



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**¿En la rata adulta el estrés por frío o luz
constante inducen el Síndrome de
Ovario Poliquístico?**

TESIS

Que para obtener el título de:

BIÓLOGO

Presenta:

YERED MISAEL SALAZAR GARCÍA

Directora de tesis:

DRA. LETICIA MORALES LEDESMA



Ciudad de México

Marzo 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

***¿En la rata adulta el estrés por frío o luz
constante inducen el Síndrome de Ovario
Poliquístico?***

TESIS

Que para obtener el título de:

BIÓLOGO

Presenta:

YERED MISAEL SALAZAR GARCÍA

Directora de tesis: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA

INVESTIGACIÓN REALIZADA GRACIAS AL PROGRAMA

UNAM-DGAPA-PAPIIT clave IN217016





UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.**

Comunico a usted que el alumno **SALAZAR GARCÍA YERED MISAEL**, con número de cuenta **308321021**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **13 de marzo de 2018** a las **13:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. PATRICIA ROSAS SAUCEDO

VOCAL Dra. LETICIA MORALES LEDESMA

SECRETARIO M. en E.S. MARÍA CRISTINA ALVARADO DOMÍNGUEZ

SUPLENTE Dra. ADRIANA GUTIÉRREZ HOYA

SUPLENTE Dra. DEYRA DE LOS ÁNGELES RAMÍREZ
HERNÁNDEZ

[Handwritten signatures of the jury members]

El título de la tesis que presenta es: **¿En la rata adulta el estrés por frío o luz constante induce el síndrome de ovario poliquístico?.**

Opción de titulación: Tesis.

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 31 de enero de 2018

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por haber sido tan generosa conmigo, ya que dentro de sus instalaciones no solo me ofreció el conocimiento académico en las diferentes áreas del aprendizaje, también en ella experimente las mejores experiencias de mi vida, las cuales llevare conmigo hasta que la memoria me falle.

A la Dra. Leticia Morales Ledesma, le doy gracias por haberme brindado la oportunidad de ingresar en su equipo de trabajo, por tenerme toda la paciencia del mundo. De igual forma le agradezco su amabilidad y su aporte de sabiduría, la cual enriqueció aún más mi forma de ver el mundo. Gracias Doctora.

A los miembros del Comité de Sinodales:

- Dra. Patricia Rosas Saucedo*
- Dra. Leticia Morales Ledesma*
- M. en E.S. María Cristina Alvarado Domínguez*
- Dra. Adriana Gutiérrez Hoya*
- Dra. Deyra de los Ángeles Ramírez Hernández*

Por contribuir en la mejora de este trabajo.

A todo el personal del bioterio en especial a las Dras. Adriana y Elizabeth y al Dr. Román, por los cuidados y atenciones que tuvieron hacia los animales utilizados para este trabajo.

Al Biol. Roberto Chavira por su apoyo en la cuantificación de hormonas que se usaron en este estudio.

A las Ratas de la cepa CII-ZV.

A mis compañeros del laboratorio 7

Ya que con ustedes pase la mayor parte de mi tiempo durante mi última temporada dentro de la FES Zaragoza. Cada uno hizo agradable mi estancia dentro de laboratorio y me aportó algo nuevo.

*A la **Bióloga Líz** y al **Biólogo Daniel**, les doy las gracias porque fueron los primeros que me ofrecieron su amistad dentro del laboratorio y me enseñaron que hay "Jerarquías" y que se puede comprar una penca completa de plátano.*

*A la **Biol. Rocío alias Chító**, y a las señoritas **Dianas**, les agradezco honestidad y su paciencia.*

***Ale-Ale-jandro**, aunque pertenezcas al otro lado de laboratorio y me hicieras tanto bullying, me caíste muy bien y te estimo.*

*A **Karí** sé que no compartimos mucho tiempo, pero lo que se compartió me agradó.*

*A **Hugo** aunque llevamos poco tiempo de conocernos se nota que eres una gran persona y he pasado momentos llenos de risa contigo.*

*A la **Dra. Dey** gracias por siempre mostrar una sonrisa y ser tan buena persona.*

*A la **Dra. Rosa** le doy las gracias por los "jalones de oreja" que me dio ya que con ellos, mejore mi forma de trabajo dentro de laboratorio.*

Fue un placer haber compartido ese pequeño espacio llamado laboratorio, con todos ustedes.

A mis amigos de la UNAM

A mi amiga la **Química en Alimentos Andrea (Andy)** fuiste de mis primeras amigas dentro de la UNAM y 10 años después aún seguimos aquí sin dejar de hablar, me has aportado tanto conocimiento académico así como días y noches llenas de risa, gracias.

A mis amigos **Bimbo** y **Loola** con los que siempre conté, ya que nunca me dejaron en esos momentos difíciles, son lo máximo los "Amodoro".

A mi amiga, la única, la inigualable... la **Bióloga Wendy** alias la **Winnis**, no tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí, el que me hayas brindado tu amistad aun en esos días cuando no la merecía, siempre estuviste ahí nunca me dejaste caer. El universo y sus estrellas no me bastan para explicar cuan agradecido estoy contigo y con la vida por haberte puesto en mi camino. Te Quiero Mucho AMIGA. Posdata: NO le tomes impresión de pantalla.

A la **Biol. Fanny Lu Fachon** y al **Ing. Kike**, gracias son buenos amigos, con ustedes pase buenos momentos que ahora solo son recuerdos pero que siempre conservare con amor y cariño. Valen Mil.

A **Jaqueline** alias la **Chakalin**, amiga fuiste tan buena y la más tranquila de la manada, claro cuando no te salía la pequeña velociraptor. Fue un placer haberte conocido.

A la compañera de intercambio de Japón, **Paula** la más extravagante del grupo, fuiste una gran compañera y amiga. Siempre recordare tu peculiar grito con el que nos hacías ponernos las pilas y esa lengua que no se callaba nada.

A mis amigos del CUBO 608, **Rodrigo, Adriana, Irlanda y Jessica**, son unas excelentes personas llenas de fiesta y diversión.

A los **Biólogos Cesar** e **Ivan**, quienes también pertenecían al laboratorio 7, de ustedes aprendí que el NSQ es una

estructura pareada. **Cesar** nunca imagine que me llegarías a caerme tan bien, misteriosos son los caminos de la vida. **Ivan** este poco tiempo que llevo conociéndote he notado que eres una persona estupenda de las que ya no hay muchas y aunque a veces peleamos eres un buen amigo.

A la próxima Doctora en Ciencias la M. en C. **Azucena Espinoza** alias **Achucheeena**. Eres una gran-gran persona, de las más inteligentes y amables que he conocido en esta vida. Te agradezco que me hayas ayudado a lo largo de mi estancia en el laboratorio, siempre recordare esas dietas basadas en PAPITAS.

Alfredo y **Alexa** amiguitos de laboratorio 5 recordare cuando trataban de sonsacarme para entrar más tarde a mi laboratorio. Son una pareja muy divertida. Yo y el cuarto de microscopios los recordaremos.

A todos y cada uno de ustedes gracias por dejarme ser parte de sus vidas, los estimo bastante y aunque nuestros caminos tomen diferentes direcciones tengan en cuenta que yo siempre los recordare y que pueden contar conmigo, tengan en cuenta las palabras sabias de Eva Rojas: "Amistad es de Amigo".

*En memoria de **Mateo Guzmán**, amigo como dicen sólo te nos adelantaste ya que para ese rumbo vamos todos. Me enseñaste tantas cosas, como a ser tolerantes con aquellos que parecieran ser diferentes a uno. Aun se siente tu vacío en la FES ya que tu risa discreta nadie la puede igualar. Siempre te recordare...*

"entre cada tacón, punta tacón".

DEDICATORIAS

*Esta tesis está dedicada a esas personas que siempre creyeron en mí, aun cuando yo no lo hacía. Estas personas en particular son mi **Familia**.*

*Le dedico esta tesis a mi **Madre Evelia** alias la **Osa**. Me has dado tanto y yo tan poco. Me has enseñado tantas cosas de la vida, entre estos aprendizajes me enseñaste que en la vida hay que luchar y no rendirse, que si caemos solo nos queda levantarnos y seguir adelante. A ti que siempre mantuviste una sonrisa en la adversidad, a ti mi gran amiga te dedico este trabajo siempre estaré en deuda contigo.*

*Le dedico este trabajo a mi **Padre Ernesto**, pues a pesar de ser una de tus mayores desilusiones en la vida, nunca me has dejado y me apoyaste a terminar mi carrera.*

*A mi **Hermana Belinda** alias la **Pachona**, quien me mostro que la belleza no está peleada con la inteligencia. Hermana te dedico esta tesis y quiero decirte que nunca te rindas, el camino a veces parece largo y con muchas pendientes pero si se puede, si yo pude tú también lo harás, tienes mi apoyo incondicional. Serás la mejor Relacionista Internacional, **NUNCA** dejes que las voces del exterior detengan tu avance, la vida está hecha de decisiones que uno mismo toma así que elige las que mejor te convengan.*

Gracias Familia

"Recuerden que si alguien los abuchea en el escenario, son sólo los aplausos de fantasmas"

- Sharon Needles

"Si vale cada hueso roto, juro que viví"

- One Republic

"Algunos van a triunfar, algunos van a fracasar, algunos nacieron para cantar blues... No dejes de creer aférrate a ese sentimiento"

- Journey

Índice:

ABREVIATURAS	I
RESUMEN	II
INTRODUCCIÓN	IV
MARCO TEÓRICO	1
ESTRÉS	1
▪ <i>Estímulo Estresante.....</i>	<i>1</i>
▪ <i>Respuesta al estrés.....</i>	<i>1</i>
▪ <i>Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.....</i>	<i>2</i>
OVARIO.....	4
▪ <i>Inervación del ovario.....</i>	<i>5</i>
FOLICULOGÉNESIS.....	7
▪ <i>Regulación neuroendocrina de la ovulación.....</i>	<i>9</i>
▪ <i>Ovulación.....</i>	<i>11</i>
ESTEROIDOGÉNESIS	12
CICLO ESTRAL.....	15
SÍNDROME DEL OVARIO POLIQUÍSTICO	15
▪ <i>La inducción del SOP como modelo de estudio.....</i>	<i>16</i>
EL ESTRÉS COMO MODELO DE INDUCCIÓN DEL SOP	18
▪ <i>Luz constante.....</i>	<i>18</i>
▪ <i>Estrés por frío.....</i>	<i>19</i>
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS:	23
PRIMER EXPERIMENTO:	23
SEGUNDO EXPERIMENTO:	23
OBJETIVO GENERAL:	24
OBJETIVOS PARTICULARES:	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
GENERALIDADES	25
TOMA DE FROTIS	25
ESTRÉS	25
▪ <i>Estrés crónico por frío, ratas adultas que sin considerar su día del ciclo estral... 25</i>	<i>25</i>
▪ <i>Estrés crónico por frío iniciado en el Diestro I.....</i>	<i>25</i>
▪ <i>Estrés intermitente por frío.....</i>	<i>25</i>

▪ <i>Estrés por luz constante</i>	25
▪ <i>Grupo testigo</i>	25
AUTOPSIA	26
DESHIDRATACIÓN Y TINCIÓN DE LOS OVARIOS	26
BÚSQUEDA DE QUISTES FOLICULARES	26
CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES EN SUERO	27
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
RESULTADOS EXPERIMENTO I: EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A ESTRÉS POR FRÍO DE MANERA CRÓNICA O INTERMITENTE	29
PESO DE ÓRGANOS.....	29
PORCENTAJE DE ANIMALES OVULANTES Y NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS.....	31
CONCENTRACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES.....	33
MORFOLOGÍA OVÁRICA	35
DISCUSIÓN EXPERIMENTO I: EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A ESTRÉS POR FRÍO DE MANERA CRÓNICA O INTERMITENTE.	40
MODELO DEL EXPERIMENTO I	47
RESULTADOS EXPERIMENTO II: EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A LA LUZ CONSTANTE	49
PESO DE ÓRGANOS.....	49
PORCENTAJE DE ANIMALES OVULANTES Y NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS.....	50
CONCENTRACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES.....	51
MORFOLOGÍA OVÁRICA	52
DISCUSIÓN EXPERIMENTO II: EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A LA LUZ CONSTANTE.	55
MODELO DEL EXPERIMENTO II.....	57
CONCLUSIONES:.....	59
BIBLIOGRAFÍA:	60



Abreviaturas

17 β -HSD1: Enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1

ACTH: Hormona adrenocorticotropa

ACh: Acetilcolina

CRF: Factor liberador de corticotropina

CGRP: Péptido relacionado al gen que codifica a la calcitonina

CYP11A1: Enzima de desdoblamiento de la cadena lateral del colesterol

CYP 450: Enzima citocromo P450

DI: Diestro I

DII: Diestro II

E: Estro

E2: Estradiol

FSH: Hormona folículo estimulante

GCMS: Complejo del ganglio celiaco mesentérico superior

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

HHA: Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

HHO: Eje hipotálamo-hipófisis-ovario

LC: *Locus Ceruleus*

LH: Hormona luteinizante

NA: Noradrenalina

NGF: Factor de crecimiento neural

NOP: Nervio del plexo ovárico

NOS: Nervio ovárico superior

NPY: Neuropeptido Y

NPV: Núcleo paraventricular

NSQ: Núcleo supraquiasmático

P: Proestro

P4: Progesterona

RU486: Antiprogesterona

SOM: Somatostatina

SOP: Síndrome del ovario poliquístico.

SP: Sustancia P

StAR: Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda

T: Testosterona

TH: Tirosina hidroxilasa

VE: Valerato de estradiol

VIP: Péptido intestinal vasoactivo



Resumen

El Síndrome del Ovario Poliquístico (**SOP**) es un trastorno que afecta a las mujeres en la edad reproductiva, se caracteriza por altas concentraciones circulantes de andrógenos, oligo u anovulación y quistes foliculares ováricos. En los laboratorios se han implementado diferentes modelos para inducir el SOP, y poder estudiar su etiología, desarrollo y consecuencias a largo plazo. Muchos de estos modelos incluyen el uso de fármacos y diferentes estímulos estresantes.

Los estímulos estresantes son manifestaciones provenientes tanto del medio interno como externo del individuo, los cuales alteran su homeostasis y dependen de factores, como la intensidad y duración. El estímulo estresante provoca en el organismo una serie de respuestas inespecíficas para que el individuo enfrente esta alteración, son manifestaciones de emergencia las cuales son conocidas como respuesta al estrés. El estrés es el conjunto de respuestas que el organismo produce ante determinado estímulo estresante, este puede alterar e inhibir a corto o a largo plazo, los sistemas neuroendocrino, nervioso, cardiovascular e inmunológico así como funciones fisiológicas: digestión, reproducción, crecimiento, entre otras.

El estrés puede activar al sistema neuroendocrino conocido como el eje del estrés, el cual está compuesto por el hipotálamo, la hipófisis y la glándula adrenal, principalmente el producto final de su activación es la secreción de glucocorticoides. El estrés también activa el sistema nervioso simpático, el cual secreta concentraciones elevadas de adrenalina y noradrenalina. En el presente trabajo analizamos dos modelos de estrés utilizados para inducir el SOP, estrés por frío y estrés por la exposición a luz constante. Del primer estímulo estresante se tiene conocimiento que induce la secreción de catecolaminas y en el segundo se ha planteado que desregula los sistemas neuroendocrinos. En la literatura se tiene registrado que el frío y la luz constante, provocan alteraciones en las funciones reproductivas.

En el presente estudio, se utilizaron tres modelos de estrés por frío durante ocho semanas: 1) Exposición crónica, donde no se tomó en cuenta el día del ciclo estral para iniciarlo, 2) exposición crónica comenzando en el día del diestro I y 3) estrés de manera intermitente, es decir, se sometió al frío cada tercer día y con un horario variado que iban desde las 8:00 hasta 17:00h.

En el primer grupo, disminuyó la concentración de progesterona y estradiol, sin cambios en la concentración de testosterona. La histología ovárica fue semejante a la de un animal testigo, que se acompañó de una respuesta ovulatoria normal. Por lo que sugerimos que se produjo un proceso de adaptación.

En el segundo grupo, la histología del ovario reveló la formación de prequistes foliculares y algunos folículos en desarrollo. Esto se acompañó del incremento en la concentración de



testosterona y estradiol, mientras que la cuota ovulatoria fue menor. Resultados que indican que la respuesta del organismo depende del día del ciclo en el que se inicia el estrés.

En el tercer grupo, se observó disminución en el porcentaje de animales ovulantes y aumento en el número de ovocitos liberados cuando es comparado con el modelo de estrés crónico por frío iniciado en diestro I. La masa ovárica disminuyó y se acompañó de una histología donde se observan prequistes foliculares y escaso desarrollo folicular. La concentración de testosterona y estradiol aumentó. En este modelo aún no se da la adaptación.

El estrés por la exposición a la luz constante durante cuatro semanas, resultó en el aumento de la concentración de progesterona y testosterona, que se acompañó por la formación de prequistes foliculares y algunos folículos en desarrollo, sin modificación en la respuesta ovulatoria. Es posible que se requiera de un período de exposición más extenso para la inducción de quistes foliculares y de la disminución de la respuesta ovulatoria.

Tanto la exposición al frío como a la luz constante ocasionan cambios histológicos en el ovario lo que se acompaña de la disminución en la ovulación y alteraciones en la secreción de las hormonas esteroides. Dos de los modelos de estrés por frío al igual que la exposición a la luz constante provocaron hiperandrogenismo y prequistes ováricos. Solo la luz fue capaz de formar quistes foliculares en el ovario.



Introducción

Las funciones de los ovarios están reguladas por el eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario, por la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (**GnRH**), la cual estimula la síntesis y liberación de la hormona folículo estimulante (**FSH**) y la hormona luteinizante (**LH**), dos gonadotropinas necesarias para la maduración de los folículos en el ovario y la ovulación (Prieto y Velázquez, 2002; Leung y Cheng, 2004; Arce y col., 2006; Iglesias y col., 2007; Plant y Zeleznik, 2015). Aunado al testigo hormonal, el ovario es regulado por la inervación simpática, parasimpática y sensorial, que recibe respectivamente por el nervio ovárico superior (**NOS**), el nervio del plexo ovárico (**NPO**) y el nervio vago (Aneseti y col., 2001; Morales-Ledesma y col., 2007; Morales-Ledesma y col., 2010; Chávez y col., 2011; Fernandois y col., 2014).

Alteraciones en las vías, endocrina y nerviosa, están asociadas al desarrollo de patologías en la reproducción femenina, tal es el caso del SOP. El SOP es un trastorno que afecta a las mujeres en edad reproductiva, su etiología es multifactorial y compleja, tanto los factores genéticos, ambientales y las anomalías neuroendocrinas influyen en su origen y desarrollo. Para su diagnóstico se toma en cuenta el hiperandrogenismo, anovulación y ovarios poliquísticos. A pesar de que la patología también se asocia a diferentes alteraciones clínicas tales como hirsutismo, acné, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 éstos no son caracteres indispensables para su diagnóstico (Shi y col., 2012; Lubna, 2014).

El uso de modelos experimentales, es de suma importancia para comprender la etiología, desarrollo y los riesgos que puede llevar a largo plazo el SOP (Frank, 2009; Frank, 2012; Shi y Vine, 2012). Dado que se plantea que la alta concentración de noradrenalina (**NA**) es la responsable de inducir la formación de quistes foliculares, concentraciones altas de andrógenos y baja o nula liberación de ovocitos, uno de los modelos utilizados para inducir el SOP es el estrés crónico por frío, el cual induce hiperactividad del sistema simpático y altas concentraciones de **NA** (Paredes y col., 1998; Dorfman y col., 2003; Bernucci y col., 2008; Bernucci y col., 2013).

En nuestro laboratorio se ha utilizado en la rata prepúber el modelo de estrés crónico por frío, el cual no logra desarrollar las características que definen al síndrome, ya que no se produce el hiperandrogenismo ni se bloquea la ovulación. La histología ovárica en estos animales sólo revela la formación de prequistes ováricos. Los efectos que se observan en estos animales hacen sugerir que son un reflejo de la adaptación que el animal tiene hacia el estímulo estresante y que la edad del organismo hace que estos animales se adapten más fácilmente (Espinoza, 2014; Navarrete, 2014; Velázquez, 2016).

Otro modelo de estrés que se ha utilizado para la inducción del SOP, es la exposición a la luz constante. Se ha reportado que la luz constante, induce el desarrollo de quistes ováricos y



en algunos casos cuotas ovulatorias bajas. A pesar de ser un modelo estudiado desde hace décadas, hay pocos estudios que reportan las concentraciones séricas de testosterona en la rata hembra y ninguno de estos conjunta la parte de ovulación, con la secreción de las hormonas esteroides (Bradshaw y col., 1965; Lawton y Schwartz, 1967; Brawer y col., 1980; Shi y Vine, 2012; Kang y col, 2014).

El propósito del presente estudio, fue analizar si en la rata adulta existe un proceso de adaptación al frío que impida el desarrollo del SOP, en función del día del ciclo estral o del día y horario de exposición. En un segundo experimento analizamos si la exposición a luz constante es capaz de inducir las características del síndrome.



Marco Teórico

Estrés

Hans Selye en 1936 define al estrés como el “conjunto de respuestas inespecíficas del individuo, frente a cualquier alteración de la homeostasis”. También se puede definir como una situación en la que el organismo es expuesto a agentes que puedan alterar real o simbólicamente su integridad (estímulos estresantes). La respuesta que se genera, se denomina respuesta al estrés (Nelson, 1996; Álvarez, 2008), que tiene como objetivo mantener el equilibrio homeostático. En sí, el estrés es un conjunto de respuestas fisiológicas destinadas a la adaptación del sujeto al medio ambiente (Nelson, 1996). El estrés no siempre produce daño, pero la ausencia de éste puede llevar a la muerte ya que el organismo no tendría un sistema que lo alerte de los riesgos potenciales (Tresguerres, 2005).

Estímulo Estresante

Los estímulos estresantes incluyen cambios del medio interno (lesión tisular, hipoglucemia, hemorragia, infecciones, etc.), del medio externo (frío, calor, agresión, etc.), alteraciones psicológicas (miedo, rabia, ansiedad, sorpresa, etc.) o la combinación de varios de estos estímulos (Tresguerres, 2005).

Los estímulos estresantes pueden clasificarse en 2 categorías:

- 1) Sistemáticos: Aquellos que provocan alteraciones directas en la homeostasis, como las infecciones, alteraciones metabólicas u osmóticas, algunos estímulos físicos (dolor, nado forzado, inmovilización). Estos estímulos pueden presentar un peligro real, la respuesta ante estos estímulos no requiere la activación de las emociones.
- 2) Emocionales: Como la sumisión, subordinación, aislamiento, privación. En humanos, el estímulo emocional es la principal fuente de estrés, también se conocen como alteraciones psicológicas que pueden estar ligadas al miedo, ira, ansiedad, sorpresa, etc. (Tresguerres, 2010).

Los estímulos estresantes no solo difieren cualitativamente si no también cuantitativamente (intensidad y duración) (Tresguerres, 2010). Cuando la intensidad o la duración del estímulo exceden ciertos límites, se pueden llegar a producir cambios patológicos o exacerbar la respuesta.

Respuesta al estrés

La respuesta al estrés es una manifestación de emergencia y es especialmente evidente con estímulos sistemáticos, se han establecido conexiones en el sistema nervioso central (SNC)

que dan lugar a una respuesta fisiológica. La respuesta al estrés esta mediada tanto por el sistema nervioso simpático, el cual al activarse libera NA y adrenalina, como por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Evanson y Herman, 2015).

La respuesta al estrés puede dar lugar a una serie de ajustes a corto o largo plazo, en los sistemas neuroendocrino, nervioso, cardiovascular e inmunológico, lo que permite al individuo adaptarse. Generalmente las funciones fisiológicas como la inmunidad, la digestión, la reproducción y el crecimiento, se llegan a inhibir manteniéndose en un estado de latencia (Tresguerres, 2010).

La respuesta al estrés es típica en todos los vertebrados, aunque no es específica, porque depende de varios factores: del tipo de estímulo, su intensidad, su duración, la predicción del organismo y su control hacia dicho estímulo (Tresguerres, 2010). Al no ser específica la respuesta, se plantea que estímulos de naturaleza distinta inducen una misma condición y que un mismo estímulo produce diferentes respuestas en dos individuos, o incluso en el mismo individuo en distintas ocasiones, esto depende del estado del organismo y de sus recursos para afrontar la situación estresante (Tresguerres, 2005).

Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

El sistema de respuesta al estrés está compuesto por tres partes: 1) el hipotálamo, en él se encuentran neuronas secretoras del factor liberador de corticotropina (CRF), 2) la hipófisis, la cual secreta la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y 3) la glándula adrenal, que secreta glucocorticoides y catecolaminas. En la parte adrenomedular hay secreción de catecolaminas y en la parte adrenocortical hay secreción de corticoides (Figura 1) (Álvarez, 2008).

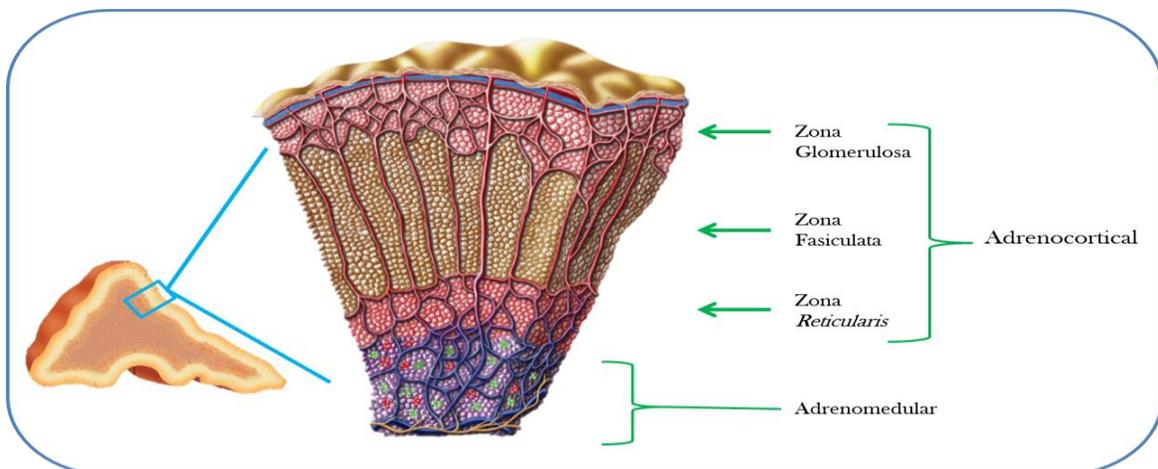


Figura 1: esquema que muestra la adrenal y sus partes.

