



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

*"EFECTO DE LA DENERVACIÓN CATECOLAMINÉRGICA DEL OVARIO, REALIZADA
DESDE LA ETAPA INFANTIL, SOBRE EL DESARROLLO DEL SÍNDROME DEL
OVARIO POLIQUÍSTICO EN LA RATA".*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

P R E S E N T A

KARLA VERÓNICA RUÍZ PANTOJA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA

MÉXICO, D. F.

JUNIO, 2009





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

*“EFECTO DE LA DENERVACIÓN CATECOLAMINÉRGICA DEL OVARIO, REALIZADA
DESDE LA ETAPA INFANTIL, SOBRE EL DESARROLLO DEL SÍNDROME DEL
OVARIO POLIQUÍSTICO EN LA RATA”.*

**Tesis presentada por:
Karla Verónica Ruíz Pantoja**

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

Realizada en el Laboratorio de Fisiología Reproductiva de la Unidad de
Investigación en Biología de la Reproducción.
UMIEZ. FES Zaragoza. UNAM.

**Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo financiero de
PAPIIT convenio IN203307.**

A G R A D E C I M I E N T O S

A la ***Dra. Leticia Morales Ledesma***, por haber dirigido este trabajo con paciencia y confianza en que un día, juntas, lo veríamos terminado. Por su apoyo en todo momento en las cuestiones académicas y personales, muchas gracias.

A los miembros del jurado:

Dra. Leticia Morales Ledesma.
Dra. Patricia Rosas Saucedo
M en IBSH. Angélica Flores Ramírez
Dra. Ma. Elena Ayala Escobar
Dra. Juana Monroy Moreno

Por dedicar tiempo a la revisión de este trabajo y enriquecerlo con sus comentarios.

Al ***Dr. Roberto Domínguez Casalá*** por su apoyo para la realización de esta tesis.

A ***María Luisa Illescas Vera*** por su colaboración en la realización de los cortes histológicos.

A los biólogos ***Roberto Chavira*** y ***Mario Cárdenas*** por su colaboración en las mediciones hormonales.

A la ***MVZ Adriana Altamirano Bautista*** y al personal técnico del bioterio de la FES Zaragoza por el cuidado de los animales utilizados en este estudio.

Con profundo agradecimiento a mi ***familia*** por su apoyo incondicional y a quienes dedico esta Tesis.

ÍNDICE

	<i>páginas</i>
RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
Desarrollo Posnatal de la Rata Hembra	3
Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario	4
El ovario	6
Desarrollo Folicular	7
Atresia Folicular	8
Esteroidogénesis	10
Ciclo Estral	14
Inervación Ovárica	15
Neurotransmisores que viajan por Nervio Ovárico Superior	17
Efectos de la Denervación Simpática	19
Síndrome del Ovario Poliquístico	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS PARTICULARES	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
RESULTADOS	31
RESUMEN DE RESULTADOS	52
DISCUSIÓN	53
MODELO	58
CONCLUSIONES	60
PERSPECTIVAS	61
REFERENCIAS	62

RESÚMEN

El ovario de los mamíferos recibe información simpática vía NOS, por donde llegan al ovario Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) y Noradrenalina (NA), dos neurotransmisores involucrados en la esteroidogénesis ovárica.

La administración de valerato de estradiol (VE), resulta en la elevación de la concentración de NA ovárica y disminución del número de receptores β -adrenérgicos en las células de la teca intersticial, que se acompaña por la falta de ovulación y pérdida del ciclo estral. En estudios previos de nuestro laboratorio, mostramos que la sección unilateral del nervio ovárico superior (NOS) practicada a ratas juveniles con síndrome del ovario poliquístico (SOPQ), restableció la ovulación por parte del ovario inervado, aún cuando la concentración de NA fue normal.

Para probar que el SOPQ no es únicamente el resultado de una mayor actividad de las fibras catecolaminérgicas, sino que también el VIP está involucrado en el desarrollo de esta patología, en el presente trabajo se diseñó un modelo en el cual se evaluó el inicio de la pubertad y la primera ovulación, así como la capacidad esteroidogénica y ovulatoria del ovario y la concentración de gonadotropinas en ratas que recibieron una dosis de VE y que fueron denervadas con guanetidina (GTD) antes o después de la administración del VE.

Los resultados mostraron que el tratamiento con VE resulta en la elevación de la concentración de estradiol (E_2) y progesterona (P_4), que se acompaña del adelanto del inicio de la pubertad y del primer estro en comparación con su grupo testigo. El incremento en la concentración de esteroides se amplificó cuando los animales fueron denervados antes o después de la inducción del SOPQ.

Los animales que fueron tratados con VE presentaron bloqueo en la ovulación, mientras que aquellos que fueron posteriormente denervados y que ovularon liberaron un número normal de ovocitos.

La concentración de gonadotropinas en los animales tratados con VE-GTD disminuyó en comparación con la del grupo con VE (FSH= 5.10 ± 0.42 vs 7.95 ± 0.67 ng/ml; LH= 0.73 ± 0.18 vs 1.15 ± 0.29 ng/ml).

En los animales denervados con GTD se registró elevación en la concentración de estradiol (E_2) (GTD= 35.21 ± 2.44 pg/ml vs SS= 20.97 ± 0.77 pg/ml) y aumento en la cuota ovulatoria (6.0 ± 0.4 vs 4.1 ± 0.48). Cuando los animales además de la denervación fueron tratados con VE, la concentración de estradiol y progesterona (P_4) aumentó considerablemente (E_2)= 243.00 ± 63.15 pg/ml vs 35.21 ± 2.44 pg/ml, progesterona (P_4)= 9.59 ± 1.91 ng/ml vs 4.27 ± 0.37 ng/ml, el número de ovocitos liberados y la concentración de la hormona folículo estimulante (FSH) disminuyó en comparación con el grupo tratado con GTD (6.03 ± 0.43 ng/ml vs 8.14 ± 0.92 ng/ml).

Dado que en los animales con SOPQ la denervación catecolaminérgica por la administración de GTD resultó en un incremento de la concentración de estradiol y progesterona mayor a la que se observó con GTD o VE, se apoya la idea de que la inervación VIPérgica estimula la esteroidogénesis.

Con los resultados obtenidos podemos concluir que VIP modula de manera estimuladora en el desarrollo del SOPQ.

INTRODUCCIÓN

El SOPQ es uno de los desórdenes endocrinos más comunes que afectan a las mujeres en edad reproductiva y es la causa más frecuente de hiperandrogenismo y oligomenorrea (irregularidades en el ciclo menstrual). Este trastorno tiene un fuerte impacto en la sociedad debido a que se encuentra estrechamente ligado a enfermedades metabólicas como la diabetes tipo II, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa o hipertensión arterial que frecuentemente derivan en obesidad (Yen, 2001).

Las mujeres con este padecimiento presentan disfunción ovulatoria que se caracteriza por anovulación crónica en respuesta a la hipersecreción de la hormona luteinizante (LH) y de los andrógenos (Tsilchorozidou y col., 2004). Se piensa que la elevación en los pulsos y frecuencia de la LH se debe al aumento en la sensibilidad de la hipófisis a la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), o al aumento en la secreción de ésta a nivel hipotalámico (Hayes y col., 1998).

El incremento en la concentración de estrógenos ejerce un efecto estimulador sobre la secreción de GnRH y LH, que aunado a la disminución de progesterona dada por la ausencia de ovulación, contribuyen a los desórdenes endócrinos que caracterizan al síndrome (Tsilchorozidou y col., 2004).

En la rata la administración de una dosis de VE, induce un estado anovulatorio con características endocrinológicas y de morfología ovárica similar a las de mujeres con SOPQ (Barria y col., 1993). Esta respuesta se atribuye al incremento en la actividad de los nervios simpáticos, que se traduce en el aumento de la concentración de NA ovárica y reducción de los receptores β -adrenérgicos (Lara y col., 1993) o al incremento en la síntesis del factor de crecimiento neural (NGF) y de su receptor de baja afinidad p75 NGFR en el ovario (Lara y col., 2000).

Dado que en estudios previos se demostró que la sección unilateral del NOS disminuye la concentración de NA, pero no es suficiente para promover la

ovulación por parte del ovario denervado (Linares, 2006), en el presente estudio se analizó la participación de la inervación VIPérgica que llega al ovario por el NOS en el desarrollo del SOPQ.

MARCO TEÓRICO

La rata hembra es utilizada como modelo experimental debido a su fácil manejo, su rápido crecimiento y a su alta tasa de reproducción. El estudio del desarrollo puberal de la rata ha proporcionado datos aplicables a otras especies. Se ha demostrado cierta similitud entre la rata y el humano en el patrón de secreción de GnRH y gonadotropinas, en el desarrollo folicular ovárico y en la participación de la hormona de crecimiento (GH) en el inicio de la pubertad (Becu-Villalobos y Lacau-Mengido 1990).

Desarrollo Posnatal de la Rata Hembra

El periodo gestacional de la rata es de 22 a 23 días, la primera ovulación se presenta de los 35 a 45 días de edad lo que depende de la cepa. En las hembras la única señal externa de inicio de la pubertad es la canalización vaginal, la cual permanece completamente cerrada hasta ese momento y ocurre en respuesta a la estimulación estrogénica (Ojeda y Urbanski, 1988).

Ojeda y colaboradores (1980) mostraron que durante el desarrollo de la rata hembra se producen una serie de cambios morfológicos y fisiológicos en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, los que han permitido dividir las etapas del desarrollo prepuberal en cuatro periodos postnatales:

◆ *Neonatal* – se extiende desde el nacimiento al día 7 de vida y se caracteriza por la insensibilidad de los ovarios a las gonadotropinas. Hay una alta concentración sérica de la α -fetoproteína, la cual se une a los estrógenos tornándolos biológicamente inactivos. Al final de esta etapa, en el ovario se forman los receptores a gonadotropinas lo que permite se inicie la actividad esteroidogénica (Becu-Villalobos y Lacau-Mengido 1990).

◆ *Infantil* – comprende del día 8 al día 21 de vida. Esta etapa se caracteriza porque en el plasma las concentraciones de FSH son altas y por la presencia de picos de secreción esporádicos de la LH. Ambas hormonas disminuyen a partir del día 15 y la α -fetoproteína desaparece, lo que favorece la retroalimentación

negativa del estradiol sobre la secreción de gonadotropinas (Becu-Villalobos y Lacau-Mengido 1990).

◆ *Juvenil* – Esta etapa transcurre del día 22 al 30 de vida. La secreción de LH es en forma pulsátil y por parte del ovario hay una mayor actividad esteroidogénica (Becu-Villalobos y Lacau-Mengido 1990).

◆ *Peripuberal* – Inicia alrededor del día 30 de vida y termina antes del inicio de la pubertad. En el ovario el número de receptores a FSH y LH es máximo, lo que se traduce en una mayor respuesta esteroidogénica. Por ello aumentan las concentraciones plasmáticas de estradiol, progesterona y testosterona; esta última, responsable de la canalización vaginal. Las altas concentraciones de estrógenos estimulan la secreción de la GnRH por el hipotálamo lo que induce el incremento en la liberación de gonadotropinas y la primera ovulación (Becu-Villalobos y Lacau-Mengido 1990) (Figura 1).

◆ *Pubertad* – En la rata hembra desde el nacimiento hasta la eclosión puberal transcurren aproximadamente entre 35 y 40 días. A partir de este momento el animal comienza a ser fértil, se incrementa la concentración de GnRH en la sangre y la consecuente actividad gonadal (Goldman, 1981). Los esteroides ováricos (testosterona, estradiol y progesterona) inhiben a nivel hipofisario, la secreción de gonadotropinas. La LH, de ser secretada en forma de picos esporádicos, pasa a ser secretada en forma pulsátil y circadiana. Este perfil de secreción logra un incremento en las concentraciones séricas de estradiol y progesterona. Cuando el ovario es capaz de secretar estradiol en concentraciones de suficiente magnitud y por un tiempo sostenido, ocurre el primer pico preovulatorio de LH. La apertura vaginal ocurre generalmente el día posterior a los picos preovulatorios de gonadotropinas y los frotis vaginales muestran células correspondientes a un primer estro (Becu-Villalobos y Lacau-Mengido 1990) (Figura 1).

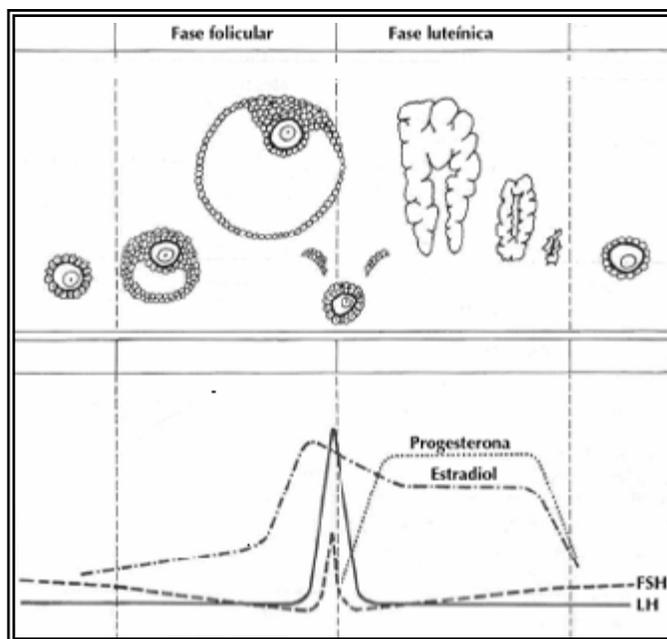


Figura1. Esquema que muestra la relación entre la concentración de hormonas esteroides y gonadotropinas en el momento de la ovulación. Modificado de Usandizaga y De la Fuente, 1997).

Eje Hipotálamo- Hipófisis- Ovario

Las funciones ováricas son reguladas por señales neuroendócrinas que se generan en diferentes regiones del sistema nervioso central e integradas por el *hipotálamo*, que secreta la GnRH, la cual es transportada mediante el sistema porta hipotálamo-hipofisiario hasta la *hipófisis* donde estimula la secreción de la LH y FSH; las que actúan en el *ovario* en donde regulan el crecimiento y maduración de los folículos, además de la secreción de hormonas esteroides. (Tresguerres, 2003). (Figura 2).

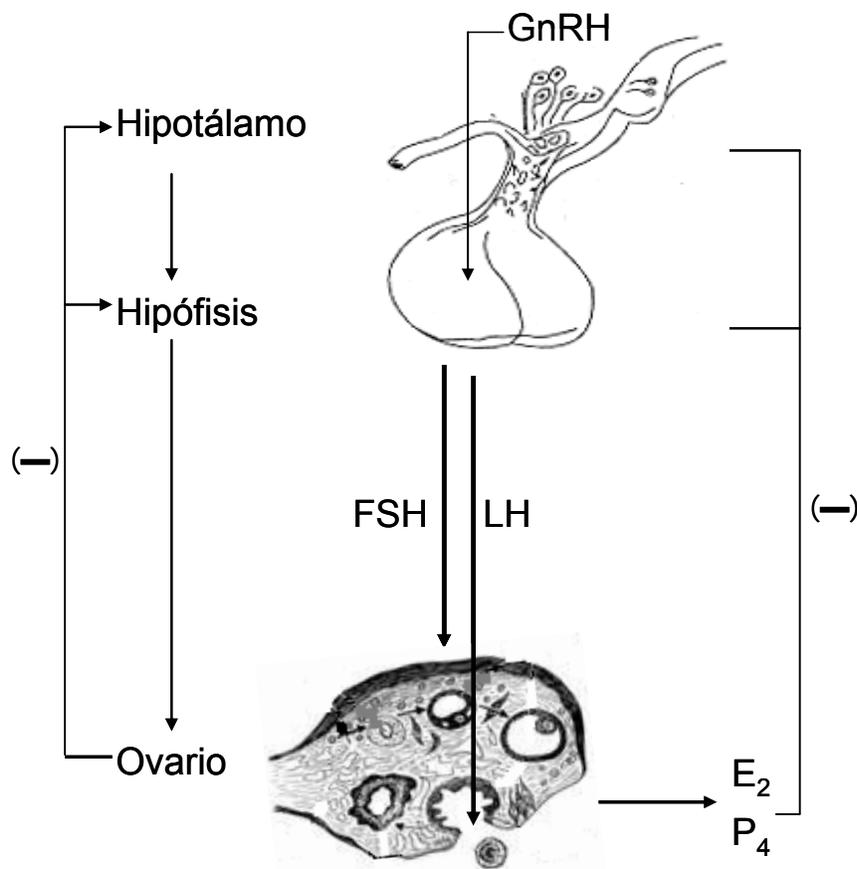


Figura 2. Representación esquemática de la regulación de las funciones ováricas controladas por el eje Hipotálamo-Hipófisis- Ovario.

El Ovario

El ovario está compuesto por tres zonas: la **corteza**, que contiene folículos en diferentes estados de maduración que a su vez contienen los ovocitos. Entre los folículos se encuentra el tejido conectivo de sostén y las células intersticiales, ambos forman el *estroma*. La **médula** que contiene una rica red vascular y tejido conectivo y el **hilio**, donde se encuentran la arteria y vena ovárica, los vasos linfáticos, las terminales nerviosas y las células intersticiales. El ovario está constituido por tres compartimientos o unidades endócrinas: el tejido intersticial, los folículos y el cuerpo lúteo (Tresguerres, 2003).

Desarrollo folicular

El folículo ovárico constituye la unidad anatómico funcional del ovario, tiene dos funciones básicas: el desarrollo y maduración del oocito y la secreción de hormonas esteroideas. En los mamíferos, durante la diferenciación gonadal, se forma una cantidad determinada de células que darán origen a los **folículos primordiales**, cada uno contiene un óvulo inmaduro con una única capa de células de la granulosa rodeadas por la membrana basal. La FSH y LH de la adenohipófisis estimulan el crecimiento de los folículos por el aumento de tamaño del ovocito y la proliferación de las capas de células de la granulosa que sintetizan y secretan mucopolisacáridos con lo que originan un halo traslúcido que rodea al ovocito conocido como zona pelúcida; en este momento reciben el nombre de **folículos primarios** (Guyton y Hall, 2001; Yen, 2001). (Figura 3).

Los folículos continúan su crecimiento, las células de la granulosa secretan un líquido que contiene gran cantidad de estrógenos, dicho líquido se concentra en una cavidad que se forma entre las células de la granulosa llamado antro; las células de la granulosa continúan proliferando y desplazan al ovocito a una posición excéntrica rodeado por dos o tres capas (cúmulo ovóforo). Las células del estroma precursoras de la teca alcanzan la membrana basal y se disponen en capas paralelas formando una estructura de células muy alargadas que rodea completamente al folículo; así se forma la teca interna. Estas desarrollan la capacidad de secretar hormonas esteroideas. Del estroma proliferan otras células que rodean a la teca interna y que junto con sus vasos sanguíneos forman la teca externa. Cuando el folículo ha adquirido estas características recibe el nombre de **folículo Secundario**. (Ganong, 2000; Tresguerres, 2003). (Figura 3).

El **folículo terciario o preovulatorio** aumenta su tamaño debido a una mayor producción de líquido antral, el cúmulo ovóforo disminuye, la capa de células de la granulosa se estira y adelgaza y la vascularización de la teca interna aumenta. La membrana basal en la superficie del ovario sufre un proceso

proteolítico y el ovocito es liberado a la cavidad peritoneal, en ese momento ocurre la ovulación. (Ganong, 2000; Tresguerres, 2003). (Figura 3).

El ovocito es recogido por las fimbrias de los extremos del oviducto donde está en posibilidad de ser fecundado. Aquellos folículos que no adquirieron dominancia degeneran por un proceso llamado atresia (Ganong, 2000; Tresguerres, 2003).

