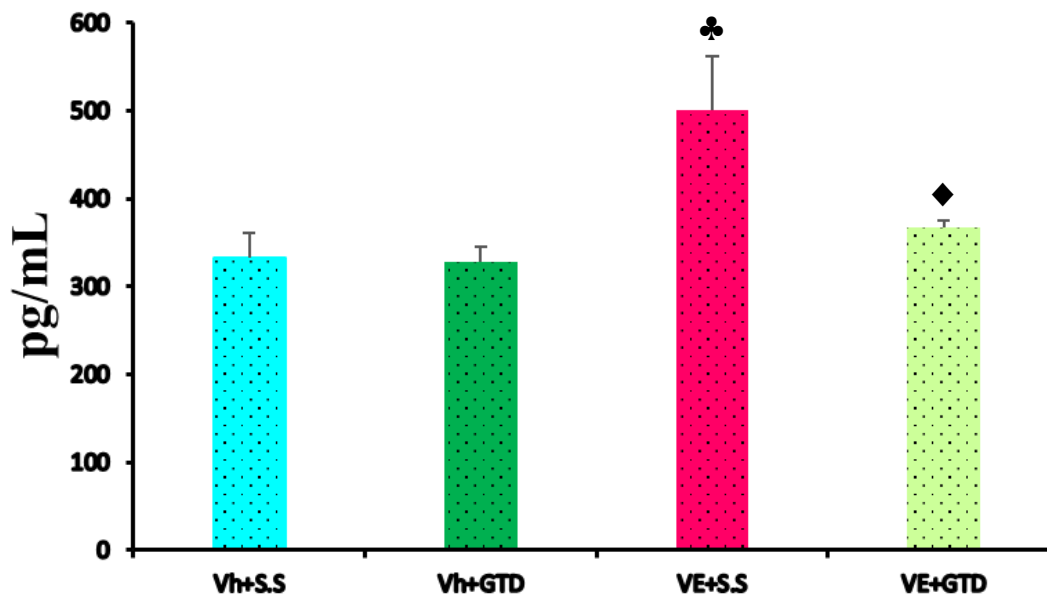


Figura 25. Media \pm eem en la concentración de **progesterona** en suero de animales inyectados con Vh a los 14 días de vida y posteriormente con solución salina (Vh+SS) o con guanetidina (Vh+GTD) del día 29 al 49 de vida, o de animales inyectados con VE a los 14 días de vida y posteriormente con solución salina (VE+SS) o con guanetidina (VE+GTD) del día 29 al 49 de vida y sacrificados a los 80 días al presentar un estro vaginal.

En el grupo con VE+SS incrementó la concentración de **testosterona** respecto al grupo Vh+SS, mientras que en los animales tratados con VE+GTD disminuyó la concentración de **testosterona** sérica respecto a los animales inyectados con VE+SS (Figura 26).

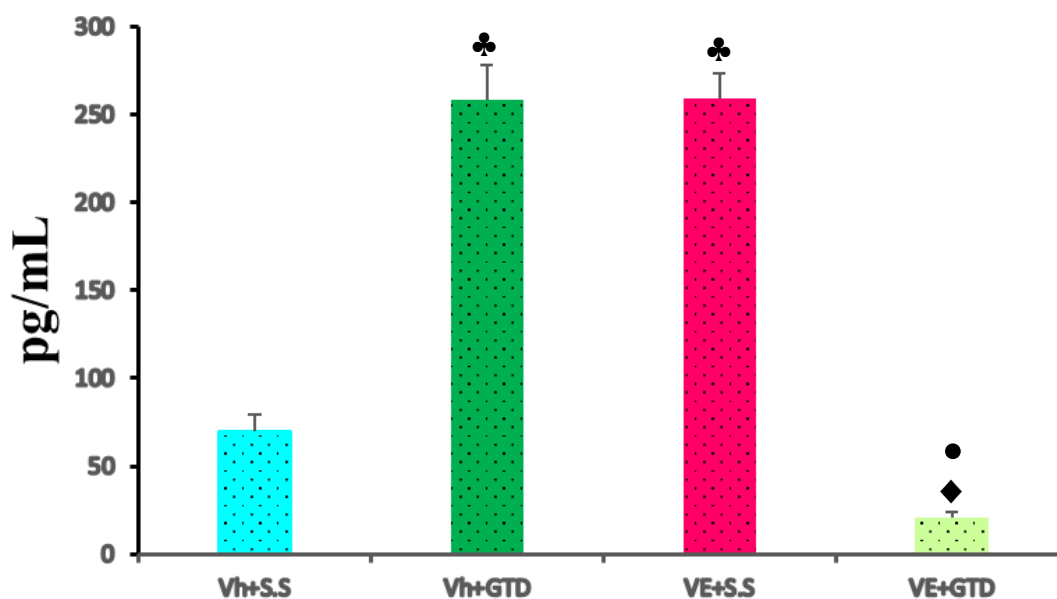


♣ $p < 0.05$ vs. grupo Vh+SS; ◆ $p < 0.05$ vs. grupo VE+SS (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer)