Todas las formas de estrés estimulan en automático el sistema nervioso simpático y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) (Figura 2) (Spanakis y col., 2015), este último tiene la

función principal de mantener la homeostasis en el organismo (Chrousos, 1995), es un sistema neuroendocrino, compuesto de los núcleos paraventriculares del hipotálamo, la adenohipófisis y la corteza adrenal (Evanson y Herman, 2015).

En todas las situaciones de estrés, la respuesta parece encontrarse coordinada por el hipotálamo, el cual desencadena la respuesta global del estrés (Tresguerres, 2010). En el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo, se encuentran neuronas parvocelulares que contienen CRF (Tresguerres, 2010; Spanakis y col., 2015).

La CRF estimula la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) en la hipófisis anterior. La ACTH actúa sobre la corteza adrenal, regulando la secreción de glucocorticoides como productos finales de la activación del eje HHA. En situaciones no estresantes la CRF se secreta en forma circadiana, incrementando sus pulsos durante la mañana y aumentando la amplitud de secreción de ACTH y cortisol; en situaciones de estrés agudo se puede observar incremento en la liberación de CRF (Álvarez, 2008).

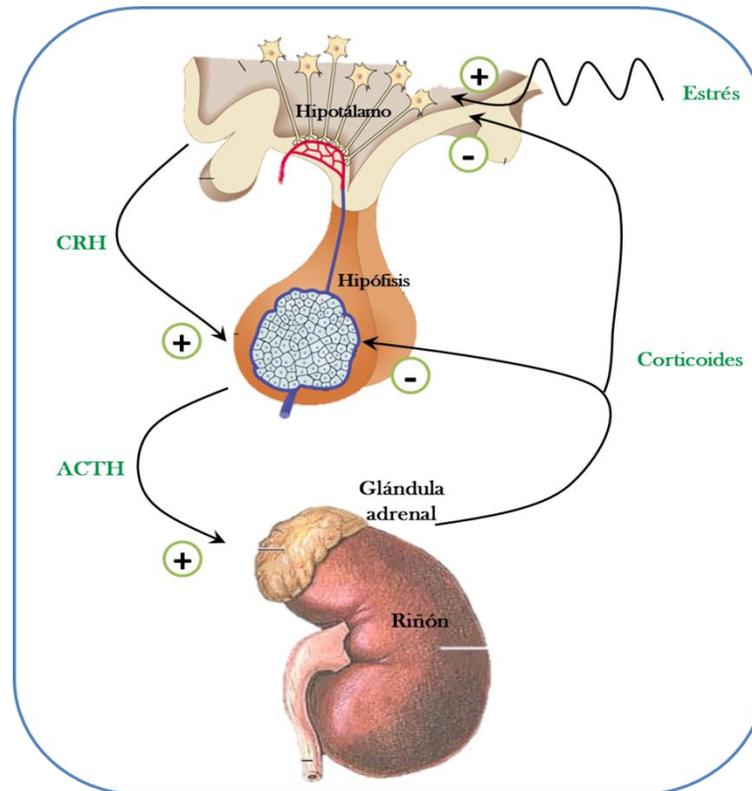


Figura 2: esquema que muestra la regulación endocrina de la adrenal ante situaciones de estrés. CRH: Hormona liberadora de corticotropina, ACTH: Hormona adrenocorticotropa. Modificado de Arce, 2006.

Ovario

Los ovarios son las glándulas reproductoras femeninas, las cuales son equivalentes a los testículos en el macho (Moore y Pseud, 2008, Rodríguez, 2005), la mayoría de los vertebrados (a excepción de las aves, reptiles y algunos mamíferos) se encuentran en número par, tienen una forma de almendra y se encuentran situados en ambos lados de la cavidad pélvica superior, se encuentran fijos a lo ancho por el ligamento del mesoovario (Quezada, 1997; Yao y Bahr, 1998; Gartner y Hiatt, 2007; Moore y Persaud, 2008; Alemán, 2016). En la rata adulta, los ovarios tienen un peso aproximado de 30 mg cada uno y miden 4.35 mm de ancho, 5.5 mm de largo y tienen grosor de 1.6 mm (Navarrete, 2011).

Los ovarios se componen por tres zonas: 1) zona cortical llamada córtex ovárico, el cual tiene epitelio germinativo y folículos en diferentes etapas de desarrollo. En el córtex también se encuentra una estructura llamada cuerpo lúteo que produce progesterona (Rodríguez, 2005; Alemán, 2016); 2) zona de la medula ovárica, ésta se localiza en el centro del ovario y consta de tejido conjuntivo, células contráctiles e intersticiales; 3) zona del hilio, el cual contiene vasos sanguíneos, linfáticos y nervios que penetran al ovario (Figura 3) (Palma, 2001; Rodríguez, 2005).

Los ovarios tienen dos funciones, la producción de ovocitos viables y la síntesis de hormonas esteroideas (estrógenos, progesterona y testosterona) y hormonas peptídicas (inhibina, activina y folistatina) (Palma, 2001; Rodríguez, 2005).

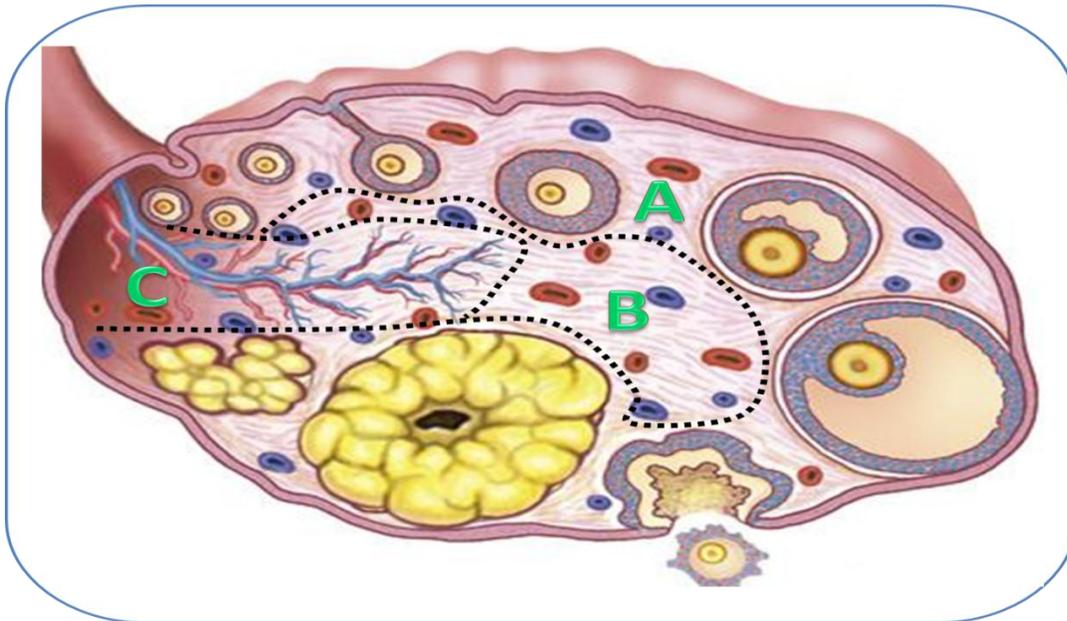


Figura 3: esquema que muestra las zonas del ovario. A) Zona cortical o córtex ovárico, B) Zona de la medula ovárica, C) Zona del hilio. Modificado del Blog Atlas de histología - <http://mackpsico.blogspot.mx/>



Inervación del ovario

El ovario regula sus funciones por diferentes vías nerviosas que se componen de fibras simpáticas, parasimpáticas y sensoriales (Aneseti y col., 2001; Ramírez, 2016).

El sistema parasimpático establece sus conexiones a través del nervio vago (**Figura 4**) (Morales-Ledesma y col., 2007), un nervio craneal que inerva la región cefálica, las cavidades torácica y abdominal (Köing y Liebich, 2008). Se origina en el ganglio nodoso y los ganglios de la raíz dorsal del segmento torácico 10 al lumbar 2, sus fibras ingresan al ovario, por el transcurren diferentes péptidos como la acetilcolina (ACh), somastotatina (SOM), sustancia P (SP), gastrina, péptido intestinal vasoactivo (VIP), el péptido relacionado al gen que codifica a la calcitonina (CGRP) y neuropéptido Y (NPY) (Chávez y col., 2011; Cruz, 2015; De León, 2016).

Las fibras simpáticas se originan del segmento torácico 11 al lumbar 4 de la medula espinal y hacen sinapsis con las neuronas post ganglionares que se localizan en el complejo del ganglio celiaco mesentérico superior (GCMS). Del GCMS se proyectan dos paquetes nerviosos, el NOS y el NPO (**Figura 4**). Las fibras que componen al NOS y NPO son principalmente amielínicas con un pequeño porcentaje de tipo mielínico (Ramírez, 2016).

El NPO está asociado a la arteria ovárica e inerva los vasos sanguíneos y se compone de dos tipos de fibras nerviosas, uno de ellos está integrado por neuronas sensoriales las cuales transportan SP y CGRP. El segundo tipo de fibras se compone por neuronas simpáticas, las cuales transportan NA y NPY (Aneseti y col., 2001; Fernandois y col., 2014; Ramírez, 2016).

El NOS se asocia al ligamento suspensorio e inerva la glándula intersticial y a la teca externa de los folículos. Este paquete nervioso es el que proporciona la mayor concentración de NA al ovario así como VIP y NPY. La información neural que transporta el NOS modula la reactividad de los folículos ováricos a las gonadotropinas, y participa en la regulación de la secreción de las hormonas esteroideas por el ovario (Fernandois y col., 2014; Ramírez, 2016).

Las tres vías nerviosas son de origen extrínseco y llegan al ovario e inervan a los folículos en diferente estadio de maduración (Aneseti y col., 2001).

Dentro del ovario se presentan estructuras celulares con características morfológicas y moleculares similares a las neuronas (Fernandois y col., 2014). Estas células se ven pronunciadas durante la etapa fetal y durante el primer año posnatal. Se localizan en el hilio, la medula y la corteza del ovario. Son capaces de sintetizar noradrenalina y se ha observado que llegan a contener NPY (Aneseti y col., 2001; Fernandois y col., 2014).

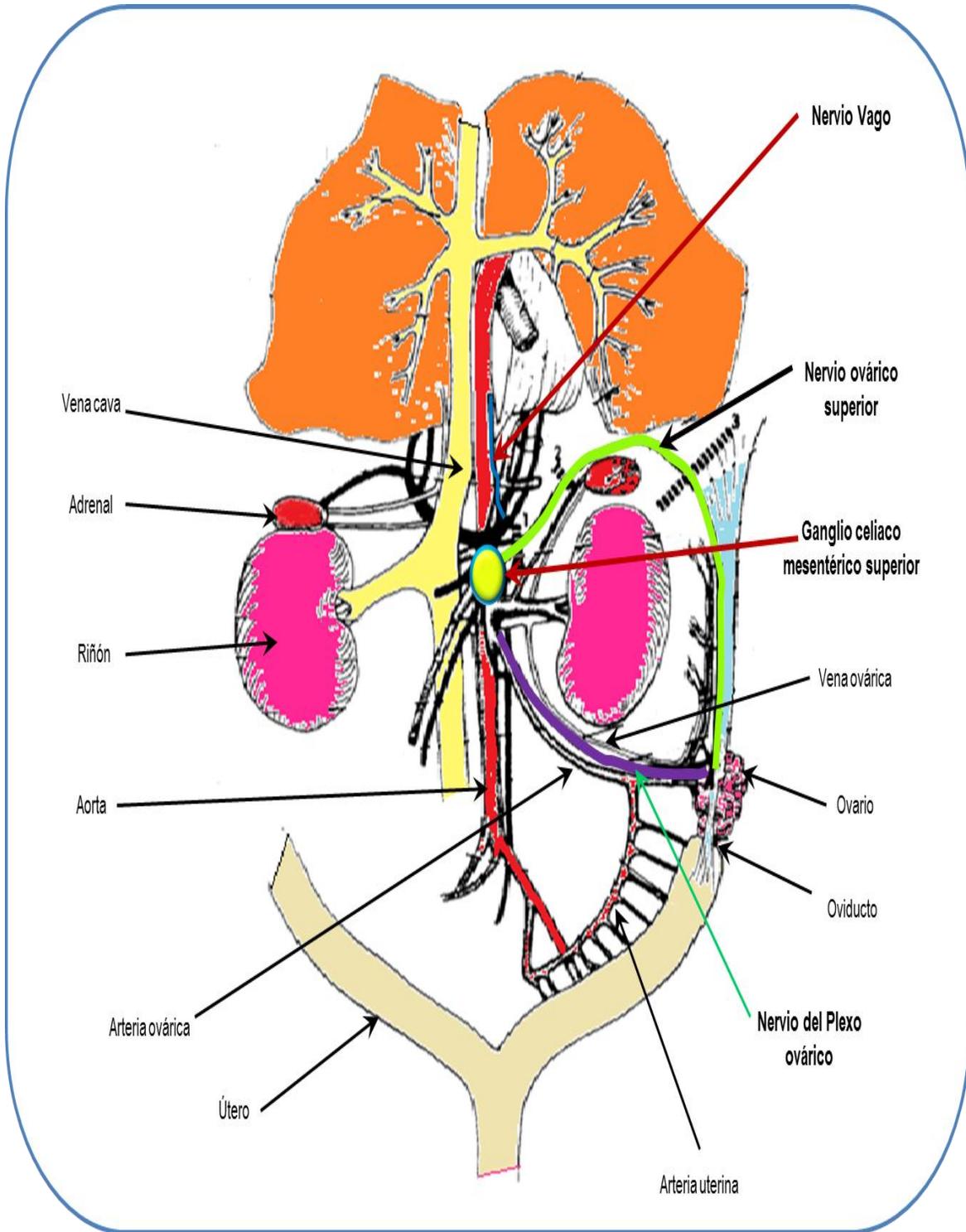


Figura 4: esquema que muestra la inervación extrínseca ovárica. La vía parasimpática a través del nervio vago, las vías simpáticas originadas en el ganglio celiaco mesentérico superior que da origen a los dos paquetes nerviosos el nervio ovárico superior y el nervio del plexo ovárico. Modificado de [Lawrence y Burden, 1980](#).



Foliculogénesis

La foliculogénesis es una serie de eventos que permiten obtener un folículo preovulatorio a partir de folículos primordiales, para que ocurra la ovulación y en muchos casos la atresia folicular (Palma, 2001; Arce y col., 2006). La foliculogénesis es un proceso que tiene lugar en la corteza ovárica (Arce y col., 2006) y es regulado por las gonadotropinas hipofisarias y las hormonas sexuales secretadas por el ovario, las cuales son moduladas por la información neural que llega al ovario (Villavicencio, 1991).

En la mujer la foliculogénesis comienza en la vida fetal, en donde se establecerá la reserva de folículos primordiales, mientras que en la rata, la formación de folículos primordiales ocurre del día uno al 4 después del nacimiento (Malamed y col., 1992; Barra y col., 2014). La foliculogénesis se inicia con el reclutamiento del folículo primordial que se encuentra en latencia y finaliza con la ovulación o bien con la desaparición del folículo por atresia (Arce y col., 2006).

La maduración folicular puede dividirse en dos fases: Fase preantral o independiente de gonadotropinas, donde el folículo crece y se diferencia, en esta etapa la regulación del folículo es de tipo autocrino/paracrino. Fase antral o dependiente de gonadotropinas, donde hay un aceleramiento en el crecimiento folicular, esta fase está regulada fundamentalmente por la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Arce y col., 2006).

Los folículos Primordiales (**Figura 5**) están formados por el ovocito primario, en un estado de arresto meiótico, rodeado de una capa de células foliculares planas (células pregranulosas), comienzan a crecer y entran en el conjunto de folículos en crecimiento. Los signos que indican que ha comenzado el crecimiento en este tipo de folículos son: (Palma, 2001; Arce y col., 2006)

- Incremento en el tamaño del ovocito
- Cambio en la forma de las células de la granulosa, adoptan una forma cuboidea
- Formación de la zona pelúcida, denominándose a esta estructura Folículo Primario.

Posterior a estos cambios las células cúbicas se multiplican y aparecen 2 o más capas de la misma. Se comienzan a expresar receptores a FSH en las células de la granulosa. Aparecen uniones gap entre la granulosa y el ovocito, las cuales permitirán el paso de nutrientes y sustancias reguladoras hacia el ovocito (Palma, 2001; Arce y col., 2006).

Durante la fase de folículo secundario (**Figura 5**) hay una diferenciación del estroma ovárico que rodean al folículo, con aparición de las dos capas de la teca. En un principio una red de capilares invade un espacio ubicado entre las células que rodean al folículo y estas constituyen la capa vascular llamada teca interna, la cual aportará los nutrientes a la

membrana de las células de la granulosa y al ovocito y permite el acceso de gonadotropinas y otras sustancias al folículo en crecimiento. Por fuera de la capa de la teca interna se encuentra la teca externa rica en tejido conectivo y fibroblastos. (Palma, 2001; Arce y col., 2006). En seguida comienzan a aparecer espacios entre las células granulosa, consecuencia del exudado plasmático de consistencia líquida por parte de dichas células. A este fluido se le conoce como líquido folicular, el cual está modificado por la presencia de productos de secreción aportados por el ovocito y por las células de la granulosa. Estos espacios posteriormente confluyen en una cavidad denominada antro folicular. El folículo secundario irá aumentando de tamaño hasta adquirir las características del folículo preovulatorio (Figura 5) (Palma, 2001; Arce, 2006).

El folículo preovulatorio está formado por células de la granulosa que se organizan en cuatro subtipos: de la membrana, las periantrales, las del *cumulus oophorus* y las de la corona radiata. Todas ellas expresan receptores para FSH durante el desarrollo del folículo antral (Figura 5) (Tresguerres, 2005; Arce y col., 2006).

En el folículo maduro las dos capas de células de la teca, interna y externa, se encuentran rodeadas por fibras de colágeno y fibras musculares lisas así como de tejido conectivo. Éstas van a formar una vaina fibrosa que durante la ovulación originará un orificio por efecto de una disgregación y esto permitirá la salida del ovocito (Domínguez, 1991).

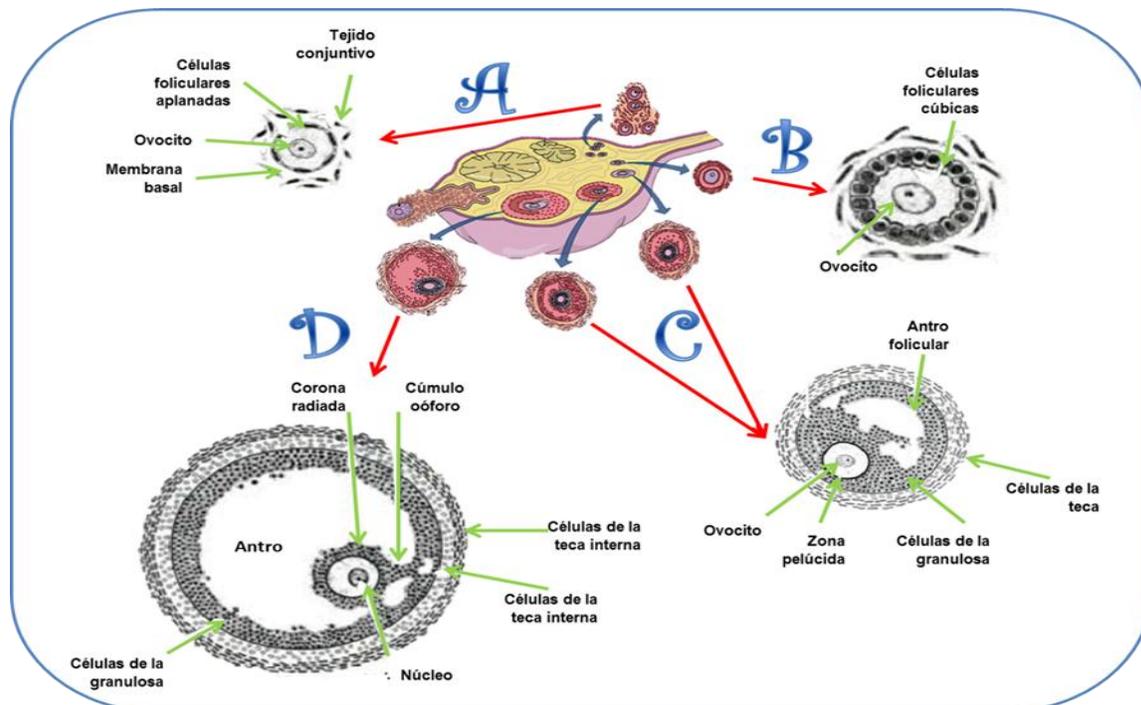


Figura 5: esquema que muestra las características de los folículos ováricos en las diferentes etapas del crecimiento. A: folículo primordial, B: folículo primario, C: folículo secundario, D: folículo preovulatorio. Modificado de Ramírez, 2007



GnRH

Tanto la síntesis como la liberación de la LH y FSH, son reguladas por la GnRH (**Figura 6**) (Prieto y Velázquez, 2002). El cual es un decapeptido que desempeña un papel endocrino fundamental en la regulación de los procesos reproductivos (Leung y Cheng, 2004), este se encuentra muy conservado evolutivamente desde los peces hasta el hombre (Prieto y Velázquez, 2002).

El gen que codifica a la GnRH se encuentra en el brazo corto del cromosoma ocho, es una secuencia que transcribe una proteína precursora de noventa y dos aminoácidos que va dar origen a la GnRH y a un péptido de 56 aminoácidos llamado GAP. El primer exón consiste de una región 5' que no transcribe, el segundo exón codifica para el péptido señal de GnRH (10 aminoácidos) y los primeros 11 residuos de aminoácidos de GAP. El tercer exón codifica para los residuos 12-43 de GAP. El cuarto exón codifica para los 13 residuos de aminoácidos terminales de GAP y el restante RNAm no se traduce (Prieto y Velázquez, 2002, Plant y Zeleznik, 2015). La secuencia de la GnRH es pyroGlu - His - Trp - Ser - Tyr - Gly - Leu - Arg - Pro - Gly - NH₂, (Leung y Cheng, 2004).

La GnRH es producida por un número relativamente pequeño de neuronas, que se encuentran localizadas en el complejo de la banda diagonal de Broca, el *septum* medial y el hipotálamo rostral. En el hipotálamo las neuronas parvicelulares secretoras de este decapeptido se encuentran en el núcleo arcuato, el núcleo periventricular, el NPV y el área preóptica. Su liberación de estas zonas es por exocitosis, que es regulada por diferentes pulsos que llegan al hipotálamo. En un principio es descargada a la eminencia media y de ahí al sistema portal hipotalámico hipofisario que conecta con la adenohipófisis. Dentro de la adenohipófisis se une a los receptores membranales de los gonadotropos, para inducir la síntesis y liberación de la LH y FSH (Prieto y Velázquez, 2002; Leung y Cheng, 2004; Plant y Zeleznik, 2015).

Regulación neuroendocrina de la ovulación

La FSH y LH son glicoproteínas producidas y liberadas por la adenohipófisis, son vertidas al torrente sanguíneo, donde llegarán a las gónadas y favorecerán la maduración folicular y la estereoidogénesis (**Figura 6**) (Prieto y Velázquez, 2002).

La FSH se une a sus receptores localizados en las células de la granulosa de los folículos ováricos en desarrollo, favoreciendo el crecimiento folicular y la secreción de estrógenos, hormona sexual femenina que durante las primeras fases del desarrollo folicular ejerce un papel de retroalimentación negativa en la secreción hipofisaria de la LH, en las últimas

etapas del desarrollo folicular los estrógenos tienen una retroalimentación positiva aumentando la liberación de LH (Prieto y Velázquez, 2002; Iglesias y col., 2007).

La LH al unirse a su receptor, el cual se encuentra en las células de la teca del folículo preovulatorio, induce la liberación del ovocito por la ruptura del folículo y estimula la síntesis de andrógenos. Además da origen y crecimiento al cuerpo lúteo, el cual secreta progesterona. Cuando el óvulo no es fecundado el cuerpo lúteo comienza un proceso de encogimiento y este deja de secretar progesterona (Prieto y Velázquez, 2002).

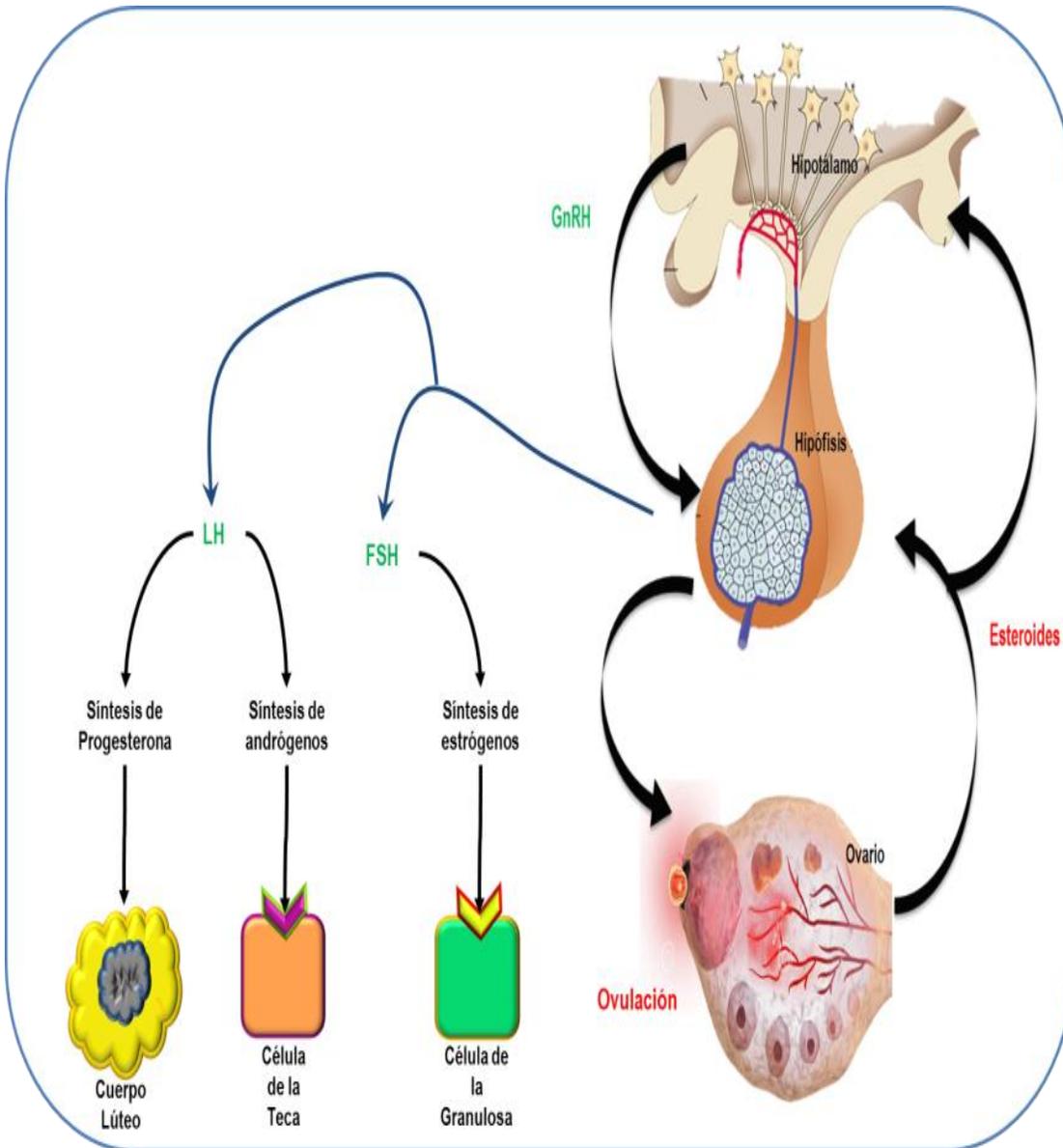


Figura 6: esquema que muestra la regulación neuroendocrina de la ovulación. GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas, FSH: Hormona estimulante del folículo, LH: Hormona luteinizante. Modificado de [Cardinali y col., 1994](#); [Yen y col., 1999](#).

