



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES - ZARAGOZA

**LA INERVACIÓN DEL OVARIO EN LA PERSISTENCIA DEL SÍNDROME DE OVARIO
POLIQUÍSTICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

JULIETA AZUCENA ESPINOZA MORENO

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM
DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATZUMURA
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA

CD. MX.

NOVIEMBRE, 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
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES - ZARAGOZA

**LA INERVACIÓN DEL OVARIO EN LA PERSISTENCIA DEL SÍNDROME DE OVARIO
POLIQUÍSTICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

JULIETA AZUCENA ESPINOZA MORENO

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM
DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATZUMURA
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA

MÉXICO, CD. MX.

NOVIEMBRE, 2018.



OFICIO CPCB/1029/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 01 de octubre de 2018, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna, **ESPINOZA MORENO JULIETA AZUCENA** con número de cuenta **404010052** con la tesis titulada "**LA INERVACIÓN DEL OVARIO EN LA PERSISTENCIA DEL SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO**", bajo la dirección del Tutor Principal: **DRA. LETICIA MORALES LEDESMA**:

Presidente: DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALA
Vocal: DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN
Secretario: DR. PABLO GUASTAVO DAMIAN MATZUMURA
Suplente: DRA. ANGÉLICA TRUJILLO HERNÁNDEZ
Suplente: DRA. CAROLINA MORÁN RAYA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 03 de octubre de 2018.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al **Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM** por haberme permitido entrar a su programa de estudios en beneficio de mi formación académica y conducirme a terminar mis estudios de doctorado.

Agradezco al **CONACYT** por la beca número 270095 otorgada para realizar mis estudios de doctorado. La realización de esta tesis contó con el apoyo financiero de UNAM-DGAPA-PAPIIT, clave **IN217016**.

Agradezco a mi tutor principal y a los miembros del comité tutor:

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dra. María Elena Ayala Escobar

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Por su gran apoyo académico en la realización de este estudio, por sus comentarios y sugerencias que enriquecieron la escritura de la tesis y por la guía que me brindaron para terminar mis estudios de doctorado.

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del jurado:

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Dra. Angélica Trujillo Hernández

Dra. Carolina Morán Raya

Por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis, por sus comentarios y sugerencias que la enriquecieron.

A mi directora de tesis, **Dra. Leticia Morales Ledesma** por el tiempo invertido en mi formación, por su apoyo e infinita paciencia, por su dedicación para trabajar conmigo en la escritura, redacción y discusión del presente estudio. Por compartir conmigo sus conocimientos, experiencia y por alentarme a concluir este proyecto. Muchas gracias Dra.!!!

A la **Dra. María Elena** y al **Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura** por formar parte de mi comité tutor por estos años, por seguir de cerca mi desarrollo académico y en enriquecer con sus comentarios y críticas constructivas cada uno de los tutorales. Por ayudarme a corregir mis errores y compartir sus conocimientos y amistad.

Al **Dr. Roberto Domínguez Casalá**, por permitirme ser parte de su grupo, por el tiempo dedicado para trabajar conmigo la escritura y redacción de la tesis y del artículo, por tenerme infinita paciencia y ayudarme a tener una visión más amplia de mi estudio. Gracias infinitas Dr. por todo.

A mis amigos del laboratorio que colaboraron en la realización de esta tesis, especialmente a las doctoras Rosa Linares, Deyra Ramírez, Gaby Rosas, Elizabeth Vieyra, Berenice Venegas y a los más pequeños Kari, Huguito, Fernanda, Nallely, Paloma, Michelle, Adry, Maya, Miguel, Hugo, Migue, Clau, Irving, Mari, Caro, Ángel, Ale. A los que ya se han titulado pero que me apoyaron en su momento Cesar, Liz, Misael, Iván y muy especialmente a Wendy Alvarado por su apoyo en la parte experimental, comentarios en seminarios, pero sobre todo porque nuestra amistad crezca cada día más.

Un muy especial agradecimiento a mi amiga la Dra. **Andrea Chaparro**. Gracias por estar en los momentos precisos, por compartir conmigo experiencias, sueños, anhelos, tristezas, alegrías y por el infinito apoyo que me has brindado en cada circunstancia de mi vida, siempre has estado conmigo y aunque no siempre pensamos lo mismo, de tu parte nunca me ha faltado una

palabra, un abrazo o una sonrisa que al final me llena de esperanza. Te quiero mucho y sabes que eres para mí como una hermana.

A la Dra. Adriana, Dra. Elizabeth, Dr. Román y al personal técnico del bioterio de la FES-Zaragoza por su apoyo en el cuidado de las ratas utilizadas en este estudio.

Al Dr. Roberto Chávira por su colaboración en las mediciones de las concentraciones hormonales. A la Dra. Berenice Venegas por su colaboración en la técnica de inmunofluorescencia.

DEDICATORIAS

A Dios, a mis padres Guadalupe Moreno y Benito Espinoza y a mi amor Alfredo Macías, que han estado ahí, para mí, cada uno apoyándome de diferentes maneras, motivándome, alentándome, haciéndome reír, aguantando mi carácter pero sobre todo por ser un soporte para darme cuenta que a pesar de las adversidades, con esfuerzo y trabajo, cualquier cosa se puede lograr.

Los amo con todo mi corazón.

ÍNDICE

Páginas

ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
El ovario y la regulación de sus funciones	2
Inervación del ovario.....	6
El síndrome de ovario poliquístico (SOPQ) en la mujer.....	10
Modelos experimentales para inducir el SOPQ.....	14
Efecto de la inyección de andrógenos.....	15
Efectos de la inyección de estrógenos.....	17
Efecto de la inyección de letrozol (inhibidor de la aromatasas).....	19
Exposición a estrés.....	19
Síndrome del ovario poliquístico e inervación simpática.....	21
Monosulfato de guanetidina (GTD).....	22
El uso de la GTD como herramienta para el estudio de la regulación de las funciones ováricas.....	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS PARTICULARES.....	31

MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
Procedimientos generales.....	32
Descripción de los grupos experimentales.....	32
Procedimiento de la autopsia.....	34
Análisis de la morfología ovárica.....	35
Análisis de la expresión y cuantificación de la tirosina hidroxilasa.....	35
Cuantificación de hormonas esteroides.....	36
Análisis estadístico.....	37
RESULTADOS.....	38
EFECTO DE LA DENERVACIÓN CON GTD SOBRE LA OVULACIÓN Y LA CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA Y TESTOSTERONA.....	38
EFECTO DE LA INYECCIÓN DE VALERATO DE ESTRADIOL (VE) SOBRE LA OVULACIÓN Y LA CONCENTRACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES.....	41
EFECTO DE LA DENERVACIÓN CON GTD DEL DÍA 7 AL 27 DE VIDA, EN LA RATA INYECTADA CON VE, SOBRE LA OVULACIÓN Y LA CONCENTRACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES.....	43
EFECTO DE LA DENERVACIÓN CON GTD DEL DÍA 14 AL 34 DE VIDA, EN LA RATA INYECTADA CON VE, SOBRE LA OVULACIÓN Y LA CONCENTRACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES.....	45
EFECTO DE LA DENERVACIÓN CON GTD DEL DÍA 29 AL 49 DE VIDA, EN LA RATA INYECTADA CON VE, SOBRE LA OVULACIÓN Y LA CONCENTRACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES.....	47

EFFECTO DE LA DENERVACIÓN CON GTD DEL DÍA 70 AL 90 DE VIDA, EN LA RATA INYECTADA CON VE, SOBRE LA OVULACIÓN Y LA CONCENTRACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES.....	50
Morfología ovárica.....	52
Expresión de tiroxina hidroxilasa (TH) en el ovario.....	55
DISCUSIÓN.....	59
CONCLUSIONES.....	67
BIBLIOGRAFÍA.....	68
ANEXO.....	87

ABREVIATURAS

ANDEVA	Análisis de varianza multifactorial
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BE	Benzoato de estradiol
CGRP	Péptido relacionado con el gen que codifica la calcitonina
DHT	Dihidrotestosterona
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
E ₂	Estradiol
FSH	Hormona folículo estimulante
GCMS	Ganglio celiaco mesentérico superior
GTD	Guanetidine
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
hCG	Gonadotropina coriónica humana
LH	Hormona luteinizante
NA	Noradrenalina
NGF	Factor de crecimiento neural
NOS	Nervio ovárico superior
NPY	Neuropéptido Y
P ₄	Progesterona
PMSG	Gonadotropina de suero de yegua preñada
PO	Plexo nervioso ovárico
PT	Propionato de testosterona

SNC	Sistema Nervioso Central
SOPQ	Síndrome de ovario poliquístico
SP	Sustancia P
SS	Solución salina
StAR	Proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis
T	Testosterona
TA	Testigo absoluto
TAO	Tasa de animales ovulantes
TH	Tiroxina hidroxilasa
VE	Valerato de estradiol
Vh	Vehículo
VIP	Péptido intestinal vasoactivo

RESUMEN

Los ovarios reciben información endócrina por parte de núcleos hipotalámicos e información neural por neuronas simpáticas, parasimpáticas y sensoriales. En las mujeres en edad reproductiva, el síndrome de ovario poliquístico (SOPQ) es una patología con una prevalencia a nivel mundial del 6 al 20%. El diagnóstico del SOPQ incluye hiperandrogenismo acompañado de anovulación crónica o formación de ovarios poliquísticos.

De manera experimental, el SOPQ puede inducirse con la inyección de 2mg de valerato de estradiol (VE), que induce modificaciones en la homeostasis de las catecolaminas, manifestadas por el alto contenido de noradrenalina (NA) en el ovario, lo que conlleva a la formación de quistes foliculares, la falta de ovulación e incremento en la concentración de andrógenos.

En ratas con SOPQ inducido con VE, la sección bilateral del nervio ovárico superior (NOS), principal fuente de NA que llega al ovario, resulta en la disminución de la concentración de NA y los animales recuperan sus funciones ováricas. Dichos resultados sugieren que el SOPQ se origina en respuesta a un mayor tono simpático. Sin embargo, además de NA, el NOS aporta al ovario otros péptidos, lo que no nos permite precisar que los efectos observados en el restablecimiento de las funciones ováricas estén dados totalmente por la disminución de NA.

Para analizar el papel exclusivo de la NA en el desarrollo del SOPQ, en el presente estudio, en la rata inyectada con VE, realizamos la denervación farmacológica de las fibras catecolaminérgicas, mediante la inyección crónica de monosulfato de guanetidina (GTD), un

neurotóxico específico para fibras catecolaminérgicas que no afecta neuronas colinérgicas, sensoriales, ni células adrenomedulares y que no atraviesa la barrera hematoencefálica, y se evaluaron las funciones ováricas en la rata adulta.

El objetivo del presente estudio fue analizar el papel de la innervación catecolaminérgica, antes, durante o después de la inducción del SOPQ con la inyección de VE, sobre la respuesta ovulatoria y la concentración sérica de hormonas esteroides en la rata adulta.

En los ovarios de los grupos inyectados con GTD disminuyó la inmunoreactividad de la tiroxina hidroxilasa, respecto a los animales que no recibieron la inyección del neurotóxico, lo que confirma la disminución de la actividad noradrenérgica.

En los animales denervados con GTD antes, durante o después de 15 días de la administración del VE, la ovulación fue semejante a la de los grupos control inyectados con el vehículo (Vh). Se restableció la morfología del ovario y la concentración sérica de testosterona disminuyó a valores semejantes a las de su grupo control.

En los animales inyectados con VE y que se dejaron evolucionar durante 56 días, la denervación con GTD resultó en la ovulación del 66% de los animales. En los ovarios se observó folículos en desarrollo, cuerpos lúteos y la persistencia de algunos prequistes y la concentración sérica de testosterona fue semejante a la de su grupo control.

Los resultados del presente estudio muestran que en la rata inyectada con VE, el desarrollo y la persistencia del SOPQ dependen de la integridad de la inervación catecolaminérgica periférica del ovario y que la reducción de la hiperactividad noradrenérgica podría prevenir el desarrollo del síndrome o bien, una vez desarrollado el SOPQ, la disminución de la actividad noradrenérgica puede restablecer la función reproductiva.

ABSTRACT

The ovaries receive endocrine information from hypothalamic nuclei and neural information from sympathetic, parasympathetic and sensory neurons. In women of reproductive age, polycystic ovary syndrome (PCOS) is a pathology with a worldwide prevalence of 6 to 20%. The diagnosis of PCOS includes hyperandrogenism accompanied by chronic anovulation or formation of polycystic ovaries.

Experimentally, PCOS can be induced with the injection of 2mg of estradiol valerate (EV), which induces modifications in the homeostasis of catecholamines, manifested by the high content of noradrenaline (NA) in the ovary, which leads to the formation of follicular cysts.

In rats with EV-induced PCOS, the bilateral section of the superior ovarian nerve (SON), the main source of NA that reaches the ovary, results in the decrease in NA concentration and the animals recover their ovarian functions. These results suggest that PCOS originates in response to a greater sympathetic tone. However, in addition to NA, the SON contributes other peptides to the ovary, which does not allow us to specify that the effects observed in the restoration of ovarian functions are totally due to the decrease in NA.

To analyze the exclusive role of NA in the development of PCOS, in the present study, in the rat injected with EV, we performed the pharmacological denervation of catecholaminergic fibers, mediated by the chronic injection of guanethidine sulfate (GTD), a specific neurotoxic agent for catecholaminergic fibers that does not affect cholinergic, sensory, or adrenomedullary

cells and does not cross the blood-brain barrier and ovarian functions were evaluated in the adult rat.

The objective of the present work was to analyze the role of noradrenergic innervation, before, during or after injection of EV, on the ovulatory response and the serum concentration of steroid hormones in the adult rat.

In the ovaries of the groups injected with GTD, the immunoreactivity of the thyroxine hydroxylase decreased compared to the animals that did not receive the neurotoxic injection, which confirms the decrease in the noradrenergic activity.

In animals denervated with GTD before, during or after 15 days of EV administration, ovulation was similar to that of control groups injected with vehicle (Vh). The morphology of the ovary was restored and the serum testosterone concentration decreased to values similar to those of its control group.

In the animals injected with EV and that were allowed to evolve during 56 days, denervation with GTD resulted in the ovulation of 66% of the animals. In the ovaries, developing follicles, corpora lutea and the persistence of some pre-cystic were observed and the serum testosterone concentration was similar to that of their control group.

The results of the present study show that in the rat injected with EV, the development and persistence of PCOS depend on the integrity of the peripheral catecholaminergic innervation of

the ovary and that the reduction of noradrenergic hyperactivity could prevent the development of the syndrome or, a once the PCOS has developed, the decrease in noradrenergic activity can restore reproductive function.

INTRODUCCIÓN

El síndrome del ovario poliquístico (SOPQ) es una patología que afecta a mujeres en edad reproductiva (Mirabolghasemi y Kamyab, 2017). Se caracteriza por hiperandrogenismo, anovulación, formación de quistes foliculares, obesidad, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia (Tsilchorozidou y col., 2004). Algunos estudios clínicos muestran que en las pacientes con el síndrome incrementa la densidad de las fibras nerviosas ováricas (Heider y col., 2001).

De manera experimental en la rata hembra, se pueden inducir algunas características del SOPQ mediante la administración de una dosis de valerato de estradiol (VE), un estrógeno de larga actividad (Brawer y col., 1986; Lara y col., 1993; Morales-Ledesma y col., 2010). En este modelo se plantea que el incremento en la actividad noradrenérgica del ovario, antecede a la formación de los quistes foliculares (Lara y col., 1993). En el modelo de la rata con SOPQ, la sección bilateral del nervio ovárico superior (NOS), principal fuente de noradrenalina (NA) que llega al ovario, restablece la ovulación y la secreción de andrógenos (Barria y col., 1993; Rosa-e-Silva y col., 2003).

El grupo de Parra (2007) mostró que en la rata inyectada con VE, además de incrementar la concentración de NA ovárica, también incrementa la del péptido intestinal vasoactivo. Evidencias que nos llevaron a plantear si el restablecimiento de las funciones ováricas en la rata con SOPQ y sección del NOS, se debe únicamente a la disminución de NA. Para analizar esta posibilidad, en el presente estudio se analizó si la eliminación de las fibras noradrenérgicas, mediante la administración de guanetidina (GTD), antes, durante o después de inducir el síndrome mediante la inyección de VE, evita el desarrollo del SOPQ cuando las ratas alcanzan la etapa adulta.

ANTECEDENTES

El ovario y la regulación de sus funciones

Las funciones de los ovarios, ovulación y secreción de hormonas esteroides y peptídicas (Guyton, 2001), son reguladas por señales hormonales provenientes de la hipófisis (Tresguerres, 1999) y por señales nerviosas que llegan al ovario vía el nervio ovárico superior y nervio del plexo ovárico (Dissen y Ojeda, 1999) y por el nervio vago (Gerendai y col., 2000). En respuesta a las acciones de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) liberada por el hipotálamo, la hipófisis secreta las gonadotropinas [hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH)] (Levine JE., 2015).

La secreción del decapeptido GnRH es pulsátil y está regulada por señales hormonales provenientes del ovario y por señales nerviosas que provienen del sistema nervioso central (SNC) (Herbison AE, 2015). La secreción de LH y FSH depende de la frecuencia y amplitud de los pulsos de la GnRH. En las células de la teca del ovario, la LH estimula la secreción de progesterona y andrógenos. Una parte de los andrógenos difunden hacia las células de la granulosa donde son transformados a estrógenos por efectos de la aromatasa. La FSH estimula la síntesis de la aromatasa, así como el crecimiento y la maduración de los folículos ováricos. A su vez, la LH estimula la diferenciación final de los folículos preovulatorios y la ovulación (Halvorson y Chin., 2001).

La ovulación es el proceso por el cual el ovario libera uno o varios ovocitos II capaces de ser fecundados dentro del oviducto. Antes de la ovulación, aproximadamente en la segunda mitad

de la fase folicular, incrementa la secreción de estradiol, que cuando alcanza un umbral, estimula el aumento brusco de la concentración de LH (“pico preovulatorio”). En la mujer, la ovulación se produce alrededor del día 14 de un ciclo normal de 28 días (Ross y col., 2005). En la rata, la ovulación ocurre en la madrugada del día del estro vaginal (Ojeda y Urbanski, 1994). Previo a la ovulación, las células del folículo liberan enzimas proteolíticas que causan la disolución y el debilitamiento de una zona de la pared folicular, lo que se observa como una protuberancia en la parte externa del folículo preovulatorio, llamada estigma. Las células de la teca interna secretan prostaglandinas que estimulan la contracción de las células musculares lisas de la teca externa lo que da lugar a la ruptura de la pared folicular en la zona del estigma (Silverthorn, 2008).

Después de la ovulación, el folículo post ovulatorio se reorganiza y forma el cuerpo lúteo, una estructura endocrina temporal. Después de la ruptura folicular los capilares y los fibroblastos del estroma circundante proliferan y penetran la membrana basal (proceso guiado por factores angiogénicos). El cuerpo lúteo está formado por las células de la granulosa-luteínicas que se entremezclan con las células teco-intersticiales circundantes y la vasculatura. Durante la fase post-ovulatoria, el cuerpo lúteo es la principal fuente de hormonas sexuales secretadas por el ovario (Yeh y Adashi, 2001). En la mujer, la vida funcional del cuerpo lúteo es de 12 a 14 días, mientras que en la rata, la fase lútea dura de 2 a 3 días (Freeman, 1994).

La mayoría de los folículos ováricos no alcanzan la etapa ovulatoria, éstos entran en un proceso natural de degeneración llamado atresia (Rosales, 1998). En los mamíferos, la atresia comienza en la etapa embrionaria y continúa durante toda la vida reproductiva (Peters, 1975).

La síntesis de las hormonas esteroides comienza a partir del colesterol y su transformación a pregnenolona. En el ovario se sintetizan progesterona (P_4), testosterona (T) y estradiol (E_2) a partir del colesterol (Figura 1), el cual llega al ovario por la circulación sanguínea, o se sintetiza a partir del acetato o bien del que está almacenado en forma de ésteres en las células de la teca interna. El rompimiento de la cadena lateral del colesterol, es el primer paso en el proceso de síntesis de las hormonas esteroides y es catalizado por el complejo enzimático del citocromo P-450_{scc} (Straus y Hsue, 2000). Esta reacción se lleva a cabo en la membrana interna de las mitocondrias de las células de la teca y es mediada por la proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR), que transfiere el colesterol al interior de la mitocondria (Hu y col., 2010).

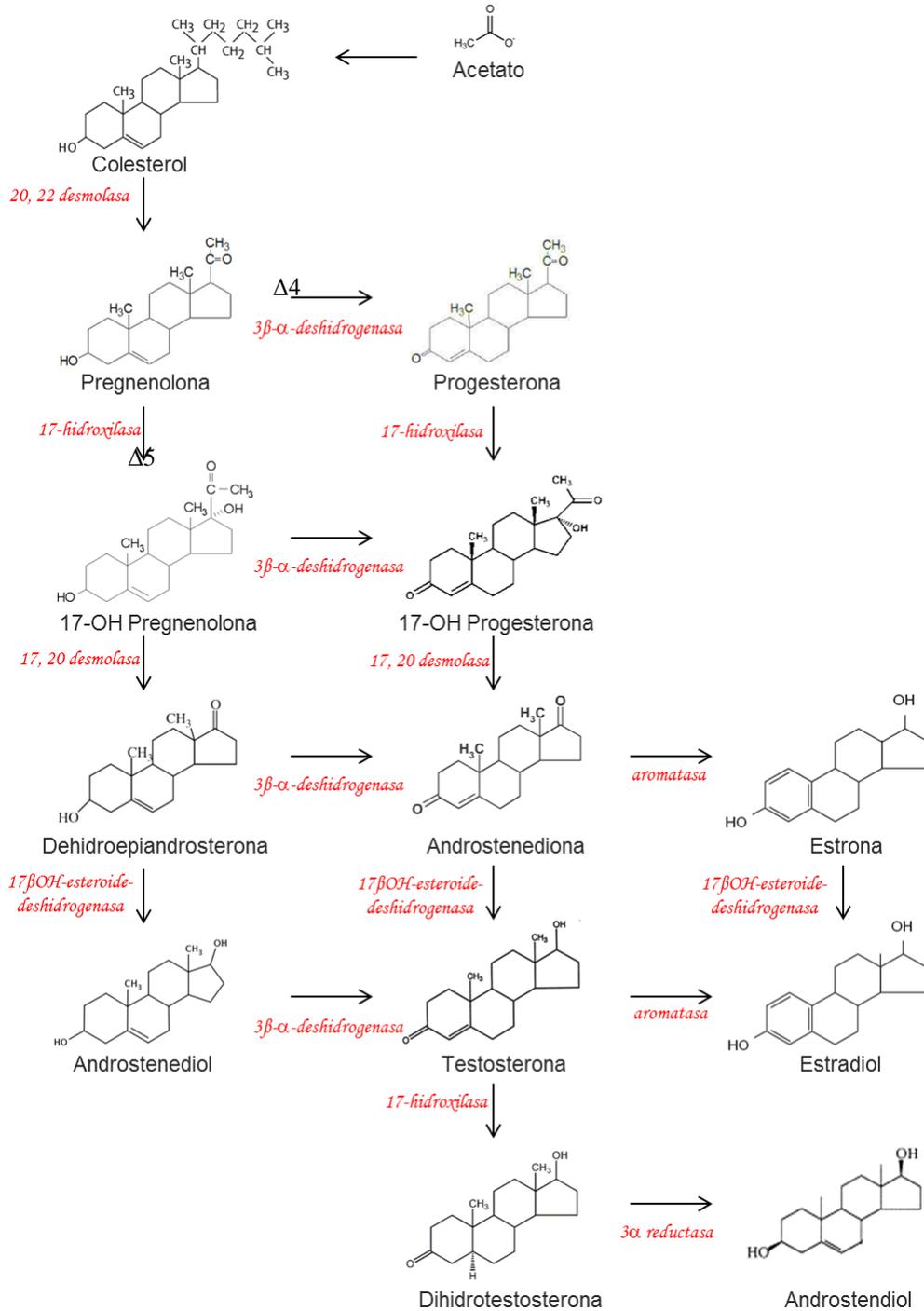


Figura 1. Esquema que muestra las rutas para la biosíntesis de las hormonas esteroideas (Tomado de Tresguerres, 1999).

A partir de la pregnenolona hay dos vías biosintéticas diferentes, la vía delta-4 y la delta-5, las cuales se diferencian en que en la vía delta-4 el doble enlace se establece entre C-4 y C-5, mientras que en la vía delta-5 el doble enlace se produce entre C-5 y C-6. A partir de estas dos vías se sintetizan andrógenos. En el ovario la síntesis de andrógenos sigue principalmente la vía delta-4, mientras que la vía delta-5 ocurre en la glándula adrenal (Tresguerres, 1999). La acción de la enzima aromatasa sobre los andrógenos, da lugar a la biosíntesis de los estrógenos que se caracterizan porque el anillo A es un benceno. La síntesis de las enzimas que participan en la esteroidogénesis es estimulada por las gonadotropinas (Waterman y Keeney, 1996).

Inervación del ovario

El ovario está inervado por neuronas del sistema nervioso periférico, las cuales llegan a los diferentes componentes estructurales del ovario y mediante la liberación de neurotransmisores regulan el flujo sanguíneo, el desarrollo folicular, la ovulación y la secreción de hormonas.

La inervación simpática del ovario está compuesta por neuronas que sintetizan catecolaminas y neuropéptido Y (NPY) (Dissen y Ojeda 1999). Las fibras sensoriales del ovario utilizan como neurotransmisores a la sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen que codifica la calcitonina (CGRP) (Dees y col., 1995; Klein y Burden 1988). Una pequeña parte de la inervación es de naturaleza parasimpática (Dissen y col., 1999), formada por fibras posganglionares colinérgicas (Dissen y col., 2004).

La mayor parte de la innervación del ovario se origina en neuronas localizadas en la cadena paravertebral. Las fibras simpáticas preganglionares se originan en los segmentos torácico inferior y lumbar superior de la médula espinal (T11-L4) y hacen sinapsis en los ganglios celiaco y mesentérico superior (Dissen y Ojeda 1999). La porción parasimpática se origina en el nervio vago y la innervación sensorial se origina en los ganglios de la raíz dorsal de los segmentos torácico inferior (T9-T11) y lumbar superior (L2-L4) y en el ganglio nodoso del vago (Gerendai y col., 2005).

Las fibras simpáticas llegan al ovario por el nervio ovárico superior (NOS) y el nervio del plexo ovárico (PO). El NOS se localiza en el ligamento suspensorio ovárico, ingresa al órgano por el hilio y llega a las células de la teca de los folículos y a la glándula intersticial. Además de fibras catecolaminérgicas, el NOS está formado por fibras que sintetizan péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Garraza y col., 2004), óxido nítrico (Casais y col., 2007) y kisseptina (Ricu y col., 2012). El PO transcurre asociado a la arteria ovárica e inerva principalmente los vasos sanguíneos (Lawrence y Burden, 1980). La innervación parasimpática que llega al ovario es proporcionada por neuronas colinérgicas posganglionares, que posiblemente alcanzan al ovario a través de ramas vagales y por ramas del plexo hipogástrico que contribuyen al PO (Burden y Lawrence., 1978).