En el momento de la ovulación el folículo roto se llena de sangre formando el **cuerpo hemorrágico**. Las células de la teca y de la granulosa proliferan y cambian para sustituir el coágulo sanguíneo por células lúteas amarillas y abundantes en lípidos para formar el **cuerpo lúteo** que produce estrógenos y progesterona. Si el óvulo es fecundado, el cuerpo lúteo persiste y sus secreciones efectúan los cambios necesarios en el útero y el metabolismo de la hembra para el soporte del feto hasta después del parto. En ausencia de fecundación disminuye la producción de progesterona y estrógenos, se inicia la degeneración del cuerpo lúteo (Ganong, 2000). El número de cuerpos lúteos presentes en el ovario depende del número de ovulaciones, que a su vez varía según la especie (Tresguerres, 2003). En la mujer el cuerpo lúteo se reemplaza por tejido cicatrizal para formar el **corpus albicans**, mientras que en la rata experimenta regresión que coincide con la ruptura de los vasos sanguíneos y la aparición de áreas en degeneración por infiltración de leucocitos (Freeman, 1994) (Figura 3).

Atresia Folicular

La hembra de los mamíferos nace con un número finito de folículos, de los cuales sólo una cantidad es seleccionada para crecer y madurar hasta alcanzar el tamaño preovulatorio, mientras que la otra parte degenera y persiste como una masa intersticial la cual se fragmenta en pequeños grupos de células que se difunden en la médula. Esta degeneración y muerte folicular es llamada **atresia** y puede ocurrir en cualquier estado del desarrollo folicular, desde que son pequeños (primordiales) hasta maduros (antrales). Se desconocen todos los factores que

llevan a los folículos a ser atrésicos por lo que todavía este fenómeno es motivo de estudio (Devine y col., 2000).

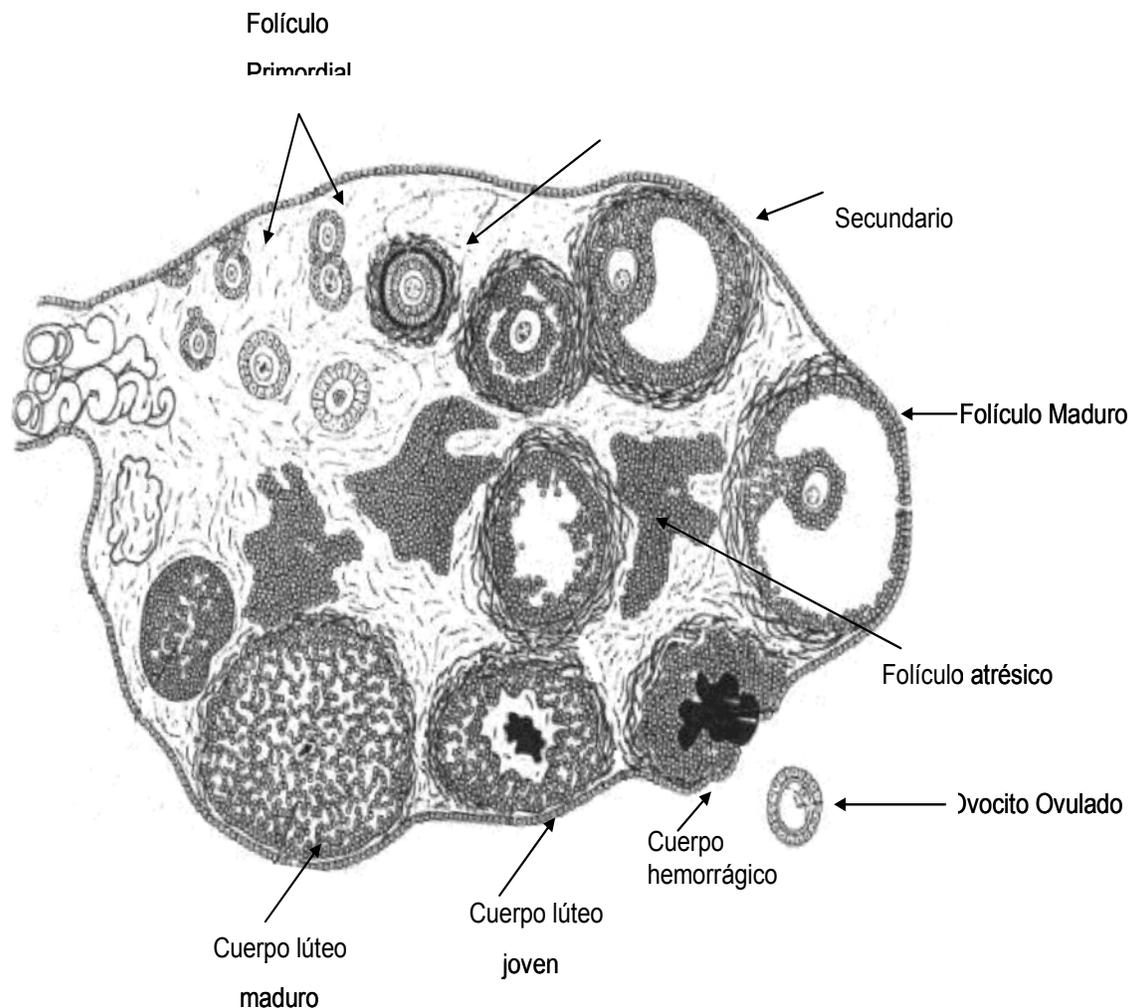


Figura 3. Esquema que muestra las diferentes etapas del desarrollo folicular. Modificado de Ganong, 2000.

Greenwald y Roy, en 1994 describieron las alteraciones morfológicas que ocurren durante el proceso de atresia dividiendo a ésta en:

Tipo A- involucra cambios necróticos en la zona pelúcida del oocito y alteraciones secundarias en las células de la granulosa. Predomina en folículos secundarios.

Tipo B- es tipificada por cambios degenerativos en las células de la granulosa. Sólo ha sido encontrado en folículos terciarios.

Se han descrito tres fases progresivas que llevan a la degeneración del folículo:

Etapa I. Mas del 20% de las células de la granulosa presentan picnosis y fragmentación en las células adyacentes a la cavidad antral. La membrana folicular permanece intacta.

Etapa II. Se produce una marcada reducción de síntesis de DNA, las células picnóticas son abundantes, las células de la granulosa detienen su proliferación, se rompe la membrana basal y el folículo es invadido por leucocitos.

Etapa III. El porcentaje de picnosis disminuye a sólo 5%. Se incrementa la cantidad de enzimas lisosomales como la fosfatasa y aminopeptidasa, además de cambios en los organelos citoplásmicos, incrementa el número de vacuolas, pérdida de microvellosidades en la zona pelúcida y finalmente segmentación del oocito (Greenwald y Roy, 1994; Oliver y col., 1999; Devine y col., 2000).

Esteroidogénesis

En el ovario, particularmente en las células de la teca interna y de la granulosa, son sintetizadas tres clases de esteroides: *progesterona*, *andrógenos* y *estrógenos* (Tresguerres, 2003).

Los esteroides son sintetizados a partir del colesterol que se produce a partir de acetato en el interior de las células, o bien es incorporado desde el plasma donde es transportado unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Ganong, 1996).

La biosíntesis de esteroides ováricos se lleva a cabo en las células de la teca y de la granulosa de los folículos ováricos y ejercen su acción en el propio ovario o salen por la circulación sanguínea hacia sus diferentes órganos blancos (Figura 4).

La señal para iniciar la síntesis de esteroides ocurre cuando la LH se une a su receptor localizado en la membrana de las células de la teca interna y estimula una cascada de señalización que genera la síntesis de andrógenos, vía el AMP cíclico como segundo mensajero (Van Voorhis, 1999).

El colesterol, unido a la proteína transportadora StAR, es introducido en la mitocondria del folículo ovárico donde el citocromo P450 rompe la cadena lateral de colesterol y lo convierte a **pregnenolona**. La pregnenolona es metabolizada por dos diferentes enzimas localizadas en el retículo endoplásmico: la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa que la convierte en **progesterona** y la P450 17hidroxilasa (P450c17) la convierte en **dehidroepiandrosterona** y **androstenediona**. Una parte de la androstenediona es convertida inmediatamente a **testosterona** por la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Van Voorhis, 1999). (Figura 4 y 5).

Los andrógenos sintetizados en las células de la teca se difunden hasta las células de la granulosa quienes tienen receptores a FSH y se estimula la actividad de la 17 β -hydroxysteroide deshidrogenasa que intervienen en la conversión de la androstenediona a **testosterona** o a **17 β -estradiol** por la enzima aromatasa P450 (Van Voorhis, 1999, Yoshinaga 1999). (Figura 4 y 5).

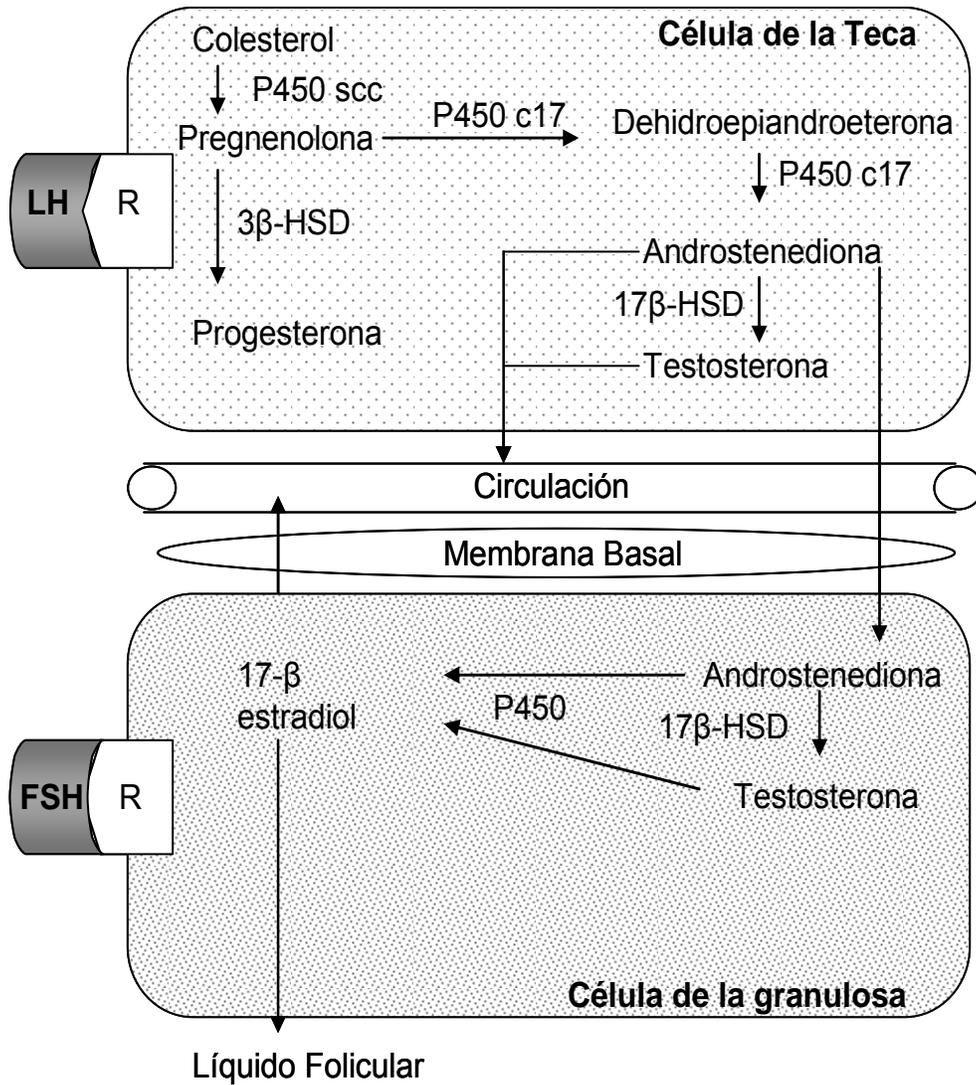


Figura 4. Esquema de la biosíntesis de hormonas esteroides en las células de la teca y de la granulosa ováricas. Modificado de Van Voohris, 1999.

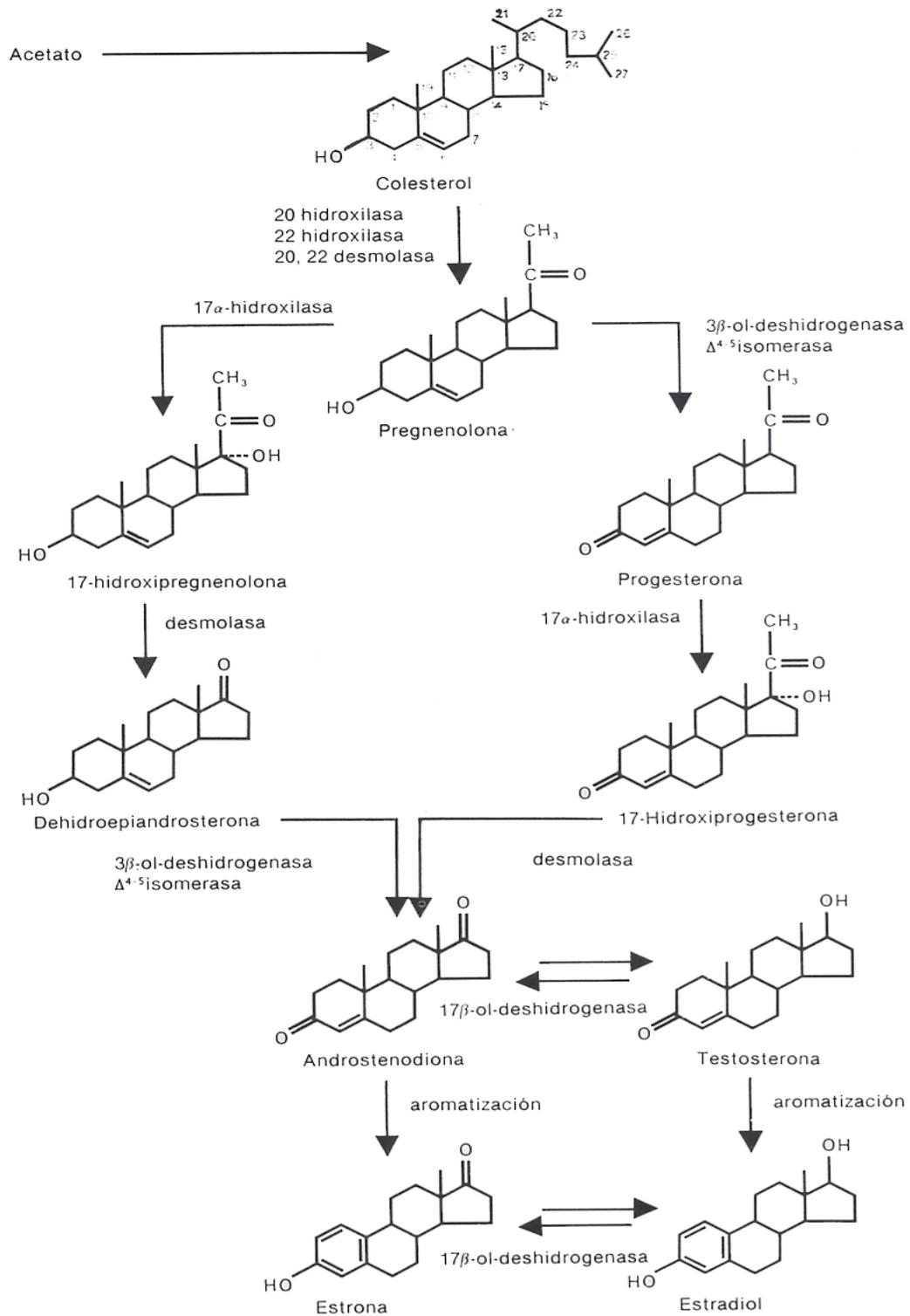


Figura 5. Rutas biosintéticas de la esteroidogénesis. Tomado de Van Voorhis, 1999.

Ciclo Estral en la Rata Prepúber

Se denomina ciclo estral a una cascada de eventos hormonales y conductuales que son progresivos, altamente sincronizados y repetitivos. En la rata tiene una duración de 4-5 días y se interrumpe sólo en caso de preñez o pseudopreñez. El ciclo se mantiene bajo fotoperiodo controlado y se divide en las siguientes fases que pueden ser identificadas mediante la observación de frotis vaginales.

Fases del ciclo estral:

- ❖ *Anestro* –se presenta en animales alrededor de los 30 días de edad, su útero es pequeño, no se detecta líquido intrauterino y la vagina permanece cerrada aún.
- ❖ *Proestro* – en el proestro temprano la vagina está cerrada, el útero se alarga y hay presencia de fluido. En el proestro tardío el útero es largo y balonado, lleno de fluido; muchos animales en esta etapa presentan vagina cerrada. Si ya hay apertura vaginal se observan en los frotis vaginales células epiteliales nucleadas, tiene una duración de 12 horas. Es la fase de mayor crecimiento folicular en el ovario; la concentración de estrógenos es máxima, lo que estimula la secreción de GnRH y ésta estimula la aparición del pico preovulatorio de gonadotropinas
- ❖ *Estro* – generalmente corresponde al día de apertura vaginal, en esta etapa se da la ovulación, la pared vaginal es gruesa y en los frotis vaginales se observan células epiteliales cornificadas. Tiene una duración aproximada de 36 horas.
- ❖ *Metaestro*- es la fase que sucede a la ovulación, en los frotis vaginales se observan predominantemente leucocitos.
- ❖ *Diestro* –Tiene una duración de 48 horas en la cual se observan leucocitos y algunas células anucleadas. En esta etapa el cuerpo lúteo secreta P_4 la cual participa de la preparación del útero, para una posible implantación en caso de producirse la fecundación del óvulo (Feder, 1981; Ojeda y col., 1988; Freeman, 1994).

El ciclo estral está bajo el control del eje hipotálamo-hipófisis-ovario y se repite si la fertilización no ocurre (Kilen y Schwarts, 1999).

Inervación del Ovario

Los ovarios de los mamíferos están inervados por fibras simpáticas y sensoriales además de un pequeño componente parasimpático (Burden y col, 1978). La inervación simpática está compuesta por fibras que transportan Neuropeptido Y (NPY), aquellas que transportan VIP y por las que contienen catecolaminas (principalmente NA). En la inervación Sensorial participan fibras que contienen el Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina (CGRP) y Sustancia P (SP) así como VIP (Dissen y Ojeda 1999).

Malamed y col. (1992) mostraron en un estudio realizado en ratas, que la inervación del ovario es un evento que ocurre durante la vida fetal, que antecede la iniciación postnatal de la foliculogénesis. Por inmunohistoquímica observaron que dichas fibras son de naturaleza catecolaminérgica, y que son inmunoreactivas a la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de catecolaminas.

Son dos los nervios simpáticos que inervan los ovarios, uno de ellos es el **Plexo Ovárico (PO)** que en la rata corre a lo largo de la arteria ovárica (Figura 6) e inerva principalmente la vasculatura del ovario. Por sus fibras viajan la SP, el CGRP (neurotransmisores de naturaleza sensorial), NA y NPY (neurotransmisores de naturaleza simpática). Las fibras sensoriales derivan del ganglio nodoso y del ganglio de la raíz dorsal; entran al cordón espinal en el segmento torácico T -10 y el segmento lumbar L2-L4 (Burden y col., 1978; Dissen y Ojeda. 1999).

La otra vía es aportada por el **NOS** que está asociado al ligamento suspensorio, el cual sujeta al ovario, al oviducto y se continúa a la musculatura longitudinal del útero (Lawrence y Burden, 1980) (Figura 6). El NOS hace conexión en el ganglio celíaco, el mesentérico y nervios espláncnicos lumbares e inerva principalmente los compartimientos que presentan actividad secretora en la glándula como las células del tejido intersticial y la teca interna de los folículos. La

porción simpática de la innervación ovárica se origina en el segmento torácico T-11 al lumbar L-4. Los neurotransmisores que viajan por NOS son NA y VIP (Aguado y Ojeda, 1984; Dissen y Ojeda, 1999).