Ovulación

Una vez que el folículo preovulatorio alcanza su maduración final, se va a producir su ruptura, con la liberación del ovocito maduro contenido en su interior hacia el oviducto (**Figura 7**). La LH produce la ruptura de la membrana folicular por acción de un activador del plasminógeno presente en el líquido folicular, que cataliza la conversión del plasminógeno en plasmina, enzima proteolítica capaz de romper la membrana basal, y que actuará sobre el tejido conectivo de la teca. El proceso de la ruptura folicular también es mediado por una especie de reacción inflamatoria local dependiente de histamina, por colagenasas o por la contractura folicular inducida por prostaglandinas (Tresguerres, 2005, Arce, 2006).

Para que se produzca la ovulación es necesaria la acción conjunta de los picos preovulatorios de LH y FSH (Arce, 2006).

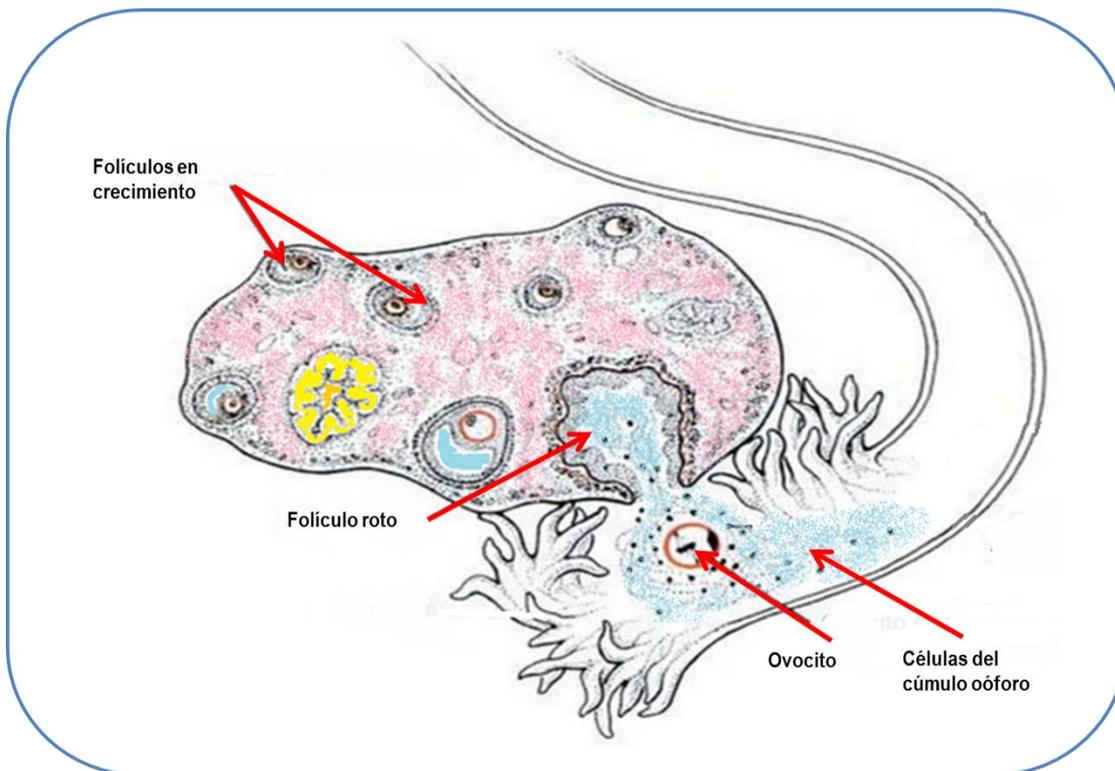


Figura 7: esquema que muestra la ruptura del folículo ovárico para liberar el ovocito contenido en su interior hacia el oviducto. Modificado de Sadler, 2006.

Esteroidogénesis

La esteroidogénesis se basa en un conjunto común de vías biosintéticas (Yen y col., 2001). Las hormonas esteroideas son derivadas del colesterol, las células biosintéticas lo pueden obtener a partir de la síntesis del acetato, o de los depósitos de ésteres de colesterol que se encuentran en las vacuolas lipídicas intracelulares, o a partir de la captación de lipoproteínas de baja densidad, que son ricas en colesterol (Roca, 2005). Los principales órganos que sintetizan esteroideas a partir del colesterol son las glándulas adrenales y las gónadas. Durante el embarazo la placenta aporta grandes concentraciones de progesterona, además hay órganos como el cerebro, el tracto intestinal y la piel que aportan enzimas esteroidogénicas (Odermatt y col., 2016). Durante el proceso de esteroidogénesis hay participación de enzimas las cuales pertenecen a dos categorías: oxidasas del citocromo P450 e hidroxisteroide deshidrogenasas (Yen y col., 2001).

Los órganos que se encargan de la síntesis de esteroideas lo hacen a partir de colesterol nuevo, el cual lo obtienen de la producción de las células a partir de acetil-CoA, o del colesterol que es tomado de la dieta diaria. El colesterol es esterificado y almacenado en gotas de lípidos, en el momento de ser requerido es liberado por actividad de la enzima lipasa. La absorción del colesterol por las mitocondrias es la etapa limitante en la esteroidogénesis. Esta captación de colesterol es modulada por la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR), su función es facilitar la transferencia del colesterol desde la membrana exterior a la membrana interna mitocondrial (Figura 8). Dentro de la mitocondria el colesterol tiene un proceso de conversión en pregnenolona mediante la enzima citocromo P450 (CYP 450) en cooperación con la reductasa adrenoxina (Figura 9). En función del órgano, la pregnenolona se convierte en andrógenos, estrógenos, glucocorticoides o mineralocorticoides (Odermatt y col., 2016).

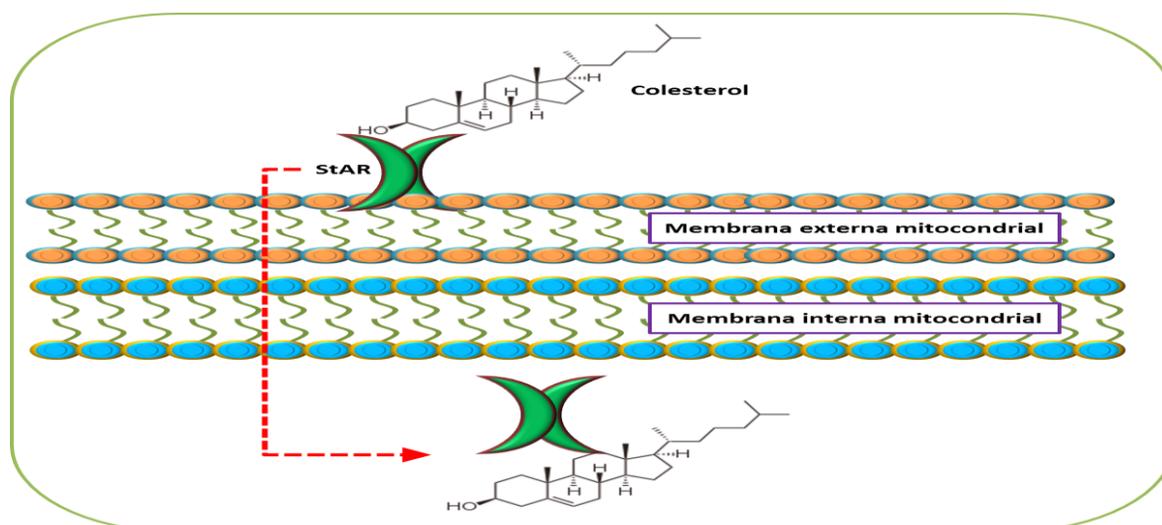


Figura 8: esquema que muestra el paso del colesterol de la membrana externa mitocondrial a la interna por ayuda de la proteína StAR. Modificado de Gómez-Chang y colaboradores, 2012.

En los ovarios la síntesis de las hormonas esteroideas es medida por las células de la teca y granulosa. Las células de la granulosa se encuentran en el compartimiento celular avascular que rodea al ovocito y las células de la teca residen en el estroma ovárico. Tanto las células de la teca como las de la granulosa expresan StAR y la enzima de desdoblamiento de la cadena lateral del colesterol (**CYP11A1**). Las células de la granulosa sintetizan pregnenolona a partir del colesterol y así posteriormente el cuerpo lúteo podrá transformar la pregnenolona a progesterona, para la producción de estrógenos. La pregnenolona puede ser secretada a partir de las células de la granulosa y captada por las células de la teca (de igual forma las células de la teca sintetizan pregnenolona), para formar dehidroepiandrosterona. Las células de la teca expresan la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (**3β -HSD2**) y convierten dehidroepiandrosterona en androstenediona, la androstenediona es entonces entregada de nuevo a las células de la granulosa para su conversión a estrógenos, evento dependiente de la aromatasa. Las células de la granulosa expresan la enzima 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (**17β -HSD1**), que se necesita para la conversión de estrona en estradiol (**E2**) (Odermatt y Col., 2016).

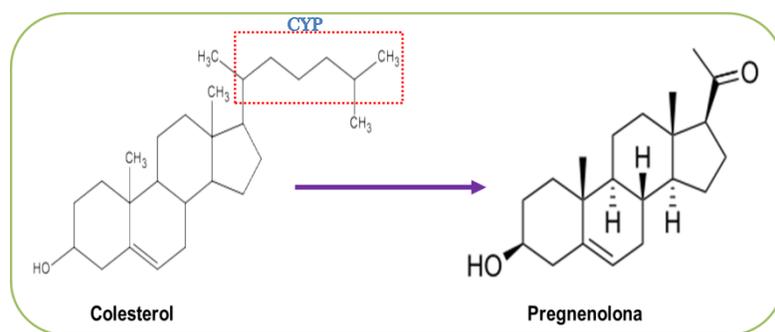


Figura 9: Esquema que muestra la biotransformación de colesterol a pregnenolona, a través de la hidroxilación y ruptura de los enlaces C-20 y C-22, por la CYP450.

Durante el ciclo estral hay cambios en la esteroidogénesis ovárica: durante la fase lútea las células de la granulosa luteinizadas son suministradas con suficiente colesterol, debido a una mayor vascularización del compartimiento previamente avascularizado, las altas concentraciones de LH mejoran la expresión de CYP11A1 y 3β -HSD2, que resulta en las grandes cantidades de progesterona (**P4**). En la fase folicular la FSH mejora la expresión de la aromatasa y 17β -HSD1 para la producción de cantidades crecientes de E2 y androstenediona por las células de la teca (Odermatt y col., 2016). Las aromatasas son un grupo de enzimas capaces de transformar andrógenos tales como androstenediona y testosterona (**T**) en estrógenos, estrona y E2 respectivamente. Proceso conocido como aromatización, el cual es inducido por la unión de FSH a sus receptores (Chabner y col., 2008; Lerner, 2008).

La LH activa sus receptores en las células de la teca para inducir la expresión de la enzima 17α -monooxigenasa esteroide (**CYP17A1**), proporcionando precursores de andrógenos para la producción de estrógenos en la granulosa. Por lo tanto hay un testigo estricto y cooperación de las funciones de la granulosa y teca para la regulación de la síntesis de E2 (Odermatt y col., 2016).

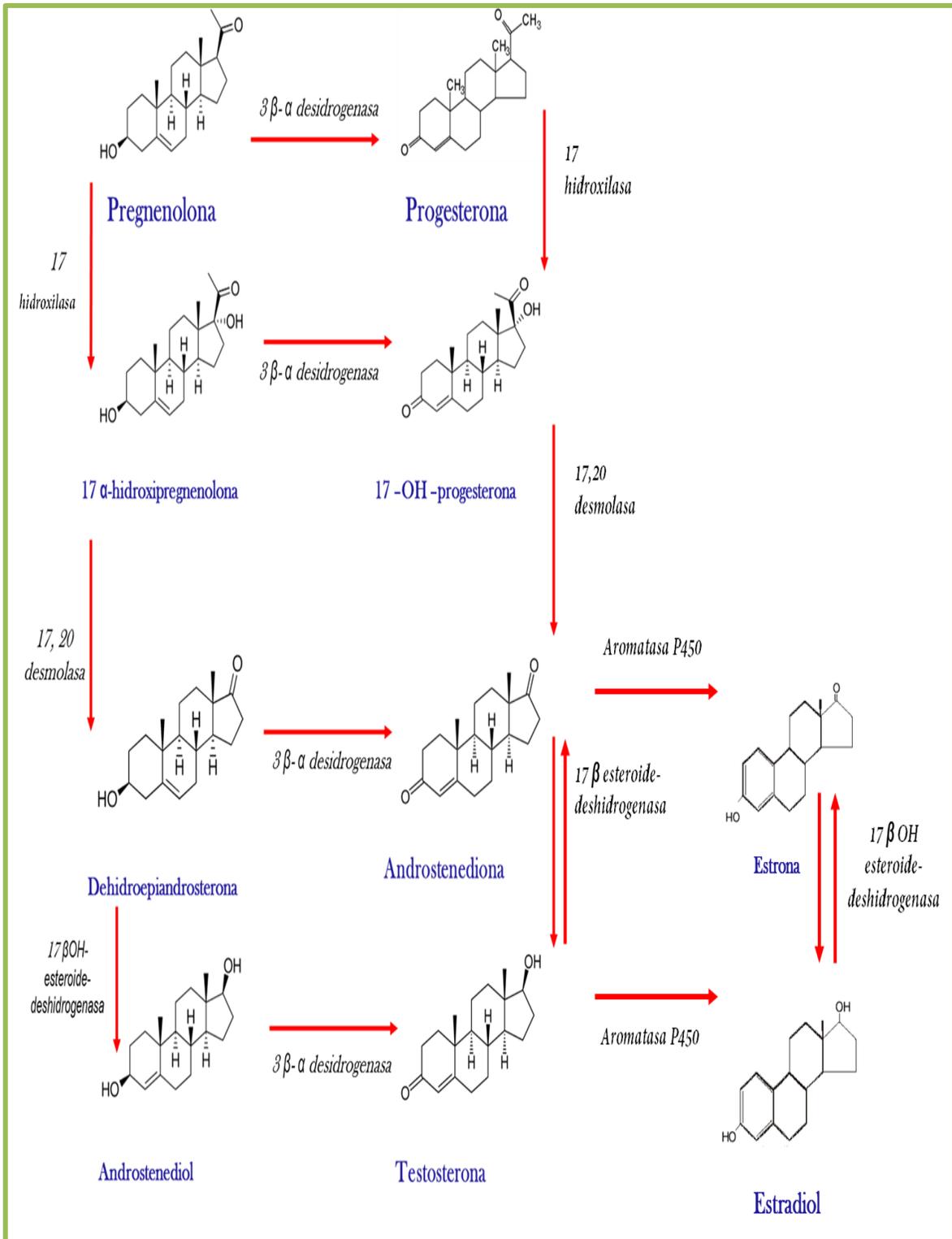


Figura 10: esquema que muestra las rutas para la biosíntesis de las hormonas esteroides. Modificado de Ramirez, 2011.



Ciclo estral

Un factor importante que ayuda a la comprensión de los mecanismos fisiológicos subyacentes a la conducta sexual femenina es el ciclo estral. El cual pone en manifiesto cambios en la citología vaginal que se repiten cada 4 o 5 días (Palma, 2001).

El ciclo estral está regulado por el eje hipotálamo- hipófisis- ovario- útero. El ciclo se puede dividir en tres fases 1) Estro o fase ovulatoria, 2) Diestro o fase luteal, y 3) Proestro (Palma, 2001).

El estro vaginal es un punto del ciclo donde se observan células epiteliales cornificadas, con una duración aproximada de 36 horas. El estro vaginal se correlaciona con la presencia de folículos que han liberado su ovocito. Asimismo, en este momento se empiezan a desarrollar folículos terciarios, a partir de folículos secundarios, que son los que van a ovular en el ciclo siguiente (Palma, 2001).

Le sigue un periodo en el cual se reduce el número de células cornificadas, apareciendo los leucocitos (glóbulos blancos). Es un periodo que se le conoce como diestro vaginal y tiene una duración aproximadamente de 48 horas. Los folículos terciarios se hacen más grandes, y las células de la granulosa más numerosas. Así mismo, el antro folicular comienza a llenarse de un fluido claro conocido como líquido folicular. En aquellos folículos que liberaron su ovocito en el día del estro sus células foliculares experimentan un proceso de transformación en el cual se transforman en células luteínicas, formando así los cuerpos lúteos. En animales con ciclo de 4 días, presentan dos días de diestro, al primer día se le designa como diestro I (DI), y al segundo, diestro II (DII). Hacia el DII hay un aumento en el crecimiento y desarrollo folicular, los cuerpos lúteos están completamente formados (Palma, 2001).

La siguiente etapa corresponde al proestro, con una duración aproximada de 12 horas. Se caracteriza por la presencia de muchas células epiteliales nucleadas, así como por una espectacular reducción del número de leucocitos. En los folículos preovulatorios destinados a ovular, tiene lugar un fuerte y rápido crecimiento. Los otros folículos que no van a ovular experimentan regresión (Palma, 2001).



Síndrome del ovario poliquístico

El SOP es un trastorno endocrino muy común entre las mujeres en la edad reproductiva. Se estima que entre el 2-18% de las mujeres con problemas reproductivos presentan SOP (Lubna, 2014), en México se estima que el 6% de las mujeres en edad reproductiva lo padecen y hay un incremento progresivo en la población mexicana (Rodríguez-Flores, 2011). Sin embargo, la determinación exacta es un problema debido a la heterogeneidad en los criterios empleados para el diagnóstico y la variabilidad en la presencia de los síntomas. Los criterios de juicio del SOP incluyen hiperandrogenismo, anovulación crónica y la morfología del ovario poliquístico (Lubna, 2014).

El hiperandrogenismo clínico puede manifestarse con hirsutismo, definido como crecimiento de vello, acné o calvicie. El hiperandrogenismo bioquímico puede incluir elevación en la testosterona total o en el sulfato dehidroepiandrosterona. Las mujeres con SOP también llegan a presentar alteraciones como obesidad, concentraciones elevadas de LH y resistencia a la insulina; aunque estos parámetros no son necesarios para el diagnóstico (Lubna, 2014).

La inducción del SOP como modelo de estudio

El SOP implica múltiples factores etiológicos, que conducen a un trastorno heterogéneo (Shi y Vine, 2012). El conocimiento que se tiene hasta el momento de la etiología del síndrome aún está incompleta (Frank, 2012). Su temprana aparición y los riesgos a largo plazo aún no están del todo claros (Shi y Vine, 2012).

Una de las estrategias para la comprensión del SOP ha sido el uso de modelos animales (Frank, 2012) los cuales deben de presentar características comunes incluyendo las reproductivas y metabólicas. Debido a la naturaleza heterogénea del SOP, es una labor difícil, el desarrollar modelos animales que imiten la anormalidad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, los factores cardiovasculares y metabólicos que se encuentran presentes en pacientes con SOP (Shi y Vine, 2012).

Se han utilizado diversos modelos animales para el estudio del SOP, incluyendo roedores, ovejas y primates (Frank, 2009). Los roedores, como los ratones y las ratas, son los animales más utilizados para estudiar el SOP, sus beneficios radican en el tamaño pequeño, el alto índice de reproducción, su ciclo de vida corto el cual permite la exploración de los efectos metabólicos y reproductivos a largo plazo (Frank, 2009; Shi y Vine, 2012).

El uso de diferentes modelos animales del SOP ofrece un mejor enfoque para el estudio y la comprensión en las intervenciones tales como la dieta, la farmacéutica y la reducción del riesgo cardiometabólico en pacientes con SOP (Shi y Vine, 2012).



Administración de andrógenos

Los andrógenos que más se utilizan son la dehidroepiandrosterona, el propionato de testosterona y la 5α -dihidrotestosterona. Utilizando estos modelos se exhiben trastornos metabólicos, incluyendo la obesidad, hiperinsulenemia, situaciones similares a las observadas en mujeres con SOP (Shi y Vine, 2012).

Antiprogesterona

La antiprogesterona (RU486) es un esteroide sintético que actúa como un antagonista de la P4. Normalmente la progesterona es sintetizada en el cuerpo lúteo después de la ovulación y tiene un papel importante en la regulación en la secreción de gonadotropinas, en el desarrollo folicular y la ovulación (Shi, 2012).

En animales tratados con RU486 la concentración de P4 decrementa, lo cual también se observa en mujeres que presentan el SOP, esta disminución trae como consecuencia que la frecuencia de pulsos de GnRH incrementen, también provoca el aumento en la liberación de testosterona ovárica, lo que trae como consecuencia la atresia folicular y la anovulación (Shi, 2012).

Inhibición de la aromatasa

La aromatasa es una enzima importante que convierte la T y androstenediona en E2 y estrona, respectivamente. El letrozol es un inhibidor no esteroideo de la aromatasa, que reduce la conversión de andrógenos en estrógenos en el ovario, lo que resulta en una alta concentración de T y la disminución de la producción de E2. En la rata hembra la administración oral de letrozol (dosis 0.1, 0.5 y 1 mg/Kg) resulta en aciclicidad y características histopatológicas y bioquímicas del SOP similares a las descritas para la mujer (Shi, 2012).

Administración de estrógenos

El valerato de estradiol (VE) es un estrógeno de acción prolongada, provoca una desregularización en la secreción de GnRH, así como una hiperactividad de las fibras catecolaminérgicas. Se ha visto que una dosis de 2 mg de VE en la rata adulta o joven induce hiperandrogenismo, anovulación y morfología de ovarios poliquísticos (Figura 11) (Lara y col. 1993; Zafari y col., 2010; Shi y Vine, 2012).



El estrés como modelo de inducción del SOP

Otros modelos de inducción del SOP son mediante el estrés físico como la exposición a luz constante o al frío.

Luz constante

La patogénesis del SOP es incierta, aunque el estilo de vida puede ser un factor importante para su desarrollo. La restricción del sueño se ha generalizado en la sociedad moderna, lo cual se ha relacionado con distintas enfermedades. La luz constante conduce a una privación del sueño que se asocia a un estrés fisiológico (Kang y colaboradores, 2014). La luz constante es uno de los modelos de estudio para las disfunciones ováricas como la anovulación, ovarios poliquísticos y la presencia de estro persistente.

La ovulación se produce en respuesta a la liberación preovulatoria de las gonadotropinas, cuya secreción es regulada por ritmos circadianos. La hora del día en que se produce la ovulación depende del fotoperíodo al que están sometidos los animales. Ratas hembras expuestas a luz constante presentan una disminución en la secreción de LH, causado por una desregulación en la liberación de GnRH. Estos cambios están asociados con el desarrollo de ovarios poliquísticos y anovulación (Bradshaw y col., 1965; Lawton y Schwartz, 1967; Brawer y col., 1980; Shi y Vine, 2012).

La exposición a la luz constante a ratas hembras adultas durante ocho semanas, ocasiona cambios en la morfología del ovario tales como disminución en el peso del ovario, atresia folicular, quistes foliculares y cuerpos lúteos de menor tamaño. Los autores sugieren que todos estos cambios morfológicos se deben a las bajas concentraciones de las hormonas LH, FSH y P4 (Beys y colaboradores, 1995).

Gao y colaboradores en el 2016 reportan que en ovejas hembras la luz constante aumenta la concentración sérica de E2 y disminuye la de P4, efecto atribuido a la interrupción del fotoperíodo normal que provoca una desconexión entre el hipotálamo y la hipófisis, resultado de la abolición en los ritmos diarios de melatonina.

En ratas hembras adultas expuestas a luz continua por 26 días e inyectadas crónicamente con solución salina cada cuatro días, disminuye la concentración de pregnano, esteroide fundamental para la síntesis de hormonas esteroideas como P4, así como de los metabolitos de la P4 (5α -pregnano-3,20-diona y 3α -hidroxi- 5α -pregnan-20-ona). Esta respuesta es atribuida a una menor actividad la enzima 5α -reductasa presente en los quistes foliculares (Sawada y col., en 1987).

Desde los años 70's se tienen reportes de los efectos que la exposición a la luz constante ocasiona en las ratas hembras. Pero el hiperandrogenismo, que es una característica clave observada en mujeres con SOP, solo se ha reportado una vez al utilizar este modelo de



estrés. [Kang y colaboradores](#) en el 2014 exponen a ratas hembras adultas a luz constante durante 16 semanas, al final de éste período obtuvieron altas concentraciones de T acompañado de quistes foliculares.

Si bien la exposición a luz constante induce la formación de quistes foliculares, aumento tanto en la concentración de estradiol como de testosterona y una disminución de progesterona y sus metabolitos, no se ha propuesto como modelo de inducción del SOP ya que no hay un estudio que conjunte en un mismo estudio la secreción de hormonas esteroides, la histología ovárica y la ovulación.

Estrés por frío

En ratas hembras la exposición a estrés por frío induce la formación de quistes foliculares, concentraciones altas de andrógenos, un bajo número de ovocitos liberados y en algunas ocasiones provoca anovulación. Esto ha sido explicado en respuesta a la hiperactividad de las fibras catecolaminérgicas que se produce en respuesta al estrés, por un mecanismo similar al que se describe para el VE ([Paredes y col., 1998](#); [Bernucci y col., 2008](#)).

El efecto principal que el estrés por frío tiene sobre los organismos es el incremento en la concentración de NA en suero ([Pacak y col., 1998](#)) como resultado de la hiperactividad del SNC ([Hank y col., 2001](#); [Bernucci y col., 2008](#); [Bernucci y col., 2013](#)) y de los nervios simpáticos que llegan al ovario (**Figura 11**) ([Paredes y col., 1998](#); [Dorfman y col. 2003](#)).