En la rata, el desarrollo de la innervación catecolaminérgica ocurre previo al nacimiento (Malamed y col., 1992), antes de que inicie la foliculogénesis, mientras que la innervación por fibras NPY positivas se observa a partir del día 12 post-natal (Allen y col., 1989). Estudios *in*

vitro muestran que en los ovarios de ratas de 2 días de edad, el VIP y la NA estimulan la síntesis de receptores a la FSH (Mayerhofer y col., 1997).

El desarrollo y mantenimiento de la inervación dependen de la unión de factores de crecimiento, neurotrofinas, a sus receptores de membrana. Algunas de estas neurotrofinas son: el factor de crecimiento neural (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 y la neurotrofina 4/5 (Dissen, 2009). Las neurotrofinas estimulan la diferenciación y sobrevivencia de poblaciones neuronales en el sistema nervioso central y periférico (Snider, 1994). En el ovario, las neurotrofinas y sus receptores se expresan desde la vida fetal antes de que se inicie la formación de los folículos (Dissen, 2009).

La participación de la inervación en la regulación de las funciones del ovario se ha analizado por los efectos de fármacos que actúan como agonistas o antagonistas de los neurotransmisores; mediante la sección de los paquetes nerviosos que llegan al ovario (denervación quirúrgica) o por la inyección de neurotóxicos (denervación farmacológica).

El ovario recibe NA a partir de tres fuentes: la que proviene de la inervación, vía el NOS y el PO, la que llega por el torrente sanguíneo desde las adrenales y la que es sintetizada por el propio ovario. El NOS se considera como el principal aporte noradrenérgico que llega al ovario (Aguado y Ojeda., 1984). Lo anterior ha sido evaluado mediante la sección uni o bilateral del nervio. La sección bilateral del NOS en ratas de 24 días resultó en una menor concentración de NA ovárica 7 días después de realizada (Aguado y Ojeda., 1984). Resultados semejantes se observan cuando la sección unilateral o bilateral del NOS se realizó en ratas de 16 o 34 días de

edad y se evaluó la concentración de NA, 24 o 72 horas después de la denervación (Chávez y col., 1994).

El grupo de Zhang (2010) mostró que en los ovarios de ratas de dos días de edad sometidas a la sección bilateral del NOS y evaluados a los 30 o 90 días de vida, el número de folículos antrales fue menor que en el grupo control, mientras que el porcentaje de atresia folicular fue mayor. Además, la inyección de PMSG y hCG en animales de 30 días con sección del NOS, el número de ovocitos liberados fue menor que en los no denervados, mientras que, a los 90 días el número de cuerpos lúteos observados fue semejante. Lo anterior permitió a los autores sugerir que el NOS es fundamental para que el ovario responda a las gonadotropinas antes de la pubertad, mientras que en la edad adulta no es necesario para la ovulación.

Chávez y col., (1991) mostraron que en la rata adulta, 20 días después de la sección bilateral del NOS o del nervio derecho, la respuesta ovulatoria fue menor que en el grupo control. En los animales con sección unilateral del NOS, el tratamiento con gonadotropinas restableció la respuesta ovulatoria en el ovario inervado, lo que no ocurrió en los animales con sección bilateral. A partir de estos resultados, los autores apoyan la idea de que la inervación modula la reactividad de los compartimentos ováricos a las gonadotropinas.

En la rata prepúber, los efectos de la sección del NOS sobre el número de ovocitos liberados, depende de la edad en que se realice la denervación (Morales y col., 1993).

En la rata adulta la sección del NOS realizada en la mañana o la tarde del día del proestro, resultó en una menor concentración de progesterona y estradiol. El mismo procedimiento realizado en la mañana del día del estro no modificó las concentraciones de estas hormonas

(Aguado y Ojeda., 1984). Estos resultados nos sugieren que la participación de la inervación en la regulación de la secreción hormonal ovárica, varía durante el ciclo estral.

La sección bilateral del NOS, en ratas de cuatro días de edad y evaluadas a los 30, 41 o 60 días de vida, la concentración de estradiol fue mayor a la del grupo control, mientras que la de progesterona fue similar. La concentración de androstenediona fue mayor que en los controles en los animales sacrificados a los 30 días, pero menor en los animales de 40 días y similar en los estudiados a los 60 días sacrificados en diestro 2 (Forneris y col., 2002).

Estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que en la rata prepúber de 32 día de edad, los efectos de la sección unilateral del NOS, sobre la secreción de hormonas esteroides, dependen de la hormona en estudio, del NOS seccionado y del tiempo transcurrido entre la cirugía y la autopsia. Estos resultados nos sugieren que los mecanismos que regulan la síntesis de cada hormona no son regulados por las mismas señales (Morales-Ledesma y col., 2012).

Tomados en conjunto los resultados descritos nos sugieren que la regulación de la ovulación y secreción de hormonas esteroides por el NOS dependen de la edad en la cual se realizó la denervación, del tiempo de evolución entre la cirugía y la autopsia y del parámetro analizado.

El síndrome del ovario poliquístico (SOPQ) en la mujer

El SOPQ es un trastorno endocrino-metabólico que afecta del 6 al 20% de las mujeres en edad reproductiva (de los 12 a los 45 años) (Tsilchorozidou y col., 2004; Goodarzi y col., 2011; Mirabolghasemi y Kamyab, 2017). En 1925 Stein y Leventhal describieron la existencia de mujeres adultas que presentaban un cuadro clínico caracterizado por la presencia de ovarios

poliquísticos, amenorrea, oligomenorrea, hirsutismo y obesidad. A este síndrome se le conoció por muchos años como síndrome de Stein y Leventhal. A partir de 1957 se le describe como SOPQ (Keettel y col., 1957). Debido a la heterogeneidad del síndrome, en años posteriores se describieron otras alteraciones vinculadas con el SOPQ, y se establecieron criterios para su mejor diagnóstico.

Los primeros criterios fueron establecidos en 1990 por el “National Institute of Child Health and Human Development of the US National Institutes of Health” donde se incluye la presencia de hiperandrogenismo clínico o bioquímico y oligoanovulación crónica (Zawadzki JK Dunaif A, 1992).

En 2003, en la conferencia de Rotterdam, mediante un consenso en el que participó la “European Society for Human Reproduction and Embryology” y la “American Society for Reproductive Medicine” se determinó que se requiere la presencia de al menos dos de las siguientes tres características: hiperandrogenismo clínico o bioquímico, disfunción ovulatoria crónica o presencia de ovarios poliquísticos. De acuerdo con este consenso incrementó el número de pacientes diagnosticadas con SOPQ.

Finalmente, en 2006 la “Androgen Excess & Polycystic Ovarian Syndrome Society” estableció que un diagnóstico conciso del síndrome debe basarse en la presencia de hiperandrogenismo clínico o bioquímico en combinación con disfunción ovárica (que puede incluir disfunción ovulatoria crónica o presencia de ovarios poliquísticos).

Dado que el uso indistinto de los criterios de diagnóstico del SOPQ resultó en confusión en la práctica clínica, en 2012 el “US National Institutes of Health” organizó un taller donde se recomendó el uso de los criterios propuestos en 2003, por ser más amplios, acompañado de una detallada descripción del fenotipo del síndrome, los siguientes fenotipos fueron recomendados: fenotipo A: hiperandrogenismo clínico o bioquímico con disfunción ovulatoria crónica y ovarios poliquísticos; fenotipo B: hiperandrogenismo clínico o bioquímico con disfunción ovulatoria crónica; fenotipo C: hiperandrogenismo clínico o bioquímico con ovarios poliquísticos; fenotipo D: disfunción ovulatoria crónica y presencia de ovarios poliquísticos.

En el caso de las adolescentes, se debe tener en cuenta que a partir de la menarca y antes de los 18 años, existe un período de transición hormonal y reproductiva, por lo que en algunas niñas se pueden presentar claramente las características del síndrome y en otras los signos son muy sutiles, lo que solo sugiere la presencia del síndrome (Lizneva y col., 2016).

En condiciones normales, el incremento en la frecuencia de los pulsos de GnRH estimula la síntesis de LH, mientras que las frecuencias bajas estimulan la de FSH. En el SOPQ, el incremento en la relación LH:FSH se explica por el aumento en la frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH lo que resulta en la mayor síntesis de la cadena beta de la LH (Haisenleder, 1994). En la clínica no se utiliza la concentración de LH como indicativo del SOPQ, ya que muchas de las pacientes no presentan el incremento en la concentración de la hormona, ni presentan cambios en la relación LH:FSH. Por lo anterior, el *National Institute of Child Health and Human Development* no considera los parámetros anteriores como determinantes para el diagnóstico del SOPQ (Arrollo y col., 1997).

En algunas pacientes con SOPQ, los ovarios incrementan de tamaño y están rodeados de una cápsula engrosada y desprovista de vascularización. En ocasiones se observa un cuerpo lúteo o un cuerpo albicans. Los quistes por lo general presentan hiperplasia de las células de la teca y pocas capas de células de la granulosa (Almahbobi y col., 1996; Azziz y col., 2009). En las células de la teca hay incremento en la actividad esteroidogénica e hipofunción en las células de la granulosa (Erickson y col., 1979; Ehrmann y col., 1995; Franks, 1995).

Un alto porcentaje de mujeres con el SOPQ presentan alteraciones metabólicas como obesidad, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, lo que aumenta el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo II, hipertensión, enfermedades cardiovasculares o cáncer de endometrio (Tsilchorozidou y col., 2004).

Para explicar el origen del SOPQ, se proponen varias hipótesis:

- La desregulación en la vía hipotálamo-hipófisis.
- La desregulación en el ovario.
- El incremento en la actividad nerviosa simpática del ovario

De acuerdo con la Sociedad de Exceso de Andrógenos y la Sociedad del SOPQ, el diagnóstico del síndrome requiere la confirmación de hiperandrogenismo (ya sea clínico o bioquímico), acompañado de trastornos menstruales (oligomenorrea, amenorrea o anovulación) o la presencia de ovarios con más de 10 quistes por ovario (Azziz y col., 2006).

Modelos experimentales para inducir el SOPQ

Pfeiffer (1936) mostró que el trasplante de testículos en la rata hembra recién nacidas inhibe la ovulación. El grupo de Barraclough y Gorski (1961) mostró que en la rata hembra, la inyección de andrógenos produce alteración en el ciclo estral, caracterizados por estro vaginal persistente, formación de quistes, hipertrofia del tejido intersticial ovárico e infertilidad. Estos estudios mostraron que en la rata hembra, los andrógenos producen efectos permanentes sobre los mecanismos hipotalámicos que regulan la secreción de gonadotropinas en la etapa adulta, por lo que los autores lo llamaron síndrome anovulatorio con estro vaginal persistente.

A partir de las evidencias anteriores, se ha utilizado la inyección de hormonas esteroides para inducir anovulación, aciclicidad o la formación de quistes ováricos que se desarrollan en algunas patologías como en el SOPQ.

Actualmente los métodos más usados para inducir el SOPQ en roedores han sido mediante inyecciones de andrógenos (Ota y col., 1983; Wu y col., 2010), estrógenos (Brawer y col., 1986; Lara y col., 1993; Morales-Ledesma y col., 2010), inhibidores de la aromatasas, como el letrozol (Manneras y col., 2007) o mediante la exposición a algunos estresores (Paredes y col., 1998; Dorfman y col., 2003; Araya y col., 2004; Bernuci y col., 2008; Dorfman y col., 2009). Actualmente no hay un consenso sobre cuál de los modelos reproduce mejor la patología, ya que cada una induce características muy particulares que otros modelos no reproducen.

Efecto de la inyección de andrógenos

Dado que en el SOPQ la concentración de andrógenos es muy elevada, para inducir el síndrome se ha usado la inyección de andrógenos de vida media larga como el *propionato de testosterona (PT)* (Ota y col., 1983; Sotomayor-Zárate y col., 2011) o la inyección diaria de *testosterona o dihidrotestosterona (DHT)* (Feng y col., 2009; Wu y col., 2010).

Según Wu y col. (2010), el SOPQ es el resultado del incremento en la concentración de andrógenos desde la vida intrauterina. Los autores mostraron que la inyección de 3mg de T libre o de DHT (andrógeno no aromatizable) a ratas preñadas del día 16 al 19 de gestación, da como resultado que las hembras nacidas de esas madres presenten ciclos estrales irregulares, mayor concentración sérica de P₄, T, E₂ y LH que los animales nacidos de madres no tratadas. La frecuencia y amplitud de los pulsos de LH fueron mayores que los controles, sin que se observaran modificaciones en la concentración de FSH. En los ovarios, el número de folículos preantrales y antrales fue mayor que en los controles, y menor el de folículos pre ovulatorios y cuerpos lúteos. La distancia de la región anogenital fue mayor que en los controles y menor el número de pezones.

Ota y col., (1983) mostraron que en ratas de 40 días de vida, el tratamiento con 1.25mg de PT iniciado a los 5 días de vida, incrementó la concentración de prolactina (un tercio de las mujeres con SOPQ tiene hiperprolactinemia), LH, T y E₂, sin modificar la concentración de FSH. Veinte días después del tratamiento con PT, observaron en el ovario la formación de quistes foliculares, folículos atrésicos y luteinización de las células de la teca, lo cual fue más evidente 40 días después del tratamiento con PT (Figura 2).

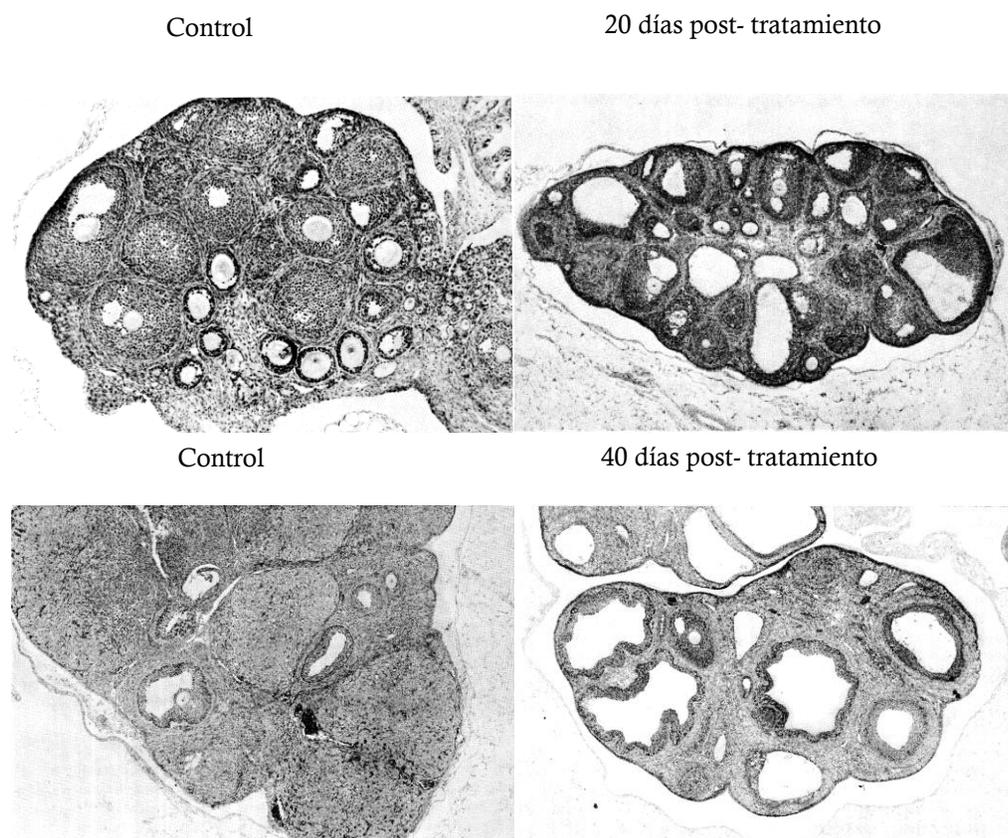


Figura 2. Las imágenes de la izquierda muestran ovarios de ratas control y a la derecha, de ovarios de ratas tratadas con PT y sacrificadas 20 o 40 días post-tratamiento (Tomado de Ota y col., 1983).

Beloosesky y col. (2004) mostraron que en ratas de 42 días de vida, la inyección de 1mg/100g de peso corporal de PT del día 21 al 35 de vida, resultó en la formación de quistes foliculares, ausencia de cuerpos lúteos y la concentración de P₄ fue menor que la de los control. Los autores sugieren que la inyección de PT en ratas inmaduras puede producir ovarios poliquísticos y bloquear la ovulación.

Efectos de la inyección de estrógenos

Estudios de Brawer mostraron que en las ratas adultas inyectadas con VE los ciclos estrales se caracterizan por presentar varios días continuos la fase de estró vaginal, en los ovarios se presentan estructuras quísticas grandes llenas de fluido folicular, formadas por la membrana basal, una delgada capa de células de la granulosa e hipertrofia de la teca interna (Brawer y col., 1978; Brawer y col., 1986; Hemmings y col., 1983). En algunos estudios se ha reportado que la capa de células de la teca que rodean a los quistes parece estar luteinizada (Schulster y col., 1984). La mayoría de los autores describen ausencia de cuerpos lúteos (Hemmings y col., 1983; Schulster y col., 1984; Lara y col., 1993). En animales inyectados con VE en la etapa adulta, la concentración plasmática de androstenediona, dehidroepiandrosterona o T evaluadas 4, 5 o 6 semanas posteriores a la inyección del estrógeno fueron semejantes a los controles (Brawer y col., 1986; Barria y col., 1993; Lara y col., 1993; Stener-Victorin y col., 2000). Los efectos de la inyección de VE sobre la concentración de LH, dependen del modelo de estudio. Brawer y col., (1978) observaron que la concentración de LH es mayor que la del grupo control, aunque en otros estudios muestran que es menor, y no observaron modificaciones en la concentración de FSH (Brawer y col., 1986; Hemmings y col., 1983; Schulster y col., 1984).

Morales-Ledesma y col., (2010) mostraron que en la rata adulta inyectada con VE en la etapa infantil, los ciclos estrales se caracterizan por presentar estró vaginal constante, las concentraciones plasmáticas de progesterona y estradiol fueron semejantes a las de su grupo control y la de testosterona fue mayor. Las diferencias encontradas entre los estudios de Brawer y de Morales-Ledesma podrían ser explicadas por la edad en que los animales se inyectaron con VE.

En la rata adulta, se ha mostrado que el implante subcutáneo de E₂ en cápsulas de silastic, lo que permite la liberación crónica de la hormona, resulta en la presencia de estros vaginales constantes. Los ovarios desarrollan quistes caracterizados por hipertrofia en las células de la teca interna y son de menor tamaño a los reportados por la inyección del VE.

En algunos animales el patrón de secreción de LH y FSH fue en pulsos pequeños y frecuentes, mientras que en otros los pulsos fueron grandes con menor frecuencia, a diferencia de lo reportado en los animales inyectados con VE donde los pulsos son pequeños y en mayor frecuencia. Debido a que los quistes producidos por los implantes de estradiol son similares a los de mujeres con el síndrome de Stein-Levanthal, los autores proponen que este es un buen modelo para el estudio de la enfermedad quística ovárica (McCarthy y Brawer., 1990).

Pinilla y col., (1993) mostraron que la inyección de 100 µg de BE a ratas hembra de 1 día de nacidas resulta en una menor concentración de LH y FSH que las de sus controles, mientras que la de prolactina fue mayor a los 2, 5, 8, 10 o 15 días después del tratamiento. En otro grupo de ratas, el mismo tratamiento con BE adelantó la edad de canalización de la vagina, los ciclos estrales se alternaban por periodos de estro o diestro constante y no se observó ovulación espontánea en la vida adulta. Efectos semejantes sobre la canalización de la vagina y la ovulación han sido observados por la inyección de VE. Una de las limitaciones que tiene este modelo es la vida media corta del BE, y su administración debe ser frecuente.

Efecto de la inyección de letrozol (inhibidor de la aromatasa)

Diversos autores han mostrado la presencia de las enzimas aromatasas en diversos tejidos (Corbin y col., 1999; Blakemore y Naftolin., 2016). Algunos estudios muestran que la disminución de la actividad de la aromatasa resulta en un ambiente hiperandrogénico, lo cual podría facilitar el desarrollo del SOPQ (Kafali y col., 2004; Xu y col., 2017).

El letrozol es un compuesto no esteroideo, que bloquea la actividad de la aromatasa y por lo tanto la conversión de testosterona a estradiol (Kafali y col., 2004; Manneras y col., 2007; Xu y col., 2017).

La inyección por 21 días de 0.1, 0.5 o 1 mg/kg de letrozol a ratas adultas, resultó en la interrupción del desarrollo de los folículos ováricos, el aumento en el número de folículos atrésicos, la formación de quistes, menor concentración de P_4 y E_2 y mayor de T y LH (Kafali y col., 2004). Cuando el letrozol se administra mediante un implante subcutáneo de liberación continua (90 días), las ratas presentan citología vaginal con diestros persistentes, formación de ovarios poliquísticos, hiperandrogenismo, incremento del peso corporal (Manneras y col., 2007). Por lo anterior, los autores concluyen que la administración del letrozol, es un modelo adecuado para inducir las características del SOPQ.

Exposición a estrés

En ratas adultas, la exposición crónica a estrés por frío induce el desarrollo de algunas características del SOPQ, lo cual depende del periodo en que los animales fueron sometidos al

estrés. En las ratas expuestas al frío por 3 semanas se interrumpe la ciclicidad estral, los animales desarrollan hiperandrogenismo, hay formación de prequistes e incremento en la concentración de NA en el ganglio celiaco (Paredes y col., 1998). A las 4 semanas de exposición al estrés incrementa la concentración de NA en el ovario (Dorfman y col., 2003). Cuando el periodo de estrés es de 8 semanas se observó hiperandrogenismo, formación de quistes, disminución del número de ovocitos presentes en los oviductos, mientras que la concentración de NA en el ganglio celiaco o en el ovario fue semejante a sus controles (Bernuci y col., 2008).

Debido a que el modelo de las ratas expuestas a estrés por frío desarrollan características semejantes a las observadas en el modelo de la rata inyectada con VE, los autores han sugerido que el mecanismo por el que el estrés regula el desarrollo del SOPQ podría ser semejante al planteado en la rata inyectada con VE, donde el aumento en la actividad simpática se considera como el factor clave en el desarrollo del SOPQ (Lara y col., 1993).

Lambert (1975) mostró que la exposición de ratas albinas de 21 días de vida, a luces encendidas de manera permanente durante 12 semanas, presentaron estros vaginales continuos, disminución del peso de los ovarios y anovulación. Baldissera y col., (1991) mostraron que en ratas adultas, la exposición a luz continua por 74 días, resulta en el desarrollo de quistes foliculares, ausencia de cuerpos lúteos, la concentración de E₂ fue mayor que la de su control y menor la de FSH y P₄. En ratas de 8 semanas de vida la exposición a luz constante por 15 semanas, resulta en la interrupción del desarrollo de los folículos, el incremento en la atresia

folicular, la formación de quistes caracterizados por el engrosamiento en la capa de células de la teca y la ausencia de cuerpos lúteos (Salveti y col., 2004).

A pesar de que en estos estudios la exposición a luz constante induce algunas de las características del SOPQ, dado que no se cuantificó la cantidad de andrógenos, no se cuenta con información sobre la principal característica que se toma para el diagnóstico del SOPQ.

Síndrome del ovario poliquístico e inervación simpática

En los ovarios de la rata adulta, la inyección de VE incrementa la concentración de NGF y de su receptor de baja afinidad, el p-75 (Lara y col., 2000). El NGF es sintetizado en las células de la teca interna de los folículos (Dissen y col., 1996). La unión del NGF al receptor p-75 localizado en el botón terminal de las fibras simpáticas (Anesetti y col., 2009), desencadena una señal retrograda hasta el núcleo del soma neuronal que se ubica en el ganglio celiaco. Estas señales aumentan la expresión de la tiroxina hidroxilasa (TH). El incremento en la TH resulta en la mayor síntesis de NA, la que llega al ovario a través de las fibras simpáticas, hecho que se interpreta como una mayor actividad de las fibras.

Según varios autores, el SOPQ se origina en respuesta a un mayor tono simpático del ovario (Lara y col., 1993; Sotomayor-Zarate y col., 2008), ya que en animales con el SOPQ, inducido por la inyección de VE, la sección bilateral del NOS, reduce la concentración de NA ovárica y los animales ovulan espontáneamente (Barria y col., 1993; Rosa-e-silva y col., 2003). La sección unilateral del NOS, resulta en la recuperación de la ovulación por el ovario inervado a pesar de que la concentración de NA en dicho ovario sigue siendo mayor que en el grupo

control. A partir de esos resultados los autores sugieren que el SOPQ es algo más que el resultado del incremento en la actividad nerviosa simpática de los ovarios (Morales-Ledesma y col., 2010).

Aunado al incremento en NA, en la rata con SOPQ inducido con VE, se ha observado que la concentración de VIP es mayor que la de los animales control, además cuando los ovarios de ratas con SOPQ son puestos en cultivo en presencia de VIP, incrementa la concentración de andrógenos y estrógenos en el medio de cultivo (Parra y col., 2007).

Dado que NA y VIP llegan al ovario a través del NOS, la sección quirúrgica del NOS no deja totalmente claro si el restablecimiento de la función ovularía en animales con SOPQ se produjo por la disminución de NA. Dado que la guanetidina es un neurotóxico exclusivo de fibras noradrenérgicas su uso como una herramienta farmacológica nos permite eliminar el aporte noradrenérgico y no el peptidérgico (Manning y col., 1983).

Sulfato de Guanetidina (GTD)

La GTD es un miembro de la familia guanidium, que es utilizado en la clínica como antihipertensivo. La GTD es capturada mediante la bomba de recaptura de las catecolaminas y almacenada en las neuronas simpáticas. Dentro de las neuronas NAérgicas, la GTD desplaza a la NA de las vesículas de almacenamiento en las terminaciones nerviosas y de este modo bloquea la liberación de NA endógena (Figura 3). La GTD suprime las respuestas mediadas por los receptores α y β -adrenérgicos sin ocasionar un bloqueo parasimpático. El bloqueo simpático produce una reducción del ritmo cardíaco y de la presión arterial supina (Katzung y col., 2010).

En ratas recién nacidas o adultas, la inyección crónica de altas concentraciones de GTD (50 mg/kg de peso) causa destrucción de las neuronas simpáticas periféricas. Esta destrucción se explica por la acumulación del fármaco dentro de la neurona, por lo que se le ha utilizado para analizar el papel de las catecolaminas en la regulación de diferentes mecanismos fisiológicos. Este compuesto no se acumula en otros tipos de neuronas periféricas como las colinérgicas y sensoriales (Burnstock y col., 1971; Manning y col., 1983; Johnson y Manning 1984).