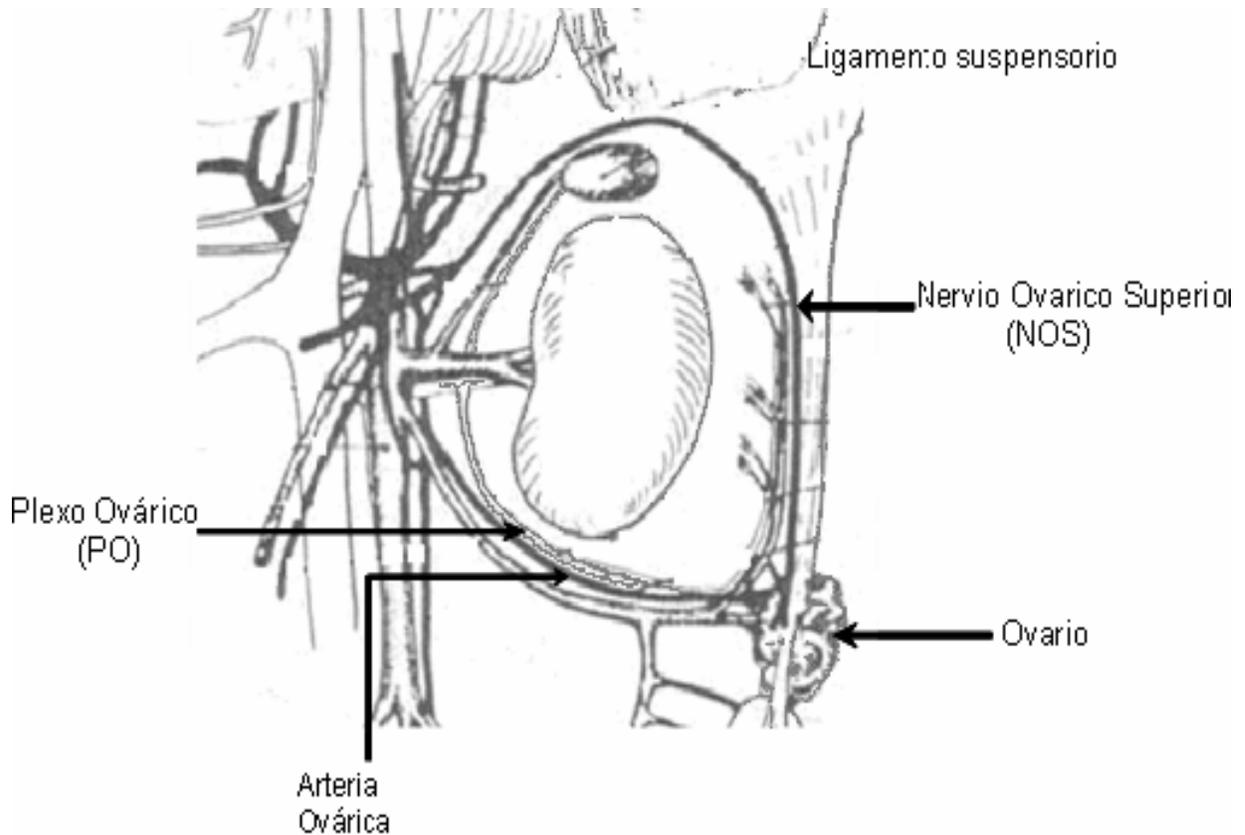


Figura 6. Esquema que muestra la innervación extrínseca del ovario que llega por Nervio Ovárico Superior (NOS) y Plexo Ovárico (PO). Modificado de Lawrence y Burden 1980.

Neurotransmisores que Viajan por el Nervio Ovárico Superior

◆ Noradrenalina

La noradrenalina es una catecolamina, que se sintetiza en neuronas postganglionares simpáticas y en células cromafines de la médula adrenal. Tiene la función de neurotransmisor y de hormona. Las otras catecolaminas son la adrenalina (A) y la dopamina (DA). La síntesis de NA es a partir de la fenilalanina (Figura 7) e involucra los siguientes pasos:

- 1) Conversión de la fenilalanina a tirosina por la hidroxilación del anillo fenólico en la tercera posición por la enzima fenilalanina hidroxilasa.
- 2) La tirosina es transportada al interior de la célula donde es transformada a hidroxifenilalanina (DOPA) por la enzima TH (reactivo limitante en la biosíntesis de NA).
- 3) DOPA es descarboxilada a DA por la enzima DOPA descarboxilasa.
- 4) DA es hidroxilada por la enzima dopamina β -hidroxilasa (DBH) por adición de un grupo $-OH$ a la cadena de carbono en el carbono adyacente al anillo fenólico.
- 5) En células cromafines de la médula adrenal o en neuronas postganglionares la DA es convertida a NA (Cryer, 1981; Hadley, 2000).

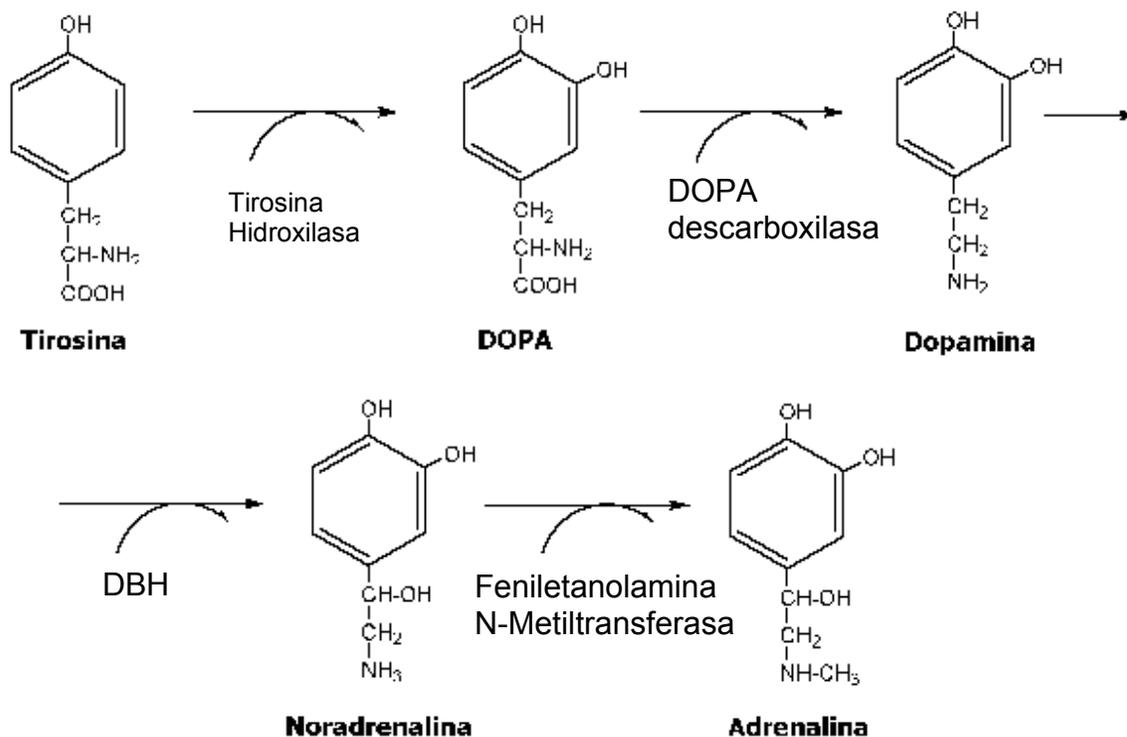


Figura 7. Ruta de síntesis de Noradrenalina (Hadley, 2000).

La NA llega a la mayoría de las fibras simpáticas postganglionares. Interviene en la esteroidogénesis ovárica por activación de receptores β_2 -adrenérgicos quienes estimulan a las células de la granulosa y luteales a producir progesterona y a las células tecales a producir andrógenos (Aguado y Ojeda, 1984; Dissen y Ojeda, 1999). También se ha encontrado relación estrecha entre NA y gonadotropinas. Ferruz y col. (1991) mostraron que en la rata, durante la etapa de diestro, cuando la concentración de gonadotropinas es baja, el número de receptores β -adrenérgicos es menor, la concentración de NA encontrada en el ovario también es baja y se incrementa durante el proestro y estro, cuando se da un aumento en las concentraciones de FSH y LH y la cantidad de receptores β -adrenérgicos es mayor.

◆ Peptido Intestinal Vasoactivo (VIP)

El VIP es un neuropéptido identificado en las fibras nerviosas ováricas que se localizan predominantemente en el tejido intersticial (Dees y col. 1986). En las células de la granulosa del ovario este péptido es un potente estimulador de la secreción de P_4 y E_2 (Advis y col., 1989, Parra y col. 2007). En las células de la granulosa en cultivo, el VIP induce la expresión del gen que codifica la síntesis del receptor para la FSH, de tal modo que induce el crecimiento folicular bajo la estimulación de la FSH (Dees y col., 1986; Mayerhofer y col., 1997; Dissen y Ojeda. 1999). Advis y col (1989) mostraron que la concentración del péptido es alta en la rata en la etapa neonata, infantil y juvenil. Cuando se aproxima la pubertad y se da el pico preovulatorio de gonadotropinas, la concentración de VIP disminuye significativamente.

Efectos de la Denervación Simpática Sobre las Funciones Reproductivas

La participación de la inervación simpática en la regulación de las funciones ováricas se ha analizado al eliminar la información neural que llega al ovario por métodos quirúrgicos o farmacológicos.

En la rata prepúber la eliminación de la información simpática por la sección bilateral del NOS no modifica el inicio de la pubertad, ni la cuota ovulatoria; pero hay una marcada disminución en el contenido de NA ovárica y aumento en el número de receptores β -adrenérgicos (Aguado y Ojeda, 1984). Cuando se realiza este tipo de denervación en la rata adulta no se modifica la ovulación espontánea (Chávez y col., 1991), ni la inducida por la administración del suero de yegua preñada (Selstam y col. 1985). Sin embargo, cuando en la rata prepúber se realiza la sección unilateral del NOS, el número de ovocitos liberados por el ovario denervado disminuye significativamente y el ovario inervado responde con una ovulación compensadora, lo que hace pensar en la existencia de una comunicación neural entre ambos ovarios (Morales y col., 1993). Estos resultados han permitido sugerir que la información que transcurre por el NOS, modula la

acción de las gonadotropinas en el folículo ovárico. Esta interpretación se ve apoyada por el hecho de que estos animales no responden al estímulo con gonadotropinas (Morales y col., 1998).

Una de las herramientas farmacológicas que se ha utilizado para inducir la denervación simpática es la administración de guanetidina monosulfatada (1-[2-Guanidinoethyl]octahydroazocine) Monosulfate (1:1) $C_{10}H_{22}N_4 \cdot H_2SO_4$. Es un polvo cristalino blanco a blanquecino, poco soluble en agua, algo soluble en alcohol; prácticamente insoluble en cloroformo y solución salina (Franz, 1995). La guanetidina (GTD) es una droga que destruye las fibras simpáticas, al eliminar la noradrenalina de las neuronas adrenérgicas simpáticas posganglionares donde tiene lugar su síntesis, e impide la liberación de la NA que ha sido captada por las terminales nerviosas, de este modo se reduce el aporte de catecolaminas a los receptores adrenérgicos (Franz, 1995). El mecanismo preciso por el cual la GTD ejerce su efecto citotóxico no ha sido totalmente descifrado, sin embargo, a lo largo de su estudio los investigadores han mostrado que la destrucción neuronal que provoca la administración crónica de la droga comienza por la inhibición de la fosforilación oxidativa en las células neuronales y cambios estructurales en las mitocondrias, lo que sugiere que GTD interfiere en el metabolismo de la energía celular (Jonson y col., 1984).

Jonhson y col., (1976) administraron a ratas de una semana de vida la dosis de 50 mg/kg/día de GTD, 5 días a la semana durante tres semanas. Tres días después de iniciado el tratamiento no se observó diferencia en la actividad de la TH en comparación con el grupo control, sin embargo al día 10 disminuyó la actividad de la enzima. En los siguientes días la TH se redujo a concentraciones indetectables. El análisis histológico reveló degeneración gradual de las neuronas simpáticas hasta su total desaparición. En este estudio se demostró que la dosis de GTD produce la máxima destrucción de las fibras simpáticas de manera permanente y además, cuando se administra de manera sistémica no cruza la barrera hematoencefálica.

Lara y col. (1990) observaron que en ratas tratadas en la etapa infantil con 50 mg/kg de p.c. de GTD 5 días a la semana, durante 3 semanas, se presenta disminución en las concentraciones plasmáticas de LH, retraso en la primera ovulación y en la edad del primer diestro, además el examen inmunocitoquímico de los ovarios mostró la eliminación total de las fibras inmunoreactivas a la TH. Todas estas evidencias han llevado a los autores a plantear que la inervación simpática participa en los mecanismos que modulan el inicio de las funciones reproductivas.

En la rata recién nacida la administración de GTD resultó en un retraso en el inicio de la pubertad e incremento en la cuota ovulatoria, mientras que cuando se realizó la denervación en la rata adulta se observó disminución en el número de ovocitos liberados y la citología vaginal fue de diestro constante. Estos resultados llevaron a sugerir a los autores que el papel de la inervación varía con la edad del animal, mientras en la rata adulta modula de manera inhibitoria los mecanismos neuroendócrinos que regulan la ovulación, en el animal prepúber lo hace de manera estimulante (Flores y col., 1990).

Síndrome del Ovario Poliquístico (SOPQ)

En la mujer, el SOPQ es reconocido como la causa más común de infertilidad durante su edad reproductiva, se caracteriza por periodos de anovulación, presencia de quistes foliculares, amenorrea, hiperandrogenismo, concentraciones variables de gonadotropinas circulantes y anormalidades metabólicas. Estas son atribuidas a varias causas: deficiencia en la acción y secreción de la insulina, alteraciones neuroendócrinas que se manifiestan por un aumento en los pulsos de LH, en la síntesis de andrógenos o en el metabolismo del cortisol (Tsilchorozidou y col., 2004, Greiner y col., 2005).

Características del Valerato de estradiol (VE)

El VE, 1,3,5(10)-Estratrieno-3,17 β -diol,17-pentanoato ($C_{23} H_{32} O_3$) es un polvo cristalino, blanco, generalmente inodoro pero puede tener ligero olor a grasa. Es soluble en aceite de ricino, maíz, ajonjolí y cacahuate, metanol, benzoato de benzilo y dioxano; prácticamente insoluble en agua. Se absorbe lentamente en suspensión oleosa inyectada por vía intramuscular, la duración de la acción de la suspensión es de aproximadamente 3 semanas (Gennaro, 1998). El VE se utiliza para inducir el SOPQ en los animales de laboratorio, por ser un estrógeno de larga duración que provoca un cuadro similar al descrito para la mujer, es decir, se observa aciclicidad, anovulación y formación de quistes foliculares (Brawer y col., 1986; Barria y col., 1993).

En ratas la administración de una sola dosis de 2 mg de VE, disuelto en aceite de maíz, resulta en el desarrollo del SOPQ (Brawer y col., 1986; Hemmings y col., 1983; Schulster y col., 1984; Lara y col., 1993; Luza y col., 1995). Se ha propuesto que el síndrome resulta en respuesta al cambio en la homeostasis catecolaminérgica del ovario, que se inicia antes del desarrollo de quistes foliculares y persiste después de la formación de estos; dichos cambios incluyen incremento en el contenido de NA ovárica y disminución de los receptores β -adrenérgicos en las células de la granulosa. Estos cambios se acompañan de anovulación y aciclicidad caracterizada por cornificación vaginal persistente, incremento en las concentraciones plasmáticas de LH y bajas concentraciones de FSH (Hemmings y col., 1983; Schulster y col., 1984; Carriere y col., 1991).

En la rata juvenil, el tratamiento con VE resulta en el aumento de la concentración de NA ovárica cuando llegan a la etapa adulta, además de aciclicidad, elevadas concentraciones de E_2 y presencia de quistes foliculares, condición que se revierte cuando se practica la sección del NOS (Rosa-E-Silva y col., 2003).

En la rata adulta a la que se le ha inducido el SOPQ, la sección bilateral del NOS resulta en una depleción de la concentración de NA ovárica. El 70% de los animales recuperaron el patrón del ciclo estral después de la cirugía. El examen

histológico confirmó que se había producido de manera normal la ovulación; esto se determinó por la presencia de cuerpos lúteos (Barria y col., 1993).

El aumento en la concentración de NA ovárica, en respuesta a la administración de VE ha sido explicado por incremento en el ovario en la síntesis del factor de crecimiento neural (NGF) y de su receptor de baja afinidad p75 NGFR (Lara y col., 2000). Lo anterior contribuye a mantener el estado disfuncional del ovario que se refleja en una alteración del ciclo estral, desarrollo de quistes foliculares, elevación en la concentración de andrógenos y disminución en la capacidad ovulatoria.

Por las evidencias experimentales señaladas anteriormente se ha sugerido que el desarrollo del SOPQ, resulta por una mayor actividad de las fibras simpáticas que arriban al ovario por el NOS (Barria y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003).

Por el NOS llega al ovario tanto NA como VIP y dado que se ha sido descrito que el neuropéptido es capaz de estimular la secreción de estradiol y andrógenos en el ovario (Davoren y Hsueh, 1985; Ahmed y col., 1986) se postula que el VIP podría ser el responsable del incremento de E₂ en ratas tratadas con VE que han desarrollado SOPQ, debido a que en estos animales se observa un aumento en la concentración de E₂ y andrógenos en comparación con la del grupo testigo (Parra y col, 2007).

Dentro de los tratamientos farmacológicos que ha desarrollado la medicina para remediar la ausencia de ovulación se encuentra la administración de citrato de clomifeno que es un modulador selectivo de los receptores a E₂ que actúa bloqueando la acción inhibitoria del E₂ sobre el eje hipotálamo-hipófisis; así la LH retorna a concentraciones normales y la FSH se incrementa para inducir el crecimiento folicular y posteriormente la ovulación. Algunas pacientes que son resistentes al citrato de clomifeno pueden ser tratadas con Letrozol, que actúa disminuyendo la conversión de androstenediona y testosterona a estrógenos en el proceso de esteroidogénesis; así estimula la secreción de FSH y el crecimiento folicular (Atay y col., 2006).

En modelos experimentales se ha utilizado la electroacupuntura como un método no farmacológico para revertir los efectos del SOPQ. Está fundamentado en la reacción provocada por estímulos eléctricos a nivel cutáneo que viajan por los nervios periféricos hasta la médula espinal y al sistema nervioso central. En respuesta a las repetidas sesiones de electroacupuntura de baja frecuencia se observa la restauración del ciclo estral y la inducción de la ovulación, así como reducción en la síntesis de NFG y de receptores β -adrenérgicos, lo cual indica que el tratamiento es efectivo en la modulación de la actividad nerviosa simpática (Stener-Victorin y col., 2005; 2008).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El desarrollo del SOPQ ha sido atribuido a un defecto neuroendócrino que se traduce en alteraciones en la secreción pulsátil de LH y en la síntesis de andrógenos o por una mayor actividad de las fibras simpáticas que inervan el ovario.

El ovario recibe información simpática vía NOS, por donde llegan al ovario VIP y NA, dos neurotransmisores involucrados en la esteroidogénesis ovárica. El estudio de la participación de la inervación sobre las funciones ováricas ha sido dilucidado utilizando modelos de denervación quirúrgica o farmacológica.