Figura 26. Media \pm eem en la concentración de **testosterona** en suero de animales inyectados con Vh a los 14 días de vida y posteriormente con solución salina (Vh+SS) o con guanetidina (Vh+GTD) del día 29 al 49 de vida, o de animales inyectados con VE a los 14 días de vida y posteriormente con solución salina (VE+SS) o con guanetidina (VE+GTD) del día 29 al 49 de vida y sacrificados a los 80 días al presentar un estro vaginal.

En los animales tratados con Vh+GTD incrementó la concentración de **estradiol** sérico respecto a los animales tratados con Vh+SS, mientras que en los animales tratados con VE+GTD disminuyó la concentración de **estradiol** sérico respecto a los animales tratados con VE+SS (Figura 27).

En el grupo con VE+SS la concentración de estradiol sérico es mayor respecto a la registrada en el grupo Vh+SS, mientras que en el grupo de VE+GTD la concentración de la hormona fue menor respecto al grupo Vh+GTD (Figura 27).



♣ p < 0.05 vs. grupo Vh+S.S.; ◆ p < 0.05 vs. grupo VE+S.S.; ● p < 0.05 vs. grupo Vh+GTD (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer)

Figura 27. Media \pm eem en la concentración de **estradiol** en suero de animales inyectados con Vh a los 14 días de vida y posteriormente con solución salina (Vh+SS) o con guanetidina (Vh+GTD) del día 29 al 49 de vida o de animales inyectados con VE a los 14 días de vida y posteriormente con solución salina (VE+SS) o con guanetidina (VE+GTD) del día 29 al 49 de vida y sacrificados a los 80 días al presentar un estro vaginal.



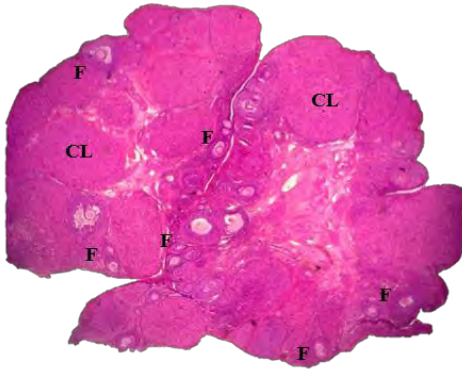
Morfología ovárica

En los cortes histológicos de los animales Testigo absoluto encontramos la presencia de folículos en diferente estadio de desarrollo, así como la presencia de cuerpos lúteos (Figura 28).

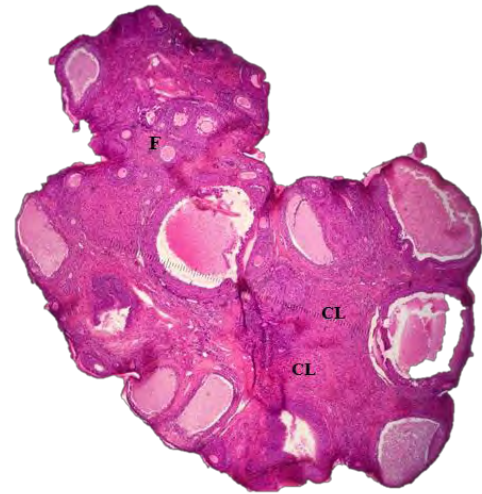
En los ovarios del animal tratado con GTD encontramos la presencia de folículos en diferente estadio de desarrollo y de cuerpos lúteos (Figura 28).

En los cortes de los ovarios de los animales con VE encontramos la presencia de quistes ováricos, característico de los animales que desarrollan el SOPQ, mientras que en los cortes de los animales con VE y posteriormente tratados con GTD ya no se observan los quistes foliculares y se puede apreciar la presencia de folículos en diferentes estadios de desarrollo (Figura 28).