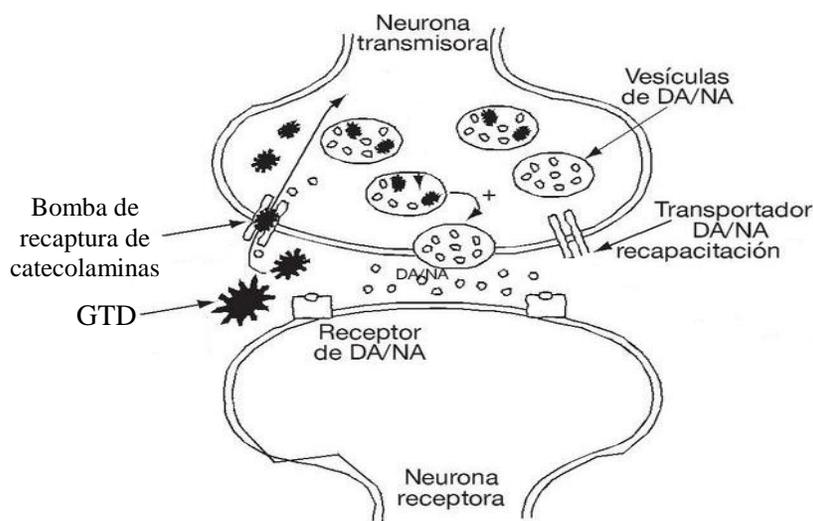


Figura 3. Esquema del mecanismo de acción de la guanetidina sobre los sistemas de neurotransmisión dopaminérgico y noradrenérgico. DA: dopamina; NA: noradrenalina (Modificado de Robledo 2008).

Se han propuesto varios mecanismos para explicar el efecto citotóxico de la GTD, entre los que se encuentra la inhibición de la fosforilación oxidativa, la inhibición del transporte retrogrado del NGF y la inhibición de la biosíntesis de las poliaminas. Otros autores han asociado la destrucción de la neurona NAérgica con mecanismos inmunológicos (Manning y col., 1982).

Estudios de ultraestructura de barrido electrónico muestran que la inyección de GTD provoca cambios en la arquitectura del ganglio cervical superior, dados por la dilatación de las mitocondrias, así como ruptura y pérdida de las crestas (Figura 4).

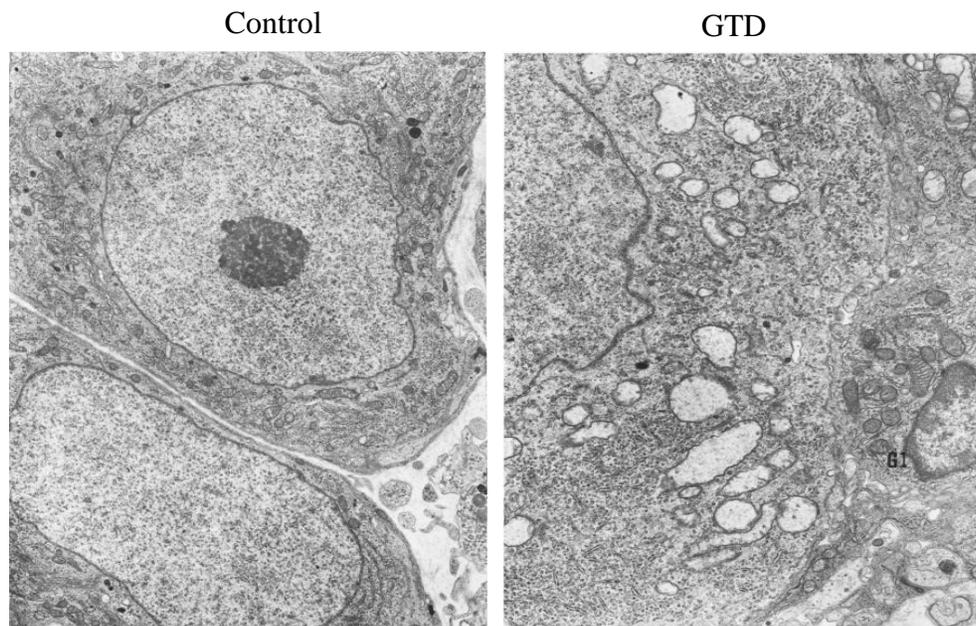


Figura 4. Micrográficas electrónicas de secciones del ganglio cervical superior de ratas control de 6 días de edad (izquierda) o inyectadas con GTD (derecha) (Tomada de Angeletti y col., 1972).

El uso de la GTD como herramienta para el estudio de la regulación de las funciones ováricas

Los efectos de la inyección sistémica de GTD permiten analizar la modulación que ejerce la NA sobre las funciones del ovario. En la cobaya recién nacida la denervación con tres dosis de GTD (20mg/kg de pc) disminuye el contenido de NA ovárica a valores menores a 50pg, cuando se sacrificaron 24 horas después de la última dosis de GTD (Riboni y col., 1998). En la rata de

3, 12 o 18 meses de edad, la inyección consecutiva de GTD (20mg/kg de pc) por 8 días, disminuye la concentración de NA ovárica a valores no detectables, cuando los animales se sacrificaron al finalizar el tratamiento con GTD (Chávez-Genaro y col., 2007), mientras que en la rata de 7 días de vida, la inyección crónica de GTD (50mg/kg de pc) por 3 semanas disminuyó en los ovarios el número de fibras inmunoreactivas a TH, cuando los animales se sacrificaron al primer diestro vaginal (Lara y col., 1990).

En la rata la inyección crónica de GTD del día uno de vida hasta el primer estro vaginal o en la rata adulta durante 30 días (sacrificadas en estro vaginal), no modificó el porcentaje de animales ovulantes. En los animales sacrificados al primer estro vaginal el número de ovocitos liberados fue mayor que el de su grupo control y menor en los animales tratados en la etapa adulta. A partir de estos resultados, los autores sugieren que la inervación noradrenérgica regula la reactividad de los folículos a las gonadotropinas de manera inhibitoria en la etapa prepúber y estimulante en la etapa adulta (Flores y col., 1990).

La estimulación gonadotrópica, por la inyección de PMSG + hCG, en el día 15 de vida, no indujo la ovulación en animales denervados con GTD a partir del día uno de vida y hasta el primer estro vaginal. Cuando las gonadotropinas se inyectaron a los 18 o 21 días de vida, la respuesta ovulatoria en los animales denervados fue mayor que en los controles. A partir de estos resultados, los autores sugieren que al final de la etapa infantil, la inervación simpática del ovario modula de manera inhibitoria la respuesta de los ovarios a las gonadotropinas (Flores y col., 1998).

En la rata la denervación con GTD del día 7 de vida al primer diestro vaginal retrasó la edad de apertura vaginal (Lara y col., 1990), mientras que en la cobaya prepúber, la inyección de GTD iniciada al nacimiento o al día 10 la adelantó (Riboni y col., 1998).

Riboni y col., (1998) mostraron que en cobayas denervadas con GTD al nacimiento o a los 10 días de vida y sacrificadas en la fase folicular tardía, no se modificó la concentración de estradiol, pero la de progesterona fue mayor que la de su grupo control. En aquellas cobayas con denervación al nacimiento y sacrificadas en la fase lútea tardía, la concentración de estradiol fue mayor que su control, mientras que la concentración de progesterona fue menor en ambos grupos denervados. A partir de estos resultados los autores indican que el aumento en estradiol se puede explicar por el incremento en el número de folículos sanos observados en los ovarios de estos animales y que la inervación noradrenérgica del ovario regula de manera estimulante las funciones del cuerpo lúteo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la mujer, el SOPQ es una patología caracterizada por hiperandrogenismo, la formación de quistes ováricos o anovulación, alteraciones que en la mayoría de los casos se acompañan de infertilidad. El SOPQ es un problema de salud pública ya que se calcula que entre el 6 y el 20% de las mujeres en edad reproductiva presentan la patología. El alto índice de obesidad que se observa en la actualidad hace pensar que la incidencia del SOPQ aumente, por ello es importante diseñar modelos experimentales que permitan estudiar los factores involucrados en el desarrollo y la persistencia del síndrome.

Uno de los modelos experimentales más utilizados para inducir el SOPQ es mediante la inyección de una dosis de VE a ratas prepúberes o adultas, que además de reproducir las características morfológicas y hormonales que caracterizan al síndrome, resulta en un incremento de la actividad nerviosa simpática.

En la rata con SOPQ inducido por la inyección de VE, la sección del NOS restablece la ovulación y normaliza la secreción de testosterona. Si bien el restablecimiento de las funciones ováricas se ha explicado por la disminución del aporte noradrenérgico que llega a los ovarios, la sección del NOS también reduce la entrada al ovario de otros péptidos, que pueden participar en el desarrollo del SOPQ.

Dado que la sección del NOS no permite asegurar que el restablecimiento en las funciones del ovario observadas en la rata con VE sea exclusivamente por la reducción de NA, es posible que

el bloqueo específico de la innervación noradrenérgica del ovario o sistémico, pueda revertir alguno o todos los componentes del SOPQ.

Por ello, en el presente estudio se analizaron los efectos de la eliminación farmacológica de las fibras catecolaminérgicas en el modelo de la rata inyectada con VE en el periodo infantil, inducida por la inyección crónica con guanetidina, fármaco que destruye las fibras noradrenérgicas periféricas, sobre la ovulación y la concentración de hormonas esteroides ováricas. Para comprobar la capacidad de la GTD para eliminar las fibras catecolaminérgicas se determinó la expresión de la TH en los ovarios de animales tratados y no tratados con GTD.

Para estudiar la participación de la innervación catecolaminérgica en el modelo de la rata inyectada con VE, diseñamos cuatro experimentos: 1) Para analizar si la denervación farmacológica evita la hiperactividad simpática inducida por el VE, se realizó la denervación catecolaminérgica del día 7 al 27 de vida; 2) En otro grupo una vez inyectado el VE, se analizó si la denervación catecolaminérgica evitaba la hiperactividad simpática, para ello, la denervación se realizó del día 14 al 34 de vida; 3) En otro modelo, se dejó transcurrir la vida media del VE (15 días) y se observó si la denervación realizada del día 29 al 49 de vida evitaba el desarrollo del SOPQ; 4) Para analizar si una vez inducido el SOPQ, la denervación es capaz de revertir el hiperandrogenismo y la anovulación, ratas con el SOPQ fueron inyectadas con GTD del día 70 al 90. En todos los animales la ovulación y secreción de hormonas esteroides se evaluó a los 90-94 días de vida, en el día del estro vaginal.

HIPÓTESIS

Si en la rata hembra la administración de VE incrementa la actividad de las neuronas noradrenérgicas, lo cual estimula el desarrollo del SOPQ, entonces la eliminación del aporte catecolaminérgico por la inyección crónica con GTD, antes o después del tratamiento con VE, prevendrá o revertirá el desarrollo del SOPQ en la rata adulta.

OBJETIVO GENERAL

Analizar en la rata hembra adulta, los efectos de la eliminación del aporte catecolaminérgico periférico producido por la inyección diaria de GTD, antes o después de la inyección de VE, sobre la ovulación y la concentración sérica de hormonas esteroides.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Analizar los efectos de la eliminación química de las fibras catecolaminérgicas periféricas, por la inyección crónica de GTD, del día siete al 27 de edad, inyectados con VE a los 14 días de edad, sobre la ovulación espontánea y las concentraciones de progesterona, testosterona y estradiol, cuando la rata alcanza la etapa adulta (90-94 días).
- 2) Analizar en la rata inyectada con VE a los 14 días de edad, los efectos de la eliminación química de las fibras catecolaminérgicas periféricas, por la inyección crónica de GTD, del día 14 al 34 de edad, sobre la ovulación espontánea y las concentraciones de progesterona, testosterona y estradiol, cuando la rata alcanza la etapa adulta (90-94 días).
- 3) Analizar en la rata inyectada con VE a los 14 días de edad, los efectos de la eliminación química de las fibras catecolaminérgicas periféricas, por la inyección crónica de GTD, del día 29 al 49 de edad, sobre la ovulación espontánea y las concentraciones de progesterona, testosterona y estradiol, cuando la rata alcanza la etapa adulta (90-94 días).
- 4) Analizar en la rata inyectada con VE a los 14 días de edad, los efectos de la eliminación química de las fibras catecolaminérgicas periféricas, por la inyección crónica de GTD, del día 70 al 90 de edad, sobre la ovulación espontánea y las concentraciones de progesterona, testosterona y estradiol, cuando la rata alcanza la etapa adulta (90-94 días).

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos fueron realizados conforme lo estipulado por la Ley Mexicana de Protección animal y atendiendo lo señalado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

Ratas hembras de la cepa CII-ZV, fueron mantenidas en condiciones controladas de iluminación con 14 hrs de luz por 10 hrs de oscuridad (luces encendidas de las 05:00 a las 19:00) y temperatura (22 ± 2 °C). Grupos de seis animales recién nacidos (cinco hembras y un macho) fueron colocados en cajas individuales, junto con su madre hasta los 24 días de vida y a partir de este momento tuvieron acceso *ad libitum* al alimento y agua. El macho de cada camada fue retirado en el momento en que las hembras presentaron canalización vaginal. La inyección de VE (2 mg) (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo. USA) disuelto en 0.1 ml de aceite de sésamo (Vehículo/Vh) (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo. USA) se realizó por vía intramuscular a los 14 días de vida y la de GTD (50 mg/kg de peso corporal) (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo. USA) disuelta en solución salina (SS) al 0.9%, por vía intraperitoneal, en función del objetivo.

Grupos de 10-14 hembras se asignarán al azar en los siguientes grupos experimentales:

- ❖ **Grupo testigo absoluto (TA):** Ratas hembra que presentaron al menos tres ciclos estrales consecutivos de cuatro días de duración, fueron sacrificadas a los 90-94 días de vida al presentar un estro vaginal precedido por un proestro.

- ❖ **Animales con inducción del SOPQ:** Ratas de 14 días de vida fueron inyectadas con VE. Como grupo de comparación se utilizaron animales inyectados solo con el Vh.
- ❖ **Ratas denervadas con GTD:** Ratas hembra fueron inyectadas con GTD en los siguientes periodos: 1) del día 7 al 27; 2) del día 14 al 34; 3) del día 29 al 49. En cada caso la GTD fue inyectada 5 días a la semana, durante tres semanas. La inyección se realizó entre las 9:00 y 11:00 siguiendo el esquema de tratamiento publicado por Lara y col., (1990). Como grupo control se utilizaron animales inyectados con SS.
- ❖ **Ratas denervadas con GTD antes del tratamiento con VE.** Ratas de 7 días de vida fueron inyectadas con GTD del día 7 al 27 de vida. A los 14 días de vida se les inyectó VE. Como grupo control se utilizaron animales inyectados con SS y Vh.
- ❖ **Ratas denervadas con GTD al mismo tiempo que el tratamiento con VE.** Ratas inyectadas con VE y el mismo día se inició la administración de GTD del día 14 al 34 de vida. Como grupo control se utilizaron animales inyectados con Vh y SS.
- ❖ **Ratas tratadas con VE y posteriormente denervadas con GTD.** Ratas inyectadas con VE, 15 días después se inició el tratamiento de GTD del día 29 al 49. Como grupo control se utilizaron animales inyectados con Vh y SS.

- ❖ **Ratas con SOPQ y subsecuentemente denervadas con GTD.** Ratas inyectadas con VE, del día 70 al 90 de vida fueron inyectadas con GTD. Como grupo control se utilizaron animales inyectados con Vh y SS.

En los grupos de animales inyectados con VE, la revisión de la apertura vaginal se inició al día siguiente de la inyección y se registró el día de la apertura vaginal momento en que se inició la toma de frotis vaginal por un periodo de 2 semanas y se registró el día del primer estro vaginal. El registro de la citología vaginal se reinició dos semanas antes de que los animales fueran sacrificados. Los animales de los grupos de control, fueron revisados diariamente a partir de los 30 días de vida y se procedió como en el caso anterior.

Procedimiento de la autopsia

Los animales fueron sacrificados a los 90-94 días de vida al presentar un estro vaginal precedido de un proestro. El 80% de los animales de cada grupo experimental fueron sacrificados por decapitación entre las 10:00-12:00 horas, se colectó la sangre del tronco y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos. Se separó el suero y se almacenó a -20 °C hasta el momento en que se cuantificaron las concentraciones de progesterona, testosterona y estradiol mediante la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Al momento de la autopsia se disecaron los oviductos donde se buscó la presencia de ovocitos con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Nikon modelo C-PS), siguiendo la metodología habitual del laboratorio. Los ovarios fueron removidos, pesados en balanza de precisión (Ohaus Adventurer AR0640 con sensibilidad de 0.1 mg), fijados en solución de Bouin durante 24 horas e incluidos en paraplast. El 20% de los animales restantes fueron inyectados con una sobredosis de

pentobarbital sódico (PiSA Agropecuaria, S.A. de C.V.) y perfundidos por vía intracardiaca para comprobar la capacidad de la GTD para destruir las fibras catecolaminérgicas, mediante la expresión de la TH en los ovarios, por inmunofluorescencia.

Análisis de la morfología ovárica.

Para analizar la morfología ovárica, tres ovarios de cada grupo experimental fueron limpiados de tejido graso adherente, fijados, deshidratados, incluidos en paraplast y cortados de manera serial a 10 μm de grosor. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina y se examinaron con un microscopio binocular (Nikon, modelo Labophot-2). Todas las secciones se analizaron para detectar la presencia de cuerpos lúteos, quistes y prequistes foliculares, siguiendo los criterios de Brawer y col., (1986). Un quiste folicular se define como aquel folículo desprovisto del ovocito, que presentan una gran cavidad antral, una gruesa capa de células de la teca y un compartimento de células de la granulosa delgado (frecuentemente una monocapa) que contiene células aparentemente sanas. Los folículos prequísticos se definieron como folículos grandes, con o sin ovocito, formados por cuatro o cinco capas de células de la granulosa, pequeñas y núcleo densamente empaquetado, que rodean un antro grande, con un compartimento de células de la teca aparentemente normal.

Análisis de la expresión y cuantificación de la tirosina hidroxilasa

Los ovarios de los animales sacrificados por perfusión intracardiaca, incluidos en paraplast, cortados a 8 μm de grosor y se seleccionaron los cortes que incluían la parte central del ovario, los que fueron montados en portaobjetos de vidrio recubiertos con silano, siguiendo la metodología descrita por Venegas-Meneses y col. (2015). En breve, las secciones fueron

colocados en buffer de fosfato (PBS) a pH de 7.4 y dos veces con PBS-B (PBS con 0.5% de Triton X-100). Las secciones fueron incubadas en albúmina de suero bovino al 2% libre de IgG (BSA sigma) durante 30 minutos para reducir la tinción de fondo y se incubaron durante toda la noche a 4 °C con un anticuerpo policlonal de conejo anti-TH (1:500) (Santa Cruz Biotechnology Inc, Estados Unidos). Al siguiente día, los portaobjetos se incubaron con un anticuerpo secundario (anti-conejo acoplado a fluoresceína FITC) (Jackson Immuno Research Laboratories Inc.) durante una hora. Los cortes fueron teñidos con DAPI-Vecta-shield (Vector Labs., CA, EE. UU.) para contra teñir los núcleos de las células.

Las observaciones y el análisis de la inmunorreactividad de los anticuerpos en las secciones de los ovarios se realizó en un microscopio de fluorescencia acoplado a una lámpara de mercurio con filtros: rojo, verde y azul (Nikon Eclipse E400). El registro de las imágenes se capturó por medio de una cámara digital acoplada al microscopio (Nikon DS-U2). Las imágenes obtenidas se almacenaron y posteriormente se analizaron con el sistema Nis-Elements BR 3.0 (Nikon). Se utilizaron seis cortes seriados de cada grupo. La inmunofluorescencia se calculó como el número total de píxeles por el área total evaluada mediante análisis de segmentación del color, que produce la cuantificación de los objetos de un color específico (verde).

Cuantificación de hormonas esteroides

Las concentraciones séricas de progesterona (ng/ml), testosterona (pg/ml) y estradiol (pg/ml) fueron cuantificadas mediante la técnica de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), con kits comprados a DRG Instruments GmbH (Alemania). Los coeficientes de

variación intra e interensayo fueron 7.52% y 8.41% (progesterona), 6.42% y 7.32% (testosterona) y 8.5% y 9.3% (estradiol).

Análisis Estadístico

El número de ovocitos liberados por animal ovulante fue analizado por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la prueba de U de Mann-Whitney. La proporción de animales ovulantes (PAO) (número de animales que ovulan/número total de animales) se analizó por la prueba exacta de Fisher para proporciones o de J_i^2 . La concentración sérica de hormonas esteroides se analizó por la prueba de Análisis de Varianza Multifactorial (ANDEVA) seguida por la prueba de Tukey. Cuando se realizó la comparación entre dos grupos se utilizó la prueba “*t*” de Student. Los datos de fluorescencia se analizaron con la prueba “*t*” de Student. Aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor a 0.05 fueron consideradas como estadísticamente significativas.

RESULTADOS

EFFECTO DE LA DENERVACIÓN CON GTD SOBRE LA OVULACIÓN Y LA CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA Y TESTOSTERONA

Ovulación

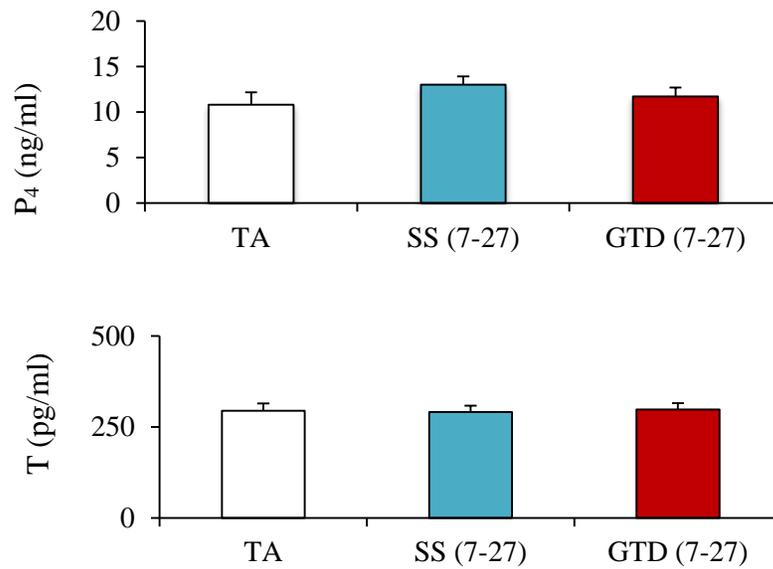
En comparación con el grupo TA la inyección crónica de SS o GTD realizada del día 7 al 27, del 14 al 34 o del 29 al 49 no modificó la PAO ni el número de ovocitos liberados (Tabla 1).

Tabla 1. Proporción de animales ovulantes (PAO) y media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados de animales testigo absoluto (TA), inyectados con solución salina (SS) o con guanetidina (GTD) del día 7 al 27, del 14 al 34 o del 29 al 49 de vida y sacrificados a los 90-94 días de vida cuando presentaron un estro vaginal precedido de un proestro.

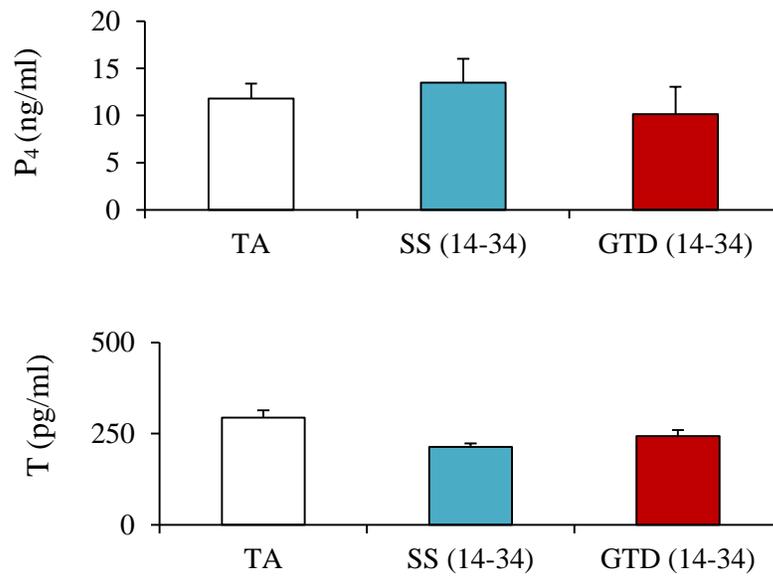
Grupo	n	PAO	No. Ovocitos liberados	
			Ovario Izquierdo	Ovario Derecho
TA	13	12/13	6.3 \pm 0.5	7.3 \pm 0.6
SS (7-27)	14	14/14	5.5 \pm 0.7	7.5 \pm 0.4
GTD (7-27)	10	10/10	8.0 \pm 0.9	5.3 \pm 0.8
SS (14-34)	10	10/10	5.6 \pm 0.5	6.4 \pm 0.5
GTD (14-34)	11	11/11	6.2 \pm 0.8	7.0 \pm 0.6
SS (29-49)	10	10/10	8.0 \pm 0	5.3 \pm 0.6
GTD (29-49)	10	6/10	6.8 \pm 1.2	6.8 \pm 1.0

Concentración sérica de progesterona y testosterona

La denervación con GTD del día 7 al 27 o del 14 al 34 de vida, no modificó la concentración plasmática de progesterona o testosterona respecto a la del grupo TA o inyectado con SS (Gráfica 1 y 2).

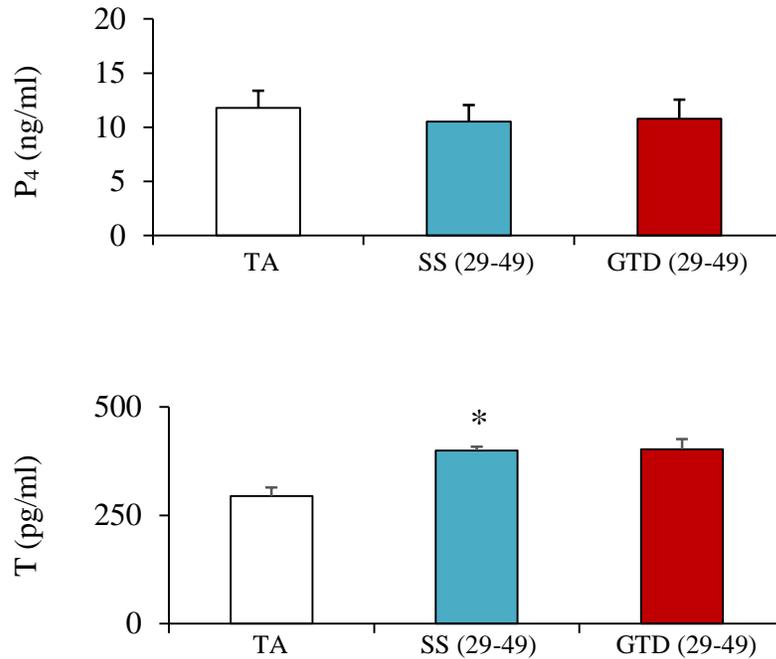


Grafica 1. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de **progesterona** y **testosterona** de animales testigo absoluto (TA), inyectados del día 7 al 27 de vida con solución salina (SS) o con guanetidina (GTD). Los animales fueron sacrificados a los 90-94 días de vida cuando presentaron un estro vaginal precedido de un proestro.



Grafica 2. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de **progesterona** y **testosterona** de animales testigo absoluto (TA), inyectados del día 14 al 34 de vida con solución salina (SS) o con guanetidina (GTD). Los animales fueron sacrificados a los 90-94 días de vida cuando presentaron un estro vaginal precedido de un proestro.

En los animales inyectados con SS del día 29 al 49 la concentración de P₄ fue semejante a la del grupo TA, mientras que la de T fue mayor. La inyección de GTD no modificó la concentración de P₄ ni de T respecto al grupo inyectado con SS (Gráfica 3).