Tanto en el hipocampo como en la corteza cerebral su única entrada noradrenérgica es por medio de las neuronas del *Locus Ceruleus* (LC) ([Nisenbaum y Abercrombie, 1993](#)). El estrés por frío, a cinco grados centígrados durante tres o cuatro semanas, incrementa la concentración de la catecolamina en el hipocampo, como resultado de una mayor actividad de las neuronas del LC, núcleo predominantemente noradrenérgico.

[Hank y colaboradores](#) en el 2001 mostraron que después de la exposición crónica al frío, a 5°C por 14 días, las neuronas noradrenérgicas del LC mostraban una mayor actividad electrofisiológica ante la inyección intracerebroventricular de CRF en comparación con las neuronas de aquellos animales que no fueron estresados. Sugiriendo que hay una mayor sensibilidad de las neuronas de LC en las ratas expuestas a estrés por frío.

En ratas hembras adultas la exposición crónica al estrés por frío durante ocho semanas, por tres horas durante cinco días, a 4° C, se observan el desarrollo de ovarios poliquísticos y el aumento en la concentración de E2 y T plasmática. Cuando a estos animales se les lesiona el LC, en el ovario se aprecian cuerpos lúteos y folículos en diferentes etapas de desarrollo, morfología similar a la de un animal sin estrés. De igual manera, las concentraciones de E2 y T se ven similares a las de un animal sin estrés ([Bernucci y col., 2008](#)).

En ratas hembras adultas la exposición al frío a 4°C de manera crónica (por tres horas de Lunes a Viernes) durante tres o cuatro semanas, produce cambios en el desarrollo folicular



asociado a una activación de los nervios simpáticos. A las tres semanas se observa disminución de la NA ovárica, como resultado de una gran liberación de la catecolamina. Mientras que a las cuatro semanas aumenta la NA junto con el factor del crecimiento neural (NGF), una neurotrofina que al pegarse a su receptor de baja afinidad, el P75, manda una señal al ganglio celiaco donde promueve la transcripción de la tirosina hidroxilasa, enzima limitante en la biosíntesis de la NA. Tanto a las tres como a las cuatro semanas se ve disminuido el número de folículos totales, dado por la disminución de los secundarios y antrales (Dorfman y col., 2003).

La resistencia a la insulina es una de las características que puede estar presente en mujeres con SOP. El grupo de Dorfman (2009) mostró que el estrés por frío crónico a 4°C, cinco días a la semana durante cuatro semanas, trae consigo resistencia a la insulina que podría estar dada por la NA liberada y que puede inducir la disminución en las proteínas asociadas al receptor de insulina, como la proteína tipo 2 y el transportador a glucosa tipo 4.

Se ha planteado que existe un mecanismo adaptativo que adquieren los animales expuestos a estrés por frío y que afecta la liberación de NA, por lo cual, cuando los animales tienen un periodo prolongado de exposición al frío, los mecanismos adaptativos no permiten que se presenten efectos a nivel ovárico. Así, al someter a ratas hembras adultas a estrés por frío continuo durante tres semanas, aumenta en el ovario la actividad nerviosa simpática, acompañado de quistes foliculares. Sin embargo, cuando se prolonga la exposición a 11 semanas estas alteraciones ya no se presentan (Paredes y col., 1998).

Algo similar se observa a nivel del LC, donde al medir su actividad en ratas hembras expuestas a una sola sesión de tres horas a estrés por frío, o después de cuatro u ocho semanas de exposición crónica, se observa que hay una mayor actividad en el núcleo en las ratas expuestas a una sola sesión, y que hay una tendencia a la normalización de la actividad en los grupos de cuatro y ocho semanas (Bernuci y col., 2013).

Espinoza en el 2014 mostró que en la rata hembra prepúber sometida a tres semanas de estrés por frío crónico incrementó la concentración de NA ovárica. Sin embargo, este incremento ya no se presenta cuando la rata es expuesta por un período de cinco semanas. Respuesta que ha sido atribuida a un proceso de adaptación ante el estrés.

Con esto se puede sugerir que los animales desarrollan mecanismos de adaptación al estrés por frío cuando la exposición es de una manera crónica, y que en el animal adulto estos mecanismos se llegan a presentar de una manera más lenta.

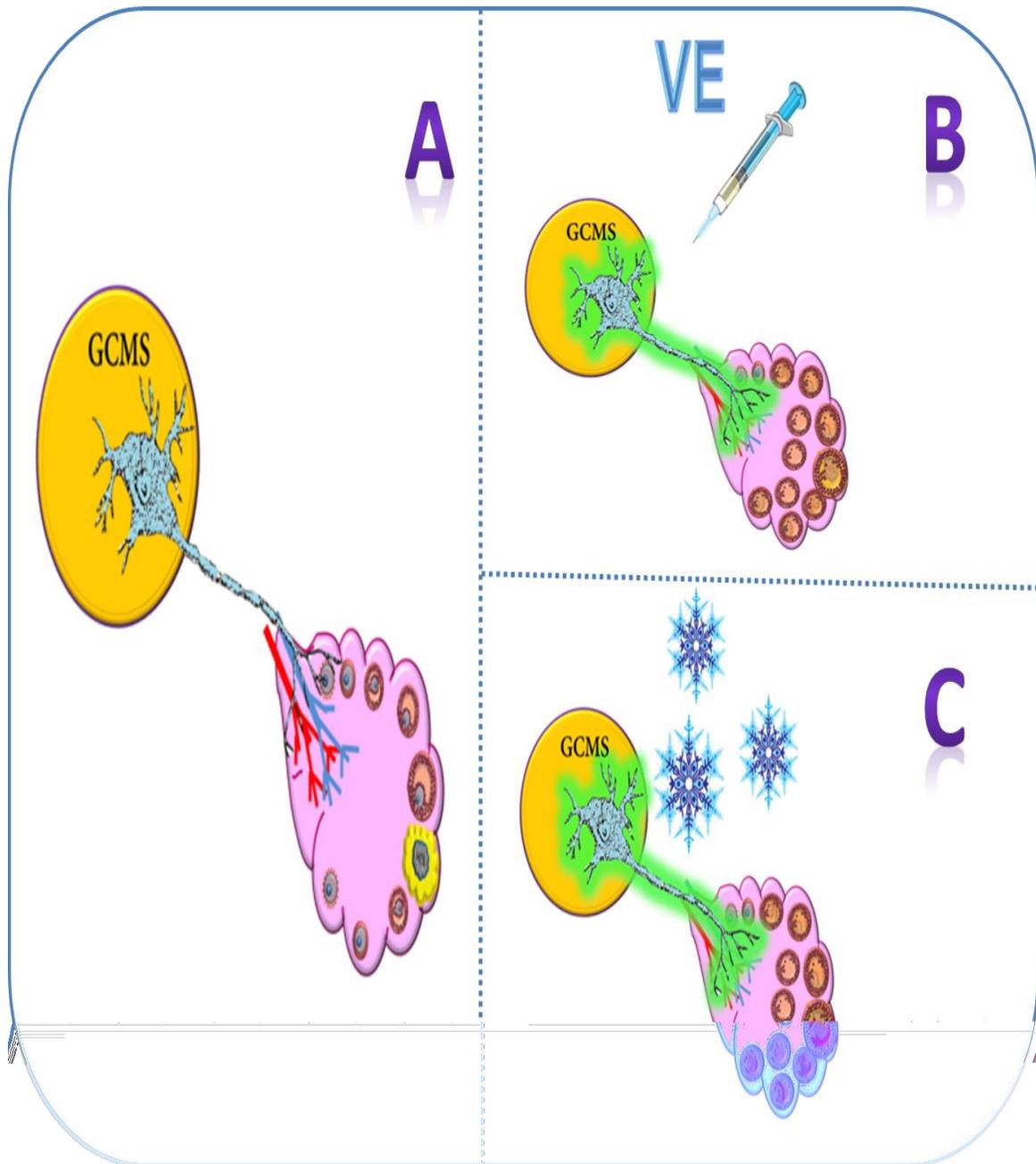


Figura 11: esquema que muestra las fibras simpáticas de un animal normal (A, hiperactividad de las mismas después de la administración del VE (B) y (C) hiperactividad de las fibras simpáticas ante la exposición al estrés por frío.



Justificación

La respuesta que el organismo tiene ante cualquier estímulo estresante puede alterar las funciones reproductivas. Se ha reportado que la respuesta al estrés puede activar tanto vías endocrinas como vías nerviosas simpáticas, las cuales estimulan la secreción tanto de glucocorticoides y de catecolaminas, esta última es producto de la hiperactividad de los nervios simpáticos. El incremento en la actividad de los nervios simpáticos ha sido asociado con el desarrollo de la patología del SOP.

El SOP es un trastorno endocrino y metabólico, que afecta a las mujeres en edad reproductiva y es la causa más frecuente de infertilidad. De manera experimental se han diseñado modelos para inducir la patología, entre estos modelos se encuentra la exposición a estímulos estresantes, como son la exposición al frío y a luz constante.

Al someter a la rata hembra al estrés por frío de manera crónica aumenta la concentración de noradrenalina tanto en ovario como en SNC, lo cual es un indicativo de una hiperactivación de los nervios simpáticos. El aumento en el tono simpático se ve asociado con la presencia de ovarios poliquísticos y alteraciones en la esteroidogénesis. Sin embargo, cuando el tiempo de exposición al estrés es prolongado, estas alteraciones ya no se logran apreciar debido a un proceso de adaptación, dejando incierto si la exposición al frío es un buen modelo de inducción del SOP. Del mismo modo, no se tiene registro si el día del ciclo estral puede afectar la respuesta al estrés. Por lo que en este estudio se analizó en la rata hembra adulta, los efectos del estrés por frío intermitente o crónico (considerando o no el día del ciclo estral) sobre las funciones ováricas.

En la literatura se plantea que la exposición a la luz constante trae consigo la formación de quistes foliculares, sin embargo, no se ha analizado si este tipo de estrés conlleva al desarrollo de todos los parámetros que definen al SOP. Por lo que en el presente estudio se evaluó el número de ovocitos liberados, la concentración de hormonas esteroides en suero y el aspecto histológico de los ovarios de animales expuestos a luz constante.



Hipótesis:

Primer Experimento:

La rata prepúber sometida al estrés por frío crónico no desarrolla el síndrome del ovario poliquístico, aún cuando incrementa el tono noradrenérgico del ovario, debido a un proceso de adaptación, que depende de la edad del animal y del tiempo de exposición al estímulo estresante. Si en la rata adulta la respuesta adaptativa es más lenta, entonces la exposición a estrés por frío, crónico e intermitente, será capaz de inducir las características que definen al síndrome tales como el hiperandrogenismo bioquímico, anovulación y morfología de ovarios poliquísticos.

Segundo Experimento:

Si el estrés por luz constante es capaz de inducir mayor actividad de las fibras simpáticas, entonces en la rata adulta la exposición a la luz constante puede inducir hiperandrogenismo, oligo-anoovulación y quistes ováricos, características que definen al SOP.



Objetivo general:

Evaluar si el estrés por frío o la exposición a luz constante, en ratas adultas, inducen el síndrome de ovario poliquístico.

Objetivos particulares:

- ♠ Analizar en la rata adulta el efecto del estrés crónico por frío durante ocho semanas, sobre la ovulación y la secreción de hormonas esteroides.

- ♠ Analizar en la rata adulta el efecto del estrés crónico por frío iniciado en el día del diestro I, sobre la ovulación y secreción de hormonas esteroides.

- ♠ Analizar en la rata adulta el efecto del estrés intermitente por frío, sobre la ovulación y secreción de hormonas.

- ♠ Analizar en la rata adulta estresada por la exposición a luz constante, la respuesta ovulatoria y la secreción de hormonas esteroides.



Materiales y Métodos

Generalidades

Se utilizaron ratas hembras adultas de 90 días de edad, de la cepa CII-ZV, y que fueron mantenidas en condiciones de bioterio, con intervalos de catorce horas de luz y diez horas de oscuridad (luces encendidas de 5:00 a 19:00 hrs), a una temperatura de 22 +/- 2° C, con libre acceso al alimento y agua *ad-libitum*. En todos los casos se siguió lo establecido por la Norma Mexicana de Protección para el Uso de Animales en Experimentación (NOM -062-ZOO-1999), especificaciones técnicas para la protección y cuidado de animales de laboratorio.

Toma de frotis

Se verificó que las ratas no presentaran alguna alteración en su ciclo estral, por lo cual se realizó la toma de frotis diaria durante dos semanas consecutivas, antes de que estas fueran sometidas a sus sesiones de estrés.

Solo las ratas que presentaron su ciclo con cuatro días de duración por dos semanas fueron utilizadas, se repartieron de manera aleatoria en los siguientes grupos experimentales, cada uno de ellos fue conformado por diez animales.

Estrés

-  **Estrés crónico por frío, ratas adultas que sin considerar su día del ciclo estral**, se introdujeron en el cuarto frío a 4° C por tres horas diarias, de Lunes a Viernes, en un horario de 8:00 a 11:00 h por un periodo de ocho semanas.
-  **Estrés crónico por frío iniciado en el Diestro I**, este grupo de ratas debió estar en la etapa del Diestro I para que fuera iniciada su sesión de estrés, fueron introducidas en el cuarto frío a 4° C, siguiendo el protocolo anterior.
-  **Estrés intermitente por frío**, las ratas adultas se colocaron en el cuarto frío a 4° C los días lunes (11:00-14:00), miércoles (08:00-11:00) y viernes (14:00-17:00 h) por un período de 8 semanas.
-  **Estrés por luz constante**, consistió en introducir a las ratas adultas en un cuarto con luces encendidas las 24 h, durante cuatro semanas.
-  **Grupo testigo**, como grupo de comparación se incluyeron ratas adultas intactas, las cuales fueron mantenidas en condiciones de bioterio con un periodo de luz de 5:00 a 19:00 h. y una temperatura de 22 +/- 2°C, durante ocho semanas.



Autopsia

Dos semanas antes de que terminara el período de estrés se reinició la toma de frotis vaginales y cuando presento el estro vaginal, se registró el peso corporal de los animales y se sacrificaron por decapitación entre las 8:00 y 11:00 h, se recolecto la sangre del tronco y se centrifugo a 3500 rpm durante 15 min, el suero que se obtuvo se almaceno a -20°C hasta el momento de la cuantificación de las hormonas esteroides P4, T y E2.

Durante la autopsia se retiraron los ovarios junto con los oviductos. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico se buscó y se contabilizaron los ovocitos contenidos en los oviductos. Para el análisis histológico de los ovarios, estos fueron fijados con Bouin durante 24 horas, deshidratados e incluidos. Además se pesaron adrenales, útero y ovarios.

Deshidratación y tinción de los ovarios

Después de 24 horas en Bouin, los ovarios se lavaron con alcohol al 70%; y permanecieron en este hasta el momento en que se realizó la deshidratación. La deshidratación de los ovarios implicó la utilización de diferentes concentraciones de alcohol, se comenzó con la concentración al 70% y fue seguida con la de 80, 96 y 100%. Posteriormente se realizaron dos cambios con cloroformo el primero fue de 1 hora y el último de 16 horas. Al término, los ovarios fueron sumergidos en paraplast fundido durante tres horas dentro de una estufa a 37°C y al finalizar este tiempo se incluyeron con el mismo paraplast. Con ayuda de un micrótopo se realizaron cortes a 10 µm de grosor y se colocaron en los portaobjetos. Los cortes histológicos fueron teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina.

Búsqueda de quistes foliculares

Una vez que estuvieron teñidos los cortes de ovario se buscaron en ellos la presencia de prequistes y quistes foliculares. Para los prequistes se consideraron todos aquellos folículos que presentaron invaginaciones en la capa de células de la granulosa. Los quistes son aquellos folículos donde la capa de la granulosa es muy delgada y la teca presentaba un engrosamiento, éstos carecían de ovocito en su interior.



Cuantificación de hormonas esteroides en suero

Las concentraciones séricas de P4, T y E2, fueron cuantificadas por la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (E.L.I.S.A), con un Kit comercial. Se tomaron 25 uL del suero y fueron colocados en los pozos correspondientes en las placas de ELISA destinadas para evaluar cada hormona, el anticuerpo estaba pegado en el fondo del pozo de la placa.

Para cada evaluación se agregaron 100 a 200 μ L de sus reactivos enzimáticos correspondientes, se agitaron y se incubaron a temperatura ambiente protegiéndolos de la luz. Concluido el tiempo de incubación de las hormonas, se eliminó el líquido contenido en los pozos de las placas por vaciado y realizaron de tres a cuatro lavados con buffer de lavado. Posteriormente se añadió a cada pozo 100 μ L de la solución de substrato y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 a 30 minutos. Se adicionaron 100 μ L de la solución de paro. Se leyó la absorbancia de cada pozo a 450nm en un equipo lector de placas. La sensibilidad del ensayo para progesterona fue de 7.52 y 8.41%, para testosterona fue de 6.42 y 7.32% y para estradiol de 8.5 y 9.3%.

Análisis estadístico

Los resultados de peso relativo de órganos y la concentración sérica de hormonas esteroides fueron analizados con la prueba de Análisis de Varianza Multifactorial (ANDEVA) seguida por la prueba de Tukey. Cuando se realizó la comparación de dos grupos se utilizó la prueba de t de Student. El número de ovocitos liberados será analizo por la prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de U de Mann-Whitney. La tasa de animales ovulantes se analizó por la prueba exacta de Fisher. Se consideraron como estadísticamente significante aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor a 0.05.

A continuación se muestra un diagrama donde se ejemplifican los modelos animales utilizados en este trabajo, (**Figura 12**).

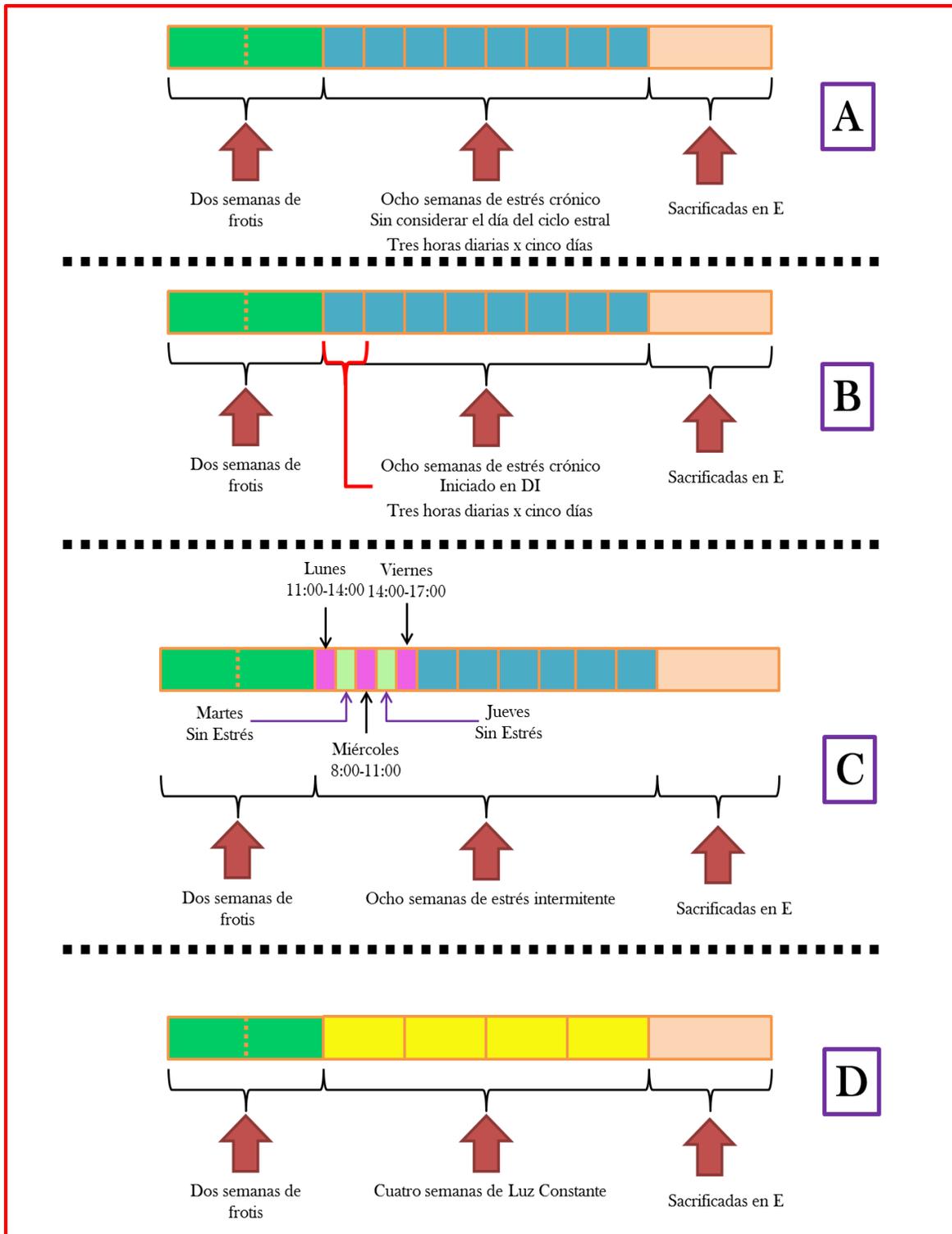


Figura 12. Diagrama de los grupos experimentales, [A] estrés crónico por frío sin considerar el día del ciclo para iniciarlo, [B] estrés crónico por frío iniciado en DI, [C] estrés intermitente por frío, [D] estrés por la luz constante.



Resultados Experimento I: Efectos de la exposición a estrés por frío de manera crónica o intermitente

Peso de Órganos

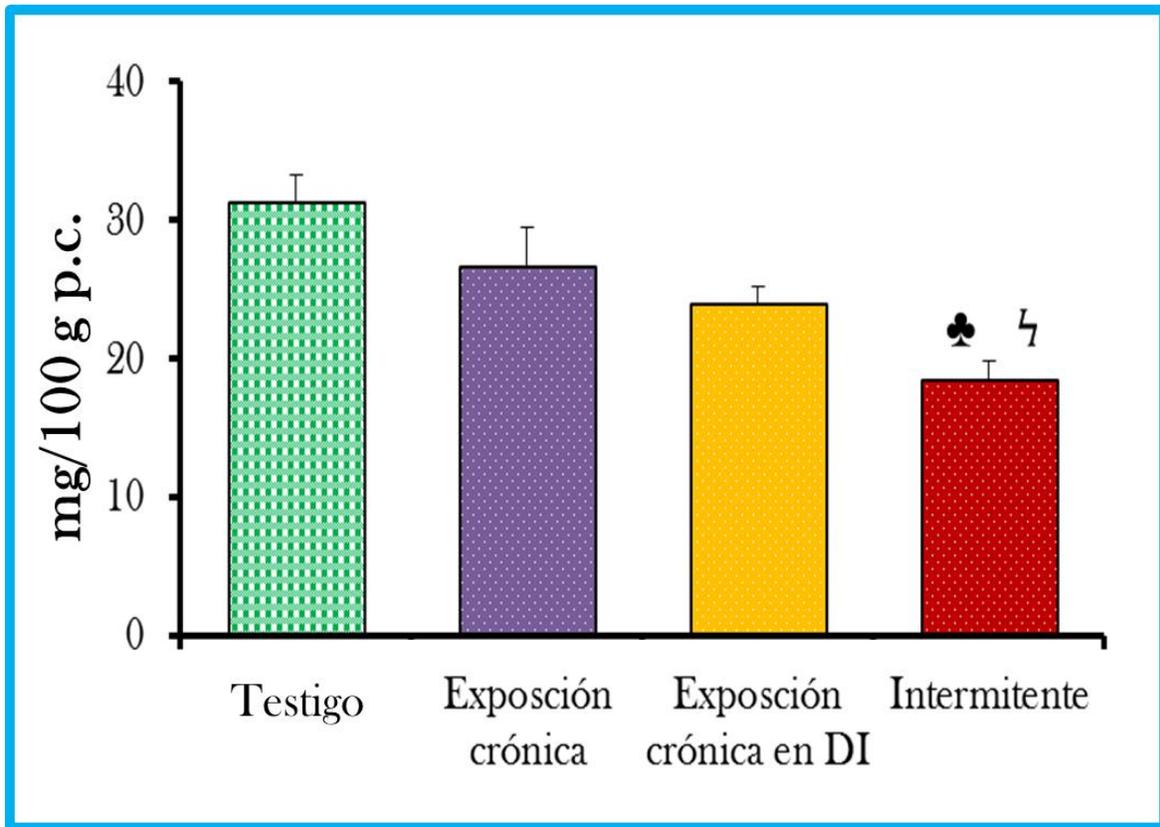
La exposición al estrés crónico por frío, dependiente o no del ciclo estral, no modificó la masa adrenal ni el peso del útero. Esta misma respuesta se observó en los animales donde el estímulo estresante se practicó de forma intermitente (Tabla 1).

Tabla 1. Media \pm eem de la masa adrenal y peso del útero del grupo **Testigo**, animales estresados de manera crónica por frío sin tomar en cuenta el día del ciclo estral (**Exposición crónica**), iniciado el día del Diestro I (**Exposición crónica en DI**) o estrés por frío de manera **Intermitente**.

Grupo	Masa adrenal mg/100 g p.c	Útero mg/100 g p.c
Testigo	19.39 \pm 1.43	152.32 \pm 15.02
Exposición crónica	23.35 \pm 2.16	147.68 \pm 9.67
Exposición crónica en DI	17.45 \pm 0.38	166.58 \pm 8.81
Exposición intermitente	18.03 \pm 1.80	171.38 \pm 11.54



El estrés por frío de manera crónica, dependiente o no del ciclo estral, no modificó **la masa ovárica**. Mientras que, en los animales expuestos al frío de manera intermitente, la masa ovárica fue menor, respecto al grupo testigo o al expuesto al frío de manera crónica (**Figura 13**).