Testigo absoluto



Guanetidina



Valerato de estradiol



Valerato de estradiol + Guanetidina



F: folículo CL: cuerpo lúteo Q: quiste

Figura 28. Cortes histológicos de ovarios de animales testigo absoluto, animales inyectados con VE a los 14 días de vida, animales inyectados con GTD del día (29-49) de vida y animales inyectados con valerato de estradiol y posteriormente inyectados con guanetidina (VE+GTD) del día 29 al 49 de vida y sacrificados a los 80 días al presentar un estro vaginal.



DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que en el modelo del animal con SOPQ la destrucción de las fibras NAérgicas con GTD permitió el restablecimiento de la respuesta ovulatoria y de la secreción de testosterona y estradiol.

En el estudio de los mecanismos implicados en el desarrollo del SOPQ, se ha utilizado diversos modelos experimentales (Mannerás y col., 2007; Feng y col., 2009).

El modelo que permite el desarrollo de las características neuroendócrinas que tipifican al síndrome es mediante la administración de una dosis de VE (Barria y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003; Morales-Ledesma y col., 2010; Cruz y col., 2012 y Linares y col., 2013).

La hiperactividad de las fibras simpáticas que se produce en respuesta a la inyección con VE culmina con la falta de ovulación, tal y como ya ha sido reportado (Barria y col., 1993; Morales-Ledesma y col., 2010; Linares y col., 2013; Ramírez, 2014). Los resultados del presente estudio apoyan la idea de que los mecanismos que desencadenan el SOPQ se producen en respuesta al aumento del tono simpático que recibe el ovario.

En el presente estudio se observó que en la rata infantil la administración de una dosis de VE, el cual es un estrógeno con vida media de 15 días, resulta en anovulación y la pérdida del ciclo estral. La falta de ovulación puede ser el resultado del hiperandrogenismo que induce el VE, tal y como ya ha sido sugerido (Barria y col., 1993; Morales-Ledesma y col., 2010; Linares y col., 2013; Ramírez, 2014), otra posibilidad, es que la anovulación sea el resultado



de una mayor hiperactividad de los nervios simpáticos, ya que cuando se realiza la sección bilateral del NOS, principal aporte noradrenérgico al ovario, se restablece la ovulación (Barria y col., 1993).

El grupo de Cruz (2012) mostró que los efectos a la administración de VE se presentan durante una ventana de tiempo. La administración del fármaco a ratas recién nacidas, a los 7, 14 ó 21 días de edad resulta en el adelanto del inicio de la pubertad y en la interrupción del ciclo estral, efecto que no se produce si el fármaco se inyecta a los 30 días de edad. En el presente estudio se observó que al inyectar el VE a los 14 días de edad, se produce la canalización de la vagina cuatro días posteriores, tal y como ya lo hemos reportado en la rata de diez días de edad (Morales-Ledesma y col., 2010; Linares y col., 2013). Algunos autores han explicado el adelanto en la pubertad como resultado del incremento en la concentración de estradiol plasmático, el cual estimula la ruptura de la membrana vaginal, y con ello el inicio de la pubertad y la competencia reproductiva (Rosa-E-Silva y col., 2003).

En este estudio la inyección con VE induce alteración en el patrón del ciclo estral, donde se observaron períodos de diestros alternados con estros, sin presentar un proestro típico, efecto que ya ha sido reportado (Barria y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003). Se plantea que un factor responsable de la irregularidad en el patrón del ciclo estral es la inhibición tónica de la secreción de gonadotropinas lograda por las elevadas concentraciones de estrógenos circulantes, que se derivan de la aromatización periférica de los andrógenos (Barria y col., 1993). Esta idea es apoyada por el hecho de que el VE induce aumento en la concentración de estradiol desde la segunda hasta la octava semana después de su administración. Debido a que el VE desaparece de la



circulación 15 días después de su administración, los autores sugieren que en el animal con SOPQ el estradiol es de origen ovárico (Brawer y col., 1978).

Otra alternativa para explicar la irregularidad en el patrón del ciclo estral son las altas concentraciones de NA que se producen en respuesta a la inyección con VE, idea que se apoya por el hecho de que la disminución de la amina por la sección bilateral del NOS restablece el patrón del ciclo estral (Barria y col., 1993).