Se ha postulado que SOPQ es el resultado de la hiperactividad de las fibras catecolaminérgicas, como lo demostró el grupo de Lara, quienes al administrar el VE observaron una mayor concentración de NA en el ovario y disminución del número de receptores β - adrenérgicos en las células de la granulosa.

En estudios previos de nuestro laboratorio, se indujo el SOPQ a ratas infantiles por la administración de una dosis de VE. Al llegar a la etapa juvenil se realizó la sección unilateral del NOS. En estos animales se observó que la ovulación se restableció por parte del ovario inervado, aún cuando la concentración de NA ovárica fue semejante a la de un animal sin denervación. Estas evidencias nos llevaron a pensar que el SOPQ no es únicamente el resultado de una mayor actividad de las fibras noradrenérgicas, sino que posiblemente también estén involucradas las que transportan VIP y que estarían regulando la respuesta esteroidogénica y la ovulación.

Para probar lo anterior, se diseñó un modelo en el cual se eliminaron las fibras simpáticas que transportan información catecolaminérgica, por medio de la administración de GTD, dejando intactas aquellas que transportan VIP; esta denervación se llevó a cabo antes o después de la inducción del SOPQ, con el fin de evaluar la participación de la inervación en el desarrollo del síndrome.

HIPÓTESIS

Si en la rata con SOPQ la respuesta ovulatoria por parte del ovario inervado esta regulada por el VIP y no sólo por NA, entonces, al eliminar las fibras noradrenérgicas y permanecer intactas las fibras VIPérgicas será mayor la capacidad esteroidogénica del ovario y no se restablecerá la respuesta ovulatoria.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la respuesta ovulatoria y esteroidogénica del ovario de la rata con denervación catecolaminérgica, realizada antes o después de la inducción del síndrome del ovario poliquístico.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ☞ Analizar la participación de la innervación VIPérgica en la rata con denervación catecolaminérgica, realizada antes o después de la inducción del síndrome del ovario poliquístico, en el inicio de la pubertad y la primera ovulación.
- ☞ Estudiar en la rata con denervación catecolaminérgica, realizada antes o después de la inducción del síndrome del ovario poliquístico, la capacidad esteroidogénica del ovario.
- ☞ Analizar el efecto de la denervación catecolaminérgica realizada antes o después de la inducción del SOPQ sobre la concentración sérica de gonadotropinas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras recién nacidas de la cepa CII-ZV mantenidas en condiciones controladas de luz y oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 hrs). En el día del nacimiento (día cero) se colocaron en grupos de 6 individuos (5 hembras y un macho) con la madre hasta el día del destete (día 21), a partir de entonces tuvieron libre acceso a la comida y agua hasta el día de la autopsia. En todos los casos se siguió lo establecido por la Ley Mexicana de Protección Animal para el uso de animales de experimentación.

Los animales fueron divididos en los siguientes grupos experimentales, cada uno de ellos formado por 10-12 individuos.

Administración de Guanetidina (GTD)

A los 7 días de edad fueron inyectadas intraperitonealmente con 20 mg/Kg p.c. de monosulfato de Guanetidina (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo. USA), disuelta en solución salina al 9%. La inyección se realizó entre las 9:00 y 11:00 am, 5 días a la semana con dos días de descanso hasta el día del primer estro vaginal, siguiendo el esquema de administración de Lara y col. (1990).

Administración de valerato de estradiol (VE)

Hembras de 14 días de edad se inyectaron intraperitonealmente con 2 mg de VE (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo. USA) disuelto en 0.1 ml de aceite de maíz.

Con la finalidad de analizar la participación de la inervación VIPérgica en el desarrollo del SOPQ, se procedió a eliminar la inervación noradrenérgica y dejar las que contienen VIP en dos momentos, antes o después de la inducción del síndrome. Para ello se diseñó los siguientes grupos experimentales

Administración de guanetidina más valerato de estradiol (GTD- VE)

Del grupo de animales tratados al día 7 con GTD, se separó un grupo, el cual fue inyectado con una dosis de 2 mg/0.1ml de VE en el día 14 de vida (tal y como fue administrado por Rosa- Silva y col., 2003 y Linares, 2006) y se continuó

con la administración de GTD hasta el momento de que presentaron el primer estro vaginal.

Administración de valerato de estradiol más guanetidina (VE- GTD)

Otro grupo de animales se inyectó con 2 mg/0.1 ml de VE al día 14 de vida, 30 minutos después se administró GTD en una dosis de 20 mg/Kg p.c. 5 días a la semana hasta el día del primer estro vaginal.

Grupos testigo

Estos animales se inyectaron:

- el día 7 de vida, con solución salina (SS) al 9%, 5 días a la semana hasta el día del primer estro vaginal.
- el día 14 de vida con 0.1 ml de aceite de maíz (AM).
- Grupo Testigo Absoluto (TA): animales intactos

Se realizaron revisiones de apertura vaginal en los animales tratados con VE a partir del día de inyección y en los demás a partir del día 30 de vida. El día de la canalización vaginal se consideró como el día del inicio de la pubertad, en ese momento se inició la toma de frotis vaginales diariamente entre las 9:00 y las 10:00 hrs. hasta el día del primer estro, momento en el cual fueron sacrificados.

Procedimiento de Autopsia

Todos los animales fueron sacrificados entre las 10:00 y las 12:00 hrs. por decapitación, la sangre del tronco se colectó en tubos de ensaye y se dejó coagular durante 30 minutos, posteriormente se centrifugó a 3500 r.p.m. por 15 minutos; el suero obtenido se separó en 4 alícuotas de 150 µl que se mantuvieron a -20°C hasta el momento de la cuantificación de hormonas esteroides (progesterona y estradiol) y protéicas (FSH y LH). El útero y ovarios fueron disecados y pesados en balanza analítica, los oviductos se observaron en un microscopio estereoscópico para realizar el conteo de ovocitos.

CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES Y GONADOTROPINAS

La cuantificación de P₄ y 17β-estradiol se realizó por radioinmunoanálisis (RIA) de fase sólida, con un Kit Coat-A-Count (Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA) para lo cual, se adicionó 100 µl de muestra problema a tubos de polipropileno que ya contenían el anticuerpo específico anti-progesterona-I¹²⁵ y anti-estradiol-I¹²⁵ respectivamente, además de 1ml de hormona radioactiva I¹²⁵. La mezcla se agitó por un minuto y se incubó durante tres horas a temperatura ambiente, después se decantó y finalmente se determinó la concentración de hormonas en función de las cuentas por minuto y de una curva de calibración con la ayuda de un contador de rayos gamma modelo Cobra 5005, Packard TM. Las concentraciones se expresaron en pg/ml para 17β-estradiol y en ng/ml para P₄.

Los coeficientes intra e interespecíficos fueron:

Hormona	Intra	Inter
Progesterona (P ₄)	8.35	9.45
Estradiol (E ₂)	8.12	9.28

Los puntos de la curva de calibración para P₄ fueron: 0.1, 0.5, 2.0, 10.0, 20.0 y 40 ng/ml. Los de la curva para E₂ fueron: 10, 20, 50, 75, 150, 250 y 500 pg/ml.

La medición de FSH y LH se realizó por RIA de doble anticuerpo: se procedió de la siguiente manera: a 100 µl de suero problema se le añadieron 100 µl de hormona marcada con I¹²⁵, posteriormente se le adicionó el anticuerpo de suero de borrego para LH (rLH-RP2) o para FSH (rFSH-RP2) según fue el caso. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 24 hrs. A continuación, se agregaron 100 µl del segundo anticuerpo (suero normal de conejo) y se incubó durante dos horas, posteriormente los tubos se centrifugaron a 3000 r.p.m. a -4° C por 30 minutos, el sobrenadante fue decantado, se secaron las paredes de cada tubo y se colocaron para ser analizados, en un contador de centelleo gama modelo Cobra 50005, Packard TM.

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

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El peso corporal, el peso de los órganos (ovarios y útero), y la concentración de hormonas esteroides y gonadotropinas se analizó por la prueba de análisis de varianza múltiple (*ANDEVA*) seguida de la prueba de Tukey

El número de ovocitos liberados, la edad de apertura vaginal y del primer estro fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de U de Mann-Whitney.

La tasa de animales ovulantes (número de animales que ovulen/número total de animales se analizó por la prueba de Fisher o de J_i^2 .

En los casos donde fue necesario efectuar una comparación entre dos grupos se utilizó la prueba “t” de Student. Se consideró como estadísticamente significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue menor o igual a 0.05.

CÁLCULO DEL PESO RELATIVO DE LOS OVARIOS Y ÚTERO

El cálculo del peso relativo de los ovarios y el útero se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Peso relativo} = \frac{\text{mg peso del órgano}}{\text{Peso corporal}} \times 100$$

RESULTADOS

Efecto de la Administración de Aceite de Maíz (AM) o Solución Salina (SS) sobre el Inicio de la Pubertad, la Respuesta ovulatoria del ovario y la Concentración de Hormonas Esteroides y Gonadotropinas.

◆ *Inicio de la Pubertad.*

Las hembras tratadas con SS mostraron mayor peso corporal que el de los animales intactos (Tabla 1).

En aquellos animales que fueron inyectados con AM el peso corporal fue menor en el momento de la autopsia y se adelantó el inicio de la pubertad y primer estro vaginal, en comparación con el grupo TA (Tabla 1).

Tabla 1. Media \pm e.e.m. del **peso corporal, edad de apertura vaginal (EAV) y primer estro vaginal (PEV)** de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con aceite de maíz (AM) o solución salina (SS), autopsiadas el día del primer estro vaginal.

TRATAMIENTO	TAO	PESO CORPORAL	EAV	PEV
		(GRAMOS)	(DIAS)	(DIAS)
TA	9/16	106.2 \pm 2.3	37 \pm 0.6	38.07 \pm 0.7
AM	10/18	91.9 \pm 1.6★	34.5 \pm 0.4★	34.9 \pm 0.4 ★
SS	8/15	114.7 \pm 1.6★	36.6 \pm 0.4	38.7 \pm 0.9

★ $p < 0.05$ vs TA (Prueba de "t" de Student).

◆ *Ovulación*

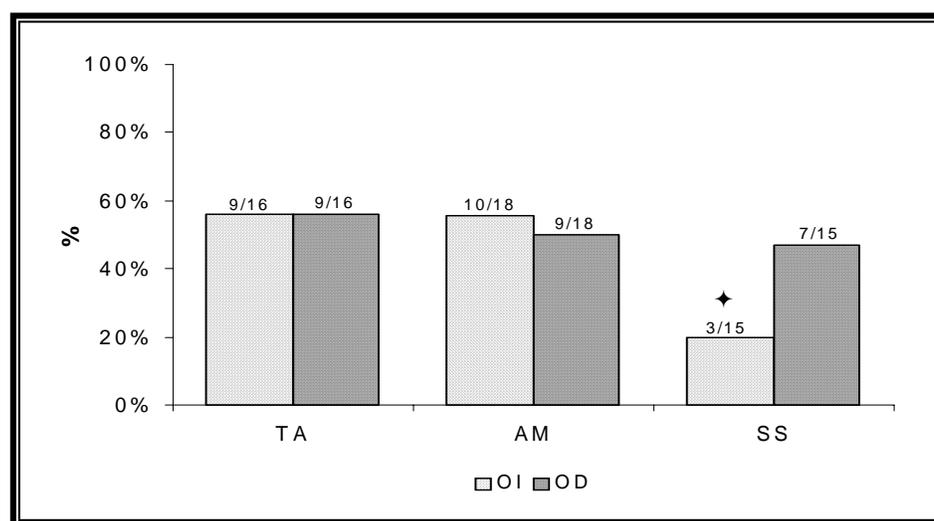
El número total de ovocitos liberados por los animales tratados con solución salina disminuyó, respecto al grupo TA. En el grupo tratado con AM no se observó diferencia en la cuota ovulatoria (Tabla 2).

Tabla 2. Media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo (OI), derecho (OD) y por ambos ovarios de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con aceite de maíz (AM) o solución salina (SS), autopsiadas en el día del primer estro vaginal.

Tratamiento	n	Número de ovocitos liberados por ovario		Ambos ovarios
		OI	OD	
TA	9/16	5.1 \pm 1.17	3.7 \pm 1.20	7.9 \pm 2.60
AM	10/18	4.4 \pm 0.50	3.2 \pm 0.50	7.3 \pm 1.0
SS	8/15	3.3 \pm 0.70	3.3 \pm 0.36	4.1 \pm 0.48 \star

\star $p < 0.05$ vs TA. (Prueba de "t" de Student).

El porcentaje de animales ovulantes fue menor en el ovario izquierdo de los animales tratados con SS comparados con el grupo TA. La administración de AM no modificó la respuesta ovulatoria (Figura 8).



\diamond $p < 0.05$ vs ovario correspondiente de TA (prueba de J_i^2).

Figura 8. Porcentaje de ovulación y tasa de animales ovulantes por el ovario izquierdo y derecho de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con aceite de maíz (AM) o solución salina (SS), autopsiadas el día del primer estro vaginal.

◆ *Concentración Sérica de Progesterona y Estradiol*

La concentración sérica de P_4 y E_2 no se modificó independientemente del vehículo administrado (Figura 9).

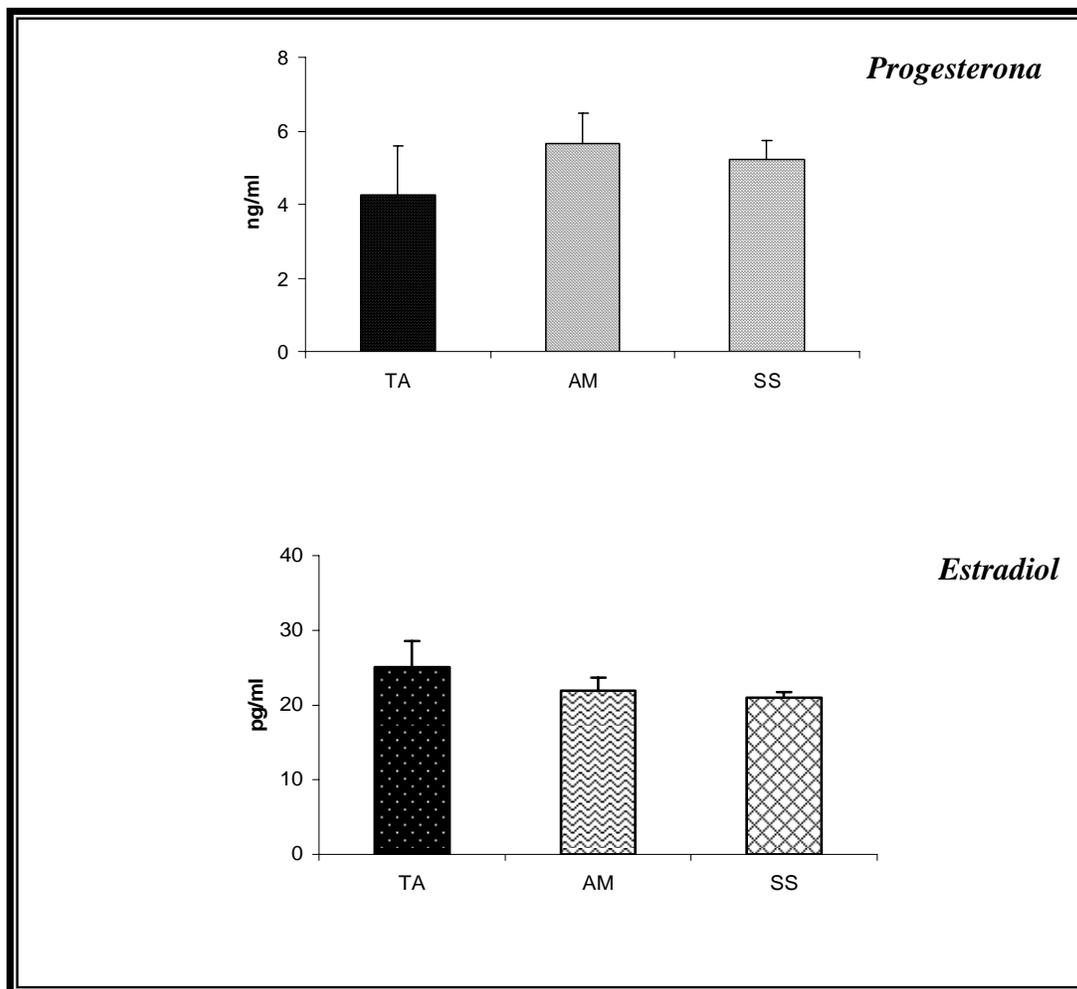


Figura 9. Media \pm e.e.m. de la **concentración sérica de progesterona y estradiol** de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con aceite de maíz (AM) o solución salina (SS), autopsiadas el día del primer estro vaginal.

◆ *Concentración Sérica de Gonadotropinas*

La concentración sérica de **LH** y **FSH** de los animales tratados con AM o SS no se modificó en comparación al grupo testigo absoluto (Figura 10).

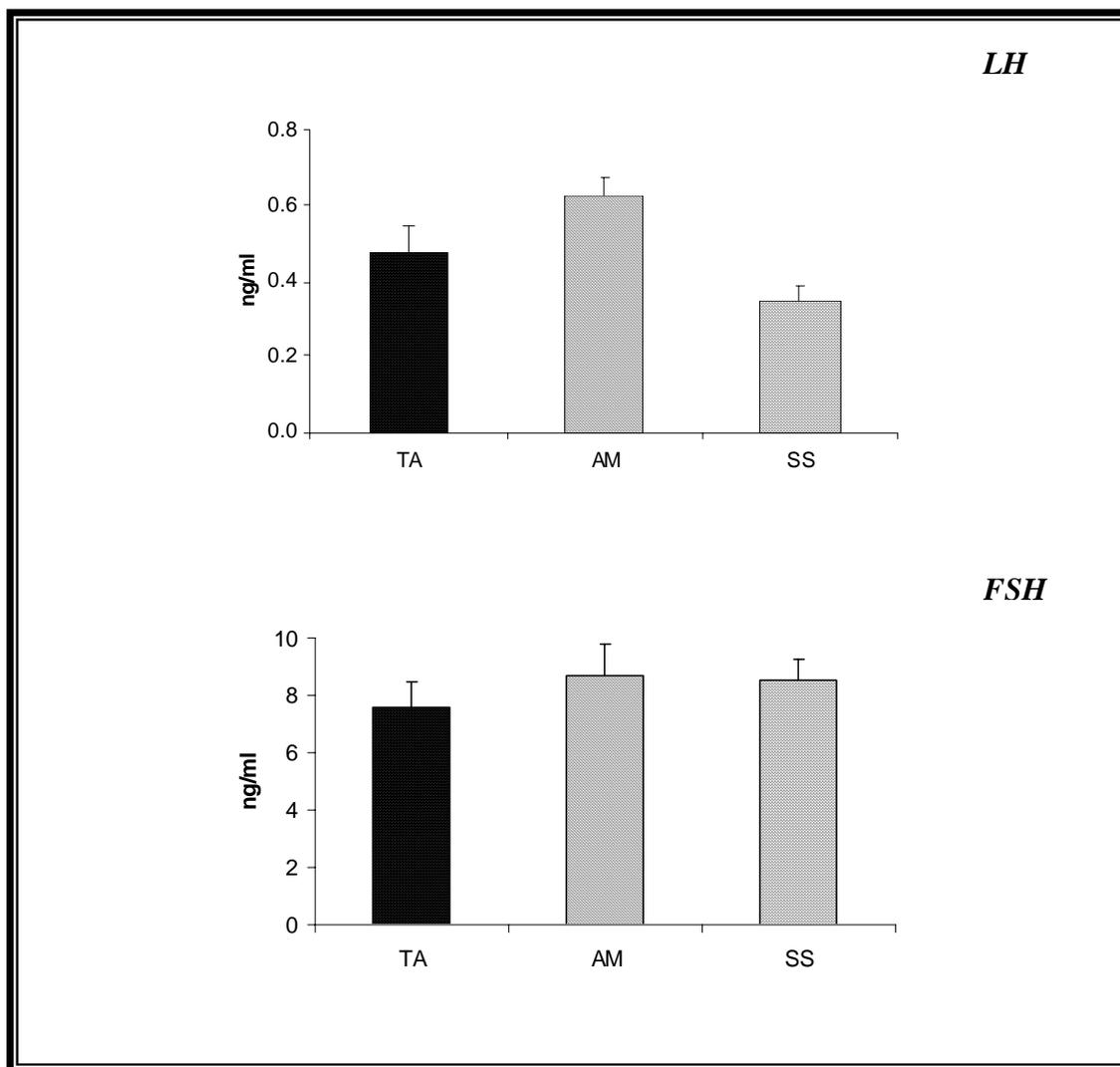


Figura 10. Media \pm e.e.m. de la **concentración sérica de LH y FSH** de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con aceite de maíz (AM) o solución salina (SS), autopsiadas el día del primer estro vaginal.