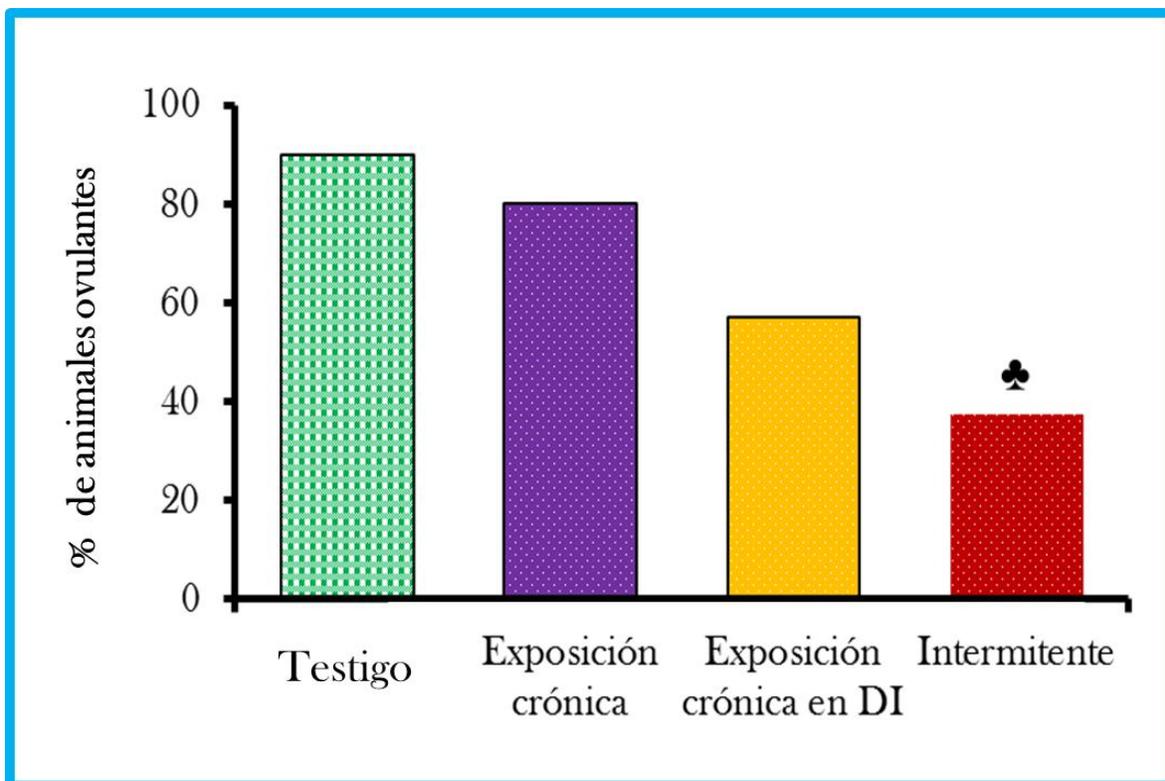
♣ $p < 0.05$ vs Testigo (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey), ⚡ $p < 0.05$ vs Exposición crónica (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

Figura 13. Media \pm e.e.m del peso de la masa ovárica del grupo **Testigo** (n=10), animales estresados de manera crónica por frío sin tomar en cuenta el día del ciclo estral (**Exposición crónica**) (n=10), iniciado el día del Diestro I (**Exposición crónica en DI**) (n=10) o a estrés por frío de manera **Intermitente** (n=10).



Porcentaje de animales ovulantes y número de ovocitos liberados

En los animales sometidos a estrés crónico por frío, sin tomar en cuenta la etapa del ciclo estral, no se modificó el **porcentaje de animales ovulantes**. Cuando el estrés se inició en el día del diestro I, el porcentaje de animales ovulantes disminuyó, aunque no de manera significativa. En el grupo de animales sometidos a estrés por frío de manera intermitente, disminuyó la tasa ovulatoria, comparado con los animales testigo (**Figura 14**).



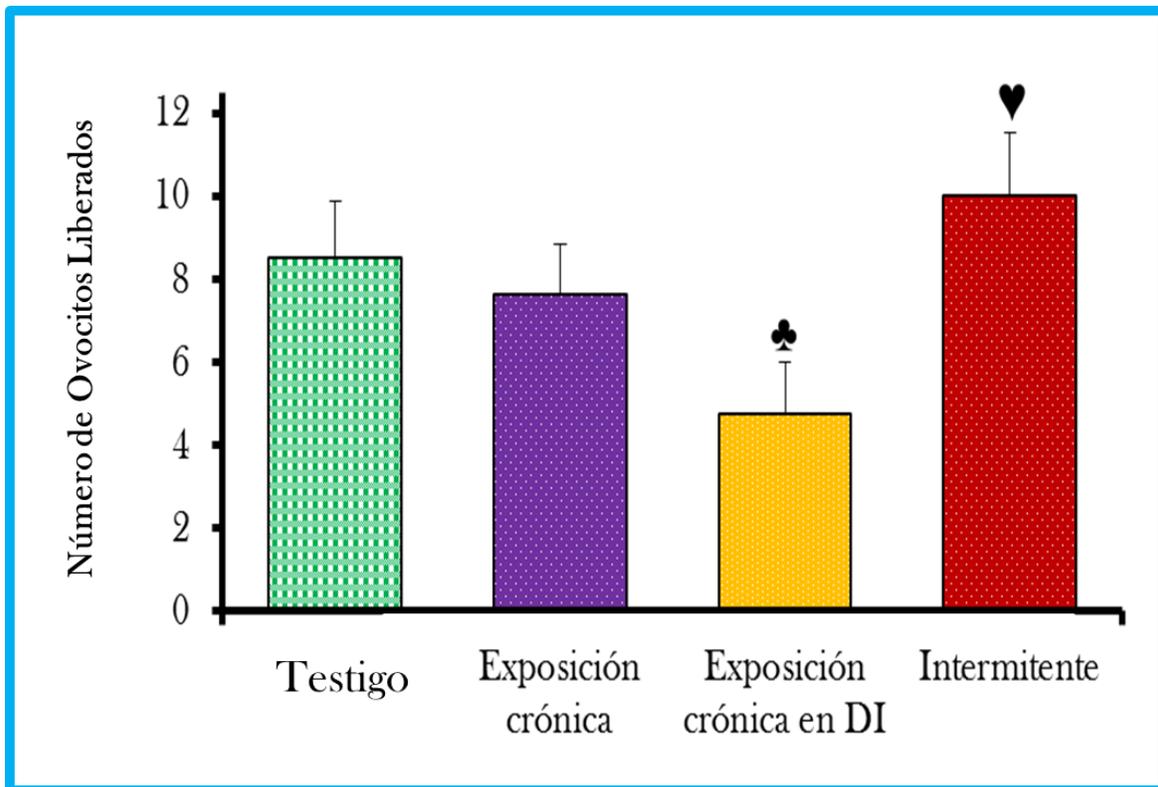
♣ $p < 0.05$ vs Testigo (prueba exacta de Fisher)

Figura 14. Porcentaje de animales ovulantes del grupo **Testigo** (n=10), animales estresados de manera crónica por frío sin tomar en cuenta el día del ciclo estral (**Exposición crónica**) (n=10), iniciado el día del Diestro I (**Exposición crónica en DI**) (n=10) o a estrés por frío de manera **Intermitente** (n=10).



El **número de ovocitos liberados** no se modificó en el grupo de animales de estrés por frío crónico independiente del ciclo estral. Cuando el estrés se inició en el día del **DI** se observó un menor número de ovocitos liberados con respecto al grupo testigo (**Figura 15**).

El estrés por frío intermitente no modificó el **número de ovocitos liberados** cuando se les compara con el grupo de animales testigo, sin embargo, cuando se compara con el grupo de estrés por frío crónico iniciado en el día del diestro I, el número de ovocitos totales fue mayor (**Figura 15**).



♣ $p < 0.05$ vs Testigo (Kruskal-Wallis seguida por la prueba de U de Mann-Whitney), ♥ $p < 0.05$ vs Exposición crónica en DI (Kruskal-Wallis seguida por la prueba de U de Mann-Whitney).

Figura 15. Media \pm e.e.m del número de ovocitos liberados del grupo **Testigo** (n=10), animales estresados de manera crónica por frío sin tomar en cuenta el día del ciclo estral (**Exposición crónica**) (n=10), iniciado el día del Diestro I (**Exposición crónica en DI**) (n=10) o a estrés por frío de manera **Intermitente** (n=10).



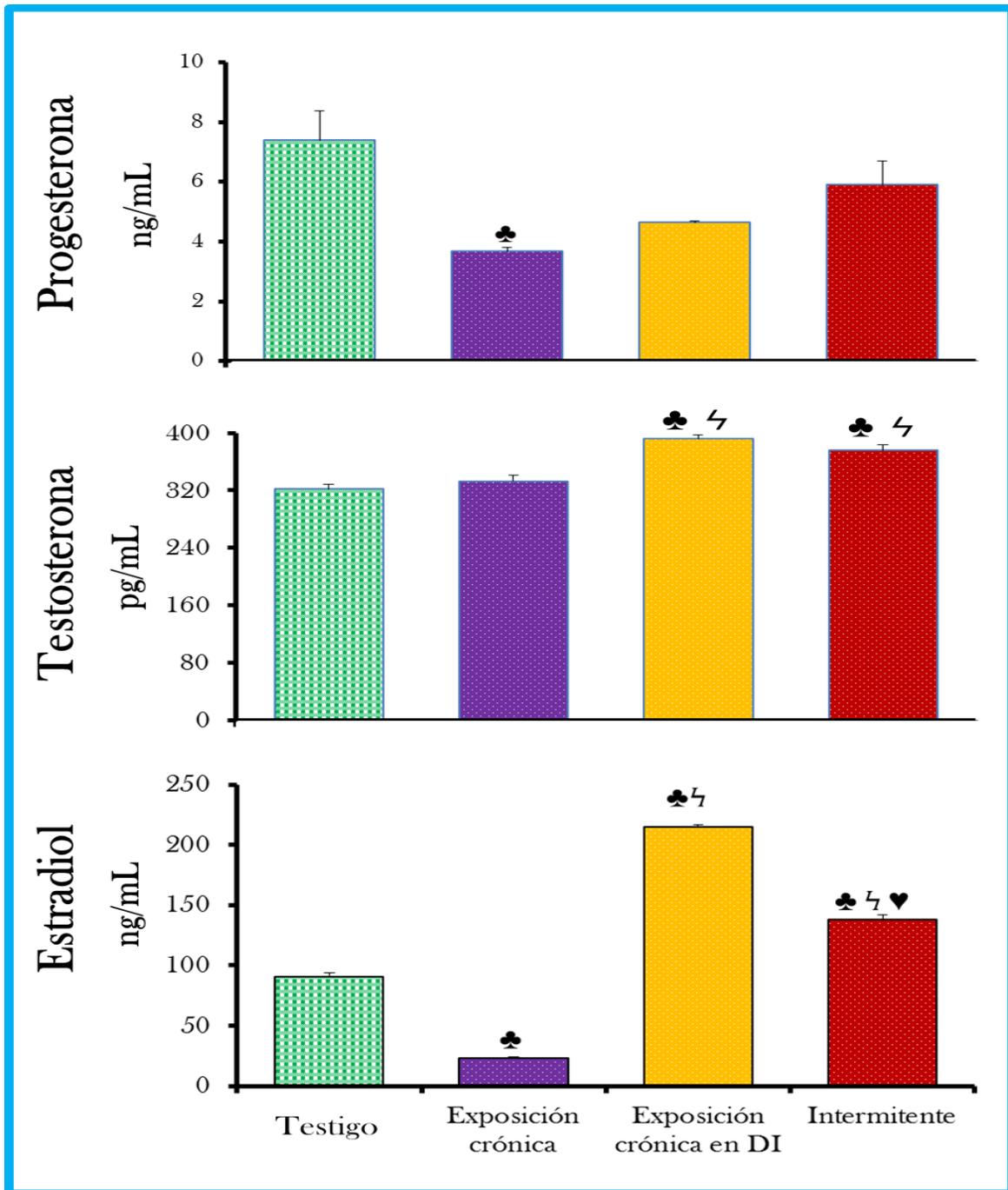
Concentración de Hormonas Esteroides

En la **Figura 16**, se muestra la concentración sérica de **P₄**, **T** y **E₂** de animales sometidos a estrés por frío.

Respecto a los animales testigo, en el grupo sometido a estrés crónico por frío independiente del ciclo estral, disminuyó la concentración sérica de **progesterona**. En el grupo expuesto al frío en el día del D1, la disminución no llegó a ser estadísticamente significativa.

Cuando el estrés se inició en el día del DI la concentración sérica de **testosterona** fue mayor en comparación con el grupo testigo. Este mismo efecto se observó cuando el estrés se practicó de manera intermitente. De los tres grupos experimentales, fue el de los animales expuestos al frío sin considerar la etapa del ciclo estral, quien presentó la menor concentración de testosterona.

La concentración sérica de **estradiol** fue menor en el grupo estresado crónicamente por frío, comparado con los animales testigo. Cuando el estrés se inició en el D1 o de manera intermitente la concentración de la hormona fue más alta que la del grupo testigo. Los animales estresados de manera intermitente presentaron una concentración menor, respecto al grupo estresado en D1. La concentración más baja de la hormona se observó en el grupo estresado de manera crónica, independiente del ciclo estral.



♣ $p < 0.05$ vs Testigo ; ♣ ♣ $p < 0.05$ vs Exposición crónica; ♣ ♣ ♣ $p < 0.05$ vs Exposición crónica en DI (ANDEVA seguida por una prueba de Tukey).

Figura 16. Media \pm e.e.m de la concentración séricas de **Progesterona**, **Testosterona** y **Estradiol** del grupo **Testigo** (n=10), animales estresados de manera crónica por frío sin tomar en cuenta el día del ciclo estral (**Exposición crónica**) (n=10), iniciado el día del Diestro I (**Exposición crónica en DI**) (n=10) o a estrés por frío de manera **Intermitente** (n=10).



Morfología ovárica

En las siguientes imágenes se muestran los cortes de ovario más representativos de cada grupo experimental.

En el corte histológico del ovario de un animal testigo, la vista panorámica (40x) permitió observar la presencia de folículos en diferentes etapas de desarrollo, así como la presencia de cuerpos lúteos frescos, indicativo de que el animal acababa de ovular (**Figura 17A**). De la figura **17B** a la **17F** se muestra las estructuras a mayor aumento.

En la Figura **18B** se muestra la presencia de un cuerpo lúteo; en **C** se observan dos folículos primarios; en **D** se muestra un cuerpo lúteo junto con un folículo secundario; en **E** se distingue un folículo secundario y en **F** se observa un folículo terciario.

En el corte histológico del ovario de un animal sometido a estrés crónico por frío, sin tomar en cuenta el día del ciclo estral para iniciarlo, la vista panorámica (40x) muestra folículos en desarrollo y cuerpos lúteos (**Figura 18A**). En **B** se señala la presencia de un folículo prequístico, folículos en desarrollo, cuerpos lúteos; en **C** se aprecia un cuerpo lúteo recién formado; en **D** se aprecian prequístes con la capa de la granulosa desorganizada y en **E y F** se muestran diferentes folículos en desarrollo.

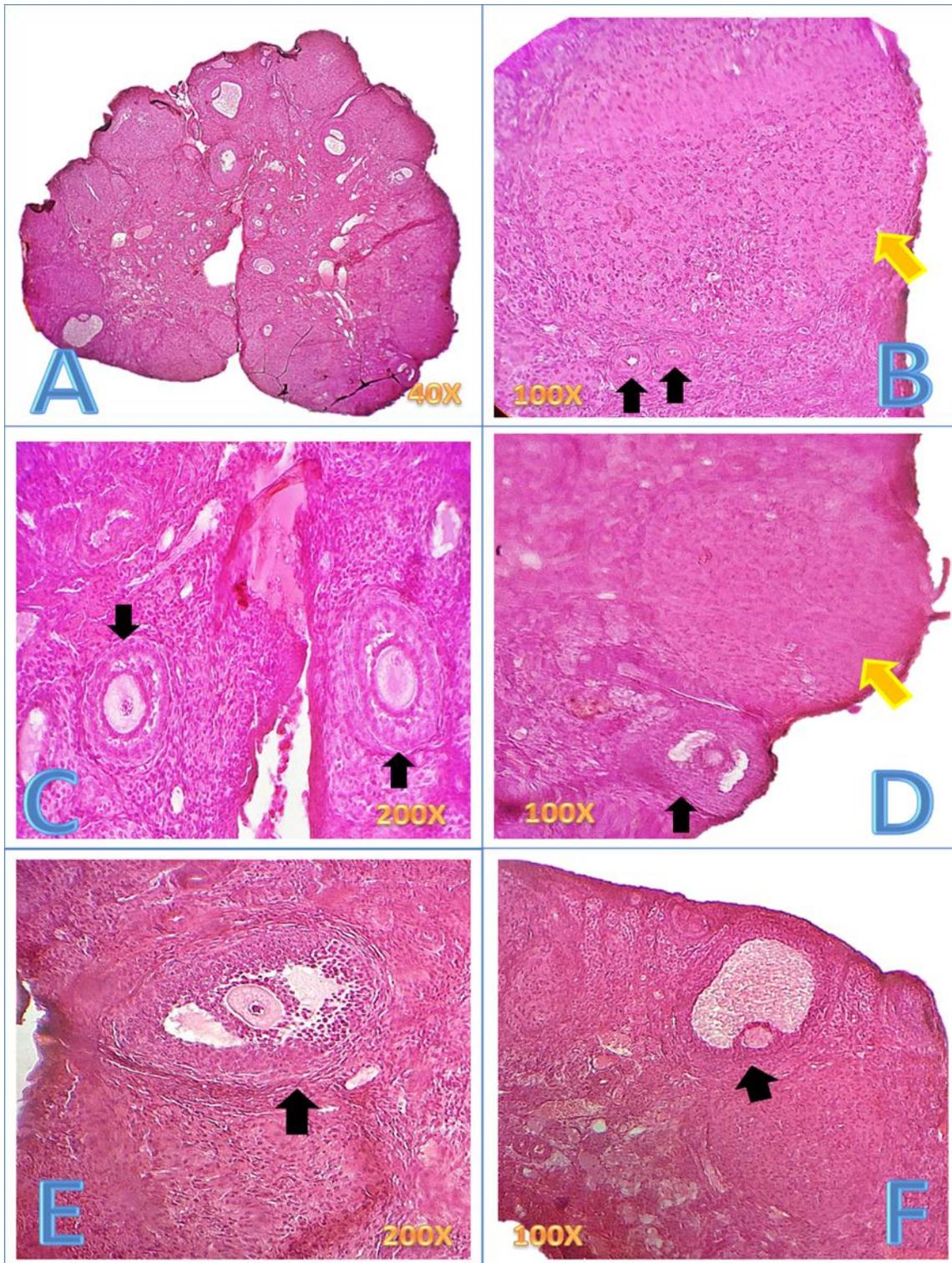


Figura 17. Microfotografías del ovario de un animal testigo. **Flechas negras:** folículos en diferentes etapas del desarrollo; **Flechas amarillas:** Cuerpo lúteo. [A] se aprecia el corte completo de un ovario, [B] y [D] observamos un cuerpo lúteo y dos folículos en crecimiento, [C], [E] y [F] se muestran folículos en crecimiento.

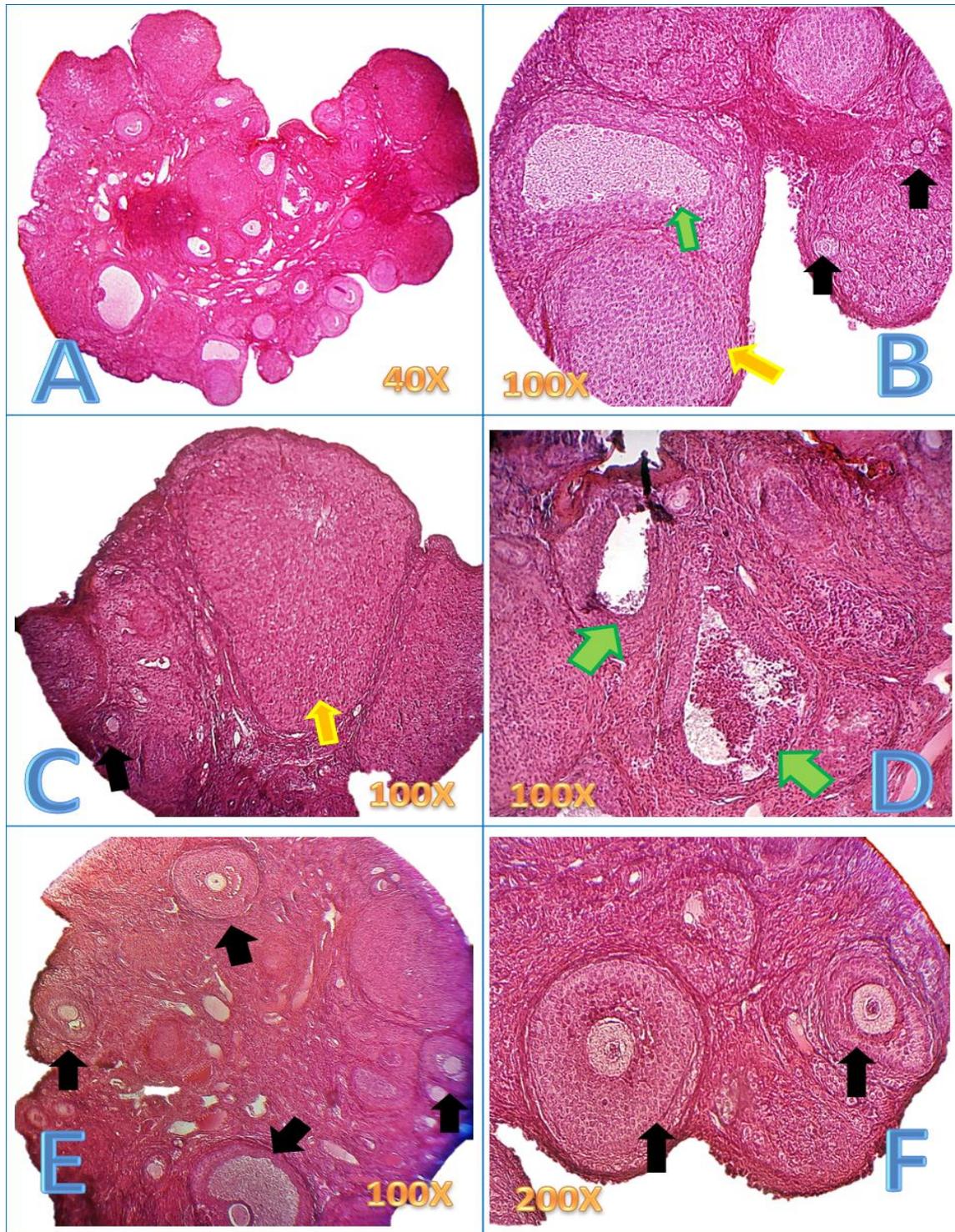


Figura 18. Microfotografías del ovario de un animal estresado crónicamente por frío. **Flechas negras:** folículos en diferentes etapas del desarrollo; **Flechas verdes:** prequistes; **Flechas amarillas:** Cuerpo lúteo. [A] se aprecia el corte completo de un ovario, [B] y [D] observamos prequistes, [B] y [C] se observan cuerpos lúteos, [B], [C], [E] y [F] se muestran folículos en crecimiento.

En la vista panorámica (40x) del corte histológico del ovario de un animal sometido a estrés crónico por frío, iniciado en el día del diestro I, se observa la pérdida de la estructura característica del ovario (**Figura 19 A**). En **B** y **C** se muestran prequistes y un folículo atrésico con antro en el que no se ha formado el *cumulus oophorus*; en **D** se presenta a mayor aumento un folículo prequístico.

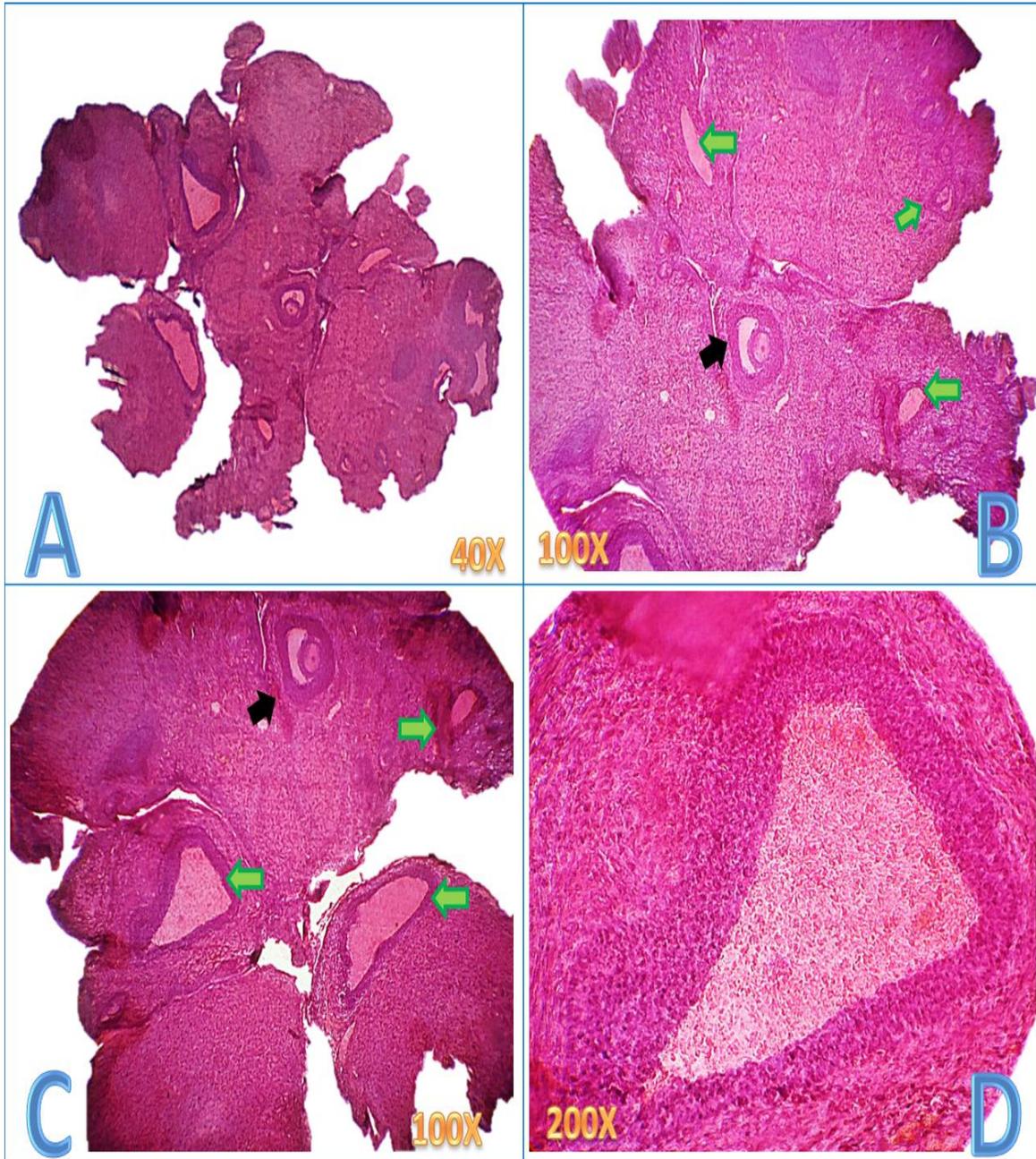


Figura 19. Microfotografías del ovario de un animal estresado crónicamente por frío iniciado en Diestro I. **Flechas verdes:** prequistes; **Flechas negras:** folículos. [A] se aprecia el corte completo de un ovario, [B] y [C] se encuentran folículos en crecimiento [B], [C] y [D] observamos prequistes.