Aún cuando los animales con SOPQ no ovulan, la concentración de progesterona no se modifica (Barria y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003; Morales-Ledesma y col., 2010; Cruz y col., 2012 y Linares y col., 2013). Resultados similares se observan cuando se realiza la destrucción selectiva de las fibras simpáticas por la inyección con GTD durante tres semanas, o cuando se inyecta el VE y se deja transcurrir la vida media del fármaco e inmediatamente es inyectada la GTD. Tomando en conjunto estas evidencias sugerimos que en la rata con o sin el síndrome, la inervación simpática no está participando en la regulación de la secreción de progesterona. Es posible que la progesterona que cuantificamos provenga de la glándula adrenal tal y como se evidencia en el animal adulto (Flores y col., 2005).

Se ha observado que el incremento del tono simpático del ovario, inducido por estrés por frío durante ocho semanas, resulta en el incremento de la concentración de testosterona (Bernuci y col., 2013). Similar a nuestro modelo inyectado con VE, donde observamos el hiperandrogenismo característico de los animales que son tratados con el estrógeno. Esta respuesta ha sido explicada por el incremento en la concentración de NA ovárica que se produce por el VE (Barria y col., 1993 y Rosa-E-Silva y col., 2003), ésta actúa en las células de la teca folicular de manera sinérgica con la LH, lo que



se traduce en el aumento de la concentración de andrógenos (Yen, 2001; Dolz, 2010).

En las células de la granulosa de mujeres con SOPQ se incrementa la actividad de la 5-alfa reductasa, lo que se traduce en una mayor transformación de la androstendiona a 5α -androstano-3,17-diona, la cual actúa como un inhibidor competitivo de la actividad de la aromatasa, este evento explicaría por qué en la mujer se registra una concentración baja de estradiol (Sanjay y col., 1996; Magoffin 2006). A diferencia de lo que ocurre en la mujer, en la rata con SOPQ, posiblemente la actividad de las aromatasas no se inhiba, ya que la inyección del VE a los 14 días de edad resulta en el aumento de la concentración de estradiol cuando el animal ha llegado a la etapa adulta, semejante a lo que se ha reportado en estudios previos (Brawer y col., 1978; Barria y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003; Morales-Ledesma y col., 2010; Cruz y col., 2012 y Linares y col., 2013). Nuestros resultados nos hacen pensar que el incremento en estradiol se debe a una mayor aromatización de los andrógenos, y descartamos que se deba a la acción permanente del VE, ya que el fármaco tiene una vida media de 15 días (Rosa-E-Silva y col., 2003).

El grupo de Chávez (2007) mostró que en la rata adulta la administración de GTD por ocho días resulta en la disminución del porcentaje de animales ovulantes, mientras que el número de ovocitos liberados y la ciclicidad estral no se modifica. En el presente estudio se observó la misma respuesta cuando la administración de GTD se realizó en ratas de 29 días de edad durante tres semanas, confirmando que se produjo la ovulación por la presencia de cuerpos lúteos recién formados. Además sugerimos que en ciclos subsecuentes podría seguir ovulando ya que observamos folículos en diferentes etapas de desarrollo.



La participación de la inervación simpática en la regulación de la secreción de testosterona parece depender del modelo experimental, ya que en un animal con SOPQ la modula de manera estimulante, mientras que en la rata sin el síndrome parece no participar, dado que observamos que la eliminación de las fibras NAérgicas por la inyección con GTD no modificó la concentración de la hormona.

En la cobaya recién nacida la administración de tres dosis por semana de GTD, resulta en altas concentraciones séricas de estrógenos cuando los animales son sacrificados 24 horas después de la última inyección. Los autores sugieren que este incremento está dado por el aumento en el número de folículos antrales capaces de producir una mayor concentración de estradiol (Riboni y col., 1998). Este incremento en estradiol también lo observamos cuando inyectamos la GTD en la rata juvenil durante tres semanas, y sacrificamos a los animales 66 días posteriores a la última inyección. Si bien en la histología ovárica señalamos que hay folículos en crecimiento, se requiere realizar un estudio más fino en el que se cuenten todos los tipos de folículos y se analice si existe una correlación entre la población folicular y la concentración de estrógenos en plasma.

Al momento existen varias hipótesis que tratan de explicar el origen del SOPQ. Algunos autores proponen que resulta en respuesta a la alteración en el patrón de secreción de la GnRH y de la LH (Yen, 2001; Dolz, 2010) y otros que se origina por una modificación en la actividad de los nervios que llegan al ovario (Barria y col., 1993; Lara y col., 1993; Lara y col., 2000; Rosa-E-Silva y col., 2003; Morales-Ledesma y col., 2010).