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

Gráfica 3. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de **progesterona** y **testosterona** de animales testigo absoluto (TA), inyectados del día 29 al 49 de vida con solución salina (SS) o con guanetidina (GTD) y sacrificados a los 90-94 días de vida cuando presentaron un estro vaginal precedido de un proestro.

EFECTO DE LA INYECCIÓN DE VE SOBRE LA OVULACIÓN Y LA CONCENTRACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES

Ovulación

En comparación con el grupo TA, la inyección de Vh no modificó la PAO ni el número de ovocitos liberados. Los animales inyectados con VE presentaron bloqueo de la ovulación (Tabla 2).

Tabla 2. Proporción de animales ovulantes (PAO) y media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados de animales testigo absoluto (TA), inyectados a los 14 días de vida con el vehículo (Vh) o con valetaro de estradiol (VE) y sacrificados a los 90-94 días de vida cuando presentaron un estro vaginal precedido de un proestro.

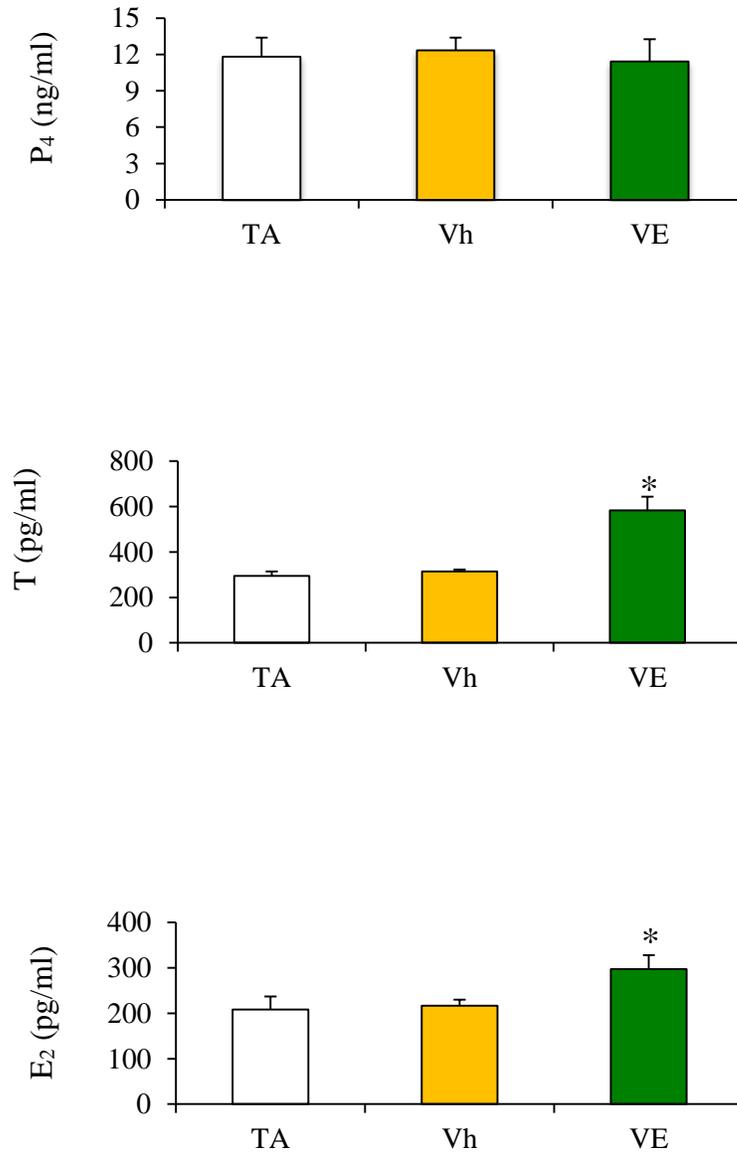
Grupo	n	PAO	No. Ovocitos liberados	
			Ovario Izquierdo	Ovario Derecho
TA	13	12/13	6.33 \pm 0.54	7.25 \pm 0.56
Vh	10	10/10	6.00 \pm 0.48	5.70 \pm 0.43
VE	10	0/10*	0♦	0♦

* $p < 0.05$ vs. TA y Vh (prueba de J_i^2)

♦ $p < 0.05$ vs. TA y Vh (Kruskal-Wallis)

Concentración sérica de hormonas esteroideas

La inyección de Vh o VE no modificó la concentración de P_4 cuando se compara contra el grupo de animales testigo. Las concentraciones de T y E_2 fueron mayores en los animales inyectados con VE respecto a los animales inyectados con el Vh (Gráfica 4).



* $p < 0.05$ vs. Vh (prueba «T» de Student).

Gráfica 4. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de **progesterona (P₄)**, **testosterona (T)** y **estradiol (E₂)** de animales testigo absoluto (TA), inyectados a los 14 días de vida con vehículo (Vh) o con valerato de estradiol (VE) y sacrificados a los 90-94 días de vida cuando presentaron un estro vaginal precedido de un proestro.

EFEECTO DE LA DENERVACIÓN CON GTD DEL DÍA 7 AL 27 DE VIDA, EN LA RATA INYECTADA CON VE, SOBRE LA OVULACIÓN Y LA CONCENTRACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES.

Ovulación

En comparación con el grupo inyectado con SS y Vh, en los animales denervados con GTD, no se modificó la respuesta ovulatoria. En los animales con VE y previamente inyectados con SS, solo 1 animal de 10 ovuló, mientras que en los denervados con GTD, 8 animales de 11 lo hicieron y liberaron un número de ovocitos semejante al de los grupos con Vh (Tabla 3).

Tabla 3. Proporción de animales ovulantes (PAO) y media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados de animales inyectados con solución salina (SS) o guanetidina (GTD) del día 7 al 27 de vida y en el día 14 de vida se les administró una dosis de vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE). Los animales fueron sacrificados a los 90-94 días de vida cuando presentaron un estro vaginal precedido de un proestro.

Grupo	n	PAO	No. Ovocitos liberados	
			Ovario Izquierdo	Ovario Derecho
SS + Vh	10	10/10	7.50 \pm 0.86	5.80 \pm 0.96
GTD + Vh	10	9/10	6.80 \pm 0.78	6.00 \pm 0.63
SS + VE	10	1/10	(6)	(4)
GTD + VE	11	8/11*	6.00 \pm 0.82	5.20 \pm 0.57

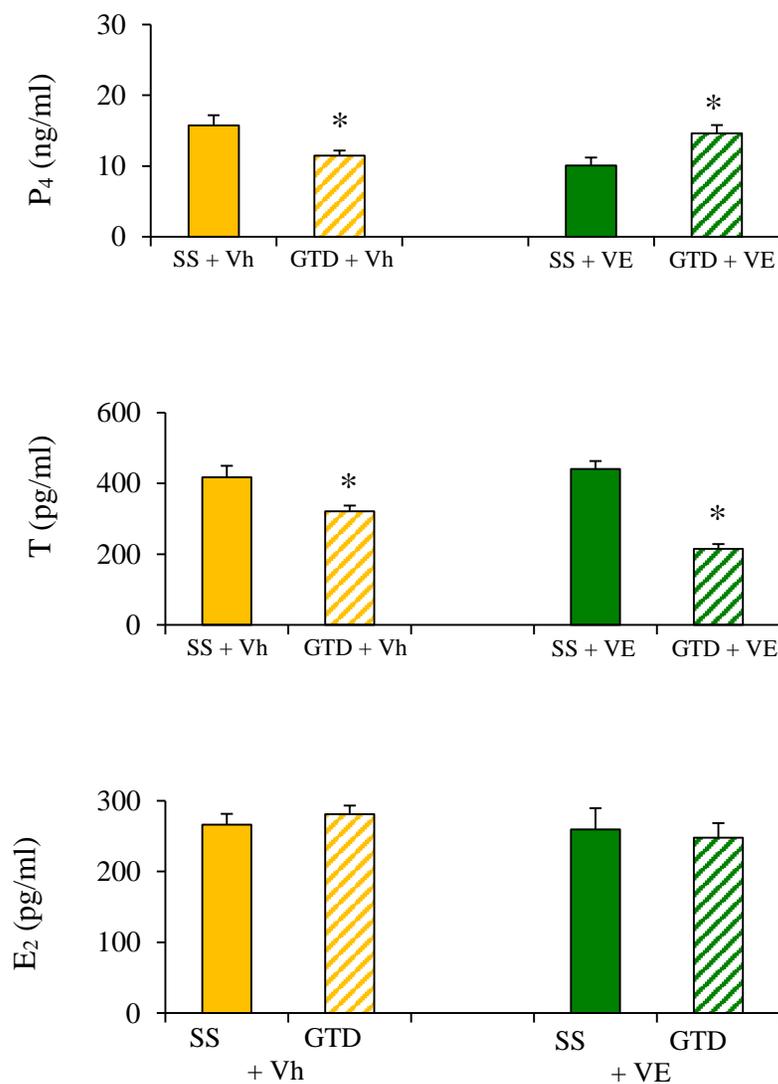
En paréntesis se indica el número de ovocitos liberados por ovario del animal ovulante.

* $p < 0.05$ vs. su grupo control (prueba de J_i^2)

Concentración sérica de hormonas esteroides

En los animales con Vh y denervados con GTD, la concentración de P₄ fue menor que la del grupo con SS, mientras que en los inyectados con VE y denervados con GTD fue mayor que la del grupo con SS. Tanto que en los animales con Vh o VE y denervados con GTD, la

concentración de T fue menor que la de los inyectados con SS. La concentración de E₂ no se modificó en los animales inyectados con Vh o VE y denervados con GTD respecto a los controles inyectados con SS (Gráfica 5).



* $p < 0.05$ vs. su grupo control (prueba "t" de Student).

Gráfica 5. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de **progesterona (P₄)**, **testosterona (T)** y **estradiol (E₂)** de animales inyectados con solución salina (SS) o guanetidina (GTD) del día 7 al 27 de vida y en el día 14 de vida se les inyectó una dosis de vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE). Los animales fueron sacrificados a los 90-94 días de vida cuando presentaron un estro vaginal precedido de un proestro.

EFFECTO DE LA DENERVACIÓN CON GTD DEL DÍA 14 AL 34 DE VIDA, EN LA RATA INYECTADA CON VE, SOBRE LA OVULACIÓN Y LA CONCENTRACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES.

Ovulación

En comparación al grupo inyectado con Vh y SS, en los animales con Vh y denervados con GTD no se modificó la PAO ni el número de ovocitos liberados. Los animales inyectados con VE y SS no ovularon, mientras que si lo hicieron el 80% de los inyectados con VE y denervados GTD, con un número de ovocitos semejante al de los animales con Vh y GTD (Tabla 4).

Tabla 4. Proporción de animales ovulantes (PAO) y media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados de animales inyectados con una dosis de vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) en el día 14 de vida y solución salina (SS) o guanetidina (GTD) del día 14 al 34 de vida. Los animales fueron sacrificados a los 90-94 días de vida cuando presentaron un estro vaginal precedido de un proestro.

Grupo	n	PAO	No. Ovocitos liberados	
			Ovario Izquierdo	Ovario Derecho
Vh + SS	10	10/10	6.17 \pm 0.7	8.0 \pm 0.6
Vh + GTD	10	10/10	5.5 \pm 0.87	7.3 \pm 0.7
VE + SS	14	0/14	0	0
VE + GTD	10	8/10*	6.0 \pm 0.6♦	6.2 \pm 0.5♦

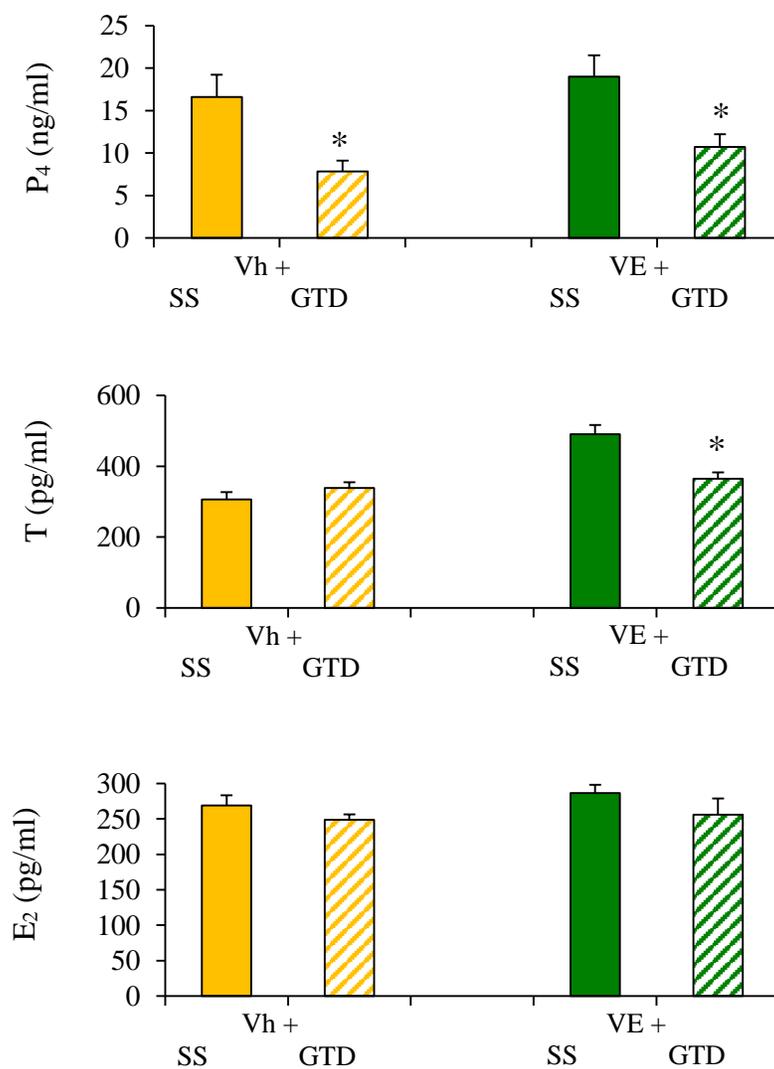
* $p < 0.05$ vs. su grupo control (prueba de J_i^2)

♦ $p < 0.05$ vs. su grupo control (Kruskal-Wallis)

Concentración sérica de hormonas esteroideas

En los animales con Vh o VE y denervados con GTD, la concentración de P_4 fue menor que la de los inyectados con SS. La concentración de T fue semejante entre los grupos

inyectados con Vh, mientras que en los animales con VE, la concentración de T fue menor en los denervados con GTD, respecto a los inyectados con SS. La concentración de E₂ no se modificó en los animales inyectados con Vh o VE y denervados con GTD, respecto a su grupo control (Gráfica 6).



* $p < 0.05$ vs. su grupo control (prueba "t" de Student).

Gráfica 6. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de **progesterona (P₄)**, **testosterona (T)** y **estradiol (E₂)** de animales inyectados con una dosis de vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) en el día 14 de vida y solución salina (SS) o guanetidina (GTD) del día 14 al 34 de vida. Los animales fueron sacrificados a los 90-94 días de vida cuando presentaron un estro vaginal precedido de un proestro.

EFFECTO DE LA DENERVACIÓN CON GTD DEL DÍA 29 AL 49 DE VIDA, EN LA RATA INYECTADA CON VE, SOBRE LA OVULACIÓN Y LA CONCENTRACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES.

Ovulación

En comparación a los animales inyectados con Vh y SS, en los animales denervados con GTD, no se modificó la PAO ni el número de ovocitos liberados. Ninguno de los animales inyectados con VE y SS ovuló, mientras que si lo hizo el 90% de los animales inyectados con VE y denervados con GTD. El número de ovocitos liberados fue semejante al del grupo tratado con Vh y GTD (Tabla 5).

Tabla 5. Proporción de animales ovulantes (PAO) y media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados de animales inyectados con una dosis de vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) en el día 14 de vida y solución salina (SS) o guanetidina (GTD) del día 29 al 49 de vida. Los animales fueron sacrificados a los 90-94 días de vida cuando presentaron un estro vaginal precedido de un proestro.

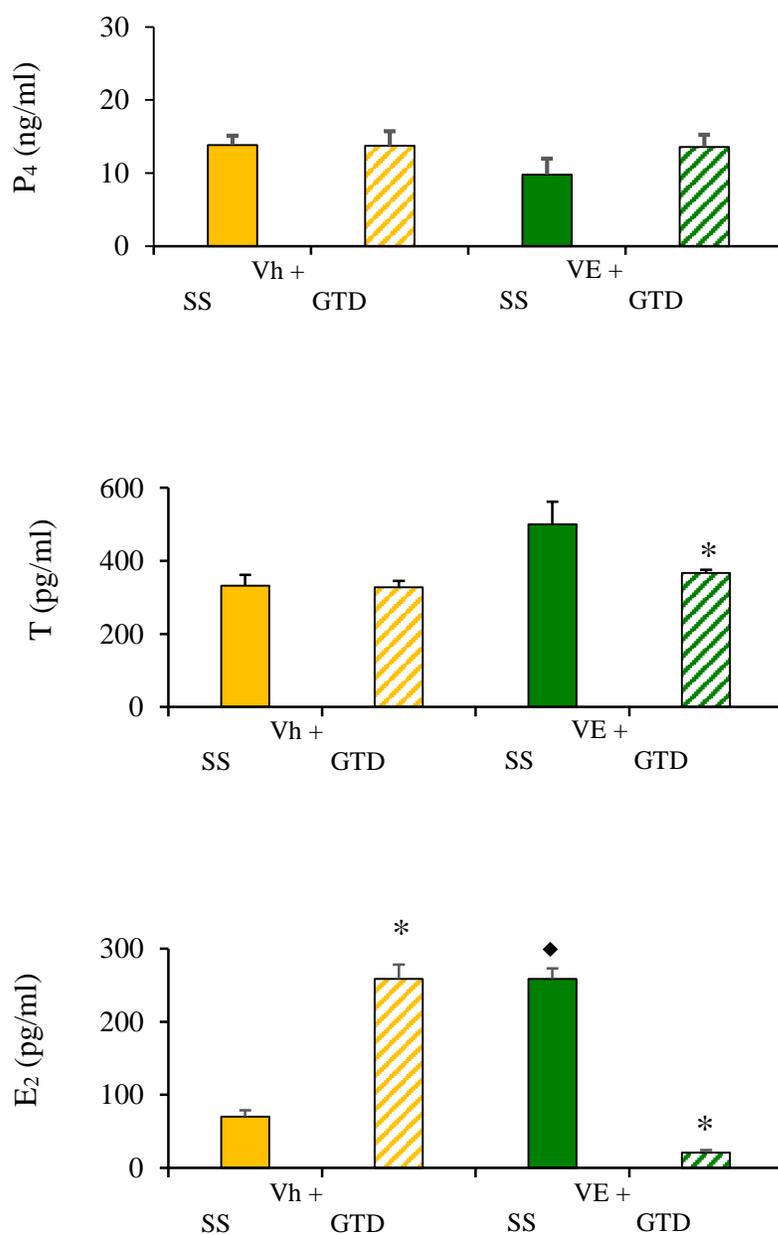
Grupo	n	PAO	No. Ovocitos liberados	
			Ovario Izquierdo	Ovario Derecho
Vh + SS	10	10/10	4.3 \pm 0.8	4.2 \pm 1.5
Vh + GTD	10	10/10	4.0 \pm 0.9	3.5 \pm 0.7
VE + SS	10	0/10	0	0
VE + GTD	10	9/10*	5.7 \pm 0.8♦	4.4 \pm 0.7♦

* $p < 0.05$ vs. su grupo control (prueba de J_i^2)

♦ $p < 0.05$ vs. su grupo control (Kruskal-Wallis)

Concentración sérica de hormonas esteroides

En los animales con Vh o VE y denervados con GTD, no se modificó la concentración de P_4 respecto a su control con SS. En los animales con Vh y denervados con GTD la concentración de T fue semejante a la de los animales inyectados con SS, mientras que en los inyectados con VE y denervados con GTD, la concentración de T fue menor que la del grupo con VE y SS. En los animales con Vh y denervados con GTD la concentración de E_2 fue mayor que la del grupo con SS, mientras que en los animales con VE y denervados con GTD la concentración de E_2 fue menor que la del grupo con VE y SS (Gráfica 7).



* p < 0.05 vs. su grupo control (prueba “t” de Student).

♦ p < 0.05 vs. su grupo control con Vh (prueba “t” de Student).

Gráfica 7. Media ± e.e.m. de la concentración sérica de **progesterona (P4)**, **testosterona (T)** y **estradiol (E2)** de animales inyectados con una dosis de vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) en el día 14 de vida y solución salina (SS) o guanetidina (GTD) del día 29 al 49 de vida. Los animales fueron sacrificados a los 90-94 días de vida cuando presentaron un estro vaginal precedido de un proestro.

EFFECTO DE LA DENERVACIÓN CON GTD DEL DÍA 70 AL 90 DE VIDA, EN LA RATA INYECTADA CON VE, SOBRE LA OVULACIÓN Y LA CONCENTRACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES.

Ovulación

En comparación a los animales inyectados con Vh y SS, en los animales con Vh y denervados con GTD, no se modificó la PAO ni el número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo o derecho. Ninguno de los animales inyectado con VE y SS ovularon, mientras que los animales con VE y denervados con GTD ovularon 8 de 12 animales, y el número de ovocitos liberados fue semejante al de los animales con Vh (Tabla 6).

Tabla 6. Proporción de animales ovulantes (PAO) y media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados de animales inyectados con una dosis de vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) en el día 14 de vida y solución salina (SS) o guanetidina (GTD) del día 70 al 90 de vida. Los animales fueron sacrificados a los 90-94 días de vida cuando presentaron un estro vaginal precedido de un proestro.

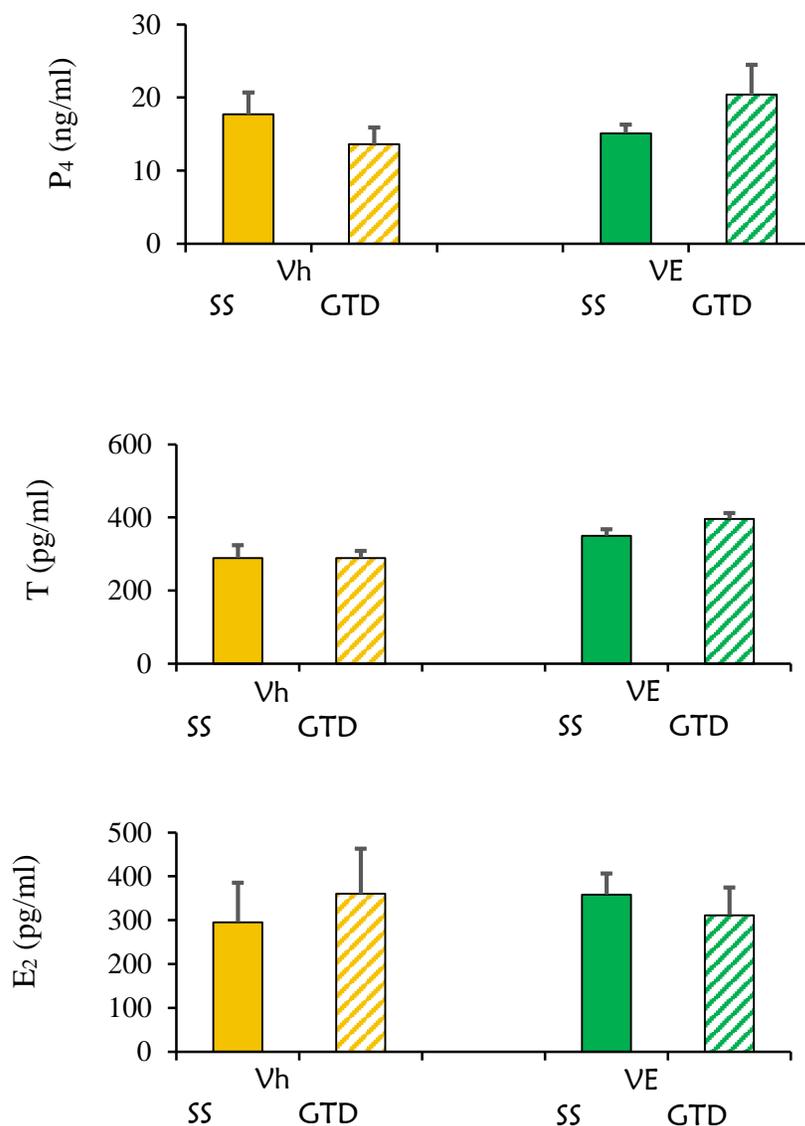
Grupo	n	PAO	No. Ovocitos liberados	
			Ovario Izquierdo	Ovario Derecho
Vh + SS	10	7/10	5.3 \pm 0.4	5.6 \pm 0.3
Vh + GTD	10	8/10	5.0 \pm 0.4	5.9 \pm 0.5
VE + SS	10	0/10	0	0
VE + GTD	12	8/12*	5.6 \pm 0.5♦	5.6 \pm 0.7♦

* $p < 0.05$ vs. su grupo control (prueba de J_i^2)

♦ $p < 0.05$ vs. su grupo control (Kruskal-Wallis)

Concentración sérica de hormonas esteroides

Tanto en el grupo de animales con Vh o VE, denervados con GTD, la concentración de P₄, T y E₂ fue similar a la de su respectivo grupo control inyectado con SS (Gráfica 8).



Gráfica 8. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de **progesterona (P₄)**, **testosterona (T)** y **estradiol (E₂)** de animales inyectados con una dosis de Vh o VE en el día 14 de vida y solución salina (SS) o guanetidina (GTD) del día 70 al 90 de vida. Los animales fueron sacrificados a los 90-94 días de vida cuando presentaron un estro vaginal precedido de un proestro.

Morfología ovárica

Los ovarios del grupo de ratas inyectadas con Vh presentaron folículos en diferentes etapas del desarrollo, algunos folículos presentaban atresia con picnosis nuclear en las células de la granulosa. En estos ovarios se observaron numerosos cuerpos lúteos (Figura 3A).

Los ovarios de las ratas inyectadas con VE fueron de menor tamaño que los animales inyectados con Vh, se observaron pocos folículos en desarrollo, algunos de los cuales mostraban picnosis en las células de la granulosa; no se observaron folículos secundarios, terciarios ni cuerpos lúteos (Figura 3B), pero si quistes foliculares (Figuras 3C y 3D).

En los ovarios de las ratas inyectadas con Vh y GTD, la morfología fue semejante a la de los ovarios de las ratas únicamente inyectadas con Vh (Figura 3 E, G, I). En los ovarios de las ratas inyectadas con VE y GTD se observaron folículos en diferentes etapas del desarrollo y cuerpos lúteos, lo cual confirma la ovulación (Figura 3 F, H, J).