En el corte histológico del ovario de un animal sometido a estrés intermitente por frío, la vista panorámica (40x) muestra que se pierde totalmente la estructura del ovario (**Figura 20 A**). En **B**, **C** y **D** se señalan estructuras quísticas caracterizadas por un menor número de capas de la granulosa y la falta de ovocito.

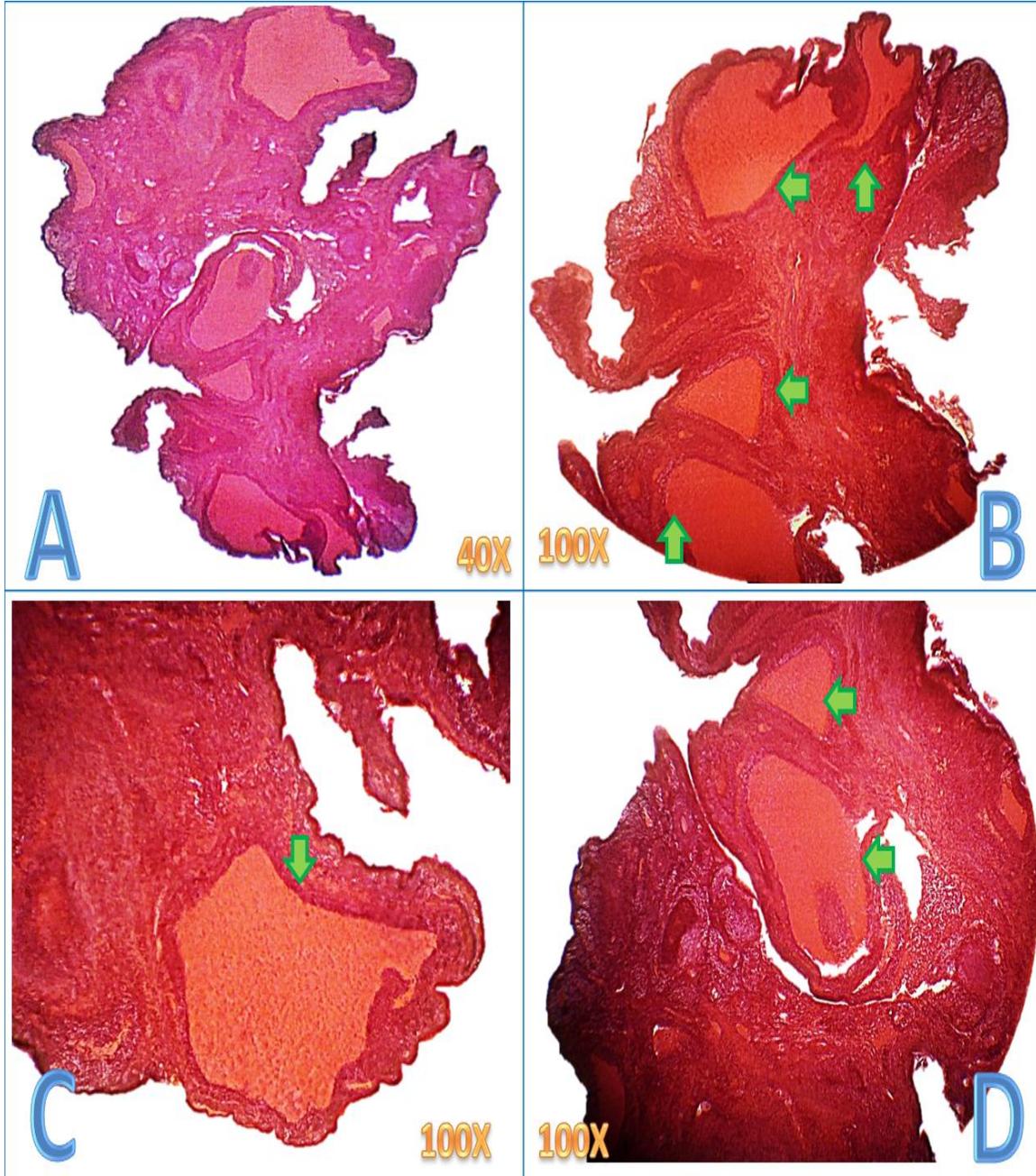


Figura 20. Microfotografías del ovario de un animal estresado de forma intermitente. **Flechas verdes:** prequistes. [A] se aprecia el corte completo de un ovario, [B], [C] y [D] observamos prequistes.



Discusión experimento I: Efectos de la exposición a estrés por frío de manera crónica o intermitente.

En los animales, un estímulo estresante induce alteraciones fisiológicas que tienen impacto sobre las funciones de los diferentes aparatos y sistemas que conforman al individuo (Ehnert y Moberg, 1991; Alvarez, 2008; Valdespino y col, 2007; Nteeba y col, 2015).

En el presente estudio se observó que la inducción del estrés por frío, produce cambios en la respuesta ovulatoria, en la morfología del ovario y en las concentraciones séricas de las hormonas esteroides, cambios que dependen de período de exposición al estímulo estresante y de la etapa del ciclo estral.

El estrés por frío desencadena la hiperactividad del sistema nervioso simpático, lo que resulta en el incremento de la concentración de NA en el ovario (Paredes y col, 1998; Dorfman y col, 2003; Araya y col, 2004; Espinoza, 2014; Navarrete, 2014), en el ganglio celíaco mesentérico superior (Paredes y col, 1998; Gálvez y col, 1999; Araya y col, 2004) y a nivel central (Finlay y col, 1997; Bernucci y col, 2008; Bernuci y col, 2013). Las evidencias obtenidas en el modelo del animal estresado por frío llevan a sugerir que las alteraciones en el crecimiento folicular y la respuesta ovulatoria van a estar en función de si se produce o no el incremento en la concentración de NA (Paredes y col, 1998; Bernucci y col, 2008; Zafari y col, 2010).

Resultados de nuestro laboratorio muestran que en la rata prepúber la exposición a frío no siempre resulta en el incremento de la concentración de NA ovárica. Así, en la rata de 24 días de edad la exposición a estrés por frío durante 2 o 3 semanas la incrementa, mientras que si la exposición es por un período de 5 u 8 semanas no se modifica la concentración de la amina. Independientemente de la concentración de NA registrada, no se modificó la respuesta ovulatoria. Estos resultados apoyan la idea de que el animal prepúber desarrolla mecanismos adaptativos, que le permitirían a los animales ovular al primer estro vaginal (Espinoza, 2014; Navarrete, 2014; Velázquez, 2016).

No sólo a nivel de ovario se normaliza la actividad de los nervios simpáticos después de un período largo de exposición al frío. En el LC, núcleo predominantemente noradrenérgico, la inmunoreactividad a c-Fos [proteína utilizada para medir la actividad neural (Gómez, 2017)] incrementa cuando las ratas adultas son expuestas a una sesión de frío por tres horas. Sin embargo, cuando son estresadas durante 4 u 8 semanas, durante tres horas diarias, la actividad del *locus* tiende a ser similar a la de un animal sin estrés. Los autores sugieren que los aumentos iniciales y transitorios de la NA ovárica son regulados por las neuronas LC y que la exposición crónica trae consigo una adaptación del sistema noradrenérgico (Bernucci y col., 2013).



En el presente estudio, en la rata adulta los efectos que ejerce el estrés por frío sobre la respuesta ovulatoria y la morfología ovárica dependen del tiempo de exposición. Cuando el estrés es producido de manera crónica, sin considerar el día del ciclo estral, no se modifica el porcentaje de animales ovulantes ni la cuota ovulatoria, resultados que nos permiten sugerir que el animal puede desarrollar procesos adaptativos que le ayudan a sobrellevar el estímulo estresante, y de esta manera se produce la ruptura del folículo de una manera normal. El grupo de [Paredes \(1998\)](#) plantea que en las ratas adultas se requiere de un período de tiempo para que el animal se adapte al frío, donde la disminución en la actividad de los nervios simpáticos podría ser la responsable del proceso adaptativo.

Por otra parte, los resultados del presente estudio apuntan a que la respuesta del animal al frío depende del estado endócrino en el cual se inicie el estímulo estresante, ya que cuando los animales están en DI y son sometidos de manera crónica al frío, se observa una alteración en la arquitectura del ovario y la disminución en el número de ovocitos liberados. Dada la alteración en la morfología del ovario no descartamos que en ciclos subsiguientes se pudiera bloquear la respuesta ovulatoria. Es probable que esta respuesta se deba a que en el DI hay un evento neural que induce la liberación de gonadotropinas necesarias para la ovulación ([Domínguez y col., 1982](#)). Además, hay varias evidencias experimentales que muestran que ante diferentes tratamientos farmacológicos realizados en ésta etapa del ciclo, traen consigo una disminución en el número de animales ovulantes, así como el número de ovocitos liberados ([Domínguez y col, 1982](#); [Cruz y col, 1989](#); [Trujillo, 2015](#)). Así, después de realizar adrenalectomías en las diferentes etapas del ciclo estral se llega a la conclusión de que en el DI la información proveniente de las adrenales es indispensable para que se dé la secreción de LH que conlleva a la ovulación ([Martínez, 2015](#)).

Probablemente la disminución en la respuesta ovulatoria en los animales estresados en el DI, se deba a la activación del eje HHA. El frío al activar el sistema simpático inicialmente resulta en el incremento de NA, la cual actúa sobre el hipotálamo induciendo el incremento en la secreción de CRH y éste estimula a la hipófisis en la secreción de ACTH. Ésta última actúa sobre la adrenal estimulando la síntesis de glucocorticoides, los que tienen efectos inhibitorios en las funciones ováricas ([Brann y Mahesh, 1991](#); [Hank y col, 2001](#); [Ma y Morilak, 2005](#)).

También podemos suponer que la disminución en el número de ovocitos liberados sea resultado de algún fenómeno que esté ocurriendo a nivel del propio ovario. [Bernucci y colaboradores](#) en el [2008](#) mostraron que en la rata adulta, después de 8 semanas de estrés por frío disminuye el número de ovocitos liberados. Estos resultados son interpretados por los autores como respuesta a la disminución en el número de folículos preovulatorios sanos y al aumento en el número quistes foliculares. Esto podría ayudar a explicar por qué los animales donde el estrés crónico se inició en DI disminuye el número de ovocitos liberados, ya que en su histología se aprecian varios prequistes foliculares y un escaso desarrollo folicular.



Con la información bibliográfica reunida y los datos que ofrece nuestro estudio se puede plantear que, cuando los animales son sometidos a estrés por periodos largos con días y horarios fijos, se desarrollan mecanismos adaptativos internos que permiten sobrellevar el estímulo estresante físico del medio externo. Para analizar esta posibilidad, en este estudio tratamos de evitar que el animal se adaptara al estímulo estresante y para ello, las sesiones de exposición al frío se realizaron cada tercer día y los horarios fueron variables, a lo que llamamos estrés intermitente. En estos animales se pierde completamente la arquitectura del ovario, lo que puede ayudarnos a explicar la disminución en la tasa de animales ovulantes. El grupo [Araya \(2004\)](#) propone que el estrés por frío es capaz de inducir mayor actividad de los nervios simpáticos, lo que se traduciría en la formación de quistes foliculares. Dado que en nuestros animales se pudo apreciar folículos prequísticos, es posible que la concentración de NA siga alta, idea que necesita ser corroborada. Con estos resultados podemos sugerir que este modelo de exposición evita la adaptación.

En los animales expuestos a estrés crónico por frío se observó una tendencia a la disminución en la masa ovárica, esta disminución sólo es significativa en los animales estresados de forma intermitente. Es posible que esta disminución esté relacionada con la alteración en la arquitectura del ovario. Se tiene reportado que en ratas prepúber, el peso de la masa ovárica no se modifica después de 2, 3 u 8 semanas de estrés crónico por frío ([Navarrete, 2014](#); [Velázquez, 2016](#)), similar a lo que se reporta para las ratas adultas estresadas por frío más restricción de movimiento ([Paredes y col, 1998](#)).

La disminución en la masa ovárica de los animales estresados de forma intermitente, podría estar dada por el incremento de la actividad simpática. Se ha mostrado que en ratas catatónicas hay una interacción entre el aumento en la concentración de NA y un bajo peso ovárico, atribuyéndolo a la disminución de los procesos proliferativos dentro del ovario y la foliculogénesis ([Klochkov y col, 2009](#)). Como observamos en la histología ovárica de los animales estresados de forma intermitente, las estructuras predominantes son los prequistes foliculares y un escaso desarrollo folicular. Pudiera ser que el estrés intermitente por frío ocasione descargas de NA más prominentes que el estrés crónico, lo que ocasionaría que los procesos de foliculogénesis y proliferación celular se hayan enlentecido.

En la bibliografía existe controversia sobre el efecto de estimular las fibras simpáticas por la exposición de estrés por frío sobre la secreción de progesterona. En la rata prepúber o adulta, el estrés crónico por frío durante 3, 4, 5 u 8 semanas no modifica la concentración de la hormona ([Dorfman y col, 2003](#); [Bernuci y col, 2008](#), [Bernuci y col, 2013](#); [Espinoza, 2014](#); [Navarrete, 2014](#)). Otros muestran que en la rata adulta expuesta a estrés crónico por frío durante 4 u 8 semanas, la concentración de la hormona incrementa ([Dorfman y col, 2003](#); [Bernuci y col, 2013](#)), mientras que la rata prepúber después de 2 o 3 semanas de exposición al frío disminuye la concentración de P₄, disminución que se hace más notable si además del frío los animales son sometidos a restricción de movimiento ([Velázquez, 2016](#)), esta respuesta también se observa en la rata adulta, después de 3 u 11 semanas ([Paredes y col,](#)



1998). Los resultados del presente estudio también mostraron que tanto el estrés crónico como el intermitente tienden a disminuir la concentración de progesterona, disminución que fue significativa cuando no se consideró el día del ciclo estral.

Dado que se plantea que el frío es capaz de incrementar la actividad nerviosa del ovario a través de la expresión del NGF así como de su receptor de baja afinidad y una alta tasa de liberación de NA, lo que resulta en la hiperactividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario (Araya y col, 2004), un posible mecanismo que explica los cambios en la actividad esteroidogénica del ovario podría estar vinculado con la función del NOS. Al respecto se sabe que la información neural que transcurre por el NOS participa en la regulación de la secreción de P₄, T y E₂ (Morales-Ledesma y col, 2010; Morales-Ledesma y col, 2012).

Se ha propuesto que el NOS regula de manera inhibitoria la secreción de P₄, ya que al realizar la sección bilateral de este nervio aumenta la concentración de la hormona (Espinoza, 2014), mientras que la estimulación eléctrica del nervio induce su disminución. Como resultado de una mayor actividad del NOS disminuye el flujo sanguíneo y la concentración de pregnenolona, sustrato necesario para la síntesis de P₄ (Weiss y col, 1982). La exposición a frío induce vasoconstricción (Ahonen y col, 2001; Wolff y col, 2008), lo que podría disminuir el flujo sanguíneo que llega al ovario y de esta manera se podría explicar la disminución en la secreción de P₄, tal y como lo sugiere el grupo de Weiss (1982).

Se ha propuesto que la regulación que ejerce el NOS en la secreción de P₄ es asimétrica, donde al parecer es el NOS izquierdo el que está más comprometido. Idea que se apoya en el hecho de que en un animal tratado con aceite de maíz la sección del NOS izquierdo resulta en la disminución de la P₄ (Morales-Ledesma y col, 2010). Esta interpretación nos abre la posibilidad de sugerir que en animales estresados por frío, se manda una señal neural a través del NOS izquierdo hacia los ovarios, lo que resulta en la disminución en la concentración de P₄.

La disminución en la secreción de P₄ también puede estar asociada con una mayor actividad de los receptores α adrenérgicos. Se ha mostrado que la activación de estos receptores disminuye la secreción de P₄, contrario a lo que ocurre cuando se activan los receptores β adrenérgicos (Weiss y col, 1982). Esta respuesta también se presenta en el modelo del SOPQ, inducido por la administración de VE, donde se mantienen funcionales los receptores α adrenérgicos del ovario y se bloquean los receptores β con propanolol (De León, 2016).

Se ha mostrado que los genes que codifican para las enzimas catalíticas, reguladoras, transductoras de señales o transportadoras pertenecientes a la familia CYP 450 tienen una *up-regulation*, después de 24 horas continuas de exposición al frío (Chen y col, 2012). Los glucocorticoides y las catecolaminas que son los productos finales de la activación del eje HHA pueden regular la expresión de las CYP (Daskalopoulos y col, 2012; Kot y col, 2015) por medio de la activación de los receptores adrenérgicos α y β (Daskalopoulos y col, 2012).



Por lo que no descartamos la posibilidad que en los animales estresados por frío incrementa la actividad del complejo CYP 450, lo que resulta en una mayor degradación de la progesterona que se refleja en una menor concentración sérica de ella, tal y como lo ha sugerido el grupo de [Daskalopoulos \(2012\)](#).

En la rata adulta el estrés crónico por frío no modifica la concentración de andrógenos después de haber sido expuestas por un período de 3 o 4 semanas ([Dorfman y col, 2003](#); [Bernuci y col, 2013](#)). Esta misma respuesta se observa en la rata prepúber cuando el período es por 2, 3 u 8 semanas ([Espinoza, 2014](#); [Navarrete, 2014](#); [Velázquez, 2016](#)). La respuesta al frío depende tanto de la edad del animal como del período de exposición, ya que, en la rata adulta la exposición al frío por 8 semanas o el frío más la restricción de movimiento durante 3 u 11 semanas, incrementa la concentración de andrógenos ([Paredes y col, 1998](#); [Bernuci y col, 2008](#); [Bernuci y col, 2013](#)).

En animales donde hay incremento de la actividad del sistema simpático, por la administración de VE o por la exposición al frío, la disminución del tono simpático por la sección bilateral del NOS resulta en la disminución de la concentración de T ([Barria y col, 1993](#); [Morales-Ledesma y col, 2010](#); [Espinoza, 2014](#)). Resultados que apoyan la idea de que la información que lleva el NOS participa en la regulación de la secreción de T.

En la rata adulta la regulación que ejerce el NOS en la secreción de testosterona es asimétrica y varía a lo largo del ciclo estral. Idea que se apoya en el hecho de que la sección del NOS izquierdo en el DI, resulta en una mayor concentración de T, mientras que si se realiza en DII es menor, y no se encuentran cambios cuando la denervación se realiza en los días del proestro o estro ([Flores y col, 2011](#)). En nuestros grupos de estudio la exposición al frío, iniciada en el día del DI, resulta en una mayor concentración de T, resultado que podría indicar que el frío produjo mayor actividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario por el NOS, donde al parecer esta actividad es más marcada en el día del DI, lo que explicaría que cuando tenemos a los animales sin considerar la etapa del ciclo en la cual se inicia la sesión de estrés, no se modifique la concentración de la hormona.

La NA al unirse a los receptores β adrenérgicos que se encuentran en la capa de las células de la teca estimula la biosíntesis de andrógenos ([Dyer y Erickson, 1985](#); [Bernuci y col, 2013](#)). El grupo de [Bernuci \(2008\)](#) propone que el aumento en T ante el estrés por frío es producto de un efecto local en el ovario, que está modulado por los nervios noradrenérgicos que llegan a la capa de la teca. Proponemos que en los animales estresados de forma intermitente no hay una adaptación ante el frío, lo que facilita que se mantenga la hiperactividad del sistema simpático, que se traduce por concentraciones elevadas de NA, la que pudiera estar estimulando los receptores β adrenérgicos de la teca del folículo prequístico (estructura que encontramos en estos animales), induciendo el aumento de la concentración de T.

En la rata adulta la concentración de E2 no se modifica después de la exposición al estrés por frío durante 3, 4 u 11 semanas ([Dorfman y col, 2003](#); [Bernuci y col, 2013](#)), mientras que si



el estrés es por 8 semanas incrementa la concentración de la hormona (Bernuci y col, 2008; Bernuci y col, 2013), esta respuesta también se observa cuando se combina el estrés por frío con la restricción de movimiento durante tres semanas (Paredes y col., 1998), o bien con la administración de una dosis de VE (Zafari y col, 2010).

En la rata prepúber después de 2, 3 o 5 semanas de estrés por frío no se modifica la concentración de E2 (Espinoza, 2014; Velázquez, 2016), mientras que si la exposición es por 8 semanas se observa disminución en la concentración de la hormona (Navarrete, 2014). Se ha sugerido que la disminución en el estradiol puede darse en respuesta al menor número de folículos secundarios y antrales presentes en el ovario, así como a la menor actividad de las aromatasas encargadas de transformar los andrógenos a estrógenos (Navarrete, 2014).

En el presente trabajo la histología de los ovarios de los animales expuestos al estrés crónico por frío, sin considerar la etapa del ciclo estral, no mostró cambios respecto a lo observado en animales no estresados, sin embargo disminuyó la concentración de E2. Esta respuesta puede ser atribuida a la disminución en la actividad de las aromatasas, enzimas encargadas de la biotransformación de andrógenos a estrógenos, y esto explicaría porque la concentración de testosterona no se modifica.

Otra explicación es que el frío al inducir mayor actividad de las fibras simpáticas, facilite que el ovario reciba, mediante el NOS, un mayor aporte de óxido nítrico (Casais y col, 2007), el cual disminuye la actividad de las aromatasas (Voorhis y col, 1994; Snyder y col, 1996).

La disminución en la actividad de las aromatasas parece no producirse cuando el estrés crónico por frío se inicia en el día del DI o cuando la exposición al frío se realiza de manera intermitente. La histología ovárica de estos grupos experimentales reveló la formación de prequistes foliculares, los cuales son responsables del aumento en la concentración de T, sustrato para la biosíntesis de E2. Diversos autores han propuesto que los prequistes y quistes ocasionados por el frío, facilitan la transformación de los andrógenos a estrógenos (Paredes y col, 1998; Bernuci y col, 2008; Zafari y col, 2010; Bernuci y col, 2013).

La NA al unirse a los receptores β adrenérgicos promueve la síntesis de las hormonas esteroideas, el incremento en la secreción de NA en el ovario durante las semanas de estrés por frío estimula los receptores β adrenérgicos lo que se traduce en la mayor secreción de hormonas esteroideas (Fernandois, 2014). En nuestros animales estresados por frío, tanto los iniciado en DI como los de exposición intermitente, la activación de los nervios simpáticos provoca liberación de NA la cual estimula los receptores β adrenérgicos provocando la activación de las aromatasas encargadas de sintetizar E2.

El incremento de E2 también puede ser explicado por un aumento en la liberación de VIP ante la hiperactividad del sistema simpático, ya que el VIP es capaz estimular la secreción de estrógenos, principalmente de E2 (Davoren y Hsueh, 1985; Ahamed y col, 1986), al aumentar la actividad de las aromatasas (George y Ojeda, 1987). La observación de que en



los animales expuestos al frío sin tomar en cuenta el día del ciclo estral no haya incrementado el E2, podría ser el reflejo de que en este grupo hay animales en todos los días del ciclo estral, y se ha reportado que el papel del VIP varía con el día del ciclo estral (Rosas y col, 2015).



Modelo del experimento I

A partir de los resultados del experimento I, se plantearon los siguientes modelos experimentales:

En la rata adulta, el estrés crónico por frío, donde no se contempló el día del ciclo estral para iniciarlo (**Figura 21**), el frío indujo vasoconstricción lo que induce la disminución en el aporte del sustrato necesario para la biosíntesis de P4 (pregnenolona) [1]. La hiperactividad de las fibras simpáticas, las cuales están integradas en el NPO y principalmente en el NOS, provoca la liberación de altas concentraciones de NA, neurotransmisor que al unirse a los receptores α adrenérgicos [2] activa las enzimas encargadas de la degradación de la P4, las cuales pertenecen al complejo enzimático CYP 450 [3]. Puesto que no hay un aporte de pregnenolona suficiente para la biosíntesis de P4 y las enzimas encargadas de su degradación están activas, la concentración de P4 se ve disminuida en este grupo. La hiperactivación del NOS provoca la liberación de óxido nítrico, el cual induce la disminución en la actividad de las aromatasas, enzimas encargadas de sintetizar E2 a partir de T [4], lo que resultó en la disminución de E2.

En la rata adulta, el estrés crónico por frío iniciado en DI o el estrés de manera intermitente (**Figura 22**) provocó la formación de prequistes foliculares, estructuras que secretan altas concentraciones de T [1]. El estrés por frío provoca hiperactividad en las fibras simpáticas, ocasionando la liberación de altas concentraciones de NA y VIP [2, 5]. La NA se une a los receptores β adrenérgicos [3] y activa la biosíntesis para T y E2 [4]. El VIP provoca el incremento en la actividad de las aromatasas [5]. Entonces el incremento de T se debe a la presencia de los prequistes foliculares y a la unión de NA con los receptor β adrenérgicos. Y el incremento de E2 es por acción de las aromatasas en respuesta al VIP y por la activación de los receptores β -adrenérgicos presentes en los prequistes foliculares ováricos.



Resultados Experimento II: Efectos de la exposición a la luz constante

Peso de Órganos

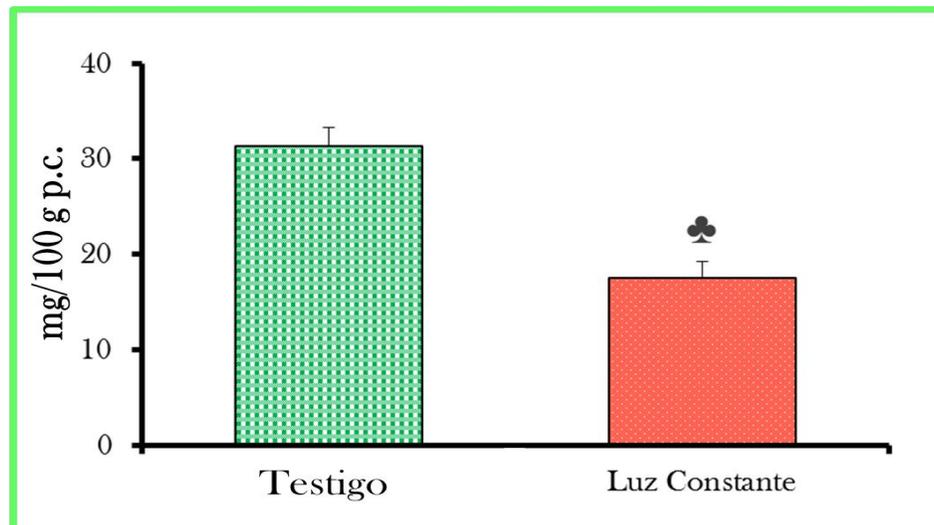
La exposición a luz constante disminuyó el **peso** de la masa **adrenal** cuando es comparada con el grupo testigo. El peso del **útero** no se modificó en los animales expuestos a la luz constante (Tabla 2).

Tabla 2. Media \pm e.e.m. de la masa adrenal y peso del útero del grupo **Testigo** y animales estresados por **Luz Constante**.