El desarrollo del SOPQ no solo se ha atribuido al incremento en la concentración de NA, también se ha postulado que puede darse en respuesta al incremento en la concentración de VIP. Al respecto, el grupo de Parra (2007) mostró que los ovarios provenientes de animales tratados con VE son capaces de sintetizar más VIP que un ovario sin la patología. Por lo anterior, no se puede concluir que el SOPQ sea el resultado exclusivo del incremento en el tono noradrenérgico del ovario.

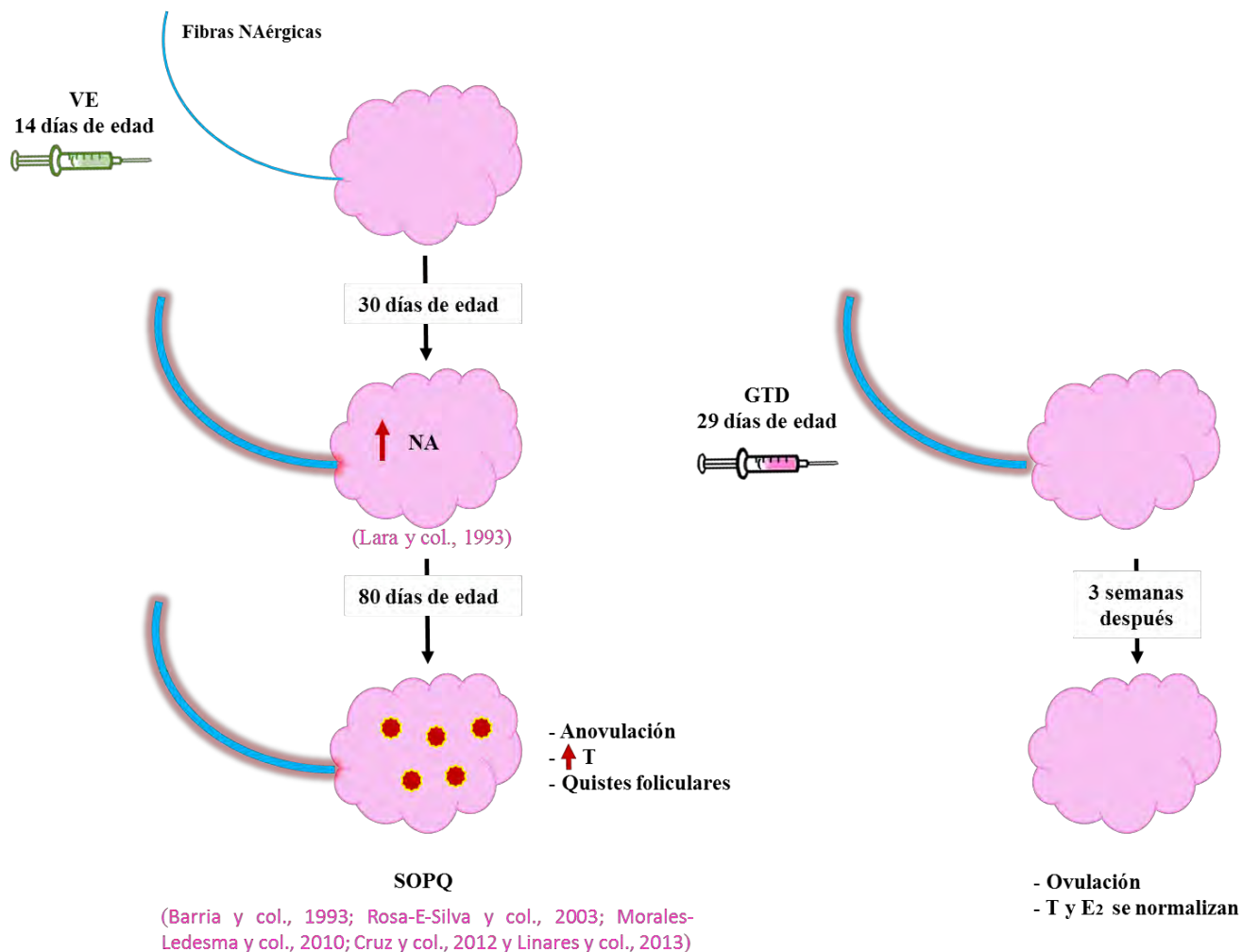
En este trabajo en las ratas hembras con SOPQ, inducido con VE, en las que se eliminaron exclusivamente las fibras noradrenérgicas por la administración de GTD se restableció el patrón del ciclo estral, y aproximadamente el 80% de los animales ovularon con una cuota ovulatoria semejante a la de un animal sin la patología. Dado que los cortes histológicos de los animales con SOPQ y denervados mostraron la presencia de folículos y no encontramos quistes y prequistes, podemos pensar que en los siguientes ciclos estrales los animales serán capaces de seguir ovulando. Resultados que nos permiten sugerir que es la NA la que tiene un papel estimulante en el desarrollo de SOPQ.