◆ *Peso Relativo de los Ovarios, Masa Ovárica y Útero*

El peso del útero en los animales tratados con AM o SS fue mayor en comparación con el del grupo testigo absoluto. La administración de los vehículos no modificó el peso relativo de los ovarios (Tabla 3).

Tabla 3. Media \pm e.e.m. del **peso relativo del ovario izquierdo, derecho, masa ovárica y útero** de ratas testigo absoluto (TA), tratadas con aceite de maíz (AM) o solución salina (SS), autopsiadas el día del primer estro vaginal.

Peso relativo (mg/100 g pc)					
Tratamiento	n	Ovarios		Masa Ovárica	Útero
		Izquierdo	Derecho		
TA	16	16.4 \pm 0.9	14.4 \pm 0.7	30.3 \pm 1.2	128.3 \pm 7.7
AM	18	18.0 \pm 1.0	14.6 \pm 0.7	32.6 \pm 0.7	154.6 \pm 7.5 \star
SS	15	17.2 \pm 0.9	16.8 \pm 1.0	33.9 \pm 1.8	153.2 \pm 6.2 \star

★ $p < 0.05$ vs TA (Prueba de "t" de Student).

*Efecto de la Inducción del SOPQ Mediante la Administración de VE
Sobre el Inicio de la Pubertad, la Respuesta Ovulatoria del
Ovario y la Concentración de Hormonas Esteroides y Gonadotropinas.*

◆ *Inicio de la Pubertad*

En comparación con el grupo testigo (AM), la administración de VE resultó en el adelanto de la canalización vaginal y del primer estro, que se acompañó de un menor peso corporal en el momento de la autopsia (Tabla 4).

Tabla 4. Media \pm e.e.m. del **peso corporal**, **edad de apertura vaginal (EAV)** y **primer estro vaginal (PEV)** de ratas tratadas con aceite de maíz (AM) o valerato de estradiol (VE), autopsiadas el día del primer estro vaginal.

TRATAMIENTO	n	PESO CORPORAL	EAV	PEV
		(GRAMOS)	(DIAS)	(DIAS)
AM	10/18	91.9 \pm 18.0	34.5 \pm 0.4	34.9 \pm 0.4
VE	1/12	53.6 \pm 1.6 ★	24.7 \pm 0.3 ★	24.9 \pm 0.5 ★

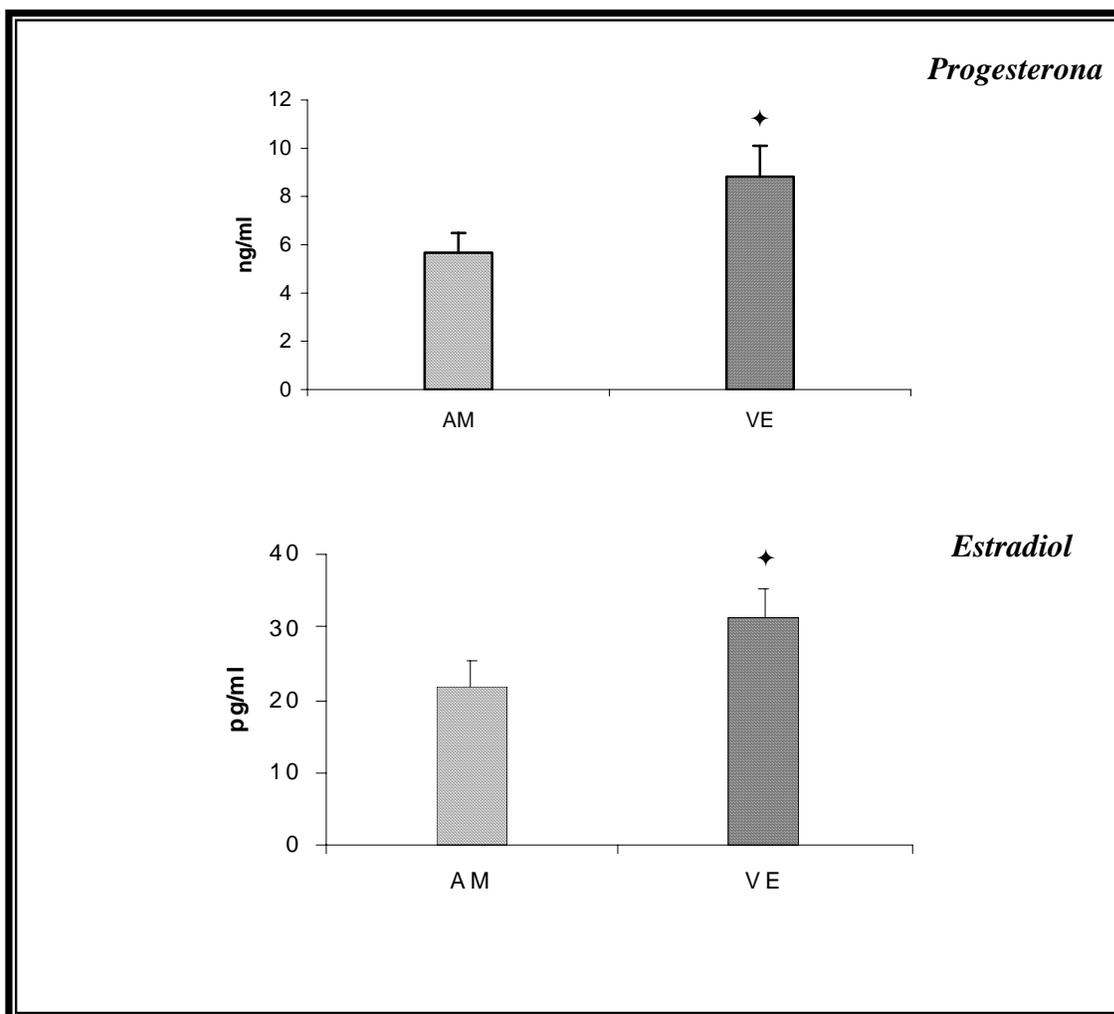
★ $p < 0.05$ vs VE (Prueba de "t" de Student).

◆ *Respuesta Ovulatoria*

En comparación con los animales tratados con el aceite de maíz, en los inyectados con VE se observó el bloqueo de la ovulación (10/18 vs. 1/12, $p < 0.05$ prueba de J_i^2).

◆ *Concentración Sérica de Progesterona y Estradiol*

En los animales tratados con VE la concentración de P_4 y E_2 fue mayor en comparación con los tratados con AM (Figura 11).



◆ $p < 0.05$ vs AM (Prueba de "t" de Student).

Figura 11. Media \pm e.e.m. de la **concentración sérica de progesterona y estradiol** de ratas tratadas con aceite de maíz (AM) o valerato de estradiol (VE), autopsiadas el día del primer estro vaginal.

◆ *Concentración Sérica de Gonadotropinas*

El tratamiento con VE no modificó la concentración de LH ni la de FSH, respecto a la del grupo testigo. Sin embargo, se observó una tendencia a la elevación de la concentración de LH que no llegó a ser significativa (Figura 12).

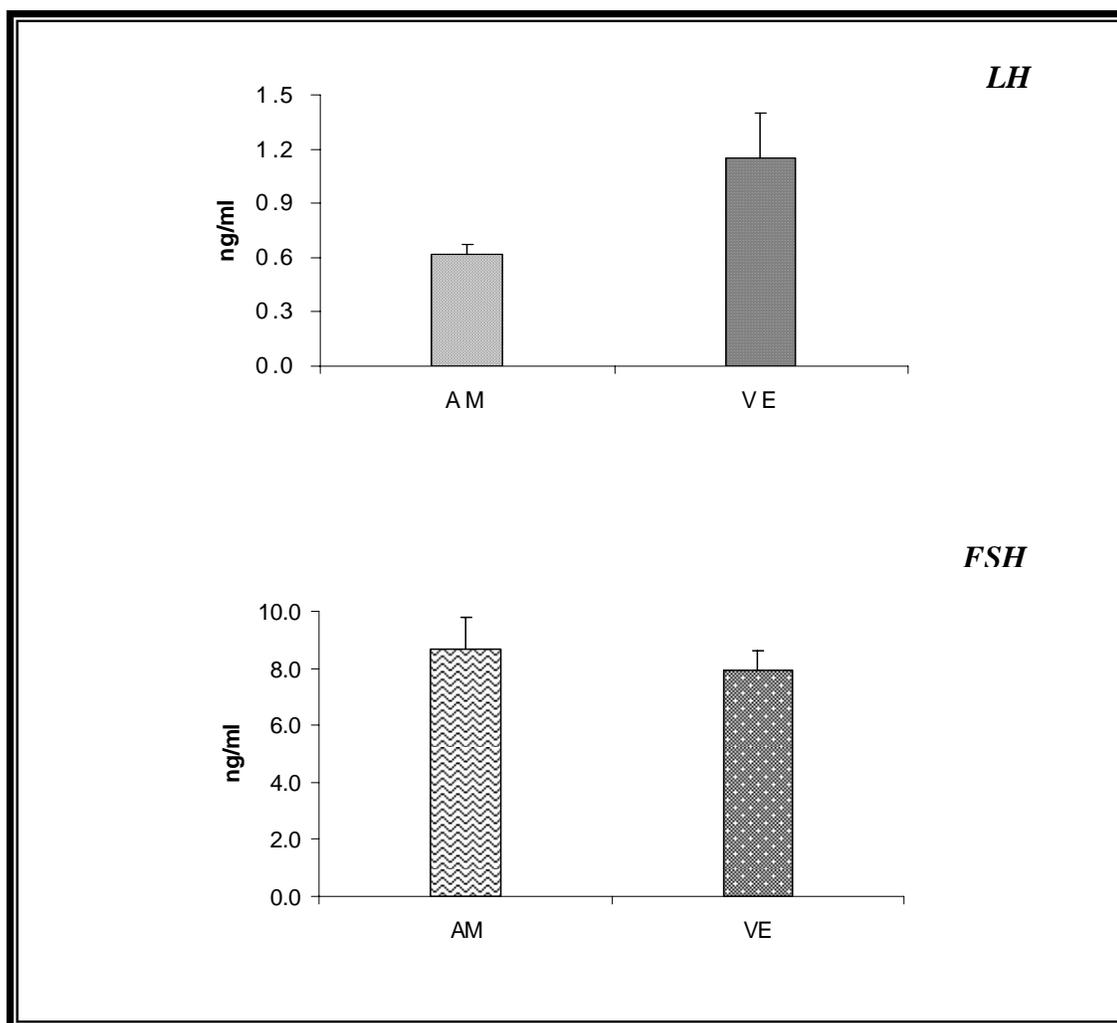


Figura 12. Media \pm e.e.m. de la **concentración sérica de LH y FSH** de ratas tratadas con aceite de maíz (AM) o valerato de estradiol (VE), autopsiadas el día del primer estro vaginal.

◆ *Peso Relativo de los Ovarios, Masa Ovárica y Útero*

El tratamiento con VE no resultó en modificaciones en el peso de los ovarios, masa ovárica ó útero en comparación con el del grupo tratado con su vehículo (Tabla 5).

Tabla 5. Media \pm e.e.m. del **peso relativo del ovario izquierdo, derecho, masa ovárica y útero** de ratas tratadas con aceite de maíz (AM) o valerato de estradiol (VE), autopsiados el día del primer estro vaginal.

Peso relativo (mg/100 g pc)					
Tratamiento	n	Ovarios		Masa Ovárica	Útero
		Izquierdo	Derecho		
AM	18	18.8 \pm 0.9	14.6 \pm 0.7	32.6 \pm 0.6	154.6 \pm 7.5
VE	12	17.6 \pm 1.1	17.3 \pm 1.3	34.2 \pm 1.6	163.5 \pm 10.1

Efecto de la Denervación Catecolaminérgica sobre el Inicio de la Pubertad, la Ovulación y la Concentración de Hormonas Esteroides y Gonadotropinas.

◆ *Inicio de la Pubertad*

El tratamiento con GTD resultó en un adelanto del inicio de la pubertad, sin que se modificara la edad del primer estro. En estos animales el peso corporal fue menor con respecto al del grupo tratado con solución salina (Tabla 6).

Tabla 6. Media \pm e.e.m. del **peso corporal, edad de apertura vaginal (EAV) y primer estro vaginal (PEV)** de ratas tratadas con solución salina (SS) o guanetidina GTD, autopsiadas el día del primer estro vaginal.

TRATAMIENTO	TAO	PESO CORPORAL	EAV	PEV
		(GRAMOS)	(DIAS)	(DIAS)
SS	8/15	114.7 \pm 1.6	36.6 \pm 0.4	38.7 \pm 0.9
GTD	4/17	98.4 \pm 2.4 ★	34.5 \pm 0.4★	37.4 \pm 0.5

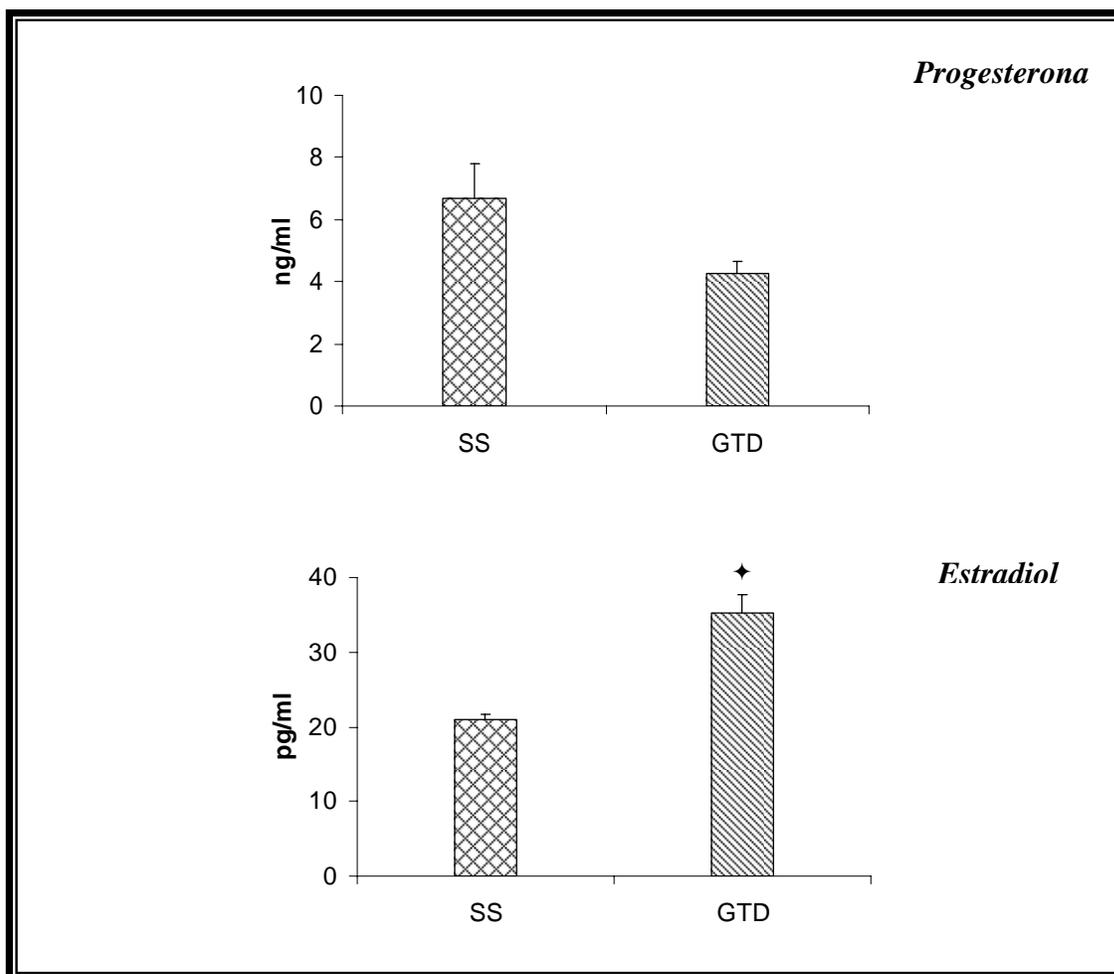
★ $p < 0.05$ vs GTD (Prueba de "t" de Student).

◆ *Ovulación*

En las hembras tratadas con GTD se observó una tendencia a la disminución en la tasa de animales ovulantes, que no llegó a ser estadísticamente significativa (4/17 vs. 8/15 n.s. prueba de J_i^2). El número total de ovocitos liberados en los animales tratados con GTD fue mayor, respecto al grupo con vehículo (6.0 \pm 0.4 vs. 4.1 \pm 0.48 $p < 0.05$ prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de U-Mann Whitney).

◆ *Concentración Sérica de Progesterona y Estradiol*

La concentración de P_4 en las hembras denervadas con GTD no se modificó, mientras que la concentración de E_2 aumentó respecto a su grupo testigo (Figura 13).



◆ $p < 0.05$ vs SS (prueba "t" de Student).

Figura 13. Media \pm e.e.m. de la **concentración sérica de progesterona y estradiol** de ratas tratadas con solución salina (SS) o guanetidina (GTD), autopsiadas el día del primer estro vaginal.

◆ *Concentración Sérica de Gonadotropinas*

La concentración de LH y FSH no se modificó con la administración de GTD (Figura 14).