Grupo	Masa adrenal mg/100 g p.c	Útero mg/100 g p.c
Testigo	19.4 \pm 1.43	152.3 \pm 15.02
Luz Constante	15.9 \pm 0.89 ♣	152.0 \pm 6.4

♣ $p < 0.05$ vs Testigo (Prueba T de Student)

La **masa ovárica** fue menor en los animales expuestos a la luz constante cuando es comparado con su grupo testigo (Figura 23).



♣ $p < 0.05$ vs Testigo (Prueba T de Student)

Figura 23. Media \pm e.e.m del peso de la masa ovárica del grupo **Testigo** (n=10) y animales expuestos a **Luz Constante** (n=15).



Porcentaje de animales ovulantes y número de ovocitos liberados

En las ratas que fueron expuestas a luz constante se observó una tendencia a la disminución del **porcentaje de animales ovulantes**, aunque no fue estadísticamente significativo cuando es comparada con el grupo testigo (**Figura 24**).

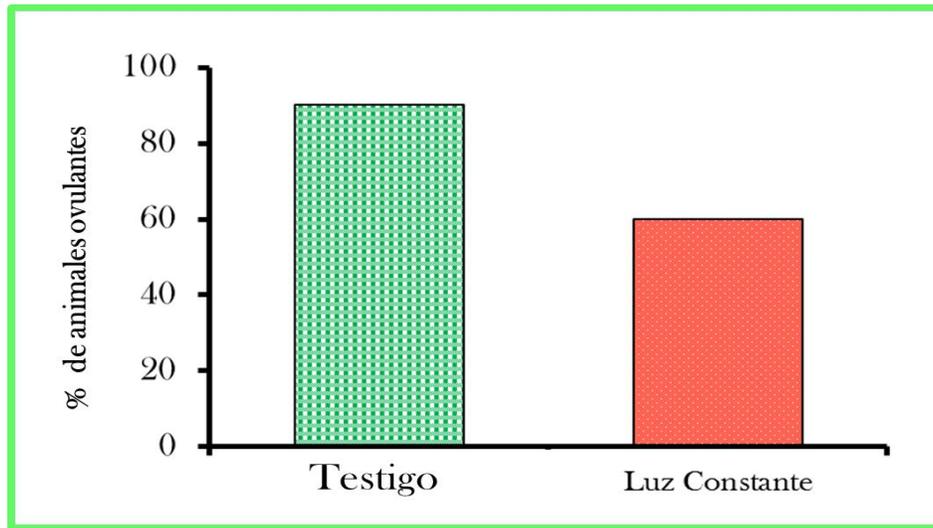


Figura 24. Porcentaje de animales ovulantes del grupo **Testigo** (n=10) o animales expuestos a **Luz Constante** (n=15).

El **número de ovocitos liberados** de aquellos animales que llegaron a ovular después de la exposición a la luz constante, no se modificó cuando es comparado con el grupo testigo (**Figura 25**).

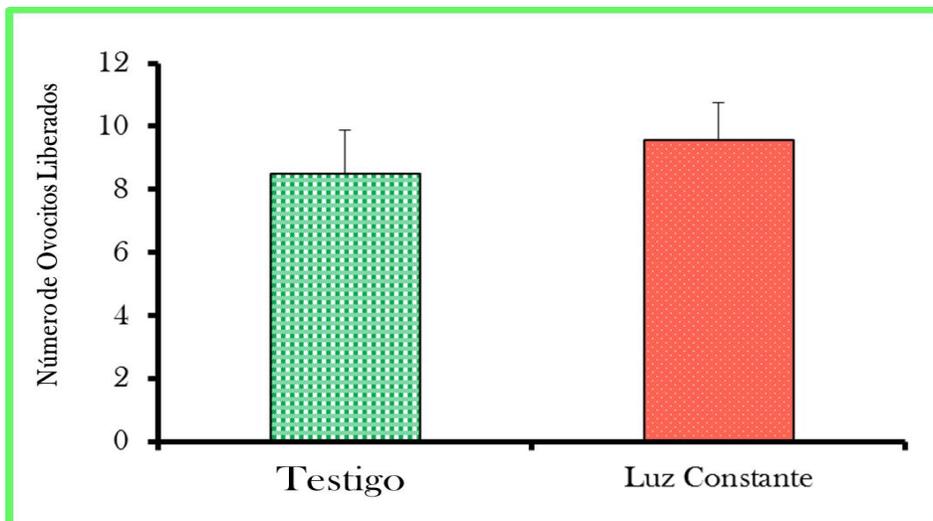


Figura 25. Porcentaje de animales ovulantes del grupo **Testigo** (n=10) y animales expuestos a **Luz Constante** (n=15).



Concentración de Hormonas Esteroides

En la **Figura 26**, se muestra la concentración sérica de **P₄**, **T** y **E₂** de animales expuestos a la luz constante.

Respecto a los animales testigo, el grupo estresado por la exposición a luz constante incrementó las concentraciones séricas de las tres hormonas, sin embargo el aumento en la concentración de **E₂** no fue estadísticamente significativo.

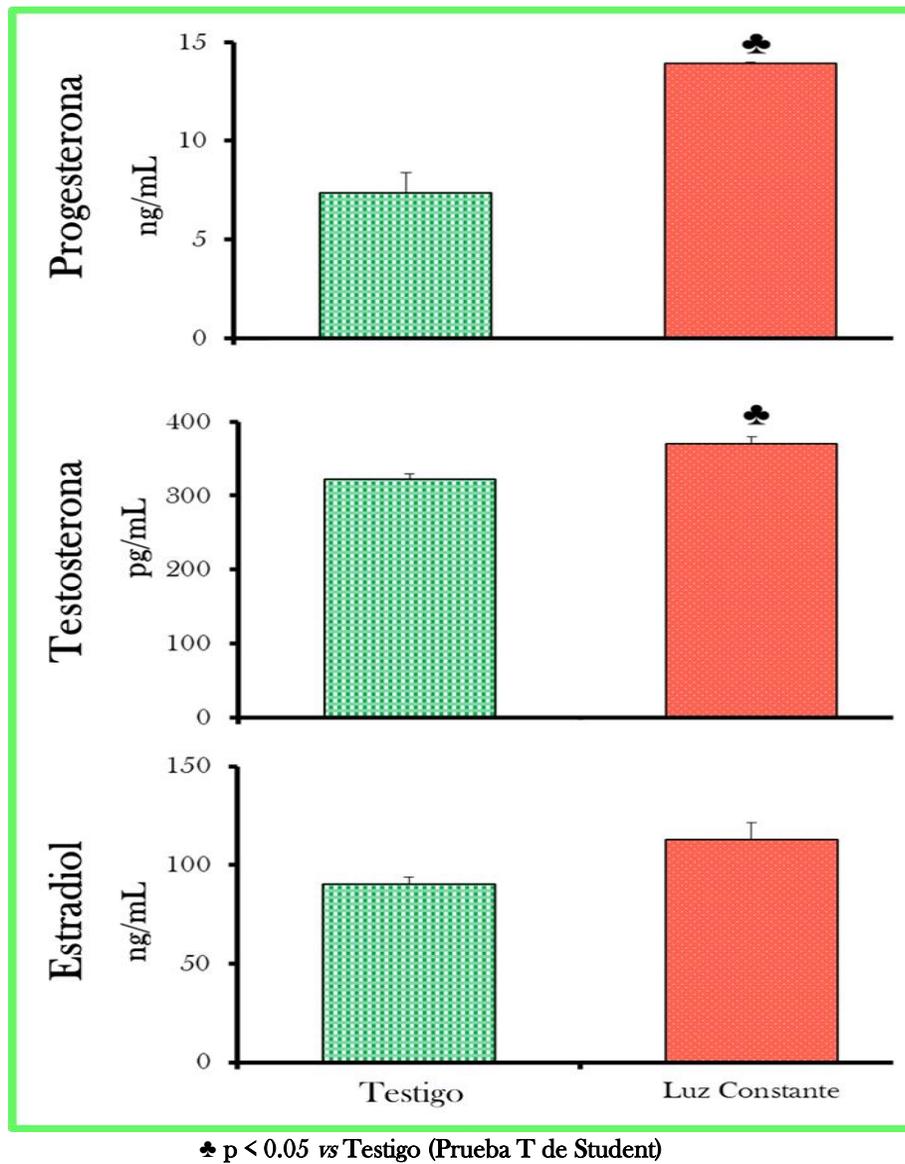


Figura 26. Media ± e.e.m de la concentración sérica de **Progesterona**, **Testosterona** y **Estradiol** del grupo **Testigo** (n=10) o de animales expuestos a **Luz Constante** (n=15).



Morfología ovárica

En las siguientes imágenes se muestran los cortes de ovario más representativos de cada grupo experimental.

En el corte histológico del ovario de un animal testigo, la vista panorámica (40x) permitió observar la presencia de folículos en diferentes etapas de desarrollo, así como la presencia de cuerpos lúteos frescos, indicativo de que el animal acababa de ovular (**Figura 27A**). En las figuras **27 B** a **27 F** se muestra las estructuras a un mayor aumento

En **B** se muestra la presencia de un cuerpo lúteo; en **C** se observan dos folículos primarios; en **D** se muestra un cuerpo lúteo junto con un folículo secundario; en **E** se distingue un folículo secundario y en el **F** se observa un folículo terciario.

En el corte histológico del ovario de un animal expuesto a luz constante, la vista panorámica (40x) muestra folículos primarios y prequístes (**Figura 28 A**). En **B** se señala la presencia de un folículo prequistico y un quiste; en **C** se aprecia un prequiste que aun contiene ovocito pero su *cumulus oophorus* se encuentra desprendido, también se observan folículos primarios; en **D** se aprecian tres quistes y folículos primarios; en **E** es el acercamiento de un prequíste en el cual se observa el engrosamiento de la capa de la granulosa así como pliegues en la capa de la granulosa y de la teca; y en **F** se muestran un folículo primario y un quiste con la capa de la teca engrosada.

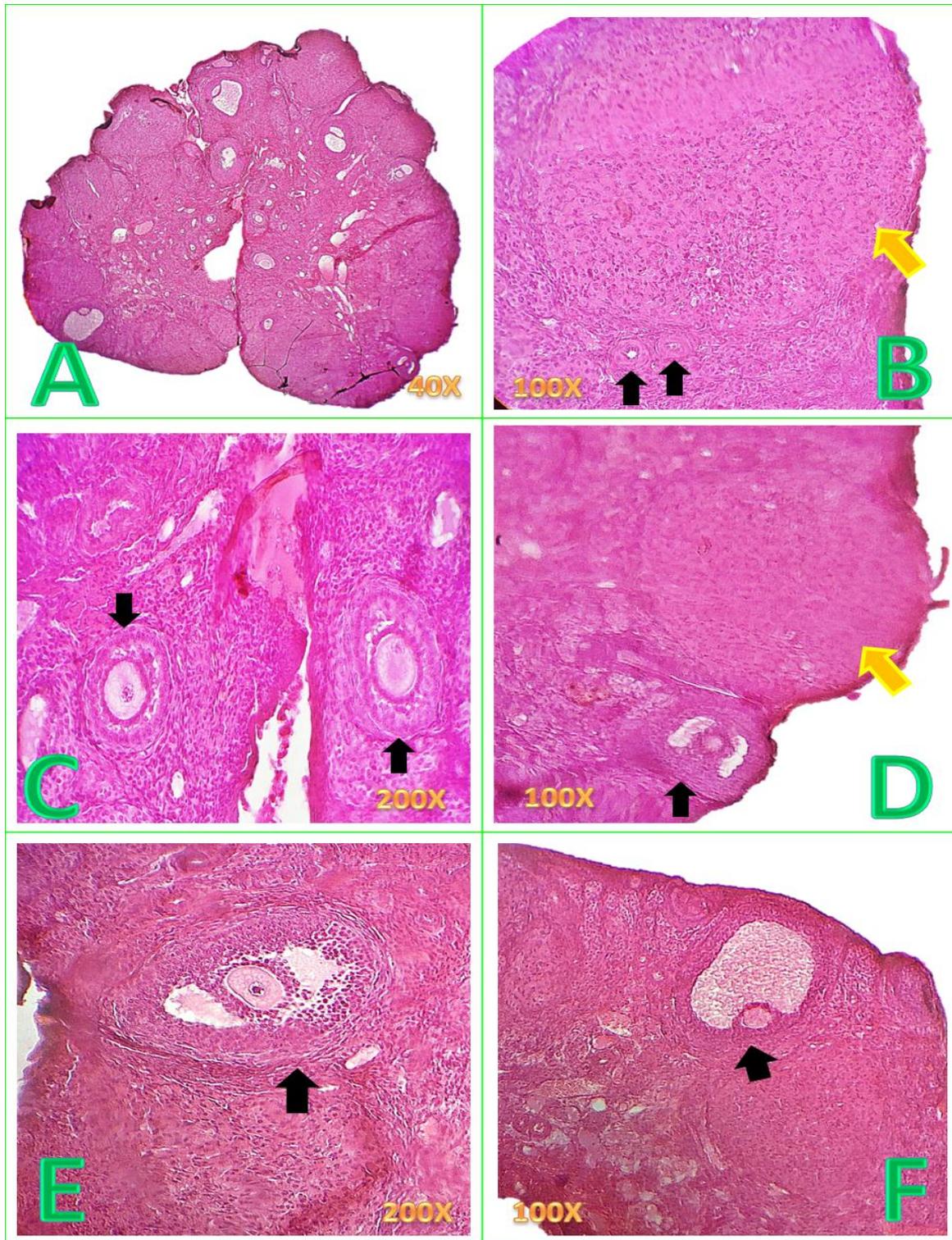


Figura 27. Microfotografías del ovario de un animal testigo. **Flechas negras:** folículos en crecimiento; **Flechas amarillas:** Cuerpos lúteos. [A] se aprecia el corte completo de un ovario, [B] y [D] observamos un cuerpo lúteo y dos folículos en crecimiento, [C], [E] y [F] se muestran folículos en crecimiento.

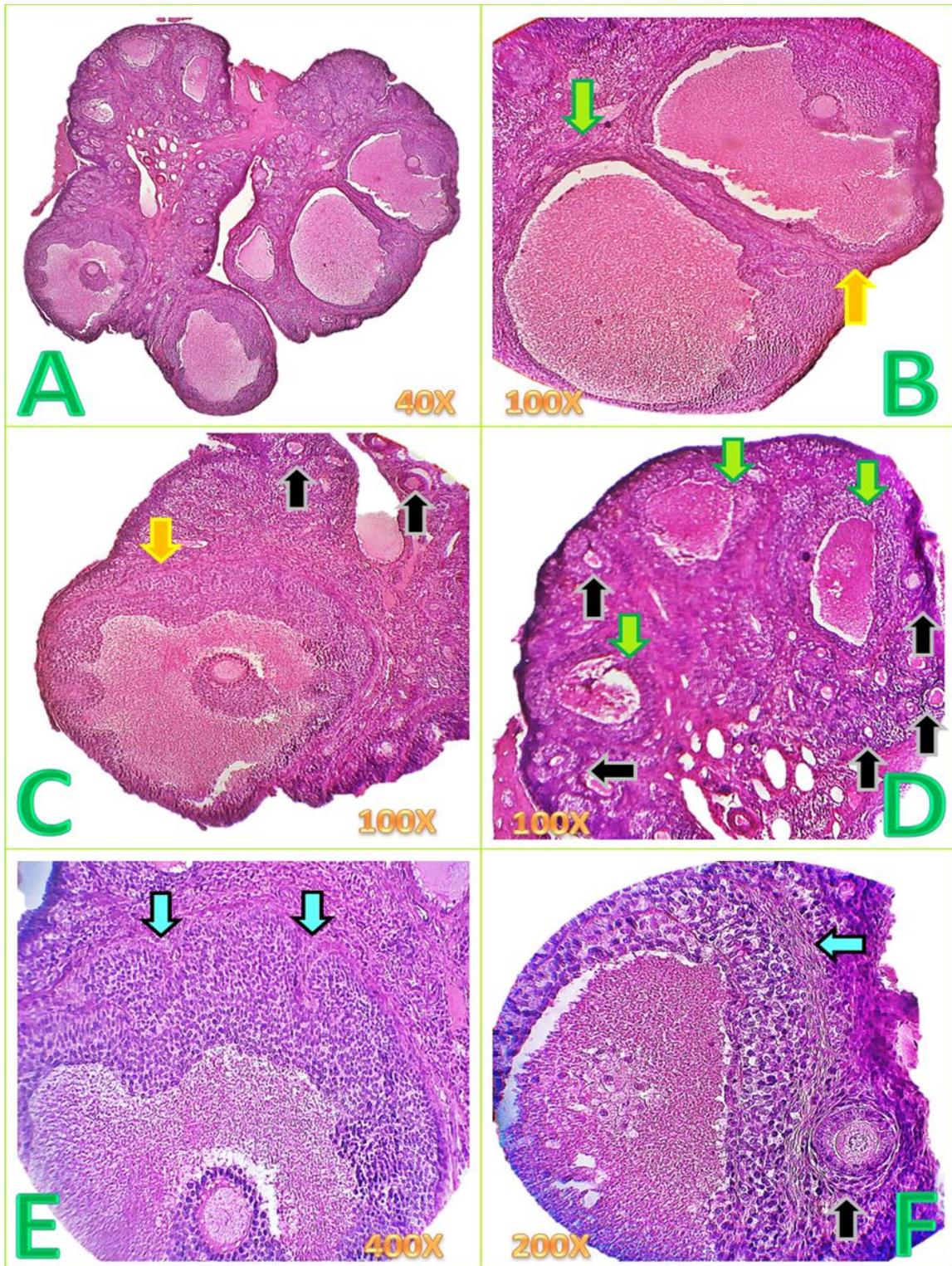


Figura 28. Microfotografías del ovario de un animal estresado por luz constante. **Flechas negras:** folículos primarios; **Flechas amarillas:** prequistes foliculares; **Flechas azules:** capa de la Teca; **Flechas verdes:** quistes foliculares. [A] se aprecia el corte completo de un ovario, [B], [D] y [F] observamos quistes, [B], [C] y [E] se muestran prequistes, [C], [D] y [F] se muestran folículos en desarrollo.



Discusión experimento II: Efectos de la exposición a la luz constante.

Los mamíferos coordinan gran parte de su actividad conductual y fisiológica de acuerdo a ritmos fisiológicos. Estos ritmos están asociados a variaciones ambientales, como cambios en la temperatura o el ciclo de luz-oscuridad y cuando se ven modificados generan cambios tanto conductuales como fisiológicos (Palma, 2011).

En el presente estudio se mostró que en ratas adultas, la luz constante por cuatro semanas disminuyó la tasa ovulatoria, lo que se acompañó por la formación de quistes foliculares y mayor actividad esteroidogénica.

El estrés activa el eje HHA (Singh, 1969; Coleman y col, 2016), que resulta en una mayor secreción ACTH por parte de la hipófisis. La exposición a luz constante puede ser traducida como una sobre-estimulación por parte de la glándula adrenal, lo que podría explicarnos el aumento en la concentración de P4. Al respecto, existe controversia de si la exposición a luz constante es capaz de inducir cambios en la concentración de la hormona, que además depende de la especie en estudio (Bacon y col, 2002; Gao y col, 2016). En situaciones de estrés se incrementa la actividad de la glándula adrenal (Plas-Roser y Aron, 1981; Herrera y col, 2016), de manera que la ACTH, producida por la hipófisis, estimula a la glándula adrenal y está en respuesta secreta P4 (Turcu y Auchus, 2015).

Los resultados del presente estudio, permiten proponer que en condiciones de luz constante tanto el CRF como la ACTH son secretados en concentraciones elevadas, lo que resulta en la estimulación de la glándula adrenal y de esta forma se esté secretando concentraciones elevadas de P4.

La función de la glándula adrenal es regulada por el núcleo supraquiasmático (NSQ), el reloj maestro, que se encarga del establecimiento de los ritmos circadianos a través de la información lumínica que le llega del exterior (Shin-Ichi, 1994; Coleman y col, 2016; Liyanarachchi y col, 2017). La exposición a la luz constante puede desregular la función de este núcleo (Lawton y Schwartz, 1967; Coleman y col, 2016; Voiculescu, 2016).

El NSQ tiene conexiones con el NPV del hipotálamo, donde se sintetiza el CRF (Coleman y col, 2016; Gutiérrez, 2017). Ante la falta de información del periodo de oscuridad se desregula el NSQ, lo cual pudiera provocar una liberación destestigoada de CRF y el resultado final sería la sobre-estimulación de la adrenal, provocando la atrofia de esta glándula, que se refleja en un menor peso.

La histología ovárica de los animales expuestos a luz constante revelo la formación de prequistes y quistes foliculares, los cuales presentan la capa de las células de la teca engrosada. Las células de la teca son capaces de secretar testosterona (Conley y col, 1994; Wrathall y Knigh, 1995; Imamichi y col, 2017) y en condiciones de hipertrofia, aumenta la



síntesis de los andrógenos, causando hiperandrogenismo (Rosenfield y Ehrmann, 2015; Cadagan y col, 2016). En nuestros animales expuestos a la luz constante, la concentración de T se vio incrementada, debido a la capacidad que tienen los prequistes y quistes foliculares para secretar andrógenos.

La luz es captada por la retina del ojo y viaja por el tracto retino-hipotalámico hasta llegar a la glándula pineal, la cual sintetiza melatonina y serotonina (Foster y col., 2007; Salazar-Juárez y col., 2002), ambos neurotransmisores participan en el testigo de las funciones ováricas (Singh, 1969; Sanjay y Bhaskar, 1997). La melatonina se encuentra en altas concentraciones en el líquido de los folículos preovulatorios y sus receptores se encuentran en la capa de las células de la granulosa, lo que indica que la melatonina tiene efectos directos en las funciones ováricas (Zhang y Liang, 2014).

La melatonina tiene un efecto estimulante en el desarrollo folicular, la disminución en su secreción por la exposición a la luz constante, trae consigo un menor número de folículos en desarrollo, y el aumento en esta hormona, por su administración o la exposición a la oscuridad continua, induce el crecimiento y desarrollo de los folículos ováricos (Sanjay y Bhaskar, 1997). En el grupo de animales estresados por luz constante, la histología ovárica reveló la presencia de prequistes y quistes foliculares y un bajo número de folículos en desarrollo. Es posible que en estos animales la secreción de melatonina disminuyera y como resultado se detuviera la maduración y el crecimiento folicular, lo que en parte podría ayudar a explicar la disminución de la masa ovárica.

La disminución en la secreción de melatonina también puede explicar el bloqueó de la ovulación que se da en el 40% de los animales, ya que se detuvo el desarrollo folicular y por lo tanto no hubo folículos maduros listos para su ruptura y liberación del ovocito.

La exposición de ratas adultas a la luz constante por períodos de 10, 15 ó 20 días, se observa ovulación en algunas de ellas y otras no. Los autores proponen que el bloqueo de la ovulación responde a una falla en la sincronización entre el feedback de los estrógenos y la liberación de LH, ya que la exposición a luz constante induce el desfase en los ciclos circadianos que regulan la ovulación. En los animales que ovulan después de la exposición de luz, apunta a que estos animales fueron capaces de volver a sincronizar sus ciclos, permitiendo la ovulación (Lawton y Schwartz 1967).

En ratas adultas expuestas a luz constante por 32 o 62 días, disminuye la secreción de LH a partir de los 10 días de exposición y se tiene el mayor decremento a los 32 días; que se acompaña con una histología ovárica carente de cuerpos lúteos frescos, lo que confirma que el animal no ha ovulado (Badshaw y col., 1965). No descartamos que la falta de ovulación se deba a la disminución en la concentración de GnRH y de LH.



Modelo del experimento II

En la rata adulta la exposición a la luz constante (**Figura 29**) resulta en la desregulación del NSQ [1] lo que induce en el núcleo paraventricular (NPV) una liberación mayor de CRF [2]; esto ocasiona que en la hipófisis se produzca el incremento en la secreción de ACTH [3], la cual va a estimular de manera constante la glándula adrenal, dando como resultado el incremento en la secreción de P4 [4].

La luz constante inhibe en la glándula pineal la secreción de melatonina [5], lo que provoca que el desarrollo folicular se vea enlentecido [6]. En respuesta a la luz constante en el ovario se desarrollaron los quistes foliculares, responsables del aumento en la concentración de T [7].

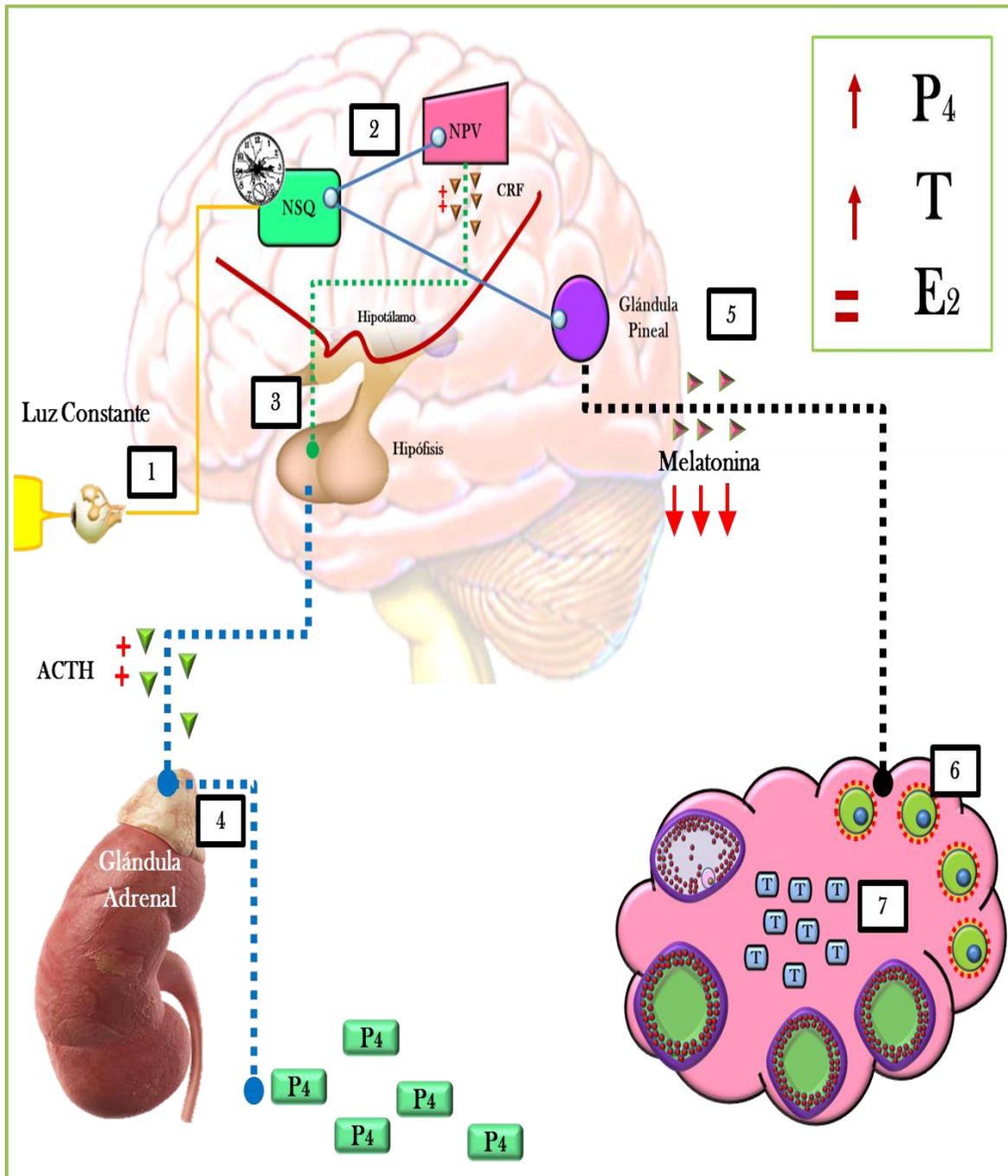


Figura 29. Modelo del animal estresado por la exposición a la luz constante por cuatro semanas.