En la rata con SOPQ, la sección uni o bilateral del NOS normaliza la concentración de testosterona, respuesta que se ha atribuido a la disminución de la concentración de NA en el ovario (Barria y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003; Morales-Ledesma y col., 2010). Esta idea es apoyada por el presente estudio, donde la eliminación exclusiva de la información NAérgica por la administración de GTD normaliza la concentración de la hormona. Estas evidencias permiten sugerir que en el animal inyectado con VE la inervación NAérgica ejerce un efecto estimulante en la persistencia del SOPQ.



En los animales con VE y posteriormente inyectados con GTD se observa una disminución en la concentración de estradiol, por lo que sugerimos que el aporte noradrenérgico juega un papel estimulante en la regulación de esta hormona.

En este estudio se logró un buen modelo de inducción del SOPQ, ya que observamos hiperandrogenismo, anovulación y en los cortes histológicos la presencia de quistes foliculares, características que han sido utilizadas como criterios del síndrome en modelos animales. Dado que la eliminación del aporte simpático que recibe el ovario por la administración de GTD es capaz de restablecer la respuesta ovulatoria y la secreción de testosterona, apoyamos la idea de que el SOPQ puede originarse en respuesta a la mayor actividad de la inervación extrínseca de naturaleza NAérgica que llega al ovario (Modelo).



Modelo. En la rata infantil la administración de VE a los 14 días de edad resulta en la hiperactividad de las fibras nerviosas en el día 30 causada por el aumento de NA ovárica (Lara y col., 1993). A los 80 días de edad presentan anovulación, hiperandrogenismo y la presencia de quistes foliculares, características que tipifican al SOPQ (Barria y col., 1993; Lara y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003; Morales-Ledesma y col., 2010; Cruz y col., 2012; Linares y col., 2013).

Cuando a estos animales con VE se les administra GTD en el día 29 de edad por 3 semanas, los animales son capaces de ovular y de presentar la concentración de T y E2 semejante a la de un animal intacto.



CONCLUSIONES

- ❶ En el animal con SOPQ, la noradrenalina regula de manera estimulante la secreción de testosterona y estradiol, y no participa en la regulación de la secreción de progesterona.
- ❷ En el animal denervado con GTD, la tasa ovulatoria es regulada de manera inhibitoria, mientras que no participa en la regulación de la secreción de hormonas esteroides.
- ❸ En el animal con SOPQ la falta de información NAérgica facilita la ovulación y normaliza la concentración de testosterona y estradiol, mientras que no participa en la secreción de progesterona.
- ❹ En el animal inyectado con VE la inervación NAérgica ejerce un efecto estimulante en la persistencia del SOPQ.



REFERENCIAS

- Acuña E, Fornes R, Fernandois D, Garrido M, Greiner M, Lara H, Paredes A. Increases in norepineprine reléase and ovarian cyst formation during ageing in the rat. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2009; 64: 1-13.
- Agarwal S, Judd H, Magoffin D. A mechanism for suppression of estrogen production in women with polycystic ovary syndrome. *The Journla of Clinical Endocrinol & Metabolism* 1996; 81:3686-91.
- Aguado L, Ojeda S. Ovarian adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion. *Endocrinology*. 1984; 84: 1145-1944.
- Aguado L. Role of the Central and Peripheral Nervous System in the Ovarian Function. *Microscopy Research and Technique*. 2002; 59:462-473.
- Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HE, Futterweit W. Criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an androgen excess society guideline. *The Journla of Clinical Endocrinol & Metabolism* 2006; 91: 4237-4245.
- Barria A, Leyton V, Ojeda S, Lara H. Ovarian steroidal response to gonadotropins and β -adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: Role of sympathetic innervation. *Endocrinology*. 1993; 133: 2696-2703.
- Bassett S, Zeleznik A. Acute supression of FSH secretion by oestradiol in the ovariectomized rhesus monkey. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1990; 88: 441-446.
- Becú-Villalobos D, Lacau-Mengido IM. Control hormonal del desarrollo puberal en la rata hembra. *Acta Physiology Pharmacology Latinoamerican* 1990; 40: 1-17.