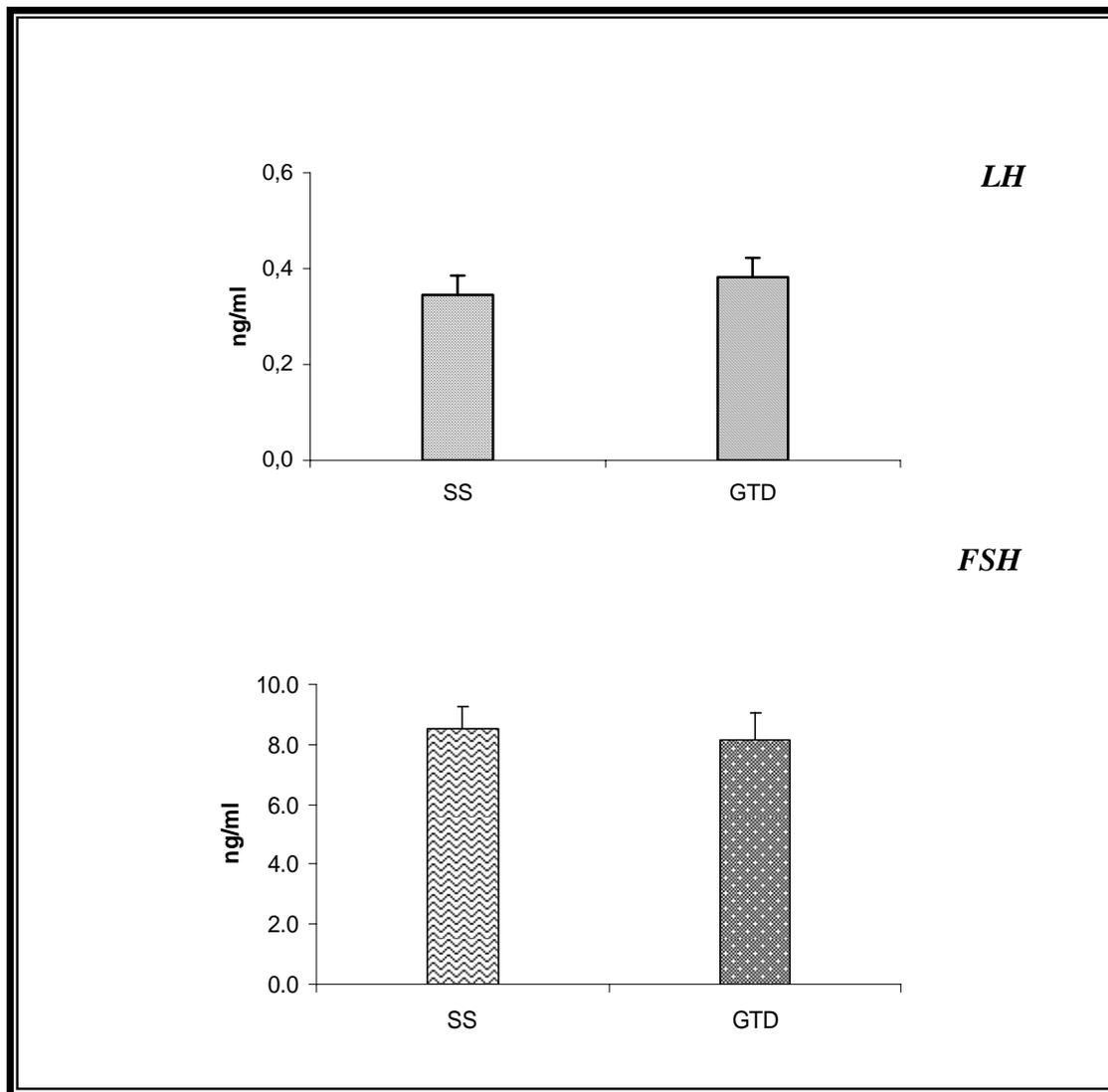


Figura 14. Media \pm e.e.m. de la **concentración sérica de LH y FSH** de ratas tratadas con solución salina (SS) o guanetidina (GTD), autopsiadas el día del primer estro vaginal.

◆ *Peso Relativo de los Ovarios, Masa Ovárica y Útero*

La denervación con GTD no modificó el peso de los ovarios, pero resultó en una disminución del peso del útero, en comparación con su grupo testigo (Tabla 7).

Tabla 7. Media \pm e.e.m. del **peso relativo del ovario izquierdo, derecho, masa ovárica y útero** de ratas tratadas con solución salina (SS) y guanetidina (GTD), autopsidas el día del primer estro vaginal.

Peso relativo (mg/100 g pc)					
Tratamiento	n	Ovarios		Masa Ovárica	Útero
		Izquierdo	Derecho		
SS	15	17.2 \pm 0.9	16.8 \pm 1.0	33.9 \pm 1.8	153.2 \pm 6.2
GTD	17	17.2 \pm 0.8	17.1 \pm 0.8	34.8 \pm 1.7	133.8 \pm 5.6 ★

★ $p < 0.05$ vs GTD (Prueba de "t" de Student).

*Efecto de la Denervación Catecolaminérgica en el Animal Tratado con VE
Sobre el Inicio de la Pubertad, la Respuesta Ovulatoria del Ovario y la
Concentración de Hormonas Esteroides y Gonadotropinas.*

◆ *Inicio de la Pubertad*

La denervación catecolaminérgica practicada a ratas tratadas con VE resultó en adelanto del inicio de la pubertad y del primer estro, así como disminución del peso corporal en el momento de la autopsia (Tabla 8).

Tabla 8. Media \pm e.e.m. del **peso corporal**, **edad de apertura vaginal (EAV)** y **primer estro vaginal (PEV)** de ratas tratadas con valerato de estradiol (VE) o valerato de estradiol-guanetidina (VE-GTD), autopsiadas el día del primer estro vaginal.

TRATAMIENTO	n	PESO CORPORAL	EAV	PEV
		(GRAMOS)	(DIAS)	(DIAS)
VE	1/12	53.6 \pm 1.6	24.7 \pm 0.3	24.9 \pm 0.5
VE-GTD	4/18	46.1 \pm 2.7 ★	21.9 \pm 0.8★	22.1 \pm 1.0 ★

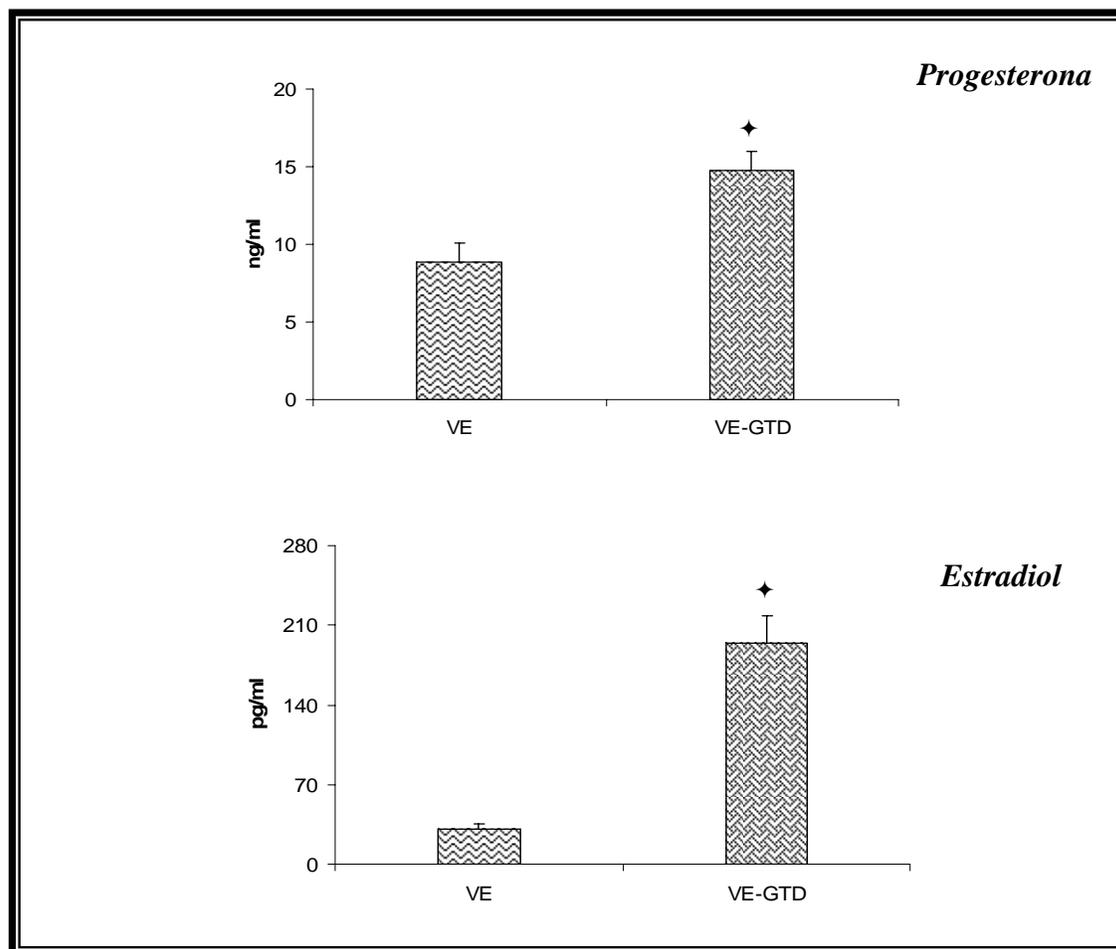
★ $p < 0.05$ vs VE (Prueba de "t" de Student)

◆ *Ovulación*

En comparación con los animales que sólo recibieron VE, las hembras tratadas con VE y posteriormente denervadas, presentaron tendencia al aumento en la tasa de animales ovulantes que no llegó a ser significativa (4/18 vs 1/12 n.s.). En las hembras denervadas después de la administración de VE, el número total de ovocitos liberados fue de 5.5 ± 0.29 .

◆ *Concentración de Sérica de Progesterona y Estradiol.*

La concentración de P_4 y E_2 de los animales tratados con VE-GTD aumentó con respecto a los tratados únicamente con VE (Figura 15).

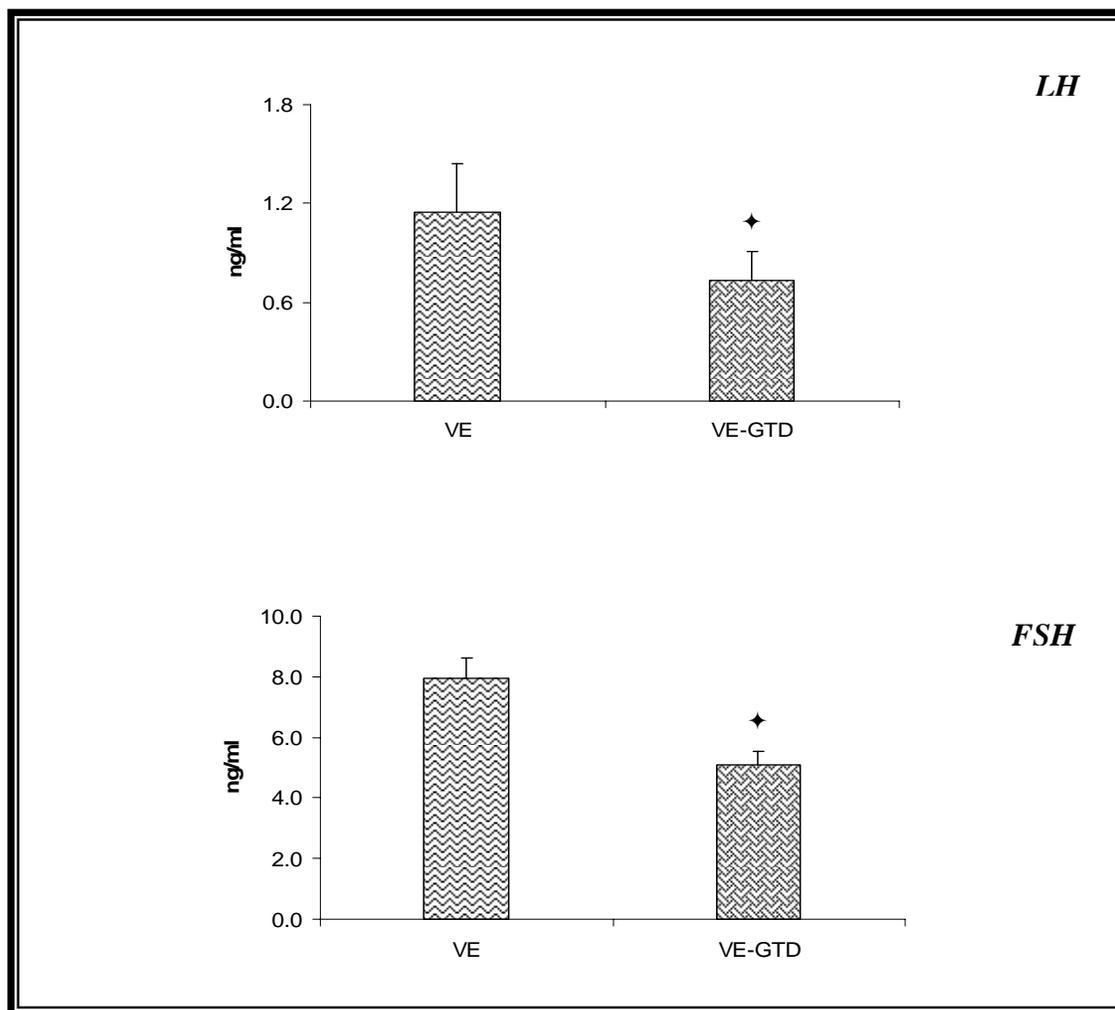


◆ $p < 0.05$ vs VE (Prueba de "t" de Student).

Figura 15. Media \pm e.e.m. de la **concentración sérica de progesterona y estradiol** de ratas tratadas con valerato de estradiol (VE) o valerato de estradiol-guanetidina (VE-GTD), autopsiados el día del primer estro vaginal.

◆ *Concentración de Gonadotropinas*

La denervación catecolaminérgica realizada después de la administración de VE, resultó en la disminución de la concentración de LH y FSH, en comparación con los animales que sólo recibieron VE (Figura 16).



◆ $p < 0.05$ vs. VE (Prueba de "t" de Student).

Figura 16. Media \pm e.e.m. de la **concentración sérica de LH y FSH** de ratas tratadas con valerato de estradiol (VE) o valerato de estradiol-guanetidina (VE-GTD) autopsiadas el día del primer estro vaginal.

◆ *Peso Relativo de los Ovarios, Masa Ovárica y Útero*

Se observó una disminución en la masa ovárica de los animales con SOPQ y denervados con GTD, este decremento fue el resultado de la disminución en el peso del ovario izquierdo. El peso del útero no se modificó por la denervación con GTD (Tabla 9).

Tabla 9. Media \pm e.e.m. del **peso relativo del ovario izquierdo, derecho, masa ovárica y útero** de ratas tratadas con valerato de estradiol (VE) o valerato de estradiol-guanetidina (VE-GTD), autopsiados el día del primer estro vaginal.

Peso relativo (mg/100 g pc)					
Tratamiento	n	Ovarios		Masa Ovárica	Útero
		Izquierdo	Derecho		
VE	12	17.6 \pm 1.1	17.3 \pm 1.3	34.2 \pm 1.6	163.5 \pm 10.1
VE-GTD	18	14.0 \pm 1.2 ★	14.4 \pm 1.1	28.7 \pm 2.2 ★	153.1 \pm 6.6

★p<0.05 vs. VE (Prueba de "t" de Student).

Efecto de la Administración de VE, en el Animal con Denervación Catecolaminérgica, Sobre el Inicio de la Pubertad, la Respuesta Ovulatoria del Ovario y la Concentración de Hormonas Esteroides y Gonadotropinas.

◆ *Inicio de la Pubertad*

La denervación previa a la administración de VE resultó en el adelanto del inicio de la pubertad y del primer estro, así como de un menor peso corporal al momento de la autopsia (Tabla 10).

Tabla 10. Media \pm e.e.m. del **peso corporal, edad de apertura vaginal (EAV) y primer estro vaginal (PEV)** de ratas tratadas con guanetidina (GTD) y guanetidina-valerato de estradiol (GTD-VE), autopsiados el día del primer estro vaginal.

TRATAMIENTO	n	PESO CORPORAL	EAV	PEV
		(GRAMOS)	(DIAS)	(DIAS)
GTD	4/17	98.4 \pm 2.4	34.5 \pm 0.4	37.4 \pm 0.5
GTD-VE	2/20	67.57 \pm 4.0 ★	23 \pm 0.5 ★	25.1 \pm 0.7 ★

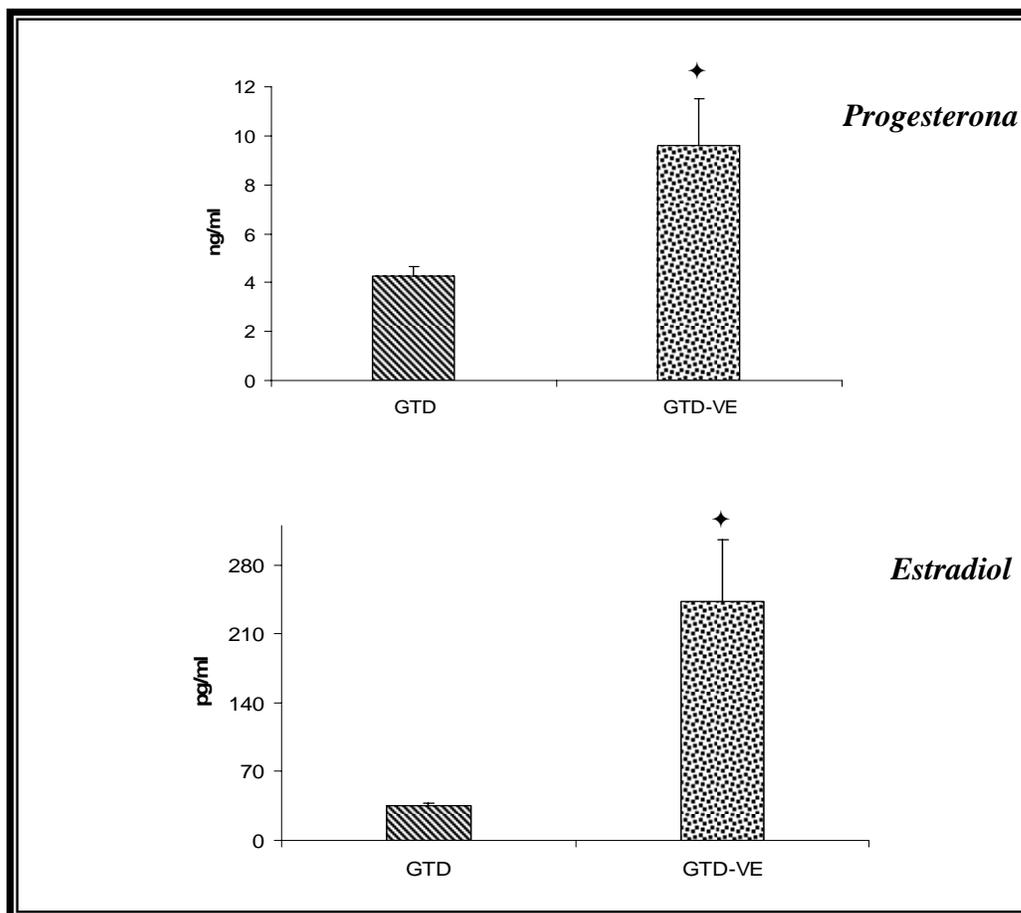
★ $p < 0.05$ vs. GTD (Prueba de "t" de Student).

◆ *Respuesta Ovulatoria*

La tasa de animales ovulantes en los animales que fueron tratados con VE y previamente denervados no se modificó en comparación con aquellos a quienes sólo se administró GTD (GTD-VE 2/20 vs GTD 4/17, n.s). El número total de ovocitos liberados por el grupo que fue inyectado con GTD fue 6.0 ± 0.4 , mientras que cuando los animales fueron además tratados con el VE la cuota ovulatoria fue menor, donde uno de los animales liberó seis ovocitos y el otro tres.

◆ *Concentración Sérica de Progesterona y Estradiol*

La concentración sérica de P_4 y E_2 aumentó en el grupo tratado con GTD-VE en comparación con el que sólo fue denervado (Figura 17).