Conclusiones:



El animal adulto sometido a estrés crónico por frío, sin considerar el día del ciclo estral, presentó adaptación al estrés por frío que impidió el desarrollo del SOP.



El estrés crónico por frío, iniciado en el día del diestro 1 o de manera intermitente, favoreció el desarrollo del SOP, ya que se presentó hiperandrogenismo, disminución en la ovulación y formación de prequistes ováricos.



La exposición a la luz contante por cuatro semanas, permitió el desarrollo del SOP, definido por la presencia de hiperandrogenismo y quistes ováricos.



Bibliografía:

- ♣ Ahonen, J., Lahtinen, T., Sandström, M., Pagliani, G., Wirhed, R. (2001). *Alivio Físico del Dolor*. En: *Kinesiología y anatomía aplicada a la actividad física*. Editorial Paidotribo. 2º Edición, Barcelona, España. Pág. 107-109.
- ♣ Arce, VM., Catalina, FP., Mallo, F. (2006). *Parte III. Crecimiento y desarrollo sexual*. En: *Endocrinología*. Editorial Servizo de Publicaciones e Intercambio Científico de la Universidad Santiago de Compostela, Santiago Compostela. Pág. 123-144.
- ♣ Arce, VM., Catalina, FP., Mallo, F. (2006). *Parte V. Suprarrenales*. En: *Endocrinología*. Editorial Servizo de Publicaciones e Intercambio Científico de la Universidad Santiago de Compostela, Santiago Compostela. Pág. 191-219.
- ♣ Araya, V., Jara, P., Lara, HE. (2004). *Cerebro, estrés y ovario poliquístico. Participación de la inervación simpática en el desarrollo del síndrome del ovario poliquístico*. *Endocrinología y Nutrición*, 52(8):473-477.
- ♣ Alemán, FJ. (2016). *Evaluación del efecto de la Fluoxetina en el eje hipotálamo-hipófisis- ovario de la rata hembra prepúber*. (Tesis de Licenciatura). FES Zaragoza, UNAM.
- ♣ Álvarez, L. (2008). *Efectos negativos del estrés sobre la reproducción en animales domésticos*. *Archivos de Zootecnia*, 57:39-59.
- ♣ Anesetti, G., Lombide, P., D´Albora, H. (2001). *Intrinsic neurons in the human ovary*. *Cell Tissue Res*. 306:231-237.
- ♣ Barra, R., Cruz, G., Mayerhofer, A., Paredes, A., Lara, HE. (2014). *Maternal sympathetic stress impairs follicular development and puberty of the offspring*. *Reproduction*, 148:137-145.
- ♣ Barria, A., Leyton, V., Ojeda, S., Lara, HE. (1993). *Ovarian steroidal response to gonadotropins and β -adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: Role of Sympathetic Innervation*. *Endocrinology*, 133(6):2696-2703.
- ♣ Bernucci, M., Szawka, R., Helena, C., Leite, C., Lara, H., Anselmo-Franci, J. (2008). *Locus Coeruleus Mediates Cold Stress-Induced Polycystic Ovary in Rats*. *Endocrinology*, 149:2907-2916.
- ♣ Bernucci, M., Leite, C., Barros, P., Kalil, B., Leon G., Del Bianco-Borges, B., Franci, C., Szawaka, R., Lara, H., Anselmo-Franci, J. (2013). *Transitory Activation of central and ovarian Norepinephrine systems during cold stress-induced polycystic ovary in rats*. *Neuroendocrinology*, 25:23-33.
- ♣ Bradshaw, M., Critchlow, V. (1966). *Pituitary Concentration of Luteinizing Hormone in Three Types of "Constant Estrous" Rats*. *Endocrinology*, 78:1007-1014.



- ♣ Brann, D., Mahesh, V. (1991). *Role of corticosteroids in female reproduction*. The FASEB Journal, 5: 2691-2698.
- ♣ Brawer, J., Schipper, H., Naftolin, F. (1980) *Ovary-Dependent Degeneration in the Hypothalamic Arcuate Nucleus*. Endocrinology, 107:274-279.
- ♣ Cadagan, D., Khan, R., Amer, S. (2016). *Thecal cell sensitivity to luteinizing hormone and insulin in polycystic ovarian syndrome*. Science Direct, 16:53-60.
- ♣ Cardinali, DP., Jordá, JJ., Sánchez, EJ. (1994). *Cronobiología de la reproducción en los mamíferos (2): Ciclos reproductores en la oveja*. En: *Introducción a la Cronobiología: Fisiología de los ritmos biológicos*. Santander: Editorial Servicio de Publicaciones Universidad de Cantabria, pág. 89-106.
- ♣ Casais, M., Delgado, SM., Vallcaneras, S., Sosa, Z., Rastrilla, AM. (2007). *Nitric oxide in prepubertal rat ovary contribution of the ganglionic nitric oxide synthase system via superior ovarian nerve*. Neuro Endocrinol Lett, 28:39-44.
- ♣ Chávez, B.O., Martínez, M.L., Cazares, A.J.L., Martínez, L.M., Roldan, V.E. (2011). *Anatomía de los nervios craneales con resonancia magnética de 3.0 Tesla: una revisión práctica para clínicos*. Gaceta médica de México, 147:526 - 537.
- ♣ Chen, X., Jiang, R., Geng, Z. (2012). *Cold stress in broiler: global gene expression analyses suggest a major role of CYP genes in cold responses*. Molecular Biology Report, 39:425-429.
- ♣ Chrousos, GP. (1995). *The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Immune-Mediated Inflammation*. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston, 332:1351-1362.
- ♣ Coleman, G., Gigg, J., Merce, M. (2016) *Postnatal light alters hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and induces a depressive-like phenotype in adult mice*. European Journal of Neuroscience, 44(10):2807-2817.
- ♣ Conley, A., Howard, H., Slanger, W., Ford, J. (1994). *Steroidogenesis in the preovulatory porcine follicle*. Biology of Reproduction, 51:655-6661.
- ♣ Cruz, M.E., Jaramillo, L., Domínguez, R. (1989). *Asymmetric ovulatory response induced by unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat*. Endocrinology, 123:437-439.
- ♣ Cruz, QAM. (2016) *Activación del receptor a glucocorticoides en el hipocampo de ratas entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria*. (Tesis de Maestría). Instituto de Neurobiología, UNAM.
- ♣ Daskalopoulos, E., Malliou, F., Rentesi, G., Marselos, M., Lang, M., Konstandi, M. (2012). *Stress is a critical player in CYP3A, CYP2C, and CYP2D regulation: role of adrenergic receptor signaling pathways*. Journal Physiology Endocrinology and Metabolism, 303:40-54.



- ♣ Davoren, B., Hsueh, A. (1985). *Vasoactive Intestinal Peptide: A novel stimulator of steroidogenesis by cultured rat granulosa cells*. *Biology of Reproduction*, 33:37-52.
- ♣ De León, GLY. (2016). *Efectos agudos y subagudos del bloqueo de los receptores β -adrenérgicos del ovario sobre la ovulación y la esteroidogénesis de la rata con Síndrome del Ovario Poliquístico*. (Tesis de Licenciatura). FES Zaragoza, UNAM.
- ♣ Domínguez, R., Riboni, L., Zipitria, D., Revilla, R. (1982). *Is The a Cholinergic Circadian Rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat?* *Endocrinology*, 95:175-180.
- ♣ Domínguez, R. (1991) *Tópicos selectos de Biología de la Reproducción*. Grupo Editorial Miguel Angel Porrúa, México DF.
- ♣ Dorfman, M., Arancibia, S., Fiedler, J.L., Lara, H.E. (2003). *Chronic Intermittent Cold Stress Activates Ovarian Sympathetic Nerves and Modifies Ovarian Follicular Development in the Rat*. *Biology of Reproduction* 68:2038-2043.
- ♣ Dyer, C., Erickson, G. (1985). *Norepinephrine amplifies human chorionic gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by ovarian theca-interstitial cells*. *Endocrinology*, 116(4):1645-1652.
- ♣ Ehnert, K., Moberg, P. (1991). *Disruption of estrous behavior in ewes by dexamethasone or management related stress*. *Journal Animal Science* 69(7):2988-2994.
- ♣ Espinoza, J.A. (2014). *Participación del nervio ovárico superior en la respuesta ovárica de la rata con síndrome de ovario poliquístico inducido por estrés por frío*. (Tesis de Maestría). FES Zaragoza, UNAM.
- ♣ Evanson, NK., Herman, J P. (2015). *Role of Paraventricular Nucleus Glutamate Signaling in Regulation of HPA Axis Stress Responses*. *Interdiscip Inf Sci*, 23:253-260.
- ♣ Fernandois, D., Garrido, M., Lara, H., Paredes, A. (2014). *Regulación neuronal de la función ovárica durante el envejecimiento reproductivo*. *Sociedad Farmacológica de Chile*, 7:47-55.
- ♣ Finlay, JM., Jedema, HP., Rabinovic, AD, Mana, M, Zigmond, MJ. (1997). *Impact of corticotropin-releasing hormone on extracellular norepinephrine in prefrontal cortex after chronic cold stress*. *Journal Neurochem*, 69:144-150.
- ♣ Flores, A., Velasco, J., Gallegos, A., Mendoza, F., Everardo, P., Cruz, M-E., Domínguez, R. (2011). *Acute effects of unilateral sectioning the superior ovarian nerve of rats with unilateral ovariectomy on ovarian hormones (progesterone, testosterone and estradiol) levels vary during the estrous cycle*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9:34-45.
- ♣ Franks, S. (2009). *Do Animal Models of Polycystic Ovary Syndrome Help to Understand Its Pathogenesis and Management? Yes, but Their Limitations Should be Recognized*. *The Endocrine Society*, 15:3983-3985.



- ♣ Ferruz, J., Barria, A., Galleguillos, X., Lara, HE. (1991). *Release of Norepinephrine from the rat ovary: Local Modulation by Gonadotropins*. *Biology of Reproduction*, 45:592-597.
- ♣ Foster, R., Hankins, M., Perirson, S. (2007). *Light, Photoreceptors, and Circadian Clocks*. En: *Methods in Molecular Biology*. Totowa, New Jersey. Humana Press, pág. 363-368.
- ♣ Gartner P, Hiatt L. (2007). *Sistema reproductor femenino*. En: *Texto Atlas de Histología*. Tercera Edición. McGraw-Hill Interamericana, pág. 439-462.
- ♣ Gálvez, A., Paredes, A., Fiedler, J., Venegas, M., Lara, HE. (1999). *Effects of adrenalectomy on the stress-induced changes in ovarian sympathetic tone in the rat*. *Endocrine*, 10(2):131-135.
- ♣ Gao, Q., Lu, J., Li, W., Zhang, P., Tao., J., Xu, Z. (2016). *Disrupting the circadian photo-period alters the release of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, progesterone, and estradiol in maternal and fetal sheep*. *Journal of Reproduction and Development*, 62(5):487-494.
- ♣ George, F., Ojeda, S. (1987). *Vasoactive Intestinal Peptide enhances aromatase activity in the neonatal rat ovary before development of primary follicles or responsiveness to follicle-stimulating hormone*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 5803-5807.
- ♣ Gómez, YM. (2017). *Inmunoreactividad de c-Fos en el hipotálamo y el sistema de recompensa asociada a la novedad social en ratas jóvenes*. (Tesis de Licenciatura). UAEM, Facultad de Ciencias.
- ♣ Gutiérrez, M. (2017) *Respuesta ovulatoria en animales con sección del nervio vago y adrenalectomía contralateral por la mañana de cada etapa del ciclo estral de la rata adulta*. (Tesis Licenciatura). UNAM, FES Zaragoza.
- ♣ Herrera, A., Nielsen, S., Mather, M. (2016). *Stress-induced increases in progesterone and cortisol in naturally cycling women*. *Neurobiology of Stress*, 3:96-104.
- ♣ Iglesias, B., Gallardo, M., Velasco, AI., Montalvo, J. (2007). *Sistema Endocrino*. En: *Bases de la Fisiología*. Segunda edición. Editorial Tébar, Madrid. Pág. 375-499.
- ♣ Imamichi, Y., Sekiguchi, T., Kitano, T. (2017). *Diethylstilbestrol administration inhibits theca cell androgen and granulosa cell estrogen production in immature rat ovary*. *Scientific Reports*, 7:8374-8385.
- ♣ Jedema, H., Finlay, J., Sved, A., Grace, A. (2001). *Chronic cold exposure potentiates CRH-Evoked increases in electrophysiologic activity of Locus coeruleus neurons*. *Society of Biological Psychiatry*, 49:351-359.
- ♣ Jordan, A. (1981). *Changes in ovarian β -Adrenergic Receptors during the estrous cycle of the rat*. *Biology of Reproduction*, 24:245-248.



- ♣ Kagitani, F., Uchida, S., Hotta, H. (2008). *Effects of electrical stimulation of the superior ovarian nerve and the ovarian plexus nerve on the ovarian estradiol secretion rate in rats*. Journal Physiology Science, 58(2):133-138.
- ♣ Kagitani, F., Uchida, S., Hotta, H. (2011). *The role of alpha adrenoceptors in the vascular and estradiol secretory responses to stimulation of the superior ovarian nerve*. Journal Physiology Science, 61:247-251.
- ♣ Klochkov, D., Alekhina, E., Kuznetzova, E. (2009). *Monoamines and Sexual Function in Rats Bred for Increased Catatonic Reactivity*. Neuroscience and Behavioral Physiology, 39(6):565-568.
- ♣ Kot, M., Sadakierska-Chudy, A., Haduch, A., Rysz, M., Bromek, E., Golembiowska, K., Wladyslawa, A. (2015). *The role of the dorsal noradrenergic pathway of brain (locus coeruleus) in the regulation of liver cytochrome P450 activity*. European Journal of Pharmacology, 751:34-41.
- ♣ König, VHE., Liebich, MHG. (2008). *Anatomía de los animales domésticos, Órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- ♣ Lara, HE, Ferruz, JL, Luza, S, Bustamante, DA, Borges, Y., Ojeda, SR. (1993). *Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome*. Endocrinology, 133(6):2690-2695.
- ♣ Lawrence, IE., Burden, HW. (1980). *The origin extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary*. Anatomic Record, 196: 51:19.
- ♣ Lawton, I., Schwartz, N. (1967). *Pituitary-Ovarian Function in Rats Exposed to Constant Light: A Chronology Study*. Endocrinology, 81:497-508.
- ♣ Leung, P., Cheng, C. (2004). *Gn-RH as an Autocrine Regulator in the Human Ovary*. En: *The Ovary*, 2nd ed. Salt Lake City, Utha: Elsevier.
- ♣ Liyanarachchi, K., Ross, R., Debono, M. (2017). *Human Studies on hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis*. Endocrinology & Metabolism, 8(4): 383-395.
- ♣ Lubna, P. (2014). *Polycystic Ovary Syndrome, Current and Emerging Concepts*. Springer, New York. Pág 3-26.
- ♣ Malamed, S., Gibney, JA., Ojeda, SR. (1992). *Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat*. Cell & Tissue Research, 270:87-93.
- ♣ Martínez, N. (2015). *Efecto de la adrenalectomía por la mañana de cada día del ciclo estral de la rata adulta sobre la ovulación*. (Tesis de Licenciatura). FES Zaragoza, UNAM.
- ♣ Morales-Ledesma, L., Ricardo, B., Bolaños, A., Chavaría, R., y Domínguez, R. (2007). *Ipsilateral vagotomy to unilaterally ovariectomized pre-pubertal rats modifies compensatory ovarian responses*. Biomed Central, 5:1-9.



- ♣ Morales-Ledesma, L., Linares, R., Rosas, G., Moran, C., Chavira, R., Cárdenas, M., Domínguez, R. (2010). *Unilateral sectioning of the superior ovarian nerve of rats with polycystic ovarian syndrome restores ovulation in the innervated ovary*. Reproductive Biology and Endocrinology, 8:99-106.
- ♣ Morales-Ledesma, L., Vieyra, E., Ramírez, D., Trujillo, A., Chavira, R., Cárdenas, M., Domínguez, R. (2012). *Effects on steroid hormones secretion resulting from the acute stimulation of sectioning the superior ovarian nerve to pre-prubertal rats*. Reproductive Biology and Endocrinology, 10:88-95.
- ♣ Moore, KL., Persaud, TVN. (2008). *Embriología Clínica*. Octava edición. Editorial Elsevier Saunders. Barcelona, España.
- ♣ Navarrete, MI. (2014). *Modificación de las funciones ováricas en el animal con síndrome del ovario poliquístico inducido por la administración de valerato de estradiol o la exposición al estrés por frío*. (Tesis de Licenciatura). FES Zaragoza. UNAM.
- ♣ Nteeba, J., Sanz-Fernandez, M., Rhoads, R., Baumgard, L., Ross, J., Keating, A. (2015). *Heat Stress Alters Ovarian Insulin-Mediated Phosphatidylinositol-3 Kinase and Steroidogenic Signaling in Gilt Ovaries*. Biology of Reproduction 92(6):148-156.
- ♣ Odermatt, A., Strajhar, P., Engeli, TR. (2016). *Disruption of steroidogenesis: Cell models for mechanistic investigations and as screening tools*. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 158:9-21.
- ♣ Palma, G. A., (2001). *Biotechnología de la Reproducción*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.
- ♣ Paredes, A., Gálvez, A., Leyton, V., Aravena, G., Fiedler, J.L., Bustamante, D., Lara, HE. (1998). *Stress Promotes development of Ovarian Cysts in Rats*. Endocrine, 8:309-315.
- ♣ Plant, TM., Zeleznik, AJ. (2015). *Chapter 20 Gonadotropes and Gonadotropine-Releasing Hormone Singnaling*. En: *Knobil and Neill 's Physiology of Reproduction, Vol. 1*. Cuarta edición. Editorial Elsevier Inc. Oxford. Pag. 335-340.
- ♣ Plas-Roser, S., Aron, C. (1981) *Stress related effects in the control of sexual receptivity and secretion of progesterone by the adrenals in cyclic female rats*. Physiology & Behavior, 27:261-264.
- ♣ Prieto, B, Velázquez, M. (2002). *Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotropinas*. Revista de la Facultad de Medicina UNAM, vol. 45, pág. 252-257.
- ♣ Quezada, DA. (1997). *Introducción al manejo de animales de laboratorio: Roedores y pequeñas especies*. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán, Centro de Investigaciones Regionales. Mérida, Yucatán.



- ♣ Ramírez, DA. (2007). *Efecto agudo de la ovariectomía unilateral en la rata juvenil sobre la esteroidogénesis y la respuesta compensadora del ovario*. (Tesis de Licenciatura). FES Zaragoza, UNAM.
- ♣ Ramírez, DA. (2016). *El nervio ovárico superior forma parte de la vía multisináptica de comunicación en el núcleo supraquiasmático y el ovario*. (Tesis de Doctorado). FES Zaragoza, UNAM.
- ♣ Rodríguez, FP., Castel, JM., Guzmán, JL., Delgado, M., Mena, Y., Alcalde, MJ., González, P., (2005). *Bases de la Producción Animal*. Servicio de Publicaciones de Córdoba.
- ♣ Rodríguez-Flores, M. (2011). *Síndrome de Ovario Poliquístico, el enfoque de un internista*. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, 49(6):611-620.
- ♣ Roca, A.J., (2005). *Fisiología Endocrina*. Tercera Edición. Bogotá, Academia Nacional de Medicina.
- ♣ Rosas, G., Ramírez, M., Linares, R., Trujillo, A., Domínguez, R., Morales-Ledesma, L. (2015). *Asymmetric steroidogenic response by the ovaries to the vasoactive intestinal peptide*. 48:968-977.
- ♣ Rosenfield, R., Ehrman, D. (2015). *The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian Hyperandrogenism Revisited*. Endocrine Reviews, 37(5): 467-520.
- ♣ Sadler, TW. (2006). *Primera semana del desarrollo: de la ovulación a la implantación*. En: *Langman Embriología médica con orientación clínica*. 10° Edición, Buenos Aires, Editorial medica panamericana, pág. 33-45.
- ♣ Salazar- Juárez, A., Escobar, C., Aguilar-Roblero, R. (2002). *Anterior paraventricular thalamus modulates light-induced phase shifts in circadian rhythmicity in rats*. American Physiological Society, 283:897-904.
- ♣ Sanjay, V., Bhaskar, N. (1969). *Melatonin and exposure to constant light/darkness affects ovarian follicular kinetics and estrous cycle in Indian Desert Gerbil "Meriones hurrianae" (Jerdon)*. General and comparative Endocrinology, 108:352-35.
- ♣ Shi, D., Vine, DF., (2012). *Animal models of polycystic ovary syndrome: a focused review of rodent models in relationship to clinical phenotypes and cardiometabolic risk*. American Society for Reproductive Medicine, 98:185-193.
- ♣ Singh, K. (1969). *Induction of polycystic ovarian disease in rats by continuous light. I. The reproductive cycle, organ weights, and histology of the ovaries*. Polycystic ovarian disease, 103(8):1708-1714.



- ♣ Snyder, G., Holmes, R., Bates, J., Voorhis, B. (1996). *Nitric Oxide inhibits aromatase activity: Mechanisms of action*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 58(1):63-69.
- ♣ Spanakis, E., Wand, G., Ji, N., Golden, S. (2015). *Association of HPA axis hormones with copeptin after psychological stress differs by sex*. Psychoneuroendocrinology, 63:254-261.
- ♣ Tresguerres, JAF., Ariznavarrete, C., Cachofeiro, V., Cardinali, D., Escrich, E., Loyzaola, PG., Julia, LV., Teruel, MF., Paro, MR., Menéndez, JT. (2005). *Fisiología humana*. Tercera edición. Editorial McGraw-hill. Madrid, España.
- ♣ Tresguerres, HF. (2010). *Fisiología humana*. Cuarta edición. Editorial McGraw-Hill. Madrid, España.
- ♣ Trujillo, A., Morales, L., Domínguez, R. (2015). *The effects of sensorial denervation on the ovarian function by the local administration of capsaicin depend on the day of the oestrous cycle when the treatment was performed*. Endocrine, 48:321-328.
- ♣ Turcu, A., Auchus, R. (2015). *Adrenal Steroidogenesis and congenital adrenal hyperplasia*. Endocrinology Metabolism and Clinic 44:275-296.
- ♣ Valdespino, C., Martínez-Mota, R., García-Feria L., Martínez-Romero, L. (2007). *Evaluación de los eventos reproductivos y estrés fisiológicos en vertebrados silvestres a partir de sus excretas: evolución de una metodología no invasiva*. Acta zoológica mexicana, 23(3):151-180.
- ♣ Valdez, K., Cuneo, S., Gorden, P., Turzillo, A. (2005). *The role of thecal androgen production in the regulation of estradiol biosynthesis by dominant bovine follicles during the first follicular wave*. American Society of Animal Science, 83:597-603.
- ♣ Velázquez, R.D. (2016). *Participación del nervio vago en la regulación de las funciones ováricas en la rata estresada por frío y restricción de movimiento*. (Tesis de Licenciatura) FES Zaragoza, UNAM.
- ♣ Voorhis, B., Dum, M., Snyder, G., Weiner, C. (1994). *Nitric Oxide: An autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis*. 135(5):1799-1806.
- ♣ Villavicencio Macias, M.J. (1991). *Un estudio de los mecanismos que regulan el crecimiento y la diferenciación folicular en la rata prepúber: El papel de la hormona estimulante del folículo y sus isohormonas*. (Tesis Maestría). Universidad Autónoma Metropolitana.
- ♣ Voiculescu, S., Le Duc, D., Rosca, A., Zeca, V., Chitimus, D., Arsene, A., Dragoi, C., Nicolae, A., Zagrean, L., Schoneberg, T., Zagrean, A. (2016). *Behavioral and molecular effects of prenatal continuous light exposure in the adult rat*. Brain Res, 1650:51-59.



- ♣ Weiss, G., Dail, W., Ratner, A. (1982). *Evidence for direct neural control of ovarian steroidogenesis in rats*. Journal of Reproduction and Fertility, 65:507-511.
- ♣ Wolff, K., Goldsmith, L., Katz, S., Gilchrest, B., Paller, A., Leffell, D. (2008). *Capítulo 92: Termorregulación*. En: *Fitzpatrick Dermatología en Medicina General*. 7° edición, Madrid, España. Editorial Medica Panamericana. Pág. 835 - 844.
- ♣ Wrathall, J., Knight, P. (1995). *Effects of inhibin-related peptides and oestradiol on androstenedione and progesterone secretion by bovine theca cells in vitro*. Endocrinology, 145:491-500.
- ♣ Yao, HH., Bahr, JM. (1998). *Ovary, Overview*. En: E., Knobil, JD, Neil (Vol. 3). *Encyclopedia of Reproduction*. Pág. 590-597. San Diego, California: Editorial Academic Press.
- ♣ Yen, SS., Jaffe, RB., Barbieri, RL. (1999). *Ciclo menstrual humano: Regulación Neuroendocrina*. En: *Endocrinología de la reproducción: Fisiología, Fisiopatología y manejo clínico*. 4° edición, Buenos Aires, Editorial Panamericana, pág. 203-220.
- ♣ Yen, SS., Jaffe, RB., Barbieri, RL. (2001). *Endocrinología de la reproducción: Fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. 4° Edición. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana S.A.
- ♣ Zafari, F., Abdollahi, A., Tavassoli, P., Madi, M. (2010). *The effect of cold stress on polycystic ovary syndrome in rat: before and during modeling*. General Gynecology, 284:651-657.
- ♣ Zhang, S., Wang, J., Li, J., Wei, D., Sui, H., Zhang, Z., Zhou, P., Tan, J. (2011). *Maternal Restraint Stress Diminishes the Developmental Potential of Oocytes*. Biology of Reproduction, 84:672-681.