- Ben-Jonathan N, Arbogast L, Rhoades T, Bahr J. Norepinephrine in rat ovary: Ontogeny and de novo synthesis. *The Endocrine Society*. 1984; 84: 1154-1426.
- Bernuci M, Leite C, Barros P, Kalil B, Leoni G, Bianco-Borges, Franci C, Szaeka R, Lara H, Anselmo-Franci. Transitory activation of the central and ovarian norepinephrine systems during cold stress-induced polycystic ovary in rats. *Journal of Neuroendocrinology* 2013; 25: 23-33.
- Braw R, Tsafiriri A. Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* 1980; 59: 267-272.
- Brawer J, Muñoz M, Farookhi R. Development of the polycystic ovarian condition (POC) in the Estradiol Valerate-treated rat. *Biology of Reproduction* 1986; 35: 647-655.
- Brawer J, Naftolin F, Martin J, Sonnenschein C. Effects of a single Injection of Estradiol Valerate on the Hypothalamic Arcuate Nucleus and on Reproductive Function in the Female Rat. *Endocrinology* 1978; 107: 274- 279.
- Chedrese J. Regulación autocrina y paracrina del desarrollo folicular I: efectos de los esteroides. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 2003; 16: 2.
- Chun S, Billig H, Tilly J, Furuta I, Tsafiriri A, Hsueh A. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 1994; 135: 1845-1853.
- Couse J, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson J, Korach K. Tissue distribution and quantitation analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) mRNA in wild-type and ER- α knockout mouse. *Endocrinology*, 1997; 138:4613-4621.
- Cruz G, Barra R, González D, Sotomayor-Zárate R, Lara H. Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian



function causing polycystic ovary morphology in rats. *Fertility and Sterility* 2012; 98: 0015-0282.

- Díaz BN. Bioquímica básica de las hormonas esteroideas: Biología y clínica del cáncer. *Biocáncer*2, 2004.
- Dissen GA, Ojeda SR. Ovarian Innervation. *Encyclopedia of Reproduction*. 1999; 3: 583-589.
- Dohler K, Wuttke W. Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *The Endocrine Society*. 1975; 97: 898-907.
- Dolz M. “Síndrome de ovario poliquístico 1. Fisiopatología y Diagnostico” En: Bonilla-Musoles F, Dolz M, Moreno D, Raga F (Eds.). *Reproducción Asistida. Abordaje en la práctica clínica*. Editorial Médica Panamericana. España. 2010; Cap. 11.
- Domínguez R, Chávez R, Cruz M. 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 163-191.
- Edson M, Nagaraja A, Matzuk M. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine*. 2009; 30: 624-712.
- Foghi A, Ravandi A, Teerds K, Van Der D, Kuksis A, Dorrington J. Fas-induced apoptosis in rat thecal/interstitial cells signals through sphingomyelin-ceramide pathway. *Endocrinology* 1998; 139: 2041-2047.
- Flores A, Meléndez G, Palafox M, Rodríguez J, Barco A, Chavira R, Cruz ME. The participation of the cholinergic system in regulating progesterone secretion through the ovarian-adrenal crosstalk varies along the estrous cycle. 2005; 2: 145-151.



- Freeman M. The Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat tomado de The Physiology of Reproduction, Second Edition, edited by E. Knobil and J.D. Neill, Raven Press, Lid., New York. 1994; 46: 615-620.
- Goodman A, Hodgen G. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. Recent Progress in hormone Research Journal. 1983; 39:1-73.
- Guyton A. Fisiología femenina antes de la gestación, y hormonas femeninas, tomado de Tratado de fisiología médica. Editorial McGrawHill 1997; 1115-1132.
- Karsch F, Weick R, Hotchkiss J, Dierscke D, Knobil E. An analysis of the negative feedback control of gonadotropin secretion utilizing chronic implantation of ovarian steroids in ovariectomized rhesus monkeys. Endocrinology 1973; 93:478-486.
- Klein C, Burden H. Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. Neurosci Lett 1988; 85:217-22.
- Lara H, Dissen G, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler J, Ojeda S. An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of the steroid-induced polycystic ovary in the rat. Endocrinology 2000; 141:1059-1072.
- Lara H, Ferruz S, Luza S, Bustamante A, Borges Y, Ojeda S. Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. Endocrinology 1993; 133:2690-2695
- Lara H, McDonald J, Ojeda S. "Involvement of nerve growth factor in female sexual development". Endocrinology. 1990; 126:364-375.
- Lawrence IE Jr, Burden H. The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. The Anatomical Record. 1980; 196:51-6.