En los grupos inyectados con VE y denervados (del día 7 al 27; del 14 al 34) no se observaron quistes, a diferencia de lo observado en los animales denervados del día 70 al 90 donde se aprecian algunas estructuras prequísticas (Figura 3J)

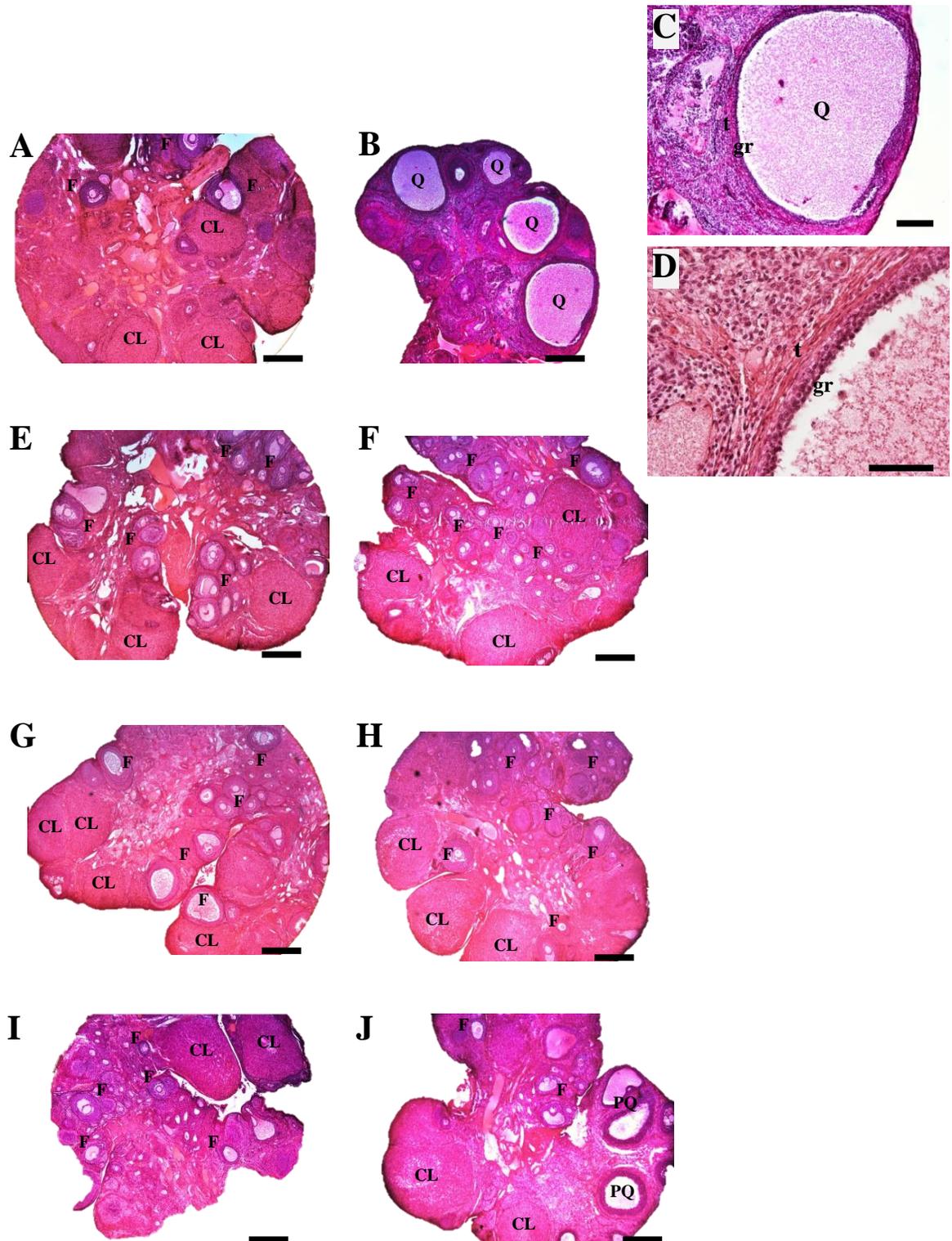


Figura 3. Cortes histológicos de ovario de animales inyectados a los 14 días de vida con vehículo (Vh) (3A) o valerato de estradiol (VE) (3B); amplificación de un quiste tomado de la figura 3B (3C); amplificación de una porción de la pared quística (3D); animales inyectados con GTD del día 7 al 27 de vida y en el día 14 de vida con Vh (3E) o VE (3F); animales inyectados con GTD del día 14 al 34 de vida y en el día 14 de vida con Vh (3G) o VE (3H); animales inyectados con GTD del día 70 al 90 de vida y en el día 14 de vida con Vh (3I) o VE (3J). Todos los animales fueron sacrificados aproximadamente a los 90-94 días de vida cuando presentaron un estro vaginal precedido de un proestro. F=folículos, CL=cuerpo lúteo, Q=quiste, PQ=prequiste, t=células de la teca, gr=células de la granulosa.

Expresión de TH en el ovario

En las ratas inyectadas con Vh, la inmunoreactividad a la TH se observó en la teca de los folículos y escasamente en las células de la granulosa (Figura 4A). En los animales inyectados con VE hay mayor expresión de la TH en los folículos quísticos y en la glándula intersticial (Figura 4B). En los ovarios de los animales inyectados con VE, la expresión de la TH fue mayor que en el grupo inyectado con Vh (Gráfica 9).

En los ovarios de los animales inyectados con GTD (antes, durante o después de la inyección con VE o Vh), la expresión de TH fue menor que la de su control (Figura 4F, G, H y 4B, C, D) Gráfica 9.

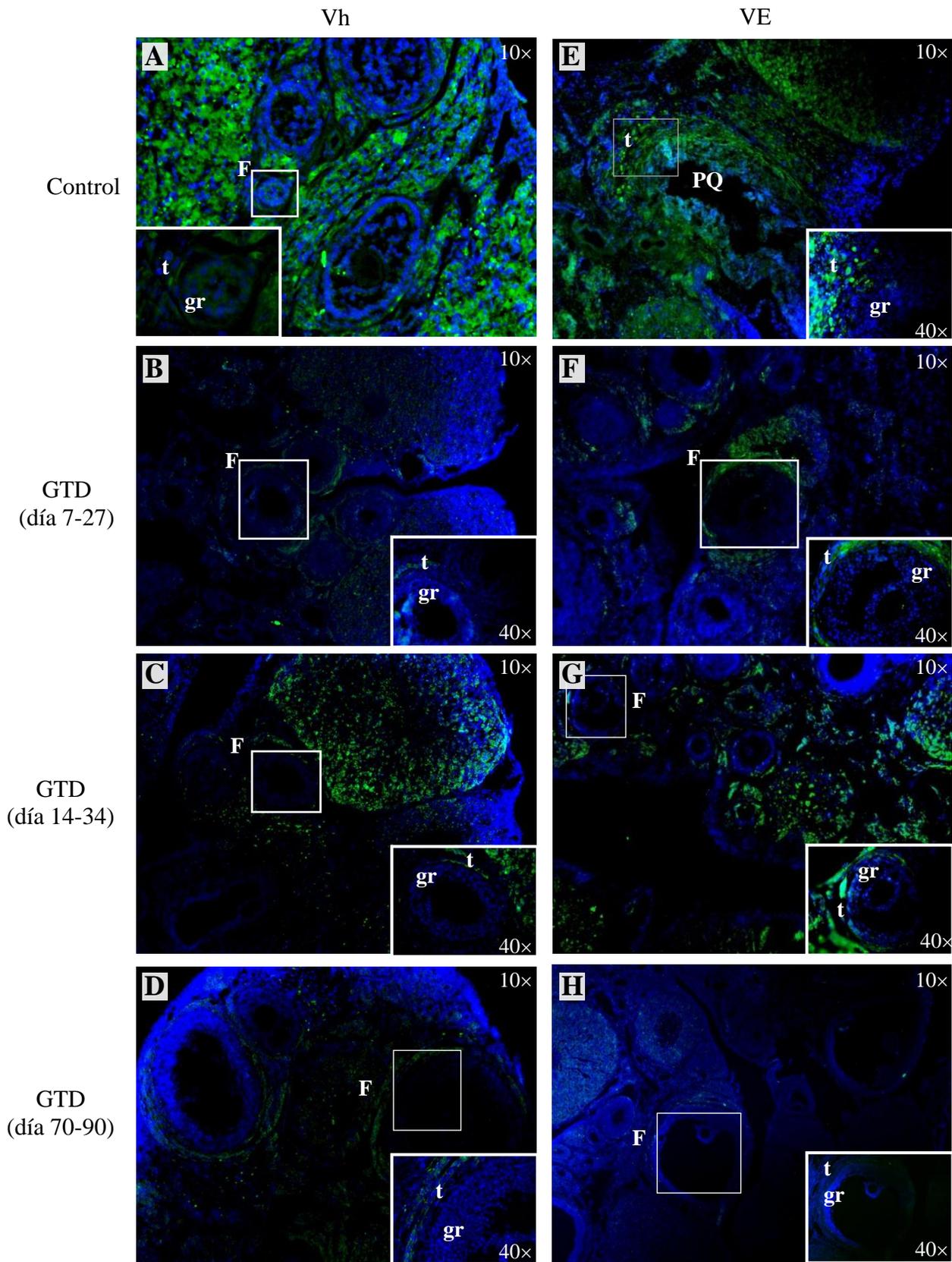
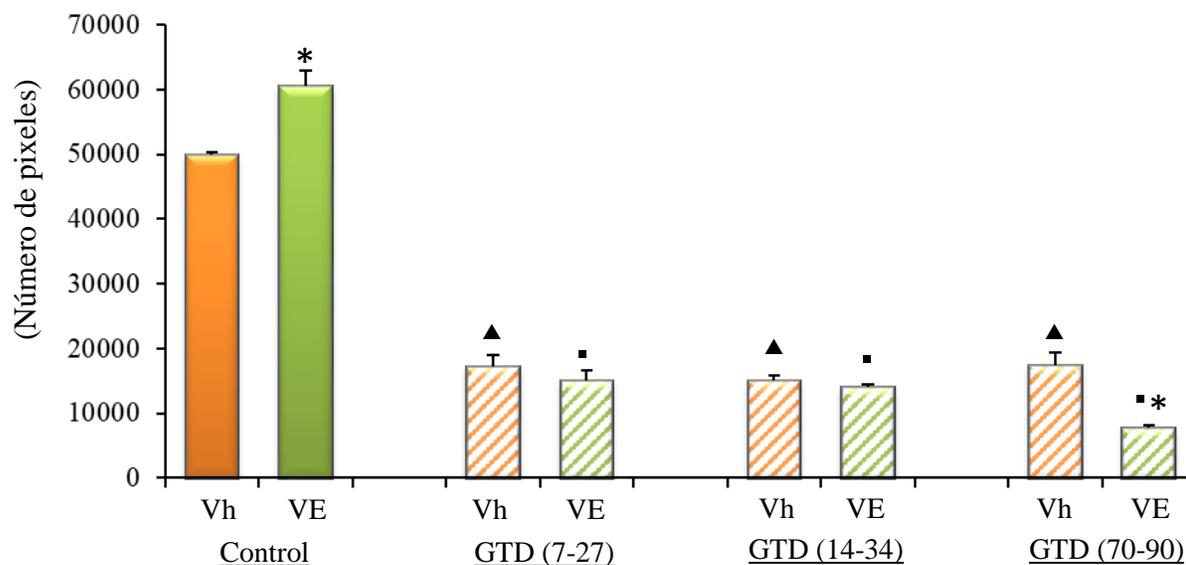


Figura 4. Distribución de la tiroxina hidroxilasa (TH) en secciones de ovario de animales inyectados a los 14 días de vida con vehículo (Vh) (4A) o valerato de estradiol (VE) (4E); animales con Vh e inyectados con GTD en los diferentes periodos de estudios (B, C, D); animales con VE e inyectados con GTD en los diferentes periodos de estudios (F, G, H). Las secciones de los ovarios fueron teñidas con anticuerpo anti-TH (color verde) y los núcleos teñidos con DAPI (color azul). Todos los animales fueron sacrificados a los 90-94 días de vida cuando presentaron un estro vaginal precedido de un proestro. F=folículos, PQ=prequiste, t=células de la teca, gr=células de la granulosa.



* $p < 0.05$ vs. su grupo de control inmediato; ▲ $p < 0,05$ vs. el grupo inyectado solo con Vh; ■ $p < 0.05$ vs. el grupo inyectado solo con VE (prueba "t" de Student).

Gráfica 9. Análisis de la distribución de la tiroxina hidroxilasa (TH) en los ovarios de ratas inyectadas a los 14 días de edad con vehículo (Vh) (barras naranjas) o con valerato de estradiol (VE) (barras verdes); animales con guanetidina (GTD) del día 7 al 27 de vida e inyectados con Vh o VE; inyectados con Vh o VE y con GTD del día 14 al 34 de vida; inyectados con Vh o VE y con GTD del día 70 al 90 de vida. Los animales fueron sacrificados a los 90-94 días de vida cuando presentaron un estro vaginal precedido de un proestro. El análisis de imágenes se realizó utilizando el sistema Nis-Elements BR 3.0.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que en la rata inyectada con VE, el desarrollo y la persistencia del SOPQ dependen de la integridad de la inervación catecolaminérgica periférica del ovario, ya que la eliminación de estas fibras con GTD, antes o después de la inyección del VE, evitó el desarrollo del SOPQ en la rata adulta, mientras que en las ratas que desarrollaron el síndrome, la denervación catecolaminérgica restableció la capacidad ovulatoria.

La GTD ha sido utilizada como una herramienta farmacológica para analizar la participación de la NA en las funciones reproductivas y se ha observado que sus efectos dependen de la especie en estudio (Riboni y col., 1998; Flores y col., 1990), la concentración utilizada (Angeletti y col., 1972; Johnson and Aloe., 1974; Manning y col., 1983), la edad en la que es administrada (Flores y col., 1990, Manning y col., 1983) y la duración del tratamiento (Angeletti y col., 1972; Riboni y col., 1998; Lara y col., 1990).

En el presente estudio la inyección de GTD no modificó la respuesta ovulatoria cuando los animales alcanzaron la etapa adulta, independientemente del momento en el que se inició el tratamiento. Esta respuesta no se modificó en los grupos de animales que además fueron inyectados con el Vh. En el presente estudio, la denervación catecolaminérgica periférica en animales prepúberes o adultos no modificó el número de ovocitos liberados por animal ovulante. La falta de diferencias en el número de ovocitos liberados observados en el presente estudio y los resultados de Flores y col (1990) pueden explicarse por el tiempo transcurrido entre el final del tratamiento con GTD y el momento de la autopsia. En el caso del estudio de Flores y col. (1990), la autopsia se realizó inmediatamente después de la última inyección de

GTD, mientras que en el presente estudio se realizó al menos 50 días después de finalizar el periodo de denervación. Según Evans y col (1979) en los animales con denervación catecolaminérgica por el tratamiento con GTD, a largo plazo se observa una reinervación parcial de algunos órganos. A partir de nuestros resultados, donde la expresión de TH fue más baja respecto a la de los animales control, confirmamos que se mantuvo la denervación catecolaminérgica. Evidencias que nos permiten sugerir que ante la falta de la innervación catecolaminérgica, hay otros sistemas que regulan la función ovárica y mantienen el equilibrio para que los animales ovulen de manera semejante a los del grupo control.

En la rata adulta la innervación simpática modula de manera estimulante la secreción de hormonas esteroides ováricas (Aguado y Ojeda 1984; Chávez y col., 1991; Morales y col., 1993; Flores y col., 2011), mientras que en la rata prepúber la modulación que ejerce la innervación depende del periodo transcurrido entre la cirugía y la autopsia (Morales-Ledesma y col., 2012). En nuestro estudio, la inyección de GTD, no modificó la secreción de hormonas esteroides cuando los animales alcanzaron la etapa adulta, independientemente del periodo de tratamiento, similar a lo descrito por Lara y col. (1990). Según Garrido y col., (2018) la innervación noradrenérgica periférica regula de manera estimulante la secreción de progesterona y estradiol, lo que se acompañan con el escaso desarrollo de los folículos y con un menor número de células de la granulosa.

En la rata hembra, las características endocrinas del SOPQ son inducidas por la inyección de una dosis de VE (Schulster y col., 1984; Brawer y col., 1978, 1986; Morales-Ledesma y col., 2010; Cruz y col., 2012), similar a lo observado en el presente estudio con la inyección de VE a ratas de 14 días de vida (formación de quistes ováricos, anovulación y concentraciones elevadas

de andrógenos y estrógenos), sin modificaciones en la concentración de P₄, tal y como ha sido observado en otros estudios (Farookhi y col., 1985; Rosa-e-Silva y col., 2003; Morales-Ledesma y col., 2010).

En ratas inyectadas con VE el desarrollo de los quistes foliculares se da en respuesta a la alteración en la homeostasis de las catecolaminas ováricas y por el incremento en la actividad de la TH (Lara y col., 1993). En el presente estudio, los quistes foliculares y la glándula intersticial del ovario de ratas inyectadas con VE, mostraron mayor expresión de la TH, lo que nos sugiere una mayor actividad noradrenérgica, tal y como ya ha sido reportado por Lara y col., (1990). El incremento en la TH se correlaciona con la mayor expresión del NGF, lo que sugiere que en el ovario de ratas con SOPQ hay un reordenamiento estructural de las fibras simpáticas del ovario (Manni y col, 2005).

Nuestros resultados nos sugieren que el SOPQ inducido por el VE, es el resultado de una mayor actividad de los nervios simpáticos, ya que su desarrollo se evita si se elimina ésta información antes o durante la inducción del síndrome o bien al término de la vida media del VE.

Los mecanismos que desencadenan la formación de los quistes foliculares en respuesta a la inyección de VE, inician 15 días después de la inyección del fármaco, con el incremento en la concentración de NGF en el ovario y el subsecuente aumento de la NA ovárica (Lara y col., 2000). Los resultados del presente estudio muestran que la eliminación de la información simpática antes de que se inicie éste mecanismo, evita los cambios ováricos característicos en el desarrollo del SOPQ. La presencia de prequistes ováricos en los animales con SOPQ,

inyectados con GTD después del día 70 de vida, nos sugiere que el tiempo transcurrido entre la denervación y la autopsia no fue suficiente para restablecer la estructura del ovario. Barria y col. (1993) mostraron que en animales adultos con SOPQ, 10 días después de realizar la sección del NOS, disminuye la actividad noradrenérgica y en los ovarios se restablece la morfología y no muestran estructuras quísticas.

La formación de quistes ováricos, el hiperandrogenismo y la anovulación se establecen después de 56 días de inyectado el VE, por lo que se dice que ya se desarrolló el SOPQ (Brawer y col., 1986). En nuestro estudio, la denervación con GTD iniciada después de establecido el SOPQ, restableció la ovulación en el 66% de los animales, respuesta que puede ser el resultado de la interrupción del elevado tono catecolaminérgico que llega al ovario. Una respuesta similar se observa en animales con SOPQ por la inyección de VE, a los cuales se les realizó la sección bilateral del NOS (Morales-Ledesma y col., 2010).

Según Acuña y col., (2009), la NA estimula la formación de quistes y prequistes ováricos en el modelo de rata senescente. En éste modelo, el bloqueo de la actividad simpática, con la inyección crónica de propranolol, antagonista β -adrenérgico, restablece la ovulación y en la histología del ovario ya no se observan quistes ni prequistes (Fernandois y col., 2012).

Considerando que en la práctica clínica el 72% de las mujeres que son diagnosticadas con SOPQ presentan problemas de infertilidad, sugerimos que la disminución de la actividad nerviosa simpática podría ser útil como una alternativa para estimular la ovulación en estas pacientes. Existe evidencia de que algunas mujeres con SOPQ, logran ovular en respuesta a la estimulación de las fibras simpáticas por medio de técnicas de electro acupuntura de baja

frecuencia (Stener-Victorin y col., 2000; Stener-Victorin y col., 2013) mientras que en la rata inyectada con VE, el tratamiento con electro acupuntura disminuye la concentración de NGF ovárico (Stener-Victorin y col., 2000b; Stener-Victorin y col., 2008). Las evidencias anteriores y los resultados del presente estudio sustentan que la inervación noradrenérgica regula de manera estimulante el desarrollo del SOPQ. Dado que en la práctica médica, la GTD ha sido utilizada como un medicamento para reducir la presión arterial en pacientes y que algunas mujeres con el síndrome presentan elevación en la frecuencia cardíaca (Ehrmann y col., 2006; Tekin y col., 2008), el tratamiento con GTD podría mejorar esta condición, sin embargo se requiere de más estudios que apoyen esta posibilidad.

En la mujer el hiperandrogenismo es la característica más importante en el diagnóstico del SOPQ (Franks 1995; Escobar-Morreale y col., 2001; Goodarzi y col., 2011; Lizneva y col., 2016) y es explicado como resultado de la mayor actividad del compartimento teco-intersticial del ovario donde pudiera estar modificada la actividad del complejo enzimático P450c17 (Yen y col., 2001). En el presente estudio, la denervación de las fibras catecolaminérgicas periféricas realizada antes, durante o 15 días después de la inyección de VE, evitó el hiperandrogenismo, lo que nos permite sugerir que la inervación catecolaminérgica que llega al ovario regula de manera estimulante la secreción de testosterona. Dicha regulación podría ser por la unión de la NA a los receptores β -adrenérgicos, como se ha mostrado en la rata con hiperactividad noradrenérgica, inducida por la administración crónica de isoproterenol, donde el incremento en los andrógenos es revertido por el bloqueo de los receptores β adrenérgicos (Luna y col., 2012). La persistencia de altas concentraciones de testosterona en los animales que desarrollaron el SOPQ y denervados del día 70 al 90 pudiera deberse a la persistencia de estructuras prequísticas.

Si bien la recuperación de las funciones ováricas en los animales denervados lo hemos atribuido a la disminución del contenido de NA en el ovario, no podemos descartar que esta respuesta dependa, al menos en parte, de la participación de péptidos que transcurren por las fibras simpáticas. A pesar de que numerosas evidencias muestran que la GTD solo actúa sobre neuronas catecolaminérgicas (Burnstock et al., 1971; Eranko and Eranko et al., 1971; Jensen-Holm and Juul, 1971; Maxwell., 1982; Manning et al., 1983), otros estudios refieren que podría modificar la actividad de las neuronas VIPérgicas y que esta regulación parecería estar en función del tejido analizado (Benarroch., 1994; Kunkova y col., 2003).

Según Parra y col., (2007) en ovarios de ratas inyectadas con VE, incrementa la secreción ovárica de NA y VIP, y bajo condiciones *in vitro* la sobre-estimulación VIPérgica incrementa la secreción de andrógenos y estrógenos en el medio de cultivo. Lo que sugiere que el VIP podría ser otras de las señales nerviosas que participan en el desarrollo del SOPQ. En la rata sin SOPQ, la denervación con GTD resulta en la mayor expresión de neuronas VIPérgicas en el GCMS, lo que no ocurre en el ganglio cervical superior (Benarroch y col., 1994). Dado que en el GCMS se localizan los somas de las neuronas simpáticas que inervan el ovario (Dissen y Ojeda, 1999), no podemos descartar que ante la falta de la información neural de naturaleza catecolaminérgica se modifique la expresión de las neuronas VIPérgicas que arriban al ovario.

En el presente estudio, la respuesta esteroideogénica del ovario en ratas inyectadas con VE y denervadas con GTD antes del desarrollo del SOPQ, varía en función de la edad en la que se realizó la denervación. Mientras que en la rata que desarrolló el SOPQ, la inervación catecolaminérgica parece no regular la secreción de progesterona ni de estradiol, resultados semejantes a los reportados por el grupo de Luna (2012) quienes inducen en la rata adulta el

SOPQ con la inyección crónica con isoproterenol y observan que el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos por la inyección de propranolol, no modificó la concentración de estas hormonas, en tanto que en la rata senescente, la inervación noradrenérgica no modifica la secreción de progesterona y la de estradiol es regulada de manera inhibitoria a través de los receptores β -adrenérgicos (Fernandois y col., 2012).

Rosa-e-Silva y col., (2003) propusieron que la NA es el factor primordial en el desarrollo del SOPQ inducido con VE, ya que la sección bilateral de los NOS disminuyó la secreción ovárica de NA, la concentración sérica de progesterona y estradiol. Sin embargo, Morales y col., (2010) mostraron que la sección unilateral del NOS en ratas con SOPQ, redujo la concentración de NA sólo en el ovario denervado, pero fue el ovario inervado el que ovuló normalmente, lo que nos sugiere que la concentración de NA no es el único factor que participa en el desarrollo del síndrome. Además, Linares y col. (2013) mostraron que la sección uni o bilateral de los nervios vago en ratas con SOPQ inducido por el VE, resulta en la ovulación de ambos ovarios. Este resultado podría explicarse por la localización del soma de las neuronas que origina al NOS en el ganglio celíaco y ganglio mesentérico superior, lo que nos sugiere que esta regulación está dada a nivel del ganglio celiaco (Linares y col., 2017).

Dado que la GTD no atraviesa la barrera hematoencefalica (Johnson., 1984) y solo produce la denervación catecolaminérgica periférica, en el presente estudio no podemos descartar que se haya modificado la actividad noradrenérgica en el sistema nervioso central, lo que resulte en el desarrollo del SOPQ, como ha sido mostrado en estudios donde el síndrome es inducido por la exposición crónica a estrés por frío, donde incrementa la actividad NAérgica del ovario y no se modifica la secreción de corticoides. En este modelo del síndrome, la lesión del locus

coeruleus, donde predominan neuronas noradrenérgicas, revierte el SOPQ (Bernuci y col., 2008).

Tomados en conjunto, los resultados obtenidos en este estudio muestran que la inervación catecolaminérgica tiene una participación fundamental en la patología del SOPQ y que la reducción de la hiperactividad noradrenérgica podría prevenir el desarrollo del síndrome o bien, una vez desarrollado éste, la disminución de la actividad catecolaminérgica restablecería la función reproductiva.

CONCLUSIONES

- ❖ En la rata hembra prepúber, la denervación catecolaminérgica periférica por el tratamiento crónico con GTD, no modifica la ovulación ni la secreción de hormonas esteroides cuando la rata alcanza la etapa adulta.
- ❖ En la rata hembra, la inervación catecolaminérgica regula de manera estimulante el desarrollo del SOPQ.
- ❖ La denervación catecolaminérgica periférica iniciada antes de la inyección de VE, evita el desarrollo del SOPQ cuando la rata alcanza la etapa adulta.
- ❖ La denervación catecolaminérgica periférica realizada al mismo tiempo o 15 días después de la inyección del VE, evita el desarrollo del SOPQ en la rata adulta.
- ❖ En ratas adultas con SOPQ, la denervación catecolaminérgica periférica restableció la ovulación.
- ❖ La inervación catecolaminérgica del ovario tiene un papel estimulante en la patología del SOPQ, el presente estudio es una evidencia de que la disminución de la actividad catecolaminérgica podría ser útil en la terapia clínica para inducir la ovulación en las pacientes con el síndrome, sin embargo son necesarios más estudios que apoyen lo anterior.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Acuña E, Fornes R, Fernandois D, Garrido MP, Greiner M, Lara HE, Paredes AH.** (2009) Increases in norepinephrine release and ovarian cyst formation during ageing in the rat. *Reprod Biol Endocrinol.* 16;7:64.
2. **Aguado LI, Ojeda SR.** (1984) Prepubertal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. Role of noradrenergic innervation. *Endocrinology.* 114:1845-1853.
3. **Allen LG, Wilson FJ y Macdonald GJ** (1989) *Neuropeptide Y-containing nerves in rat gonads: sex difference and development*, *Biology and reproduction*, 40:371-378
4. **Almahbobi G, Anderiesz C, Hitchinson P, et al.** (1996) *Functional integrity of granulosa cells from polycystic ovaries.* *Clin. Endocrinol (Oxf)* 44: 571.
5. **Anesetti G, Lombide P, Chávez-Genaro R.** (2009) *Prepuberal estrogen exposure modifies neurotrophin receptor expression in celiac neurons and alters ovarian innervation.* *Anatomic Neuroscience: Basic and clinical.* 145: 35-43.
6. **Angeletti PU, Levi-Montalcini R, Caramia F.** (1972) Structural and ultrastructural changes in developing sympathetic ganglia induced by guanethidine. *Brain Res.* 43:515-525.
7. **Araya V, Jara P, Lara HE.** (2004) *Cerebro, estrés y ovario poliquístico. Participación de la inervación simpática en el desarrollo de ovario poliquístico.* *Endocrinol Nutr.* 51(8):473-477.