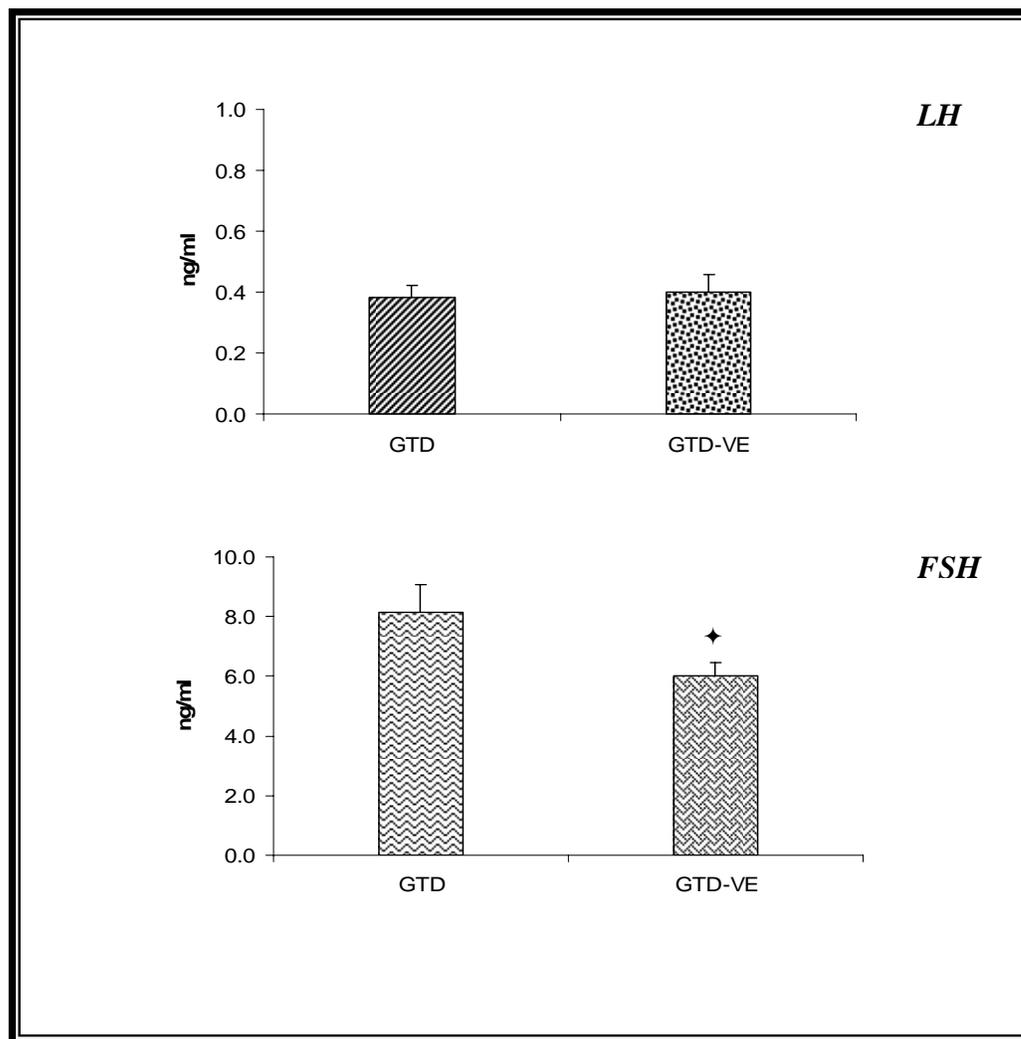


◆ $p < 0.05$ vs. GTD (prueba "t" de Student).

Figura 17. Media \pm e.e.m. de la **Concentración Sérica de Progesterona y Estradiol** de ratas tratadas con guanetidina (GTD) o guanetidina/valerato de estradiol (GTD-VE), autopsiadas el día del primer estro vaginal.

◆ *Concentración Sérica de Gonadotropinas*

En las hembras que primero fueron denervadas y después recibieron VE la concentración sérica de FSH disminuyó, con respecto al grupo tratado con GTD, en tanto que la de LH no se modificó (Figura 18).



* $p < 0.05$ vs. GTD (prueba "t" de Student).

Figura 18. Media \pm e.e.m. de la **Concentración Sérica de LH y FSH** de ratas tratadas con guanetidina (GTD) o valerato de estradiol-guanetidina (GTD-VE), autopsiadas el día del primer estro vaginal.

◆ *Peso Relativo de los Ovarios, Masa ovárica y Útero*

La administración de GTD-VE resultó en la disminución en la masa ovárica, que es el reflejo del decremento en el peso del ovario derecho, en comparación al grupo que sólo fue denervado. El peso del útero incrementó por la administración del VE (tabla 11).

Tabla 11. Media \pm e.e.m. del **peso relativo del ovario izquierdo, derecho, masa ovárica y útero** de ratas tratadas con guanetidina (GTD) o valerato de estradiol-guanetidina (GTD-VE), autopsiadas el día del primer estro vaginal.

Peso relativo (mg/100 g pc)					
Tratamiento	n	Ovarios		Masa Ovárica	Útero
		Izquierdo	Derecho		
GTD	17	17.2 \pm 0.8	17.1 \pm 0.8	34.8 \pm 1.7	133.8 \pm 5.6
GTD-VE	20	16.0 \pm 0.7	14.9 \pm 0.7 ★	29.8 \pm 1.1 ★	150.9 \pm 4.6 ★

★ $p < 0.05$ vs. GTD-VE (Prueba de "t" de Student).

RESUMEN DE RESULTADOS

	PC	EAV	PEV	TAO	NOL	E ₂	P ₄	FSH	LH	MO	ÚTERO
AM											
VE	↓	A	A	↓	↓	↑	↑	=	↑ NS	=	=
SS											
GTD	↓	A	=	↓ NS	↑	↑	=	=	=	=	↓
VE											
VE-GTD	↓	A	A	↑ NS	↑	↑↑	↑↑	↓	↓	↓	=
GTD											
GTD-VE	↓	A	A	=	↓	↑↑	↑↑	↓	=	↓	↑

TA, testigo absoluto; **AM**, aceite de maíz; **SS**, solución salina; **VE**, valerato de estradiol; **GTD**, guanetidina; **VE-GTD**, valerato de estradiol-guanetidina; **GTD-VE**, guanetidina-valerato de estradiol; **PC**, peso corporal; **EAV**, edad de apertura vaginal; **PEV**, primer estro vaginal; **TAO**, tasa de animales ovulantes; **NOL**, número de ovocitos liberados; **E₂**, estradiol; **P₄**, progesterona; **FSH**, hormona folículo estimulante; **LH**, hormona luteinizante; **MO**, masa ovárica; **OI**, ovario izquierdo; **A**, adelanto; **NS**, no significativo.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio nos permiten sugerir que en la rata púber con SOPQ, ante la falta de la inervación catecolaminérgica, la inervación VIPérgica es sobrestimulada, lo que se traduce en una mayor actividad esteroideogénica del ovario. Aún cuando eliminamos todas las fuentes de noradrenalina que llegan al ovario, no se restableció la ovulación, lo que comprueba el hecho de que el SOPQ es un evento multifactorial, en donde intervienen factores endócrinos y neurales.

Algunos autores proponen que el SOPQ se produce en respuesta a un incremento en la concentración plasmática de E_2 (Brawer y col., 1993) y otros que se produce por hiperactividad de las fibras nerviosas catecolaminérgicas que arriban al ovario (Barria y col., 1993; Lara y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003). Nuestro grupo de trabajo sugiere que el SOPQ es el resultado del aumento de la actividad de las fibras noradrenérgicas y del VIP, otro neurotransmisor que llega al ovario por el NOS, ya que con la sección unilateral de éste nervio, resultó en la ovulación sólo por parte del ovario que permaneció inervado, aún cuando la concentración de NA fue normal, en tanto que el ovario denervado no ovuló y presentó una menor concentración de la amina (Linares, 2006).

En la rata hembra, la canalización de la vagina es el resultado de la acción de los estrógenos sobre el tejido vaginal (Ojeda y col., 1994). En la rata tratada con VE se presenta un incremento en la concentración sérica de estradiol (Shulster y col., 1984; Barria y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003) que explica el adelanto de la pubertad en estos animales. Estas evidencias son similares a lo que observamos en el presente estudio.

En la rata con SOPQ la inervación simpática que transcurre por el NOS, modula de manera estimuladora los eventos que conllevan a la canalización de la vagina (Linares, 2006). Estos resultados difieren a los del presente estudio, donde al eliminar toda la inervación catecolaminérgica que llega al ovario, por la administración de GTD, antes o después de la inducción del síndrome, se produce adelanto en el inicio de la pubertad. Esta discrepancia podría deberse a que no

solo eliminamos la información que llega por el NOS, sino también la aportada por el plexo ovárico y la que llega por el torrente sanguíneo.

En el presente estudio la administración de la GTD resultó en adelanto en el inicio de la pubertad. Esto podría ser explicado por el aumento en la concentración de estradiol presente al primer estro vaginal. A diferencia de otros autores que muestran retraso en la pubertad, acompañado de la disminución en la concentración de estradiol (Lara y col., 1990). Esta discrepancia podría ser atribuida a la dosis utilizada, mientras que el grupo de Lara inyectó 50 mg/kg, en el presente estudio se inyectó 20 mg/kg.

En nuestros resultados, se observó que en los animales tratados con VE se incrementó la concentración sérica de progesterona, lo que se podría explicar por una mayor actividad de las fibras simpáticas en respuesta a la administración del estrógeno, tal y como ya ha sido reportado (Lara y col, 1993; Lara y col., 2002; Rosa-E-Silva, 2003; Sotomayor-Zárate y col., 2008). Esta interpretación también se ve apoyada por los resultados de Weiss y colaboradores (1982), quienes mostraron que con la estimulación eléctrica de las fibras simpáticas ováricas, se incrementa la producción de P_4 . Ellos sugieren que la síntesis de progesterona es regulada directamente por la inervación simpática, donde la influencia puede ser excitatoria por la activación de los receptores β -adrenérgicos o de tipo inhibitoria por la estimulación de los α -adrenérgicos.

En estudios previos, la denervación catecolaminérgica realizada a ratas desde la edad neonata, resultó en la disminución de la concentración de P_4 (Lara y col., 1990, Rosa-E- Silva 1997), que se explica por la reducción del número de folículos por ovario y del contenido de receptores β -adrenérgicos en las células de la granulosa. En nuestros animales, la denervación por la administración de GTD no tuvo efecto en la concentración de P_4 respecto a la del grupo testigo. Esta diferencia con respecto a lo reportado en la bibliografía podría ser debida a que ellos utilizaron una dosis mayor de GTD.

Por los resultados obtenidos en el presente estudio sugerimos que la inervación vipérgica que llega al ovario por NOS, participa de manera estimulante

en la secreción de E_2 y P_4 ya que en los animales con SOPQ que fueron denervados con GTD antes o después de la administración de VE, el incremento en la concentración de ambas hormonas sobrepasó considerablemente a las registradas en los grupos tratados sólo con VE o GTD. Estos resultados indican que en las hembras con el SOPQ, en ausencia de las fibras noradrenérgicas las fibras peptidérgicas sufren una hiperactivación que sobrestimula la síntesis de esteroides.

En las células de la granulosa, el VIP estimula la síntesis del complejo enzimático $P450_{SCC}$, que rompe la cadena lateral del colesterol y facilita su transformación a P_4 (Davoren y Hsueh, 1985; Trzeciak 1986). Por otro lado, el grupo de Parra (2007) demostró que cuando los ovarios, provenientes de animales con SOPQ, son cultivados en presencia del VIP la concentración ovárica de estradiol se incrementó aproximadamente en un 400%.

Al momento existe controversia de cómo son los perfiles de gonadotropinas que caracterizan a los individuos que presentan el SOPQ. Por un lado, se dice que en la mujer se da un aumento de la frecuencia de los pulsos de la LH, aproximadamente de 1 pulso por hora, en respuesta al incremento en los pulsos de GnRH o al aumento en la sensibilidad de la hipófisis a ésta. En algunas mujeres se indica que se produce disminución en los pulsos de la FSH o bien que no hay cambios en la concentración de la hormona (Yen y col., 2001; McCartney y col., 2002, Blank y col., 2006). Algunos reportes señalan que en la rata adulta, tratada con VE, se da elevación en la concentración sérica de LH (Shulster y col., 1984; Carriere y col., 1991), mientras que en otros la concentración de ambas gonadotropinas disminuye (Hemmings y col., 1983; Brawer y col., 1986; Rosa-E-Silva y col., 2003).

En nuestra cepa de animales el SOPQ, inducido por la administración del VE, resultó en incremento, de la concentración sérica de LH que no llegó a ser significativo, a diferencia de lo reportado en la literatura en donde si observan un claro aumento. La discrepancia se puede atribuir a la edad en la que se evaluó el síndrome, ya que mientras nosotros sacrificamos los animales al primer estro vaginal, en la mayoría de los trabajos se evalúan en la etapa adulta.

Lara y col., (1990) encontraron que la denervación con GTD realizada desde la etapa neonata, resulta en la disminución en la concentración sérica de LH en tanto que la de FSH permanece igual. En el presente estudio no se observaron cambios en la concentración de gonadotropinas de las hembras tratadas con GTD con respecto a su grupo control. Al momento no tenemos explicación a esta discrepancia, lo único que podríamos retomar sería que la dosis que se empleó en ambos estudios fue diferente.

Fornieris y Aguado (2002) observaron que en la rata neonata, la sección bilateral del NOS resulta en la disminución de la concentración de FSH, mientras que la de LH no cambia. En las hembras denervadas antes o después de la administración de VE, la concentración de FSH disminuyó, mientras que la de LH disminuye solamente cuando la denervación se realiza después de la inducción del síndrome. Los resultados indican que la denervación trae desajustes en el eje hipotálamo-hipófisis y probablemente sea consecuencia de la disminución en la secreción de GnRH a nivel hipotalámico.

En el presente estudio las hembras denervadas con GTD registraron aumento en el número de ovocitos liberados por animal ovulante en comparación con su grupo testigo. Estos resultados son similares a lo reportado por Flores y colaboradores (1990), quienes mostraron que la administración de GTD en la rata neonata resulta en el incremento en la respuesta ovulatoria al primer estro vaginal. Todas estas evidencias apoyan la idea de que en la rata púber la inervación noradrenérgica participa en los mecanismos que culminan con la ovulación, al inhibir la reactividad de los folículos a las gonadotropinas.

Tal y como ya ha sido reportado, la administración del VE resultó en el bloqueo de la ovulación (Schulster y col., 1984; Brawer y col., 1986, Barria y col., 1993; Rosas, 2006). La mayoría de los investigadores plantean que la falta de ovulación se debe al incremento en la concentración de NA ovárica (Lara y col., 1993). Dado que en nuestro modelo experimental se destruyeron de manera selectiva las fibras simpáticas y se dejaron intactas aquellas que transportan VIP (Jonhson y col., 1976, Jonhson y Manning 1984; Lara y col., 1990; Rosa-E-Silva y

col., 1997) y no se restableció la ovulación en todos los animales, apoyamos la idea de que el VIP es otro factor que participa en el desarrollo del síndrome, y que la sola depleción de NA no es suficiente para restablecer la ovulación.

La administración de GTD no modificó la masa ovárica, semejante a lo reportado por el grupo de Rosa E Silva y col. (1997). Cuando los animales son denervados antes o después de la inducción del síndrome la masa ovárica fue menor. Esta disminución podría estar dada en respuesta a la depleción de NA, inducida por la GTD. La respuesta del folículo ovárico a las gonadotropinas es menor en ausencia de NA, lo que conlleva a un retraso en el crecimiento de los folículos y posiblemente a la ausencia de cuerpos lúteos.

El útero es un órgano que recibe inervación simpática y experimenta cambios fisiológicos en respuesta a las variaciones en la concentración de hormonas sexuales (Zoubina y col., 1998; 2002). Spratto y Miller en 1968 mostraron que la administración de 5 diferentes estrógenos trae como resultado el incremento en el peso del útero de ratas adultas.

En las hembras tratadas con VE el peso del útero no se modificó, no obstante la elevada concentración de estradiol. Lo que nos sugiere que el peso del útero depende además de otros factores entre los que podrían estar incluso la propia inervación. En apoyo a esta idea, se tiene que en los animales denervados antes de la inducción del síndrome aumentó el peso del útero, mientras que cuando la denervación se realizó después, el peso del órgano no se modificó. Este efecto diferencial es independiente de la concentración de estradiol, ya que en ambos grupos la concentración de la hormona fue 600% mayor que en los animales tratados con el VE o la GTD.

A partir de los resultados obtenidos podemos decir que el VIP participa de manera estimulante en el desarrollo del SOPQ, ya que al eliminar la inervación catecolaminérgica que llega al ovario, dejando sólo la información peptidérgica, permanecieron las características del síndrome.

MODELO

En el modelo que se presenta a continuación, se esquematiza la inervación simpática ovárica que corre a cargo del NOS. La porción simpática de la inervación extrínseca ovárica proveniente del segmento de T11 a L4 de la cadena simpática que hace sinápsis en el ganglio celíaco y llega al ovario transportando dos neurotransmisores: NA y VIP. En el animal con SOPQ, se observa que con la denervación catecolaminérgica, inducida por la administración de GTD, se incrementa la capacidad esteroidogénica del ovario además de una disminución en la concentración de FSH en tanto que la LH disminuye sólo cuando se realiza la denervación previa a la administración de VE. Esta elevación en la concentración de gonadotropinas podría deberse a la marcada elevación en la concentración de estradiol, que regularía de manera positiva sobre el hipotálamo incrementando la síntesis de GnRH o sobre la propia hipófisis. Estas evidencias apoyan la idea de que la inervación VIPérgica es la responsable de la elevación de la concentración de esteroides en el síndrome y que es otro de los factores neuroendocrinos responsable del desarrollo de esta patología.

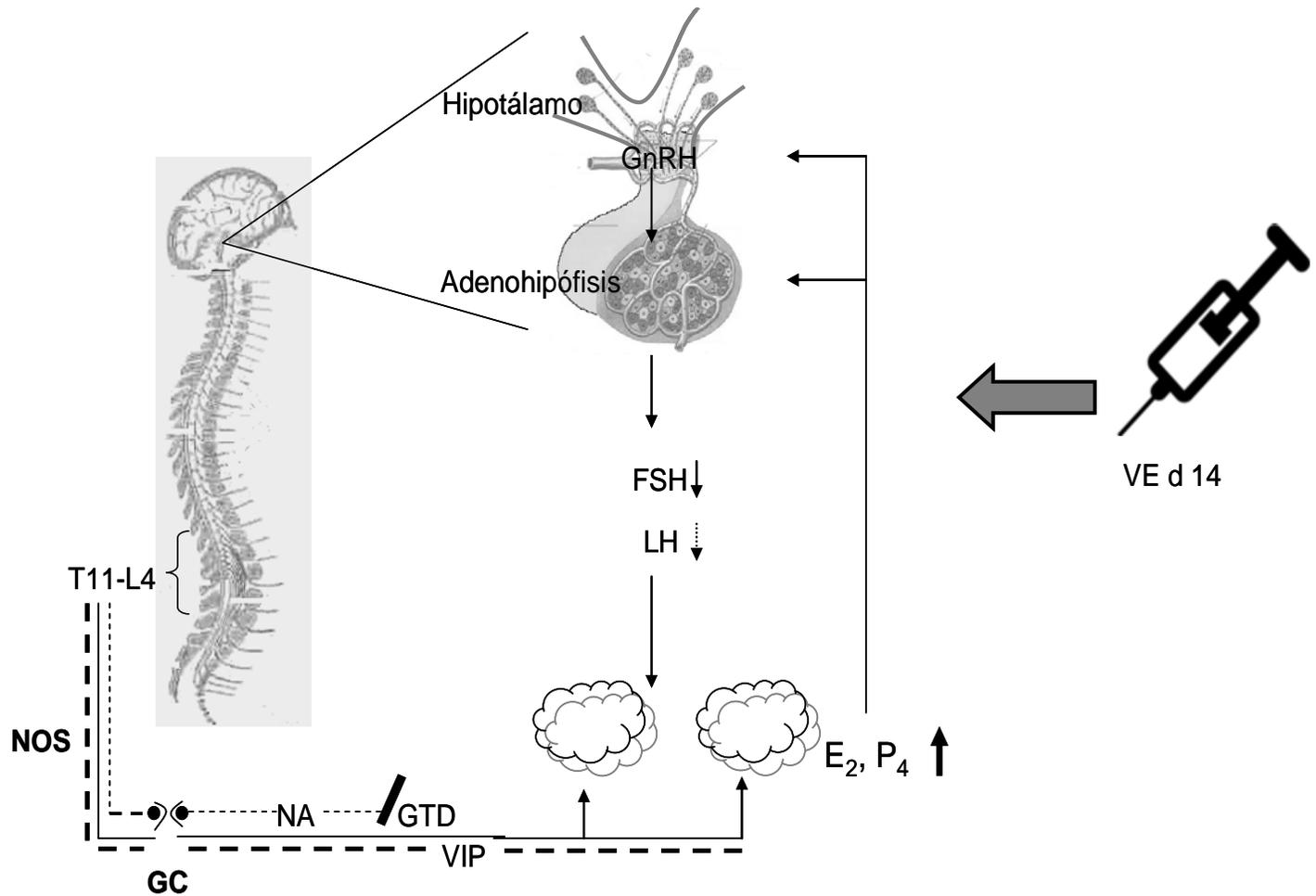


Figura 15. Representación esquemática de la participación de la inervación VIPérgica en el desarrollo del SOPQ. Nervio Ovárico Superior (**NOS**), Ganglio Celíaco (**CG**), Noradrenalina (**NA**), guanetidina (**GTD**), Péptido Intestinal Vasoactivo (**VIP**), Estradiol (**E₂**), Progesterona (**P₄**), Hormona Luteinizante (**LH**), Hormona Folículo Estimulante (**FSH**), Valerato de Estradiol (**VE**), Hormona Liberadora de las Gonadotropinas (**GnRH**). La línea punteada delgada representa la inervación noradrenérgica, en tanto que la línea punteada gruesa representa la inervación VIPérgica; ambas llegan al ovario por NOS. La eliminación de la inervación noradrenérgica por la administración de GTD está representada por: /.