- Linares R, Hernández D, Morán C, Chavira R, Cárdenas M, Domínguez R, Morales-Ledesma L. Unilateral or bilateral vagotomy induces ovulation in both ovaries of rats with polycystic ovarian syndrome. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2013; 68: 1477-7827.
- Magoffin D. Ovarian enzyme activities in women with polycystic ovary syndrome. *Department of Obstetrics and Gynecology*. 2006; 86: 0015-0282.
- Malamed S, Gibney J, Ojeda S. Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in rat. *Cell and Tissue Res* 1992; 270: 87-93.
- Malgor L, Valsecia M. *Farmacología Médica: Farmacología general y del sistema nervioso autónomo*. 2000; 1: 121- 122.
- Mayerhofer A, Dissen G, Costa M, Ojeda S. A role for neurotransmitters in early follicular development: Introduction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*. 1997; 138: 3320-3329.
- McGee E, Hsueh A. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine*. 2000; 21: 200-214.
- Morales-Ledesma L, Linares R, Rosas G, Morán C, Chavira R, Cárdenas M, Domínguez R. Unilateral sectioning of the superior ovarian syndrome restores ovulation in the innervated ovary. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2010; 8:1-7.
- Morales-Ledesma L, Vieyra E, Ranirez D, Trujillo A, Chavira R, Cárdenas M, Domínguez R. Effects on steroid hormones secretion resulting from the acute stimulation of sectioning the superior ovarian nerve to pre-pubertal rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2012; 10:88 doi 10.1186/1477-7827-10-88.



- Parra C, Fiedler J, Luna S, Greiner M, Padmanabhan V, Lara H. 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*. 2007; 133: 147-154.
- Ramírez SM. Tesis de Licenciatura: Efectos 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. 2014.
- Ricu M, Paredes A, Greiner M, Ojeda S, Lara H. Functional development of the ovarian noradrenergic innervation. *Endocrinology*. 2008; 149: 50-56.
- Riboni L, Escamilla C, Chavira R, Domínguez R. Effects of peripheral sympathetic denervation induced by guanethidine administration on the mechanisms regulating puberty in the female guinea pig. *Journal of Endocrinology* 1998; 156: 91-98.
- Rosa-E-Silva A, Guimaraes M, Padmanabhan V, Lara H. Prepubertal administration of estradiol valerate disrupts cyclicity and leads to cystic ovarian morphology during adult life in the rat: role of sympathetic innervation. *Endocrinology*. 2003; 144: 4289-4297.
- Sánchez-Criado J. Fisiología del Ovario. En Tresguerres JA. (Eds.) *Fisiología humana* 2da. Edición. Editorial MacGraw-Hill-Interamericana. Madrid, España. 1999; 75: 1040-1055.
- Sanjay K, Howard L, Magoffin A. A mechanism for the suppression of estrogen production in polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinol & Metabolism*. 1996; 81: 3686-3691.
- Tilly J, Kowalski K, Johnson A, Hsueh A. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 1991; 129: 2799-2801.



- Tresguerres H. Fisiología del ovario. En: Tresguerres H (Eds.). Fisiología humana. 4^a Edición. Editorial McGraw-Hill. Madrid, España. 2010; 75: 1020-1030.
- Yen S. “Ciclo Menstrual Humano: Regulación Neuroendocrina”. En Yen S, Jaffe R, Barbieri R. (Eds.) Endocrinología de la reproducción: Fisiología, fisiopatología y manejo clínico. 4ta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2001; 7: 203-212. .
- Zawadski J, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens J, Haseltine F, Merriam G, eds. Polycystic ovary syndrome. Boston: Blackwell Scientific Publications 1992; 377-384.
- Zeleznik A, Wildt L, Schuler H. Characterization of ovarian folliculogenesis during the luteal phase of the menstrual cycle in rhesus monkeys using [H3] thymidine autoradiography. Endocrinology, 1980; 107: 982-988.