8. **Arrollo A, Laughlin GA, Morales AJ, Yen SCC.** (1997) *Inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome: Influence of adiposity.* J Clin Endocrinol Metab 82:3728, 1997.
9. **Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HE, Futterweit W y Col.** (2006) *Criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an androgen excess society guideline.* J Clin Endocrinol Metab, 91:4237-4245.
10. **Azziz, R. et al.** (2009) The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. Fertility and Sterility, 91;2:456-488
11. **Baldissera SF, Motta LD, Almeida MC, Antunes-Rodrigues J.** (1991) *Proposal of an experimental model for the study of polycystic ovaries.* Braz J Med Biol Res, 24:747-751
12. **Barraclough Ch A, Gorski RA** (1961) *Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat,* Hypothalamus and sterility, 68:68-79
13. **Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE.** (1993) *Ovarian steroidal response to gonadotropins and β -adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation.* Endocrinology 133: 2696-2703.
14. **Beloosesky R, Gold R, Almog B, Sasson R, Dantes A, Land-Bracha A, Hirsh L, Itskovitz-Eldor J, Lessing JB, Homburg R, Amsterdam A.** (2004) *Induction of*

- polycystic ovary by testosterone in immature female rats: Modulation of apoptosis and attenuation of glucose/insulin ratio. Int J Mol Med, 14(2):207-15.*
15. **Benarroch EE, Zollman PJ, Smithson IL, Schmelzer JD, Low PA.** (1994) *Different reinnervation patterns in the celiac/mesenteric and superior cervical ganglia following guanethidine sympathectomy in adult rat. Brain Res.644:322–6.*
 16. **Bernuci MP, Szawka RE, Helena CV, Leite CM, Lara HE, Anselmo Franci JA.** (2008) Locus Coeruleus mediates cold stress-induced polycystic ovary in rats. *Endocrinology. 149:2907-2916.*
 17. **Blakemore J, Naftolin F.** (2016) *Aromatase: Contributions to Physiology and Disease in Women and Men. Physiology (Bethesda), 31(4):258-69*
 18. **Brawer JR, Muñoz M, Farookhi R.** (1986) *Development of the polycystic ovarian condition (POC) in the Estradiol Valerate-treated rat. Biology of Reproduction 35: 647-655.*
 19. **Brawer JR, Naftolin F, Martin J, Sonnenschein C.** (1978) *Effects of a single Injection of Estradiol Valerate on the Hypothalamic Arcuate Nucleus and on Reproductive Function in the Female Rat. Endocrinology 107: 274 - 279.*
 20. **Burden, H.W., and Lawrence, I. E. J.** (1978). *Experimental studies on the acetylcholinesterase-positive nerves in the ovary of the rat. Anat. Rec. 190, 233–241.*

21. **Burnstock G, Evans B, Gannon BJ, Heath JW, James V.** (1971) *A new method of destroying adrenergic nerves in adult animals using guanethidine.* Br J Pharmac 43:295–301
22. **Casais M, Delgado SM, Vallcaneras S, Sosa Z y Rastrilla AM** (2007) *Nitric oxide in prepubertal rat ovary contribution of the ganglionic nitric oxide synthasa system via superior ovarian nerve.* Neuroendocrinology letters, Vol 28, No. 1, (February), pp 39-44, ISSN 0022-0795.
23. **Chávez R y Domínguez R** (1994) *Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of compensatory ovarian hypertrophy: the effects of its section performed on each day of the oestrous cycle.* Journal of endocrinology 140:197-201
24. **Chávez R, Carrizosa L, Domínguez R.** (1991) *Effects of superior ovarian nerve on spontaneous and induced ovulation in adult rats.* Medical Science Research. 19: 41-48.
25. **Chávez-Genaro R, Lombide P, Domínguez R, Rosas P, Vázquez-Cuevas F.** (2007) *Sympathetic pharmacological denervation in ageing rats: effects on ovulatory response and follicular population.* Reprod Fertil Dev. 19(8):954-60
26. **Corbin CJ, Trant JM, Walters KW, Conley AJ.** (1999) *Changes in testosterone metabolism associated with the evolution of placental and gonadal isozymes of porcine aromatase cytochrome P450,* Endocrinology 140:5202–10

27. **Cruz G, Barra R, González D, Sotomayor-Zárate R, Lara HE.** (2012) Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats. *Fertil Steril.* 98(5):1283-90
28. **Dees WL, Hiney CE, Schulte TD, Mayerhofer A, Danilchik M, Dissen GA, Ojeda SR.** (1995) *The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptors.* *Endocrinology.* 136:5760-5768
29. **Dissen GA y Ojeda SR.** (1999) *Ovarian Innervation.* *Encyclopedia of Reproduction.* 3: 583-589.
30. **Dissen GA, Garcia-Rudaz C y Ojeda SR** (2009) *Role of neurotrophic factors in early ovarian development.* *Semin Reprod Med,* 27(1):24-31
31. **Dissen GA, Hill DF, Costa ME, Dees WL, Lara HE, Ojeda SR.** (1996) *A role for trkA nerve growth factor receptors in mammalian ovulation.* *Endocrinology.* 137: 198-209.
32. **Dissen GA, Paredes A, Romero C, Dees WL, Ojeda SR.:** Neural and Neurotrophic Control of ovarian development. In Leung P.C.K., Adashi e.y. (eds) *The ovary,* chapter 1, 2nd edition, pp 3-23, Elsevier Academic Press, San Diego (2004)
33. **Dorfman M, Arancibia S. Fiedler JL, Lara HE.** (2003) *Chronic intermittent cold stress activates ovarian sympathetic nerves and modifies ovarian follicular development in the rat.* *Biology of Reproduction.* 68:2038-2043.

34. **Dorfman M, Ramírez VD, Stener-Victorin E y Lara HE.** (2009) *Chronic Intermittent cold stress in rats induces selective ovarian insulin resistance.* Biology of Reproduction. 89:264 – 271.
35. **Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL.** (1995) *Polycystic ovary syndrome as a form of functional ovarian hyperandrogenism due to dysregulation of androgen secretion.* Endocr. Rev. 16: 322.
36. **Ehrmann DA, Liljenquist DR, Kasza K, Azziz R, Legro RS y Ghazzi MN** (2006) *Prevalence and Predictors of the Metabolic Syndrome in Women with Polycystic Ovary Syndrome,* The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 91(1):48–53
37. **Eränkö L, Eränkö O.** (1971) *Effect of guanethidine on nerve cells and small intensely fluorescent cells in sympathetic ganglia of newborn and adult rats.* Acta Pharmacol Toxicol. 30:403–16.
38. **Erickson GF, Hsueh AJW, Quigley ME, et al.** (1979) *Functional studies of aromatase activity in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries.* J Clin Endocrinol Metab. 49: 514.
39. **Escobar-Morreale HF, Asunción M, Calvo RM, Sancho J, San Millán JL.** (2001) *Receiver operating characteristic analysis of the performance of basal serum hormone profiles for the diagnosis of polycystic ovary syndrome in epidemiological studies.* Eur J Endocrinol, 145:619-624.

40. **Evans BK, Heath JW y Burnstock G.** (1979) *Reinnervation following guanethidine-induced sympathectomy of adult rats*, Journal of Neurocytology, 8:381-400.
41. **Farookhi R, Hemmings R, Brawer JR,** (1985) *Unilateral ovariectomy restores ovulatory cyclicity in rats with a polycystic ovarian condition*. Biol Reprod 32:530-40.
42. **Feng Y, Johanson J, Shao R., Manneras L, Fernandez-Rodriguez J, Billing H y Stener-Victorin E.** (2009) *Hypotalamic neuroendocrine functions in rats with dyhidrotestosterone-induced*
43. **Fernandois D, Lara HE, Paredes AH.** (2012) *Blocking of β -adrenergic receptors during the subfertile period inhibits spontaneous ovarian cyst formation in rats*. Horm Metab Res. 44(9):682-7.
44. **Flores A, Ayala ME. Domínguez R** (1990) *Does noradrenergic peripheral innervation have a different role in the regulation ovulation in the pubertal and the adult rat?* Med. Sci. Res. 70;18:817-818
45. **Flores A, Loyo R, Domínguez R.** (1998) *Peripheral sympathetic denervation induced by guanethidine in newborn rats results in the advancement of ovulation but does not modify oestrogen positive feedback effects*, Medical Science Research, 26:259-261
46. **Flores A, Velasco J, Gallegos AI, Mendoza FD, Everardo PM, 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
47. **Forneris M, Aguado L** (2002) *Neonatal superior ovarian nerve transection disturbs the cyclic activity of the female rats*, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 82:75–82
 48. **Franks S.** (1995) *Polycystic ovary syndrome*. *N Engl. J Med.* 333: 1435.
 49. **Freeman ME.** (1994) *The Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat*. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) *The Physiology of Reproduction*. 2nd edition. Editorial Raven Press. New York. Vol. 2 Cap. 46 pp. 615 – 620.
 50. **Garraza MH, Aguado LI, De Bortoli MA** (2004) *In vitro effect of neuropeptides on ovary or celiac ganglion affects the release of progesterone from ovaries in the rat*, *Med Sci Monit*, 10(12):440-446.
 51. **Garrido MP, Fernandois D, Venegas M, Paredes AH.** (2018) *Effects of sympathectomy on ovarian follicular development and steroid secretion*. *Reproduction*. 155(2):173-181.
 52. **Gerendai I, Banczerowski P, and Halász B** (2005) *Functional Significance of the Innervation of the Gonads* **Endocrine**, vol. 28, no. 3, 309–318,

53. **Gerendai I, Toth IE, Boldogkoi Z, Medveczky I, Halasz B** (2000) *CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function*, Journal of the Autonomic Nervous System 80:40-45
54. **Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, Azziz R.** (2011) *Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis*. Nat Rev Endocrinol. 7(4):219-31.
55. **Guyton AC.** (2001) *Tratado de fisiología médica*. Editorial Interamericana-McGraw-Hill, México. pp. 1115-1132.
56. **Haisenleder DJ, Dalkin AC, Marshall JC.** (1994) *Regulation of gonadotropin gene expression*. In: Knobil E, Neill J, eds. The Physiology of Reproduction. 2nd ed. New York: Raven Press; 1793
57. **Heider U, Pedal I, Spanel-Borowski K.** (2001) Increase in nerve fibers and loss of mast cells in polycystic and postmenopausal ovaries. Fertility and Sterility. 75(6):1141-1147
58. **Hemmings R, Farookhi R, Brawer JR.** (1983) *Pituitary and ovarian responses to luteinizing hormone-releasing hormone in a rat with polycystic ovaries*. Biol Reprod. 29:239-248.
59. **Herbison AE.** Physiology of the Adult gonadotropin-releasing hormone neuronal network. In: Neill JD, ed. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier; 2015: 398-467.

60. **Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Azhar S (2010)** *Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones*. Nutr Metab (Lond) 7:47. DOI: 10.1186/1743-7075-7-47.
61. **Jensen-Holm J y Juul P. (1970)** *The effects of guanethidine, pre- and postganglionic nerve division on the rat superior cervical ganglion: cholinesterases and protein*. Acta pharmacol et toxicol, 28: 270-282.
62. **Jensen-Holm J y Juul P. (1970)** *The effects of guanethidine, pre- and postganglionic nerve division on the rat superior cervical ganglion: cholinesterases and catecholamines (histochemistry) and histology*. Acta pharmacol et toxicol 28, 283-298.
63. **Johnson Jr EM y Manning PT (1984)** *Guanethidine-induced destruction of sympathetic neurons*. Int Rev Neurobiol 25:1
64. **Johnson, EM y Aloe L. (1974)** *Suppression of the in vitro and in vivo cytotoxic effects of guanethidine in sympathetic neurons by nerve growth factor*. Brain Res. 81:519-532.
65. **Kafali H, Iriadam M, Ozardali I, Demir N. (2004)** *Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease*. Arch Med Res, 35:103–108.
66. **Katzung BG. (2010)** *Farmacología básica y clínica*. 11ª edición, México. McGraw-Hill

67. **Keettel WC, Bradbury JT, Stoddard FJ.** (1957) *Observations on the polycystic ovary syndrome*, *Obstetrical & Gynecological Survey*, 12(5):721-723
68. **Klein CM, Burden HW.** (1988) *Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary*. *Neurosci. Lett.* 85: 217-222.
69. **Kuncová J, Slavíková J, Reischig J.** (2003) *Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat heart: effect of guanethidine and capsaicin*. *Ann Anat*, 185:153–61.
70. **Lambert HH.** (1975) *Continuous red light induces persistent estrus without retinal degeneration in the albino rat*. *Endocrinology*, 97:208–210.
71. **Lara HE, Dissen GA, Leyton V, et al.** (2000) *An Increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid induced polycystic ovary in the rat*. *Endocrinology*. 141:1059-1072.
72. **Lara HE, Ferruz J, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR.** (1993) *Activation of Ovarian Sympathetic Nerves in Polycystic Ovary Syndrome*. *Endocrinology* 133: 2690 - 2695.
73. **Lara HE, Mcdonald JK, Ahmed CE Y Ojeda SR** (1990) *Guanethidine-Mediated Destruction of Ovarian Sympathetic Nerves Disrupts Ovarian Development and Function in Rats*, *Endocrinology* 127:5:2199-2209

74. **Lawrence IE, Burden HW.** (1980) *The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary.* The Anatomical Record. 196: 51-59.
75. **Levine JE.** Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. . In: Neill JD, ed. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction.* Amsterdam, the Netherlands: Elsevier; 2015: 1199-1257.
76. **Linares R, Hernández D, Morán C, et al.** (2013) *Unilateral or bilateral vagotomy induces ovulation in both ovaries of rats with polycystic ovarian syndrome.* Reproductive Biology and Endocrinology, 11(68):1-9.
77. **Linares R, Rosas G, Vieyra E, Ramírez DA, Guerrero YA, Morán C, Domínguez R y Morales-Ledesma L.** (2017) *In rats with the polycystic ovary syndrome, the monoaminergic activity in the celiac superior mesenteric ganglion depends on the vagal innervation.* Australasian Medical Journal 10(4):304-313
78. **Lizneva D, Suturina L, Walker W, Brakta S, Gavrilova-Jordan L, Azziz R.** (2016) *Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome.* Fertil Steril, 106(1):6-15.
79. **Luna SL, Neuman S, Aguilera J, Brown DI, Lara HE.** (2012) *In vivo β -adrenergic blockade by propranolol prevents isoproterenol-induced polycystic ovary in adult rats.* Horm Metab Res. 44(9):676-81.
80. **Malamed S, Gibney JA, Ojeda SR** (1992) *Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat,* Cell and Tissue Research. 270:87-93.

81. **Manneras L, Cajander S, Holmang A, Seleskovic Z, Lystig T, Lonn M, Stener-Victorin E.** (2007) *A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome.* Endocrinology, 148:3781–3791.
82. **Manni L, Holmäng A, Lundeberg T, Aloe L, Stener-Victorin E.** (2005) Ovarian expression of alpha (1)- and beta (2)-adrenoceptors and p75 neurotrophin receptors in rats with steroid-induced polycystic ovaries. Auton Neurosci. 31;118(1-2):79-87.
83. **Manning PT, Powers CW, Schmidt RE y Johnson EM** (1983) *Guanethidine-induced destruction of peripheral sympathetic neurons occurs by an immune-mediated mechanism.* The journal of Neuroscience. 3:4:714-724.
84. **Manning PT, Russell JH y Johnson EM** (1982) *Immunosuppressive agents prevent guanethidine-induced destruction of rat sympathetic neurons.* Brain Res. 241:131-143.
85. **Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR.** (1997) A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. Endocrinology. 138(8):3320-9.
86. **McCarthy GF, Brawer JR.** (1990) *Induction of Stein-Leventhal-like polycystic ovaries (PCO) in the rat: a new model for cystic ovarian disease.* Anat Rec 228:137–144.

87. **Mirabolghasemi G y Kamyab Z** (2017) *Changes of the uterine tissue in rats with polycystic ovarysyndrome induced by estradiol valerate*. International Journal of Fertility and Sterility. 11:1:47-54
88. **Morales L, Chávez R y Domínguez R** (1993) *Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve*. Medical Science Research 21 15–17.
89. **Morales-Ledesma L, Linares R, Rosas G, Morán 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.
90. **Morales-Ledesma L, Vieyra E, Ramírez D, et al.** (2012) Effects on steroid hormones secretion resulting from the acute stimulation of sectioning the superior ovarian nerve to pre-puberal rats. Reproductive Biology and Endocrinology. 10(88):1-7.
91. **Ojeda SR, Urbanski HF.** (1994) *Puberty in the Rat*. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) The Physiology of Reproduction. 2nd edition. Raven Press, Ltd. New York. Vol. 2 Cap. 40 pp. 363 - 409.
92. **Ota H, Fukushima M y Maki M** (1983) *Endocrinological and histological aspects of the process of polycystic ovary formation in the rat treated with testosterone propionate*, Tohoku J. exp. Med, 140:121-131

93. **Paredes A, Gálvez A, Leyton V, Aravena G, Fiedler JL, Bustamante D, Lara HE** (1998) *Stress promotes development of ovarian cystic in rats*. *Endocrine*. 8(3):309-315
94. **Parra C, Fiedler JL, Luna SL, Greiner M, Padmanabhan V, Lara HE**. (2007) Participation of vasoactive intestinal polypeptide in ovarian steroids production during the rat estrous cycle and in the development of estradiol valerate-induced polycystic ovary. *Society for Reproduction and Fertility*. 133:147–154.
95. **Peters H, Byskov AG, Himelstein-Braw R**. (1975) *Follicular growth in fetal and pubertal ovaries of human and other primates*. En Ross GT, Lipsett MB. (1978) (eds.) *Gynecological Endocrinology* Saunders, London pp. 469-485.
96. **Pfeiffer CA** (1936) *Sexual differences of the hypophyses and their determination by the gonads*, *The American Journal of Anatomy*, 58(1):195-225
97. **Pinilla L, Trimino E, Garnelo P, Bellido C, Aguilar R, Gaytan F, Aguilar E**. (1993) *Changes in pituitary secretion during the early postnatal period and anovulatory syndrome induced by neonatal oestrogen or androgen in rats*. *J Reprod Fertil* 97:13–20.
98. **Riboni L, Escamilla C, Chavira R, Domínguez R**, (1998). Effects of peripheral sympathetic denervation induced by guanethidine administration, on the mechanisms regulating puberty in the female guinea pig. *Journal of Endocrinology* 156:91–98.

99. **Ricu MA, Ramirez VD, Paredes AH, Lara HE.** (2012) Evidence for a celiac ganglion-ovarian kisspeptin neural network in the rat: intraovarian anti-kisspeptin delays vaginal opening and alters estrous cyclicity. *Endocrinology*. 153(10):4966-77.
100. **Robledo P** (2008) *Las anfetaminas*, Trastornos Adictivos, 10(3):166-74
101. **Rosa-E-Silva A, Guimares MA, Padmanabhan V y Lara HE** (2003) *Prepubertad administration of estradiol valerate disrupts cyclicity and leads to cystic ovarian morphology during adult life in the rat: Role of Sympathetic innervation.* *Endocrinology* 144, 4289-4297
102. **Rosales AM.** (1998) *Atresia Folicular.* En *Biología de la Reproducción*, Ed. Javier Velázquez Moctezuma. UAM-I 223:261.
103. **Ross MH, Gordon IK, Wojciech P.** (2005) *Histología, texto y atlas a color con biología molecular y celular.*
104. **Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group.** *Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome.* *Fertil Steril* 2004; 81:19–25.
105. **Salvetti NR1, Gimeno EJ, Lorente JA, Ortega HH.** (2004) *Expression of cytoskeletal proteins in the follicular wall of induced ovarian cysts.* *Cells Tissues Organs*. 178(2):117-25.

106. **Schulster A, Farookhi R, Brawer JR.** (1984) Polycystic ovarian condition in estradiol valerate-treated rats: spontaneous changes in characteristic endocrine features. *Biol Reprod.* 31(3):587-93.
107. **Silverthorn D.U.** (2008) *Fisiología Humana, un enfoque integrado*, 4ª edición, Editorial Médica-Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
108. **Snider WD.** (1994) *Functions of the neurotrophins during nervous system development: What the knockouts are teaching us.* *Cell*, 77:627–638
109. **Sotomayor-Zárate R, Tiszavari M, Cruz G, Lara HE.** (2011) *Neonatal exposure to single doses of estradiol or testosterone programs ovarian follicular development-modified hypothalamic neurotransmitters and causes polycystic ovary during adulthood in the rat.* *Fertil Steril*, 96(6):1490-1496
110. **Sotomayor-Zarate, Dorfman M, Paredes A, y Lara HE.** (2008) *Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat.* *Biology of Reproduction.* 78: 673-680.
111. **Stener-Victorin E, Jedel E, Mannerås L.** (2008) *Acupuncture in polycystic ovary syndrome: current experimental and clinical evidence.* *J Neuroendocrinol*, 20(3):290–298.
112. **Stener-Victorin E, Lundeberg T, Waldenström U, Manni L, Aloe L, Gunnarsson S, and Janson PO** (2000b) *Effects of Electro-Acupuncture on Nerve Growth Factor and Ovarian Morphology in Rats with Experimentally Induced Polycystic Ovaries*, *Biology of Reproduction* 63:1497–1503.

113. **Stener-Victorin E, Waldenström U, Tägnfors U, Lundeberg T, Lindstedt G and Janson PO.** (2000) Effects of electro-acupuncture on anovulation in women with polycystic ovary syndrome. *Acta Obstet Gynecol*, 79:180–188.
114. **Stener-Victorin E.** (2013) *Hypothetical physiological and molecular basis for the effect of acupuncture in the treatment of polycystic ovary syndrome*, *Molecular and Cellular Endocrinology* 373:83–90
115. **Strauss J R-III y Hsueh AJW** (2000) *Ovarian hormone synthesis*. In: *Endocrinology*, Fourth Edition edited by LJ De Groot and JL Jameson vol 3, Chap. 148, pp 2043-2052. WB Saunders Co. ISBN 0-7216-7840-8 (set). Philadelphia, Pennsylvania.
116. **Tekin G, Tekin A, Kılıçarslan EB, Haydardedeoğlu B, Katircibaşı T, Koçum T, Erol T, Çölkesen Y, Sezgin AT, Müderrisoğlu H** (2008) *Altered autonomic neural control of the cardiovascular system in patients with polycystic ovary syndrome*, *International Journal of Cardiology* 130:49–55
117. **Tresguerres JA.** (1999) *Fisiología Humana*. 2a edición. Editorial McGraw-Hill•Interamericana. Madrid. Cap. 75 pp. 1020-1032.
118. **Tsilchorozidou T, Overton C y Conway GS.** (2004) *The pathophysiology of polycystic ovary syndrome*. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60:1-17
119. **Venegas-Meneses B, Padilla JF, Juárez CE, Morán JL, Morán C, Rosas-Murrieta NH, Handal A y Domínguez R** (2015) *Effects of ovarian dopaminergic receptors on ovulation*, *Endocrine*, 50:783–796.

120. **Waterman MR y Keeney DS** (1996) *Signal transduction pathways combining peptide hormones and steroidogenesis*. Vitam Horm, 52:129-148
121. **Wu XY, Li ZL, Wu CY, Liu YM, Lin H, Wang SH, Xiao WF.** (2010) *Endocrine traits of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female Sprague-Dawley rats*. Endocrinol J, 57:201–209.
122. **Xu Y, Zhang H, Li Q, Lao K, Wang Y.** (2017) *The role of nesfatin-1 expression in letrozole-induced polycystic ovaries in the rat*. Gynecol Endocrinol. 33(6):438-441.
123. **Yeh J y Adashi EY.** (2001) El ciclo ovárico. En **Yen SSC, Jaffe RB y Barbieri RL** (Eds.) *Endocrinología de la reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. 4ta edición, Editorial Médica Panamericana S.A., Buenos Aires, Argentina, cap. 6.p. 86-117.
124. **Yen SSC, Vela P, Rankin J.** (2001) *Inappropriate secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in polycystic ovarian disease*. J Clin. Endocrinol. Metab. 30: 435.
125. **Zawadzki JK, Dunaif A.** (1992) *Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome; towards a rational approach*. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine F, Merriam G, editors. *Polycystic ovary syndrome*. Boston: Blackwell Scientific.
126. **Zhang X, Zhang L, Huo S, Wang J and Cui S** (2010) *Neonatal superior ovarian nerve transection inhibits follicle development by enhancing follicular atresia and suppressing granulosa cell proliferation in rats* *Reproduction, Fertility and Development*, 22:1148–1158

ANEXO

ARTICULO PUBLICADO EN REPRODUCTIVE BIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY

Julieta A. Espinoza, Wendy Alvarado, Berenice Venegas, Roberto Domínguez and Leticia Morales-Ledesma (2018). **Pharmacological sympathetic denervation prevents the development of polycystic ovarian syndrome in rats injected with estradiol valerate.** *Reproductive Biology and Endocrinology* 16:86. DOI: 10.1186/s12958-018-0400-8.

RESEARCH

Open Access



Pharmacological sympathetic denervation prevents the development of polycystic ovarian syndrome in rats injected with estradiol valerate

Julieta A. Espinoza¹, Wendy Alvarado¹, Berenice Venegas², Roberto Domínguez¹ and Leticia Morales-Ledesma^{1*} 

Abstract

Background: The injection of estradiol valerate in female rats induces polycystic ovary syndrome, which is characterized by polycystic ovaries, anovulation, and hyperandrogenism. These characteristics have been associated with an increase in the ovarian concentration of norepinephrine, which occurs before establishing the polycystic ovary syndrome. The bilateral section of the superior ovarian nerve restores ovarian functions in animals with polycystic ovary syndrome. The superior ovarian nerve provides norepinephrine and vasoactive intestinal peptide to the ovary. An increase in the activity of both neurotransmitters has been associated with the development of polycystic ovary syndrome. The purpose of the present study was analyzed the participation of the noradrenergic nervous system in the development of polycystic ovary syndrome using guanethidine as a pharmacological tool that destroys peripheral noradrenergic nerve fibers.

Methods: Fourteen-day old female rats of the ClIZ-V strain were injected with estradiol valerate or vehicle solution. Rats were randomly allotted to one of three guanethidine treatment groups for denervation: 1) guanethidine treatment at age 7 to 27-days, 2) guanethidine treatment at age 14 to 34- days, and 3) guanethidine treatment at age 70 to 90- days. All animals were sacrificed when presenting vaginal oestrus at age 90 to 94-days. The parameters analyzed were the number of ova shed by ovulating animals, the ovulation rate (i.e., the numbers of ovulating animals/the numbers of used animals), the serum concentration of progesterone, testosterone, oestradiol and the immunoreactivity for tyrosine hydroxylase enzyme. All data were analyzed statistically. A *p*-value of less than 0.05 was considered significant.