CONCLUSIONES

- ☞ La denervación simpática, inducida por la GTD, antes o después del desarrollo del SOPQ resultó en una mayor capacidad esteroidogénica del ovario.

- ☞ En los animales con SOPQ la falta de información catecolaminérgica, inducida por la administración de GTD, adelantó el inicio de la pubertad.

- ☞ La denervación catecolaminérgica antes o después de la inducción del SOPQ no restablece la función ovulatoria.

- ☞ Es probable que la regulación que ejerce VIP sobre la secreción de estradiol y progesterona sea estimulante.

- ☞ A falta de la información catecolaminérgica, al parecer el VIP juega un papel estimulante en el desarrollo del SOPQ.

PERSPECTIVAS

- Analizar la dinámica del crecimiento y diferenciación de los folículos ováricos, de las ratas con denervación catecolaminérgica antes o después de la inducción del síndrome del ovario poliquístico (SOPQ).
- Cuantificar la concentración de noradrenalina ovárica por HPLC con el fin de verificar la depleción de noradrenalina (NA) ovárica por la administración de GTD.
- Utilizar el modelo de denervación catecolaminérgica aplicado en este estudio y cuantificar la concentración de VIP con el fin de verificar el papel del péptido intestinal vasoactivo (VIP) en el desarrollo del SOPQ
- Para dilucidar si el SOPQ se debe a la hiperactivación de las fibras VIPérgicas, administrar el péptido directamente al ovario y evaluar la concentración de hormonas esteroides y gonadotropinas, así como la ovulación y morfología ovárica y verificar el desarrollo de la patología.

BIBLIOGRAFÍA

- Advis JP, Ahmed CE, Ojeda SR (1989). "Direct Hypothalamic Control of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) Levels in the Developing Rat Ovary". **Brain Research Bulletin**. 22, 605-610.
- Aguado LI, Ojeda SR (1984). "Ovarian Adrenergic Nerves Play a Role in Maintaining Preovulatory Steroid Secretion". **Endocrinology**. 114, 1944-1946.
- Ahmed CE, Dees WL, Ojeda SR. (1986). "The Immature Rat Ovary Is Innervated by Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)- Containing Fibers and Responds to VIP with Steroid Secretion". **Endocrinology**. 118, 1682-1689.
- Atay V, Cam C, Muhcu M, Cam M, Karateke A. (2006). "Comparison of Letrozole and Clomiphene Citrate in Women with Polycystic Ovaries Undergoing Ovarian Stimulation". **The Journal of International Medical Research**. 34; 73-76.
- Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara H E. (1993) "Ovarian Steroidal Response to Gonadotropins and β -Adrenergic Stimulation Is Enhanced in Polycystic Ovary syndrome: Role of Sympathetic Innervation". **Endocrinology**. 133, 2696-2703.
- Becu-Villalobos DB, Lacau-Mengido MI. (1990). "Control Hormonal del Desarrollo Puberal en la Rata Hembra". **Acta Physiology Pharmacology Latinoamerican**. 40:1-17.
- Blank SK, McCartney CR, Marshall JC. (2006). "The Origins and Sequelae of Abnormal Neuroendocrine Function in Polycystic Ovary Syndrome" **Human Reproduction Update**. 12:351-361.
- Brawer JR, Munoz M, Farookhi R. (1986) "Development of the Polycystic Ovarian Condition (PCO) in the Estradiol Valerate-Treated Rat". **Biology of Reproduction**. 35, 647-655.
- Brawer JR, Beaudet A, Desjardins GC, Schipper H.M. (1993) "Pathologic Effect of Estradiol on the Hypothalamus". **Biology of Reproduction**. 49: 647-652.
- Burden HW. (1978) "Ovarian Innervation". En: Jones R.E. (ed.) **The Vertebrate Ovary Comparative Biology**. Plenum Press. New York. 615-628.
- Carrière PD, Brawer JS, Farookhi. (1991) "Alterations in Gonadotropin-Releasing Hormone- Dependent Gonadotropin Secretion in Rats with Polycystic Ovaries". **Biology of Reproduction**. 45: 685-690.
- Chávez R, Carrizosa L, Domínguez R. (1991) "Effects of Superior Ovarian Nerve Section Spontaneous and Induced Ovulation in Adult Rats". **Medical Science Research**. 19, 41-42.

- Cryer PE (1981) "Disease of the Adrenal Medullae and Sympathetic Nervous System" En: Felig P. **Endocrinology and Metabolism**. USA. Editorial Mc Graw-Hill Book Company. Pp. 511-515.
- Davoren JB, Hsueh AJW. (1985) "Vasoactive Intestinal Peptide: A Novel Stimulator of Steroidogenesis by Cultured Rat Granulosa Cells". **Biology of Reproduction**. 33, 37-52.
- Dees WL, Ahmed CE, Ojeda SR. (1986) "Substance P- and Vasoactive Intestinal Peptide-Containing Fibers Reach the Ovary by Independent Routes". **The Endocrine Society**. 119, 638-641.
- Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Hoyer PB. (2000) "Ultrastructural Evaluation of Oocytes During Atresia in Rat Ovarian Follicles". **Biology of Reproduction**. 63, 1245-1252.
- Dissen G, Ojeda SR. (1999) "Ovarian Inervation". En: Knobil E, Neill J (Eds.) **Encyclopedia of Reproduction**. Academic Press. USA, 3:583-589.
- Feder HH. (1981) "Estrous Cyclicity in Mammals" En: Adler N.T. **Neuroendocrinology of Reproduction. Physiology and Behavior**. Editorial Plenum Press. New York. Pp.279-293
- Ferruz J, Barria A, Galleguillos X, Lara HE. (1991). "Release of Norepinephrine from the Rat Ovary: Local Modulation by Gonadotropins". **Biology of Reproduction**. 45, 592-597.
- Flores A, Ayala MA, Domínguez R. (1990) "Does Noradrenergic Peripheral Innervation Have a Different Role in the Regulation Ovulation in the Prepubertal and the dult Rat? **Medical Science Research**. 18, 817-818.
- Forneris LM, 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.
- Franz DN. (1995) "Drogas Bloqueantes Adrenérgicas y Bloqueantes de la Neurona Adrenérgica". En: Remington (1995). **Farmacía**. 19a. edición. Editorial Médica Panamericana. Pp.1520-1523.
- Freeman ME. (1994) "The Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat". En: Knobil E, Neill J. D. (Eds.) **The Physiology of Reproduction**. 2a. edición. Vol.2 Editorial Raven Press. New York. Pp 615-620.
- Ganong WF (1996) **Fisiología Médica**. Editorial El Manual Moderno. México. Pp.1026-1030.
- Ganong WF. (2000) **Fisiología Médica**. Editorial El Manual Moderno. México. Pp. 457-503.

- Gennaro AR. (1998) **Remington. Farmacia**. 19ª. Edición Tomo 2. Editorial Médica Panamericana. Argentina. Pp. 1647.
- Goldman BD. (1981) "Puberty". En: **Neuroendocrinology of Reproduction. Physiology and Behavior**. Ed. N.T. Adler. 229-238.
- Greenwald GS, Roy SK. (1994) "Follicular Development and its Control". En: Knobil E y Neill JD.(Eds.) **The Physiology of Reproduction**. 2ª. Edición. Raven Pres Ltd. Vol.2 ap. 12 New Cork. Pp. 529-724.
- Guyton AC. Hall JE. (2001) "Fisiología femenina antes de la Gestación y Hormonas Femeninas" En: **Tratado de Fisiología Médica**. 10ª. Edición. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. México. Cap. 81. Pp 1117-1133.
- Greiner M, Paredes A, Araya V, Lara HE. (2005) "Role of Stress and Sympathetic Innervation in the Development of Polycystic Ovarian Synrome". **Endocrine**. 28 (3): 319-324.
- Hadley ME. (2000) "**Endocrinology**". 5a. Edición. Editorial Prentice Hall. Pp 342-346.
- Hemmings R, Farookhi R, Brawer JR. (1983) "Pituitary and Ovarian Responses to Luteinizing Hormone Releasing Hormone in a Rat with Polycystic Ovaries", **Biology of Reproduction**. 29, 239-248.
- Hayes, FJ, Taylor, AE, Martin, KA. & Hall, JE. (1998) "Use of a Antagonist Asa Physiologic Probe in Polycystic Ovary Syndrome: Assessment of Neuroendocrine and androgen dynamics". **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 83,2343–2349.
- Jonhson EM, O'brien F, Werbit R. (1976) "Modification and Characterization of the Permanent Sympathectomy Produced by the Administration of Guanethidine to Newborn Rats". **European Journal of Pharmacology**. 37, 45-54.
- Jonhson EM, T. Manning P. (1984) "Guanethidine-induced Destrucción of Sympathetic Neurons". **Internatinal Review of Neurobiology**. 24: 1-37.
- Kilen SM, Schwarts NB. (1999) "**Estrous Cycle**". En: Knobil E, Neill J. D. (Eds.) **Encyclopedia of Reproduction**. Vol.2 Editorial Academic Press. USA Pp. 127-136.
- Lara HE, Dissen GA, Leyton Y, Paredes A, Fuenzalida H. (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". **The Endocrine Society**. 141: 1059-1072.
- Lara HE, Dorfman M, Venegas M, Luza SM, Marerhofer MA, Guimaraes MA, Rosa-E- Silva AAM, Ramírez VD. (2002) "Changes in Sympathetic Nerve Activity of the Mammalian Ovary During a Normal Estrous Cycle and in Polycystic Ovary Syndrome: Studies on Norepinephrine Release". **Microscopy Research and Technique**. 59: 495-502.

- Lara HE, McDonald JK, Ahmed CE, Ojeda SR. (1990) "Guanethidine Mediated Destruction of Ovarian Sympathetic Nerves Disrupts Ovarian Development and Function in Rats". **Endocrinology**. 127: 2199-2209.
- Lara HE, Ferruz JI, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR. (1993) "Activation of Ovarian Sympathetic Nerves in Polycystic Ovarian Syndrome". **Endocrinology**. 133. 2690-2695.
- Lawrence IE. Burden HW. (1980) "The Origin of the Extrinsic Adrenergic Innervation to the Rat Ovary". **Anatomical Record**. 196, 51-59.
- Linares CR. (2006) "Participación del Nervio Ovárico Superior en el Desarrollo del Síndrome del Ovario Poliquístico. La Rata Como Modelo de Estudio". **Tesis de Licenciatura**. UNAM. FES Zaragoza.
- Luza SM, Burgos RA, Lara HE. (1995) "Hypothalamic Changes in Norepinephrine Release in rats with Estradiol Valerate- Induced Polycystic Ovaries". **Biology of Reproduction**. 52: 398-404.
- Malamed S, Gibney JA, Ojeda SR. (1992) "Ovarian Innervation Develops Before Initiation of Folliculogenesis in the Rat". **Cell Tissue Research**. 270, 87-93.
- McCartney CR, Eagleson CA, Marshall JC. (2002) "Regulation of Gonadotropin Secretion: Implications for polycystic Ovarian Syndrome". **Seminars in Reproduction Medicine**. 20 (4): 317-326.
- Morales L, Chávez R, Domínguez R. (1993) "Participation of the Superior Ovarian Nerve in the Prepubertal Rat: Differential Effects of Unilateral and Bilateral Section of the Nerve". **Medical Science Research**. 21, 15-17.
- Morales L, Chávez R, Ayala ME, Domínguez R. (1998) "Effects of Unilateral or Bilateral Superior Ovarian Nerve Section in Prepubertal Rats on the Ovulatory Response to Gonadotrophin Administration". **Journal of Endocrinology**. 158, 213-219.
- Meyerhofer 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: 3320-3329.
- Ojeda SR, Andrew WW, Advis JP, Smith-White S. (1980). "Recent Advances in the Endocrinology of Puberty". **Endocrine Reviews**. 1:228-257.
- Ojeda SR, Urbanski HF. (1988) "Puberty in the Rat". En Knobil E, Neill J. D. (Eds.) **Encyclopedia of Reproduction**. Editorial Raven Press. New York Pp.1699-1737.
- Ojeda SR, Urbanski HF. (1994) "Puberty in the Rat". En Knobil E, Neill J. D. (Eds.) **Encyclopedia of Reproduction**. 2a edición. Editorial Raven Press. New York Vol.2. Pp.363-382.

- Ojeda SR, White SS, Advis JP, Andrews WW, Aguado LI (1990) "First preovulatory Gonadotropin Surge in The Rat" en Control of the Onset of Puberty. Editorial Williams & Wilkins. Cap. 6. pp
- Oliver RH., Chen GD, Yeh J. (1999) "Follicular Atresia". En Knobil E, Neill J. D. (Eds.) **Encyclopedia of Reproduction**. Vol 2. Editorial Academic Press. USA Pp. 373-375.
- Parra C, Fiedler JL, Luna SL, Greiner M, Padmanabhan V, Lara HE. (2007) "Participation of Vasoactive Intestinal Polypeptide in Ovarian Steroids Producción During the Rat Estrous Cycle and in the Development of Estradiol Valerate- Induced Polycystic Ovary" **Society of Reproduction and Fertility**. 133, 147-154.
- Quiróz U, Morales L, Morán C, Domínguez (1999) "Effects of Sympathetic Denervation Induced by Guanethidine Administration to Pregnant Rats on Follicular Development and Puberty of the Offspring". **Medical Science Research**. 27:599-600
- Quiróz U. (1994) "Efectos de la Denervación Catecolaminérgica Realizada Durante la Etapa Fetal Sobre la Pubertad Espontánea de la Rata Hembra o Macho" **Tesis de Licenciatura**. UNAM. FES Zaragoza.
- Rosa-E-Silva A, Guimares MA, Padmanabhan V, Lara HE. (2003) "Prepubertal Administration of Estradiol Valerate Disrupts Cyclicity and Leads to Cystic Ovarian Morphology During Adult Life in the Rat: Role of Sympathetic Innervation". **Endocrinology**. 144, 4289-4297.
- Rosa-E-Silva A, Prajante TM, Almeida FHS, Guimaraes MA, Lunardi LO. (1997). "Ovarian Granulosa and Theca Interstitial Cells: a morphological and Physiological Analysis in Guanethidine Denervated Rats at Pre-puberty". **Cellular and Molecular Biology**. 43 (3): 409-416.
- Rosas G. (2006) "Efecto de la Inducción del Síndrome del Ovario Poliquístico en la Rata Infantil, Sobre la Dinámica del Crecimiento Follicular y la Secreción de Hormonas Esteroides" **Tesis de Licenciatura**. UNAM. FES Zaragoza.
- Selstam G, Norjavaara E, Tegenfelt T, Lundberg S, Sandstrom C, Persson S. (1985) "Partial Denervation of the Ovaries by Transection of the Suspensory Ligament Does Not Inhibit Ovulation in Rats Treated With Pregnant Mare Serum Gonadotropin". **Anatomical Record**. 213, 392-395.
- Shulster A, Farrookhi R, Brawer JR. (1984) "Polycystic Ovarian Condition in Estradiol Valerate-Treated Rats: Spontaneous Changes in Characteristic Endocrine Features". **Biology of Reproduction**. 31, 587-593.
- Sotomaor-Zárate R, Dorfman M, Paredes A, 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.

- Spratto GR, Miller JW. (1968). "The Effect of Various Estrogens on the Weight Catecholamine Content and Rate of Contractions of Rat Uterus". ***The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics***. 161: 1-6.
- Stener-Victorin E, Jedel E, Manneras L. (2008) "Acupuncture in Polycystic Ovary Syndrome: Current Experimental and Clinical Evidence". ***Journal of Endocrinology***. 20: 290-298.
- Stener-Victorin E, Ploj K, Larsson B, Holmång A. (2005) "Rats with Steroid-Induced Polycystic Ovaries Develop Hypertension and Increased Sympathetic Nervous System Activity". ***Reproductive Biology and Endocrinology***. 3:44
- Tresguerres JAF. (1999) ***Fisiología Humana***. 2ª. Edición. Editorial Mc Graw-Hill. Madrid, España. Pp. 488-490.
- Tresguerres JAF. (2003) ***Fisiología Humana***. 2ª. Edición. Editorial Mc Graw-Hill. Madrid, España. Pp. 1036-1048.
- Trzeciak WH, Carol E, Ahmedt CE, Simpson ER, Ojeda SR. (1986) "Vasoactive Intestinal Peptide Induces the Synthesis of the Cholesterol Side-chain Cleavage Enzyme Complex in Cultured Rat Ovarian Granulosa Cells". ***Medical Sciences***. 83:7490-7494.
- Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS. (2004) "The Pathophysiology of Polycystic Ovary Syndrome". ***Clinical Endocrinology***. 60:1-17.
- Usandizaga JA, De Fuente P. (1997). "Tratado de Obstetricia y Ginecología". Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid. Vol 1.
- Van Voorhis BJ. (1999) "Follicular Steroidogenesis". En Knobil E, Neill J. D. (Eds.) ***Encyclopedia of Reproduction***. Vol 2. Editorial Academic Press. USA. Pp. 389-395.
- Weiss GK, Dail WG, Ratner A. (1982) "Evidence of Direct Neural Control of Ovarian Steroidogenesis in Rats". ***Journal of Reproduction and Fertility***. 65: 507-511.
- Yen SSC, "Síndrome del Ovario Poliquístico" (2001) En: Yen S.S.C, Jaffe R.B, Barberi R.L. ***Endocrinología de la Reproducción***. 4ª. Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. Pp.465-510.
- Yoshinaga K. (1999) "Estrogen Secretion, Regulation of". En Knobil E, Neill J. D. (Eds.) ***Encyclopedia of Reproduction***. Vol 2. Editorial Academic Press. USA Pp. 108-118.
- Zoubina E.V, Fan Q y Smith P.G (1998) "Variations in Uterine Innervation During the Estrous Cycle in Rat." ***The Journal of Comparative Neurology***. 397:561-571.

- Zoubina E.V, Smith P.G. (2002) "Distribution of Estrogen Receptors Alpha and Beta in Sympathetic Neurons of Female Rats: Enriched Expression by Uterine Innervation." ***Journal of Neurobiology***. 52: 14-23.