Results: Our results show that the elimination of noradrenergic fibers before the establishment of polycystic ovary syndrome prevents two characteristics of the syndrome, blocking of ovulation and hyperandrogenism. We also found that in animals that have already developed polycystic ovary syndrome, sympathetic denervation restores ovulatory capacity, but it was not as efficient in reducing hyperandrogenism.

Conclusion: The results of the present study suggest that the noradrenergic fibers play a stimulant role in the establishment of polycystic ovary syndrome.

Keywords: Polycystic ovary syndrome, Estradiol valerate, Innervation, Ovulation, Steroid hormones

* Correspondence: moralesledesma@yahoo.com.mx

¹Biology of Reproduction Research Unit, Physiology of Reproduction Laboratory, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM AP 9-020, CP 15000 México, DF, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



Background

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine disorder which affects between 6 and 10% of women in reproductive age [1, 2]. In 2006, the Androgen Excess & PCOS Society concluded that in the diagnosis of PCOS, the disorder predominantly consists of androgen excess and ovulatory dysfunction (i.e., chronic ovulatory dysfunction or polycystic ovarian morphology), with the exclusion of specific disorders, such as nonclassic adrenal 21-hydroxylase deficiency, Cushing's syndrome, hyperprolactinemia, and androgen-producing tumors [3]. Frequently, PCOS is accompanied by obesity, hirsutism, and in the vast majority of cases, infertility [4]. In addition, some women with PCOS present metabolic alterations such as hyperinsulinemia and insulin resistance, the severity of both disorders increases in the presence of obesity [5] and the risk of cardiovascular diseases [6]. Some of the medical treatments for inducing ovulation in patients with the syndrome are: treatment with clomiphene citrate (an anti-estrogen) [7], treatment with exogenous follicle stimulating hormone (FSH) [8], wedge resection of the ovaries [9] or treatment with low frequency electroacupuncture [10].

The etiology of PCOS is currently unknown. Evidence suggesting that the syndrome may originate in the hypothalamus, due to a primary neuroendocrine defect in gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion that leads to increased frequency and amplitude in the pulses of the secretion of luteinizing hormone (LH) [11]. Recent studies suggests that ovarian innervation also plays a role in the physiopathology of the syndrome, since it has been observed that, in both, rodent with the induced pathology and women with the syndrome, there is an increase in sympathetic ovarian nervous activity [12–15].

In the rat, the ovary receives sympathetic innervation from two neural pathways: the ovarian plexus nerve (OPN) and the superior ovarian nerve (SON). The SON-fibers innervate the thecal cells and provide the ovary with norepinephrine (NE), mainly; but also, with neuropeptide Y (NPY) and vasoactive intestinal peptide (VIP) [16, 17]. In prepubertal rats, the bilateral section of the SON decreases ovarian NE concentrations at the first 24 h post-denervation [16, 18].

In prepubertal and adult rats, injection with 2 mg of estradiol valerate (EV), a long-acting estrogen, induces PCOS [19–22]. Rats with EV-induced PCOS are characterized by early puberty [21, 22], loss of estrous cycles [21, 23], high concentrations of androgens [22], anovulation, and around 60 days after EV injection, follicular cysts in the ovaries are observed [19]. The polycystic ovaries developed by the EV-injection show a reduction in their size, absence of corpora lutea, development of follicular cysts and poor follicular development [21, 24]. Because the structure of the ovaries of rats injected with EV is different from that of the ovary of women with

PCOS, some authors have suggested having precautions when comparing these polycystic ovaries [25].

The development of PCOS has also been associated with changes in the catecholaminergic activity of the ovary. These changes include increase ovarian NE concentration and in the activity of tyrosine hydroxylase (TH), a limiting enzyme in NE biosynthesis, and a decrease in the number of beta-adrenergic receptors [12]. In this PCOS model, spontaneous ovulation occurs after the bilateral section of the SON and the androgens concentration in the ovary is normalized [20–22]. Parra et al. [26] showed that in addition to ovarian NE concentration increases, EV-treated rats also show an increase in VIP concentration, which could stimulate the onset of PCOS. This is possible, since ovaries of rats with PCOS cultivated in the presence of VIP release higher amounts of androgens and oestradiol than ovaries of rats without the syndrome.

Since surgically sectioning the SON of rats with PCOS does not allow us to distinguish whether the reestablishment of ovulation and serum androgen concentrations is due to a decrease in ovarian NE or VIP levels, the aim of the present study was to analyze the participation of the noradrenergic system in the onset of PCOS. For this purpose, we used guanethidine monosulfate (GTD) as a pharmacological tool that destroys only peripheral noradrenergic fibers [27], as GTD does not cross the blood-brain barrier [28]. GTD does not accumulate in other cell types (i.e. sensory neurons) nor does it cause their destruction [28, 29]. Our working hypothesis was that eliminating of noradrenergic fibers before or during PCOS onset would result in spontaneous ovulation and normal testosterone levels, while the same treatment after PCOS onset would reverse the ovulation blockage caused by the syndrome. In the present study, the treatment consisted of chronically injecting GTD for three weeks, before, during or after EV treatment to induce PCOS. Our data suggest that the noradrenergic fibers play a stimulant role in the establishment of PCOS.

Methods

All experiments were carried out in strict accordance with the Mexican Law of Animal Treatment and Protection Guidelines, and the specifications of the Mexican Official Standard, NOM-062-ZOO-1999. The Committee of the Facultad de Estudios Superiores Zaragoza approved the experimental protocols. All efforts were taken to minimize the number of animals used, and all procedures were undertaken in a humane manner.

The study was performed using pre-pubertal female rats of the CIIZ-V strain from our own breeding stock. Animals were maintained under controlled lighting conditions (lights on from 05:00 to 19:00 h); with free access to food (Purina S.A., México) and tap water.

Animal treatment

Following previously described methodologies [22, 30], PCOS was induced by injecting 14-day old rats with a single 2 mg EV (Sigma Chem. Co., St. Luis, Mo. USA) dose dissolved in 0.1 ml of sesame oil (Vehicle Vh, Sigma Chem. Co., St. Luis, Mo. USA). The control group consisted of 10 animals injected with Vh only.

To analyze the effect that noradrenergic denervation has on PCOS onset, GTD denervation treatment was performed before, during and after EV-treatment to induce PCOS (Fig. 1).

Rats were randomly assigned to one of the following experimental groups described below.

Model 1. GTD denervated rats before EV treatment

Following the Lara model [31], to test whether the elimination of noradrenergic fibers prevents the onset of PCOS, 21 rats were denervated by chronic intraperitoneal chronic injection of 50 mg/kg GTD (Sigma Chem. Co., St. Luis, Mo. USA) for three weeks, from age 7 to 27-days old. At 14-days of age, 11 of the 21 rats treated with GTD were injected with EV, and the remaining 10 animals with Vh.

Model 2. Rats denervated with GTD at the same time of EV treatment

To assess if GTD denervation treatment prevents PCOS onset when initiated at the same time as the EV treatment, ten 14-day old rats were injected with EV and subsequently with the first three week dose of GTD, as described in the previous model, from age14 to 34-days old. The control group consisted of fourteen 14-day old animals injected with Vh and treated with GTD during the same (age14 to 34-days old) period.

Model 3. Rats with induced PCOS subsequently denervated with GTD

Since ovarian cysts develop 56 days after EV injection [19], this model served to analyze if denervation with GTD restores ovarian function in animals with an established PCOS. Twelve 14-day old animals were injected with EV and after 56 days with GTD for three weeks (from 70 to 90 days). The control group consisted of ten 14-day old animals treated with Vh and with GTD during the same (age70 to 90 days) period.

Autopsy procedures

All animals were sacrificed when presenting vaginal oestrus, at 90 to 94 days of age. Eighty percent of the animals from each experimental group were sacrificed by decapitation and the remaining 20% with an overdose of sodium pentobarbital (PiSA Agropecuaria, S.A. de C.V.).

Animals sacrificed by decapitation: Sacrifice and autopsy procedures were performed between 10.00 AM and noon. Trunk blood was collected, allowed to clot, and

centrifuged during 15 min at 3000 RPM. The serum was stored at -20°C until progesterone, testosterone and oestradiol concentrations were measured. During autopsy the oviducts were dissected and the number of ova was counted with the aid of a dissecting microscope (Nikon, Model C-PS). Ovaries were removed and processed for ovarian morphology analysis.

Animals sacrificed with sodium pentobarbital: An overdose of pentobarbital was injected at 10.00 time of day and perfused intracardially to corroborate GTD's ability to destroy the noradrenergic fibers. This was carried out by the expression of TH in the ovaries, using the immunofluorescence technique.

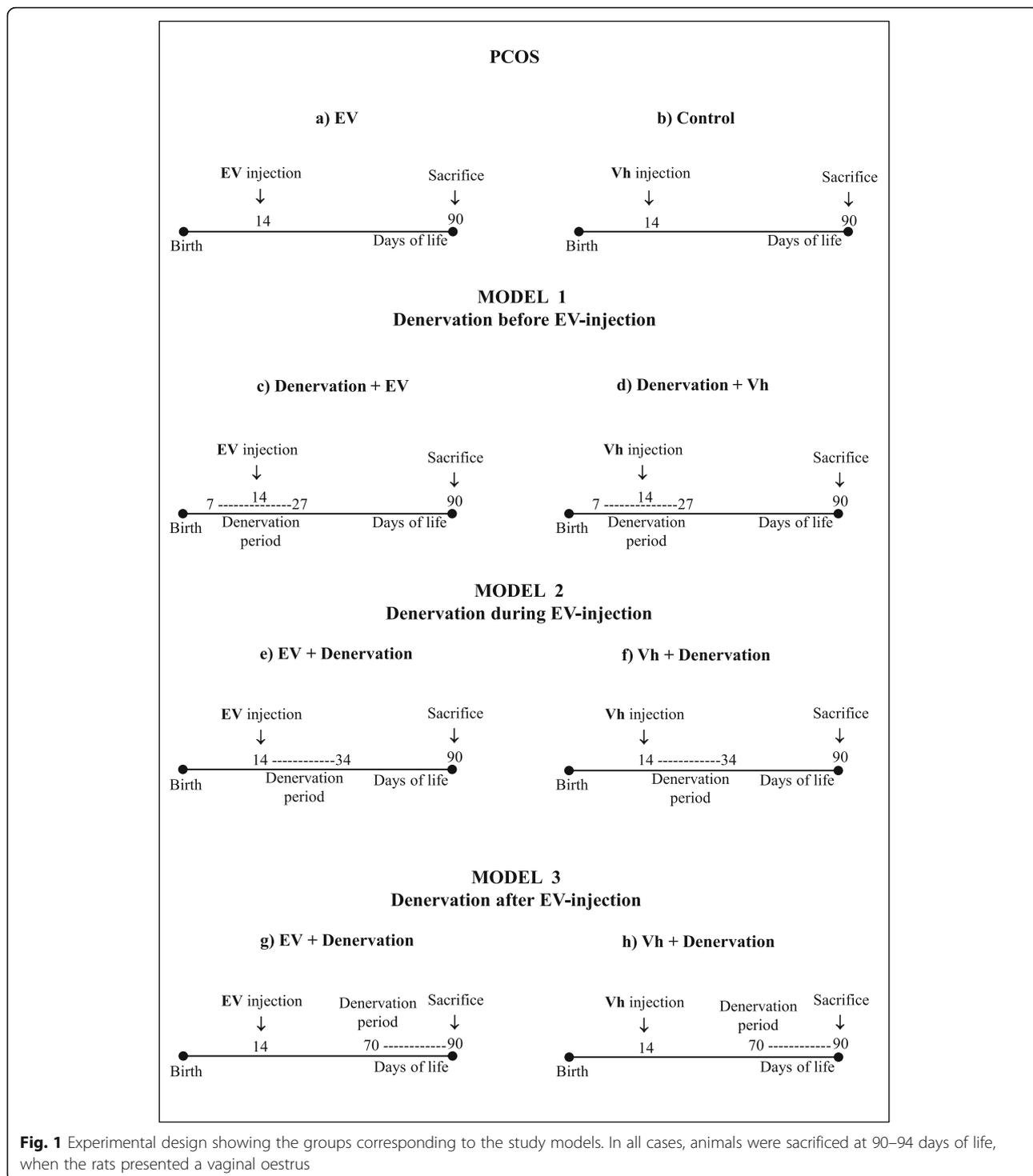
The efficacy of GTD's effects was assessed by measuring TH expression using the immunofluorescence technique.

Analysis of ovarian morphology

To analyze the differences in ovarian morphology, three ovaries from each experimental group were cleaned of adherent fat tissue, fixed in Bouin solution for 24 h, dehydrated, embedded in paraplast, and serially sectioned at $10\ \mu\text{m}$. The sections were stained with hematoxylin-eosin and examined under a binocular microscope (Nikon, Model Labophot-2). All sections were analyzed for the presence of corpora lutea (CL), follicular cysts, and pre-cystic follicular structures. Following the criteria of Brawer et al. [19], follicular cysts were defined as follicles devoid of oocytes, displaying a large antral cavity, with an enlarged thecal cell layer, and a thin (most frequently monolayer) granulosa cell compartment containing apparently healthy cells. Pre-cystic follicles were defined as large follicles, with or without oocytes, containing four or five plicate layers of small, densely packed granulosa cells surrounding a very large antrum, and displaying a seemingly normal thecal compartment [19].

Tyrosine hydroxylase immunofluorescence

The tyrosine hydroxylase immunofluorescence was performed following previously described methodology [32]. In brief, ovarian $8\ \mu\text{m}$ paraplast sections were mounted on coated glass slides. Each section was rinsed with PBS at pH 7.4, and twice with PBS-B (PBS with 0.5% Triton X-100). Sections were blocked by incubating them in IgG free 2% bovine serum albumin (BSA sigma) for 30 min to reduce background staining [33], and subsequently incubated at 4°C overnight with a polyclonal rabbit anti-TH antibody (1:500) (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA, sc-14,007). On the next day, slides were incubated with a secondary antibody (goat anti-rabbit FITC-labeled) (Vector Labs., CA, USA, FI-1000) for their visualization in the green channel. Slides were counterstained with Vectashield with DAPI (Vector Labs., CA, USA, H-1200). Sections of the ovaries were viewed and photographed using a Digital Camera (Nikon



DS-U2, Japan) coupled with a fluorescence microscope (Nikon Eclipse E400, Japan). Intensity settings were kept constant between sections. The image analysis was performed using the Nis-Elements BR 3.0 system (Nikon). Immunofluorescence was calculated as the total number of pixels for the total area assessed by color segmentation

analysis, which produces quantification by locating all objects of a specific color (green).

Hormone measurement

Serum concentrations of progesterone (ng/ml), testosterone (pg/ml), and oestradiol (pg/ml) were measured using

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) techniques, with kits purchased from DRG Instruments GmbH (Marburg, Germany). The intra- and inter-assay coefficients of variation were 7.52% and 8.41% for progesterone, 6.42% and 7.32% for testosterone, and 8.5% and 9.3% for oestradiol, respectively. The standard curves for each hormone were in the following range: progesterone from 0 to 40 (ng/ml), testosterone from 0 to 16,000 (pg/ml) and oestradiol from 0 to 2000 (pg / ml). None of the samples indicated concentrations below the test's sensitivity.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad InStat 3. The number of ova shed by ovulating animals was analyzed using a Kruskal-Wallis test, followed by a Mann-Whitney U-test. Ovulation rate (i.e., the numbers of ovulating animals/the numbers of used animals) was analyzed using a Fisher's exact probability test. The fluorescence data and the serum concentration of progesterone, testosterone and oestradiol were analyzed with a two-tailed Student's t test for comparing the results of two groups. A *p*-value of less than 0.05 was considered significant.

Results

Ovulatory response

None of the EV treated rats ovulated (0/10), while 10/10 of Vh-treated ones did. The number of ovulating animals and total number of ova shed was similar between Vh-treated and the GTD-treated (before, during or after) groups. No ovulation differences were observed between the Vh-treated control groups of rats and animals denervated with GTD before, during or after EV-treatment. When comparing the ovulatory response of EV-treated animals with GTD denervated animals we observed that ovulation was restored in the three study (EV-treatment before, during, or after GTD-treatment) groups (Table 1).

Ovarian morphology

Ovaries from the Vh group appeared normal, and various primary and secondary follicles were apparent. Some of the follicles were atretic and showed nuclear pyknosis and

some showed cell degeneration in the granulosa cell layer. Numerous corpora lutea were also observed (Fig. 2a).

The ovaries of EV-treated rats were small and showed very few follicles in development. Some of these follicles showed pyknosis of the granulosa cell layers. No large secondary or tertiary follicles, nor corpora lutea were observed (Fig. 2b). In addition, the ovaries of these rats showed numerous cysts which a very large central cavity (Fig. 2c), a highly attenuated granular layer and an abnormally thick theca layer (Fig. 2d).

In any of the three treatment periods studied, ovaries of rats treated with Vh and denervated with GTD showed a similar appearance to those of rats injected only with Vh (Fig. 2e, g, i). On the other hand, ovaries of animals injected with EV and denervated with GTD exhibited follicles at various stages of development as well as corpora lutea, observations that confirm ovulation (Figs. 2f, h, j). In addition, no follicular cysts were observed in the ovaries of rats treated with GTD before or immediately after EV-treatment. In contrast, some cystic structures were visible in animals denervated 56 days after EV-treatment (Fig. 2j).

Tyrosine hydroxylase expression in the ovary

As shown in Fig. 3, TH immunoreactivity was detected in the ovaries of both, the Vh-treated control group and the EV-treated group (Fig. 3a, b). Image analysis using the Nis-Elements BR system showed a greater TH expression in the EV-treated group than in the Vh-treated control group (Fig. 4). In both groups, the TH expression were observed around the follicles and in the interstitial gland. In the EV-treated groups, the TH expression were observed in the pre-cystic follicles. GTD-treatment before, during or after EV-treatment yielded lower ovarian TH expression (Fig. 3d, f, h). A similar effect was observed in the Vh-treated groups (Fig. 3c, e, g). A semiquantitative analysis of the images confirmed that, compared to the Vh-treated control group, animals in all GTD-treated groups showed lower TH expression. Compared to the EV only or Vh only treatment groups, all GTD-treated groups showed lower TH expression (Fig. 4).

Table 1 Number of ovulating rats (numbers of ovulating animals/the numbers of used animals) and mean \pm S.E.M. number of ova shed by rats injected with vehicle (Vh) or estradiol valerate (EV) at day 14 of life, and treated with GTD from 7 to 27 days of age (Model 1), or 14 to 34-day of age (Model 2) or at 70 to 90-day of age (Model 3). Rats were sacrificed in the adult stage at days 90–94 of life, on the day of vaginal oestrus

Groups	Number of ovulating rats		Total number of ova shed	
	Vh	EV	Vh	EV
Without denervation	10/10	0/10 ^a	14.4 \pm 0.7	0 ^c
GTD (days 7–27)	9/10	8/11 ^b	13.0 \pm 1.3	11.2 \pm 0.7 ^d
GTD (days 14–34)	11/14	9/10 ^b	13.2 \pm 0.7	10.6 \pm 1.4 ^d
GTD (days 70–90)	10/10	7/12 ^b	10.3 \pm 0.8	12.2 \pm 0.8 ^d

Number of ovulating rats ^a *p* < 0.05 vs. group treated with Vh; ^b *p* < 0.05 vs. group treated with EV (Fisher's exact probability test); total number of ova shed ^c *p* < 0.05 vs. group treated with Vh; ^d *p* < 0.05 vs. group treated with EV (Kruskal Wallis test, followed by Mann-Whitney U-test)

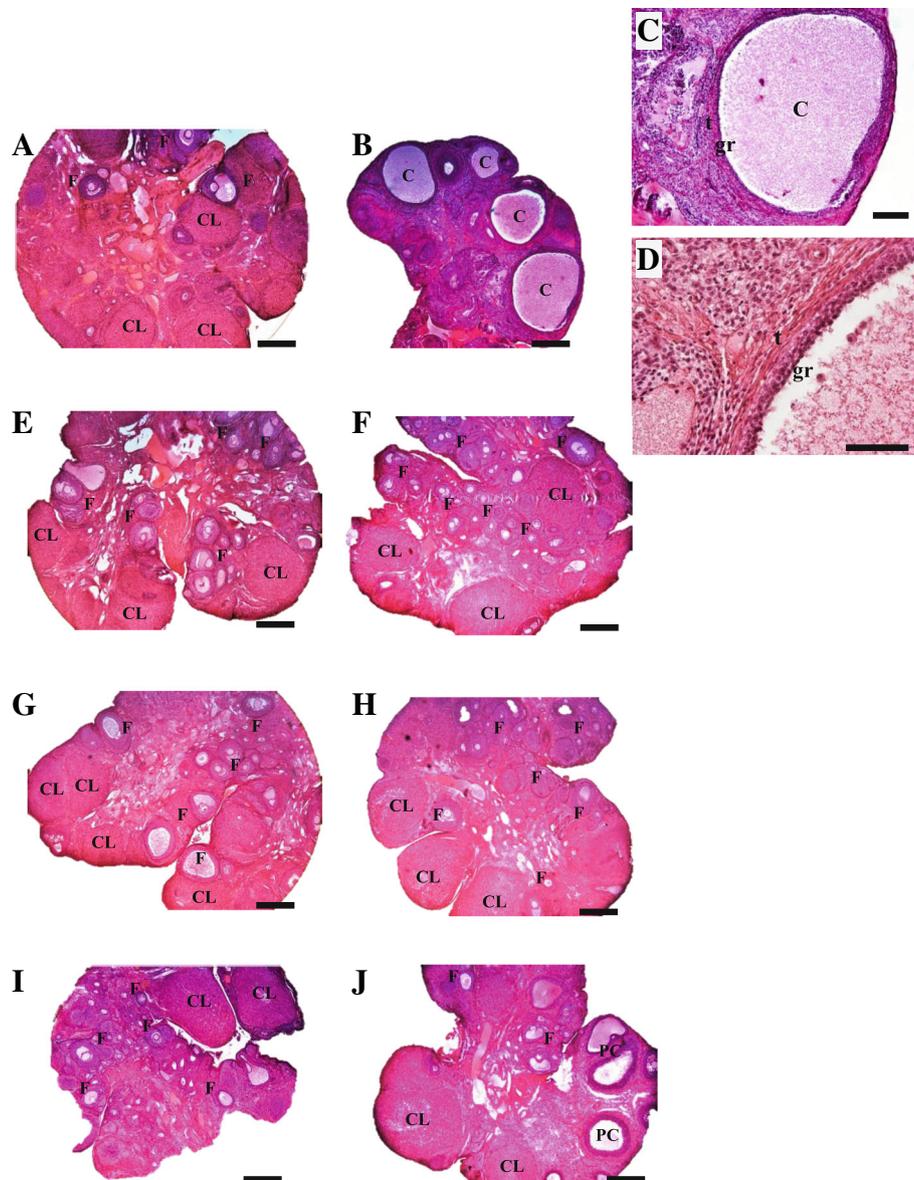


Fig. 2 Ovarian histologies of the rats injected with **a** Vh or **b** EV at 14 days of age, **e** denervated with GTD (from days 7 to 27) + Vh at day 14 of life or **f** GTD (from days 7 to 27) + EV at day 14 of life, **g** Vh-injected at day 14 of life + GTD (from days 14 to 34) or **h** EV-injected at day 14 of life + GTD (from days 14 to 34), **i** Vh-injected at day 14 of life + GTD (from days 70 to 90) or **j** EV-injected at day 14 of life + GTD (from days 70 to 90). 4X microscopic lens, Scale Bar = 500 μ m; **c** amplification of a cyst taken from Fig. B. 10X microscopic lens, Scale Bar = 200 μ m; **d** thickening of the stratum of theca cells and thinning of the stratum of the granulosa cell of a follicular cyst taken from Fig. C. 40X microscopic lens, Scale Bar = 50 μ m. Rats were sacrificed in the adult stage at days 90–94 of life, on the day of vaginal estrus; F: follicles in different stages of maturation; CL: corpora lutea; PC: pre-cyst; C: cyst; gr: granulosa cells; t: thecal cells

Hormone concentrations in serum

Compared to the Vh-treatment control group, EV-treatment did not modify progesterone levels in serum. In animals Vh-treated and GTD-treated at 14 to 34-day of age progesterone levels were lower than in the Vh-treated control group, while in the other periods of denervation was not modified. In the 7 to 27-days of age groups, EV-treated rats showed higher progesterone levels than Vh-treated group. Compared to the EV-only treatment

group, rats subsequently treated with GTD from 14 to 34 days of age did not show changes in progesterone concentration, while rats with denervation treatment at 70 to 90-days of age showed higher progesterone levels (Fig. 5a).

Compared to the Vh-treatment control group, EV-treated animals showed higher testosterone concentrations, while, no testosterone concentration changes were observed in the GTD-treatment groups (Study Model 1, 2 or 3). Compared to the EV-treated group, testosterone

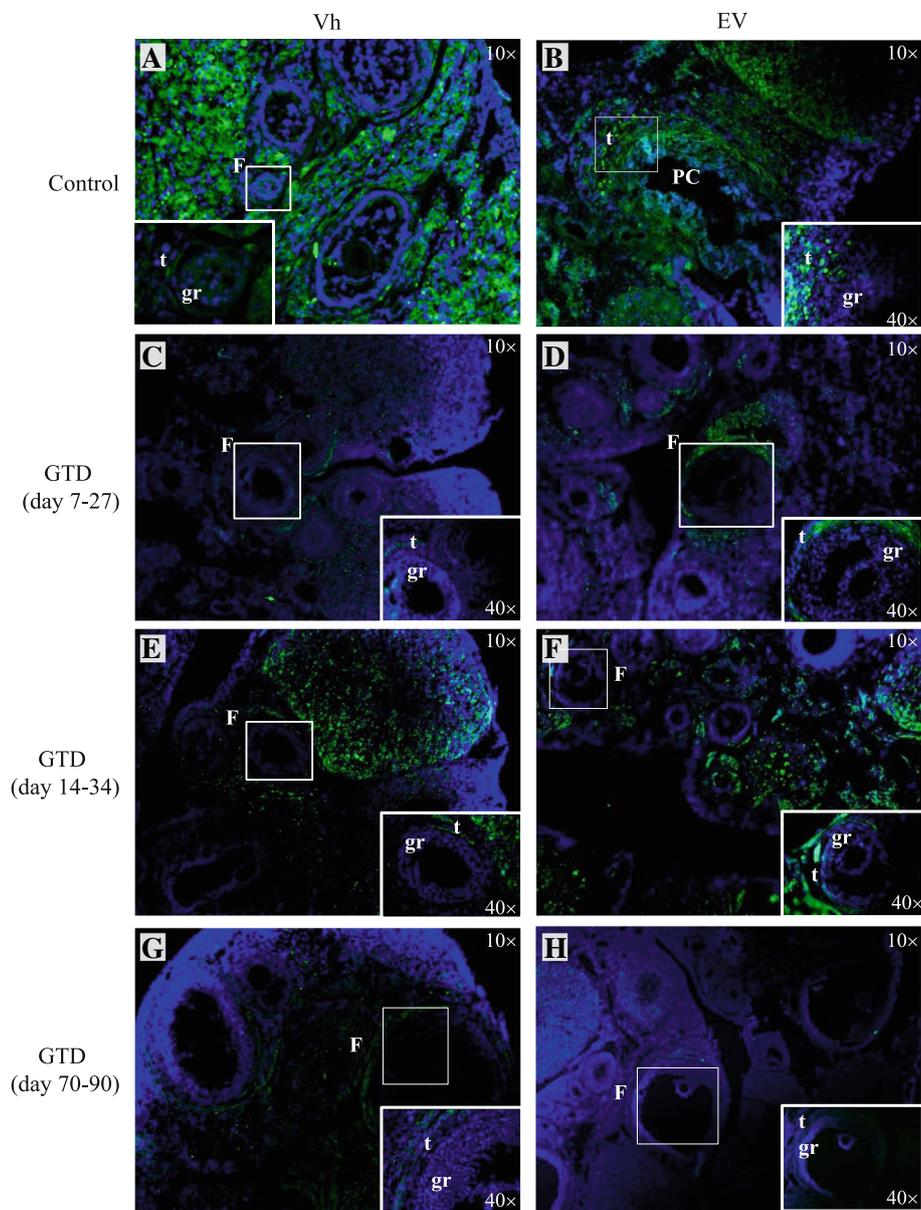


Fig. 3 Immunofluorescence staining of tyrosine hydroxylase (TH) in ovaries of rats injected with **a** Vh or **b** EV at 14 days of age, **c** denervated with GTD (from days 7 to 27) + Vh at day 14 of life or **d** GTD (from days 7 to 27) + EV at day 14 of life, **e** Vh-injected at day 14 of life + GTD (from days 14 to 34) or **f** EV-injected at day 14 of life + GTD (from days 14 to 34), **g** Vh-injected at day 14 of life + GTD (from days 70 to 90) or **h** EV-injected at day 14 of life + GTD (from days 70 to 90). Ovarian sections were stained with anti-TH antibody (green color), and nuclear staining with DAPI (blue color). F: follicles in different stages of maturation; PC: pre-cyst; gr: granulosa cells; t: thecal cells

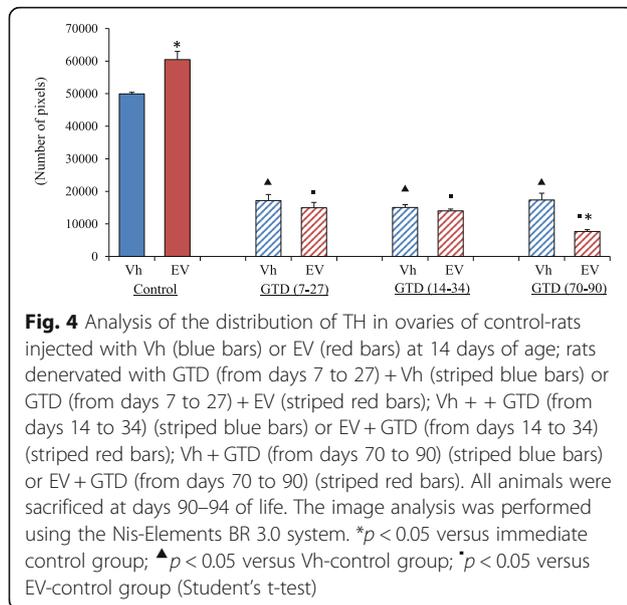
levels were lower in rats EV-treated and GTD-treatment at 7 to 27-days of age (Model 1) and at 14 to 34-day of age (Model 2). EV-treated animals denervated at 70 to 90 days of age showed higher testosterone concentrations than the Vh-treated and GTD from 70 to 90 days of age (Fig. 5b).

Compared to the Vh-treatment control group, higher estradiol levels were measured in EV-treated rats and in the Vh-treated and GTD-treatment at 7 to 27-days of age. The same treatment on the other

two age groups did not have an apparent effect on estradiol levels (Fig. 5c).

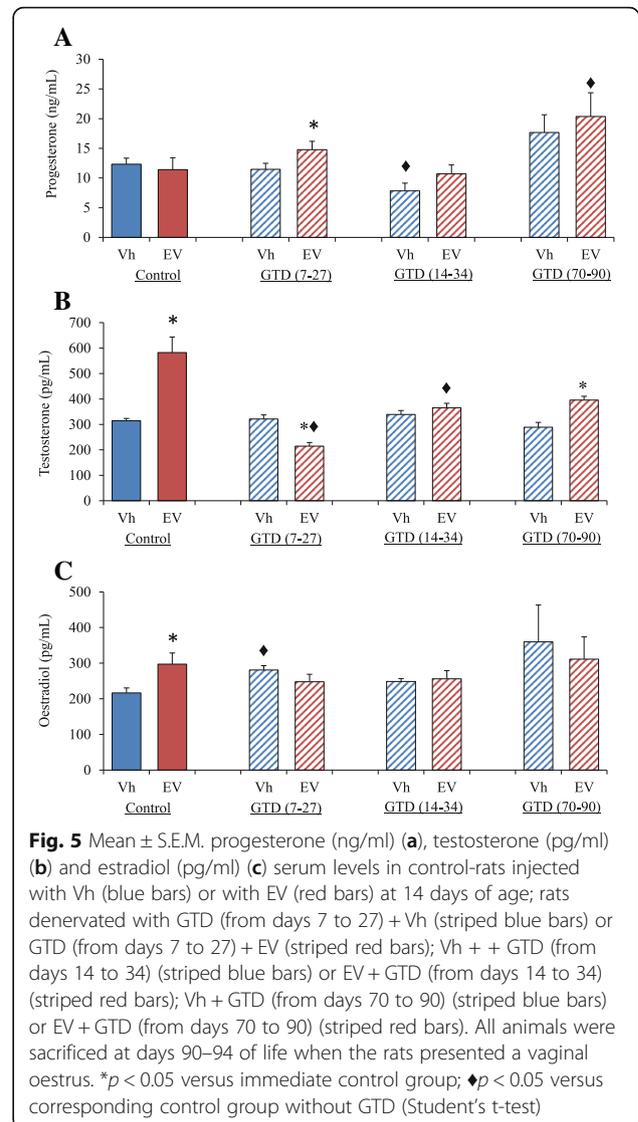
Discussion

Taken together, the results of the present study shows that PCOS onset in pre-pubertal EV-treated rats depends on the integrity of the ovary's peripheral noradrenergic system.



The ovary is innervated by sympathetic fibers through the SON and OPN. In addition to containing catecholamines synthesizing fibers, the SON are formed by fibers that synthesize other peptides; such as VIP and NPY; the supply of substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) to the ovaries by the OPN [34]. The surgical section of these nerves has been used to analyze the role of innervation in ovarian functions. A research model to target specific types of neurons consist of treatments with neurotoxins, such as GTD; which when administered chronically and in high doses produce sympathectomy at the peripheral level [31, 35–37].

Studies with male rats by Heath and Burnstock, [38] show that chronic high-doses GTD treatment has no apparent effect on parasympathetic cholinergic neurons or sensory neurons. According to Angeletti et al. [39], injecting three doses of GTD decreases the number of catecholaminergic neurons in the superior cervical ganglion. Lara et al. [31] showed that in the pubertal rat, the chronic injection of GTD destroys the ovary's catecholaminergic neurons. Tyrosine hydroxylase is the limiting enzyme in catecholamines biosynthesis, and is widely used as a norepinephrine biosynthesis marker [31]. An increase in TH activity and expression in the ovary has been documented in rats with EV-induced PCOS [12, 24, 40]. Our results support these findings, since the ovaries of EV-treated rats showed as increase in TH expression. Tyrosine hydroxylase expression was almost completely lost in GTD-treated animals before, during, or after EV-treatment. This result reinforces the accounts of a GTD-induced reduction of catecholaminergic neurons and agrees with the observations presented by Angeletti et al. [39] and Lara et al. [31].



To date, despite the exhaustive research on the etiology of PCOS, the causes of the syndrome are still unknown. One of the hypotheses proposed to explain the origin of PCOS suggests that increases in ovarian sympathetic nerve activity results in abnormal ovarian function [12, 13, 20, 24]. In women with PCOS, the ovaries show greater density of nerve fibers [14] and higher sympathetic nerve activity [41]. In EV-treated rats, and in rats exposed to chronic cold stress, the onset of PCOS is accompanied by increases in sympathetic nerve activity [13, 42]. In the EV-induced PCOS model, the surgical sectioning of the SON restores estral cyclicity, ovulatory capacity, and the presence of corpora lutea [20, 21]. This response has been explained by decreases in adrenergic tone; however, as previously described, in addition to providing adrenergic fibers to the ovary the SON is also a source of other peptides such as VIP.

Hence the importance of using a more specific tool, such as GTD, that only destroys catecholaminergic neurons [37]. In the present study, the results obtained from estimating TH expression in control and EV-treated animals with GTD denervation shows that regardless of the age of treatment, the number of pixels with the immunoreactive mark was significantly lower in GTD treated animals. These results confirm the success of catecholaminergic fibers denervation.

According to the criteria established in 2006 by the Society of Excess of Androgens and Polycystic Ovarian Syndrome, hyperandrogenism is the most important parameter in PCOS diagnosis. In EV-induced PCOS rats, hyperandrogenism is explained by increases in steroidogenic activity in theca cells of cystic and pre-cystic structures in the ovaries [43] and increases in NE concentrations [13].

This hypothesis is supported by present study results, by the time the rats reached adulthood EV-treated animals with chronic GTD treatment stopped PCOS onset (anovulation and high of testosterone concentrations).

According to Lara et al. [24], an increase in ovarian neural growth factor (NGF) concentration is observed 15 days after EV treatment, resulting in higher TH activity in the superior mesenteric celiac ganglion (CSMG) and the subsequent release of NE to the ovary that precedes development of ovarian cysts.

In models 1 and 2 of the present study, denervation with GTD began before the ovarian NGF increases, suggesting that TH activity increases was not present. We can't rule out that PCOS onset had taken place and was resolved by the nerves inactivity. New experiments are necessary to evaluate such possibility.

In animals of Model 3, in which EV-induced PCOS is fully established, denervation of the noradrenergic fibers reaching the ovary is efficient at restoring ovulation, but the testosterone concentration decrease was not significant. This can be explained by the persistence of some pre-cystic structures in the ovaries of these rats. The persistence of pre-cystic structures in the ovaries in animals from Model 3 could be explained by the short time between denervation and autopsy. Unlike the animals in Model 1 and 2, where autopsy was performed at least 50 days after denervation treatment, animals in Model 3 were sacrificed immediately after denervation treatment, and the time elapsed between denervation treatment and autopsy was not enough to allow the remodeling of the ovarian structure.

In addition to preventing hyperandrogenism and anovulation, peripheral noradrenergic denervation in EV-treated animals prevented morphological alterations of the ovaries, a characteristic of animals with PCOS. The ovaries of these animals showed corpora lutea and follicles in different growth stages, which allow us to suggest that the animals would probably be able to ovulate in later cycles.

In mammals, the sympathetic innervation of the ovary stimulates ovulation and secretion of steroid hormones [18, 44, 45]. According to several authors, the role of the ovarian sympathetic innervation varies according to the animal's endocrine stage [16, 17, 31, 46, 47].

In the present study, the results obtained from Vh-treated and GTD-denervated animals support this idea. Uchida and Kagitani [48] reported that the electrical stimulation of the SON results in lower testosterone concentrations via the activation of alpha-1 adrenergic receptors, and in lower oestradiol levels by the activation of alpha-2 adrenergic receptors. The discrepancy between Uchida and Kagitani's findings and the present study results on testosterone and oestradiol secretion regulation in the Vh-treated and GTD denervated animals may result from the destruction of noradrenergic neurons by GTD treatment, evidenced by the TH (activity / expression) reduction.

According to Kuncová et al. [49], GTD-treatment to pre-pubertal rats does not modify immunoreactivity to VIP in cardiac tissue. According to Benarroch et al. [50], adult rats treated with GTD for 5 weeks showed increased immunoreactivity to VIP neurons in the CSMG and not to VIP neurons in the superior cervical ganglion. The authors indicate their results were due to differences in afferent inputs to prevertebral and paravertebral ganglia. Working with adult rats, we've previously shown [51] that the effects on progesterone, testosterone, and oestradiol secretion resulting from unilaterally injecting VIP into the ovary's intra-bursal depends on the injected ovary, the day of the estrous cycle treatment was performed, and the time elapsed between treatment and autopsy. These results suggest that the asymmetric response of the ovaries to VIP treatment is modulated, at least in part, by the innervation received by each ovary [51]. The effects of VIP on steroid hormones release by the ovaries are modulated by neural signals arriving through the SON (NE and/or NPY) ([52], in press). According to Lara et al. [31] there is no information on whether VIP-containing nerves in the SON or VIP-producing ovarian cells remain functional in GTD-treated rats. Therefore, in the present study we cannot rule out the possibility that the GTD-treatment had an impact on the VIP effects on the ovaries.

Studies have shown that VIP is a potent stimulant of steroid hormones secretion, and its effects have been explained through the regulation of enzymes involved in steroidogenesis [53]. The effect that VIP has on regulating steroid hormone secretion has been shown in experimental models, where the ovaries of adult EV-treated rats were removed and placed in a culture medium with VIP can release a greater quantity of androgens and estrogens than the ovaries of EV-treated rats cultured without the VIP-stimulus [26].

Conclusions

Taken together, the results of the present study support the notion that the increased peripheral noradrenergic tone seen in animals with EV-induced PCOS is an important factor in the onset of the pathophysiology.

There is evidence showing that even though the concentration of NE is high in rats with EV-induced PCOS, the reestablishment of ovarian function is not only due to a decrease in noradrenergic activity since ovulation restoration occurs in the innervated ovary and not in the denervated ovary of animals with EV-induced PCOS and unilateral sectioning of the SON [22].

Furthermore, in rats with EV-induced PCOS ovulation reestablishment occurs after unilateral or bilateral sectioning of the vagus nerve [30]. Morales-Ledesma et al. [54] showed that development of the PCOS induced by subcutaneous injecting testosterone propionate was not modified by the unilateral or bilateral sectioning of the SON, suggesting that the etiology of PCOS depends not only on the hyperactivity of NE fibers and that other neurotransmitters are participating in the onset and maintenance of PCOS.

The present study contributes to the set of evidence that support the participation of the sympathetic innervation in PCOS onset and could lay the foundations to propose therapeutic alternatives that improve PCOS alterations. There is evidence that some women with PCOS can ovulate after treatment with low frequency electroacupuncture applied at the ovarian innervation origin level [55]. In clinical studies, low GTD doses have been used to reduce hypertension [56]. Since some patients with PCOS present metabolic alterations, including high blood pressure [57, 58], GTD treatment could reduce sympathetic activity and improve some of the alterations related to the PCOS. More studies are necessary to support such possibility.

Abbreviations

CGRP: Calcitonin gene-related peptide; CL: Corpora lutea; CSMG: Superior mesenteric celiac ganglion; EV: Estradiol valerate; FSH: Follicle stimulating hormone; GnRH: Gonadotropin-releasing hormone; GTD: Guanethidine monosulfate; LH: Luteinizing hormone; NE: Norepinephrine; NPY: Neuropeptide Y; OPN: Ovarian plexus nerve; PCOS: Polycystic ovary syndrome; SON: Superior ovarian nerve; SP: Substance P; TH: Tyrosine hydroxylase; Vh: Vehicle; VIP: Vasoactive intestinal peptide

Acknowledgements

We want to thank for the support given to the realization of this study by the "Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM" and CONACyT. This work is a requirement for obtaining of the degree of Doctor in Biological Sciences. We also thank the Biologist Roberto Chavira for participating in performing the ELISA's to measure the steroids hormones concentrations and thank Álvaro Domínguez-González for his assistance in English language editing.

Funding

Our grant sponsors were the "Investigación realizada gracias al programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IN217016"; CONACyT Grant 270095.

Availability of data and materials

All datasets on which the conclusions of the paper rely are available to readers.

Authors' contributions

JAE, and LM-L Planned and designed the experiments. JAE, WA and BV Performed experiments. JAE, RD, and LM-L Devised the study, analyzed the data, and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval

All experiments were carried out in strict accordance with the Mexican Law of Animal Treatment and Protection Guidelines and followed the Mexican Official Standard NOM-062-ZOO-1999 specifications. The Institutional Committee of the Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México approved the experimental protocols (FES/DEPUCI/236/14). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Biology of Reproduction Research Unit, Physiology of Reproduction Laboratory, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM AP 9-020, CP 15000 México, DF, Mexico. ²Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Blvd. Valsequillo, Av. San Claudio, Edificio 112-A, Cd Universitaria, Col. Jardines de San Manuel, Puebla, Mexico.

Received: 2 April 2018 Accepted: 21 August 2018

Published online: 07 September 2018

References

- Homburg R. Polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2007;22(2):261–75.
- Franks S. Polycystic ovary syndrome in adolescents. *Int J Obes.* 2008;32:1035–41.
- Lizneva D, Suturina L, Walker W, Brakta S, Gavrilova-Jordan L, Azziz R. Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2016;106:6–15.
- Franks S. Polycystic ovary syndrome. *Med Prog.* 1995;333:853–61.
- Morales AJ, Laughlin GA, Bützow T, et al. Insulin, somatotrophic, and LH axes in lean and obese women with polycystic ovary syndrome: common and distinct features. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:2854.
- Vrbikova J, Cifkova R, Jirkovska A, Lanska V, Platilova H, Zamrazil V, Starka L. Cardiovascular risk factors in young Czech females with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2003;18:980–4.
- Hull MGR. The causes of infertility and relative effectiveness of treatment. In: Tepleton AA, Drife JO, editors. *Infertility.* London: Springer-Verlag; 1992. p. 33–62.
- Wang CF, Gemzell C. The use of human gonadotropins for induction of ovulation in women with polycystic ovarian disease. *Fertil Steril.* 1980;33:479.
- Adashi EY, Rock JA, Guzick D, et al. Fertility following bilateral ovarian wedge resection: a critical analysis of 90 consecutive cases of the polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 1981;36:320.
- Stener-Victorin E, Bedel E, Manneras L. Acupuncture in polycystic ovary syndrome: current experimental and clinical evidence. *J Neuroendocrinol.* 2008;20:290–8.
- Taylor AE, Mccourt B, Martin KA, et al. Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(7):2248–56.
- Lara HE, Ferruz J, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR. Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology.* 1993;133:2690–5.
- Lara HE, Dorfman M, Venegas M, et al. Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in

- polycystic ovary syndrome: studies on norepinephrine release. *Microsc Res Tech.* 2002;59:495–502.
14. Heider U, Pedal I, Spänzel-Borowski K. Increase in nerve fibers and loss of mast cells in polycystic and postmenopausal ovaries. *Fertil Steril.* 2001;75(6):1141–7.
 15. Luna SL, et al. In vivo beta-adrenergic blockade by propranolol prevents isoproterenol-induced polycystic ovary in adult rats. *Horm Metab Res.* 2012;44(9):676–81.
 16. Aguado LI, Ojeda SR. Prepubertal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. Role of noradrenergic innervation. *Endocrinology.* 1984;114:1845–53.
 17. Forneris LM, Aguado L. Neonatal superior ovarian nerve transection disturbs the cyclic activity of the female rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002;82:75–82.
 18. Chávez R, Carrizosa L, Domínguez R. Effects of superior ovarian nerve on spontaneous and induced ovulation in adult rats. *Med Sci Res.* 1991;19:41–8.
 19. Brawer JR, Munoz J, Farookhi R. Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biol Reprod.* 1986;35:647–55.
 20. Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE. Ovarian steroidal response to gonadotropins and β -adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology.* 1993;133:2696–703.
 21. Rosa-E-Silva A, Guimares MA, Padmanabhan V, Lara HE. Prepubertal administration of estradiol valerate disrupts cyclicity and leads to cystic ovarian morphology during adult life in the rat: role of sympathetic innervation. *Endocrinology.* 2003;144:4289–97.
 22. Morales-Ledesma L, Linares R, Rosas G, et al. Unilateral sectioning of the superior ovarian nerve of rats with polycystic ovarian syndrome restores ovulation in the innervated ovary. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010;8(99):1–7.
 23. Sotomayor-Zárata R, Dorfman M, Paredes A, Lara HE. Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat. *Biol Reprod.* 2008;78:673–80.
 24. Lara HE, Dissen GA, Leyton V, et al. An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology.* 2000;141:1059–72.
 25. Lansdown A, Rees A. The sympathetic nervous system in polycystic ovary syndrome: a novel therapeutic target? *Clin Endocrinol.* 2012;77:791–801.
 26. Parra C, Fiedler JL, Luna SL, Greiner M, Padmanabhan V, Lara HE. Participation of vasoactive intestinal polypeptide in ovarian steroids production during the rat estrous cycle and in the development of estradiol valerate-induced polycystic ovary. *Soc Reprod Fertil.* 2007;133:147–54.
 27. Manning PT, Powers CW, Schmidt RE, Johnson EMJ. Guanethidine-induced destruction of peripheral sympathetic neurons occurs by an immune-mediated mechanism. *J Neurosci.* 1983;3(4):714–24.
 28. Johnson EM, Manning PT. Guanethidine-induced destruction of sympathetic neurons. *Int Rev Neurobiol.* 1984;25:1–37.
 29. Jensen-Holm J, Juul P. Ultrastructural changes in the rat superior cervical ganglion following prolonged guanethidine administration. *Acta Pharmacol Toxicol.* 1971;30:308–20.
 30. Linares R, Hernández D, Morán C, et al. Unilateral or bilateral vagotomy induces ovulation in both ovaries of rats with polycystic ovarian syndrome. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013;11(68):1–9.
 31. Lara HE, McDonald JK, Ojeda SR. Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function. *Endocrinology.* 1990;127:2199–209.
 32. Venegas-Meneses B, Padilla JF, Juárez CE, et al. Effects of ovarian dopaminergic receptors on ovulation. *Endocrine.* 2015;50:783–96.
 33. Díaz A, De Jesús L, Mendieta L, et al. The amyloid- β 25–35 injection into the CA1 region of the neonatal rat hippocampus impairs the long-term memory because of an increase of nitric oxide. *Neurosci Lett.* 2010;468(2):151–5.
 34. Dissen GA, Ojeda SR. Ovarian Innervation. *Enc Reprod.* 1999;3:583–9.
 35. Burnstock G, Evans B, Gannon BJ, Heath JW, James V. A new method of destroying adrenergic nerves in adult animals using guanethidine. *Br J Pharmacol.* 1971;43:295–301.
 36. Heath JW, Evan BK, Gannon BJ, Burnstock G, James VB. Degeneration of adrenergic neurons following guanethidine treatment: an ultrastructural study. *Virchows Arch Abteilung B-Zellpathologie.* 1972;11:182–97.
 37. Eränkő L, Eränkő O. Effect of guanethidine on nerve cells and small intensely fluorescent cells in sympathetic ganglia of newborn and adult rats. *Acta Pharmacol Toxicol.* 1971;30:403–16.
 38. Heath JW, Burnstock G. Selectivity of neuronal degeneration produced by chronic guanethidine treatment. *J Neurocytol.* 1977;6:397–405.
 39. Angeletti PU, Levi-Montalcini R, Caramia F. Structural and ultrastructural changes in developing sympathetic ganglia induced by guanethidine. *Brain Res.* 1972;43:515–25.
 40. Manni L, Holmäng A, Lundeberg T, Aloe L, Stener-Victorin E. Ovarian expression of alpha (1)- and beta (2)-adrenoceptors and p75 neurotrophin receptors in rats with steroid-induced polycystic ovaries. *Auton Neurosci Basic Clin.* 2005;118:79–87.
 41. Sverrisdóttir YB, Mogren T, Kataoka J, Janson PO, Stener-Victorin E. Is polycystic ovary syndrome associated with high sympathetic nerve activity and size at birth? *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294:576–81.
 42. Bernuci MP, Szawka RE, Helena CV, Leite CM, Lara HE, Anselmo Franci JA. Locus Coeruleus mediates cold stress-induced polycystic ovary in rats. *Endocrinology.* 2008;149:2907–16.
 43. Yen SSC. Síndrome del ovario poliúístico (Anovulación crónica hiperandrogénica). In: Yen SSC, Vela P, Rankin J, editors. *Médica Panamericana S. A.* Buenos Aires; 2001. p. 465–509.
 44. Dyer CA, Erickson GF. Norepinephrine amplifies human chorionic gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by ovarian theca-interstitial cells. *Endocrinology.* 1985;116(4):1645–52.
 45. Morales L, Chávez R, Domínguez R. Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve. *Med Sci Res.* 1993;21:15–7.
 46. Flores A, Ayala ME, Domínguez R. Does noradrenergic peripheral innervation have a different role in the regulation of ovulation in the prepubertal and the adult rat? *Med Sci Res.* 1990;18:817–8.
 47. Morales-Ledesma L, Vieyra E, Ramírez D, et al. Effects on steroid hormones secretion resulting from the acute stimulation of sectioning the superior ovarian nerve to pre-pubertal rats. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012;10(88):1–7.
 48. Uchida S, Kagitani F. Autonomic nervous regulation of ovarian function by noxious somatic afferent stimulation. *J Physiol Sci.* 2015;65:1–9.
 49. Kuncová J, Slavíková J, Reischig J. Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat heart: effect of guanethidine and capsaicin. *Ann Anat.* 2003;185:153–61.
 50. Benarroch EE, Zollman PJ, Smithson IL, Schmelzer JD, Low PA. Different reinnervation patterns in the celiac/mesenteric and superior cervical ganglia following guanethidine sympathectomy in adult rat. *Brain Res.* 1994;644:322–6.
 51. Rosas G, Ramírez M, Linares R, Trujillo A, Domínguez R, Morales-Ledesma L. Asymmetric steroidogenic response by the ovaries to the vasoactive intestinal peptide. *Endocrine.* 2015;48:968–77.
 52. Rosas G, Linares R, Ramírez DA, Vieyra E, Trujillo A, Domínguez R, Morales-Ledesma L. The neural signals of the superior ovarian nerve modulate in an asymmetric way the ovarian steroidogenic response to vasoactive intestinal peptide. *Front Physiol.* 2018;9:1142.
 53. Davoren JB, Hsueh AJW. Vasoactive intestinal peptide: a novel stimulator of steroidogenesis by cultured rat granulosa cells. *Biol Reprod.* 1985;33:37–52.
 54. Morales-Ledesma L, Díaz Ramos JA, Hernández Trujillo A. Polycystic ovary syndrome induced by exposure to testosterone propionate and effects of sympathectomy on the persistence of the syndrome. *Reprod Biol Endocrinol.* 2017;15:50.
 55. Stener-Victorin E, Waldenström U, Tägnfors U, Lundeberg T, Lindstedt G, Janson PO. Effects of electro-acupuncture on anovulation in women with polycystic ovary syndrome. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2000;79:180–8.
 56. Abad-Santos F, Novalbos J, García AG. Sistema nervioso simpático: fármacos simpaticolíticos. In: Lorenzo- Velázquez B, Lorenzo P, Moreno A, et al, editors. *Médica Panamericana S. A.* Buenos Aires; 2008. p. 178.
 57. Tekin G, Tekin A, Kilicarslan EB, Haydardedeoglu B, et al. Altered autonomic neural control of the cardiovascular system in patients with polycystic ovary syndrome. *Int J Cardiol.* 2008;130:49–55.
 58. Ehrmann DA, Liljenquist DR, Kasza K, Azziz R, Legro RS, Ghazzi MN. Prevalence and predictors of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(1):48–53.