



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PARTICIPACIÓN DEL NERVIO OVÁRICO SUPERIOR EN LA RESPUESTA  
OVÁRICA DE LA RATA CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO,  
INDUCIDO POR ESTRÉS POR FRÍO.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**JULIETA AZUCENA ESPINOZA MORENO**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA**  
**FES ZARAGOZA, UNAM.**  
**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR: DRA. MARIA ELENA AYALA ESCOBAR**  
**FES ZARAGOZA, UNAM.**  
**DRA. ANA LILIA CERDA MOLINA**  
**INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRIA**

**MÉXICO, D.F., MAYO DE 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PARTICIPACIÓN DEL NERVIO OVÁRICO SUPERIOR EN LA RESPUESTA  
OVÁRICA DE LA RATA CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO,  
INDUCIDO POR ESTRÉS POR FRÍO.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**JULIETA AZUCENA ESPINOZA MORENO**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA**  
**FES ZARAGOZA, UNAM.**  
**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR: DRA. MARIA ELENA AYALA ESCOBAR**  
**FES ZARAGOZA, UNAM.**  
**DRA. ANA LILIA CERDA MOLINA**  
**INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRIA**

**MÉXICO, D.F., MAYO DE 2014**

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**


**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 17 de febrero de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **JULIETA AZUCENA ESPINOZA MORENO** con número de cuenta **404010052** con la tesis titulada **"PARTICIPACIÓN DEL NERVIJO OVÁRICO SUPERIOR EN LA RESPUESTA OVÁRICA DE LA RATA CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO, INDUCIDO POR ESTRÉS POR FRÍO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LETICIA MORALES LEDESMA:**

Presidente: DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN  
Vocal: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR  
Secretario: DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATZUMURA  
Suplente: DRA. ERIKA MONSERRAT ESTRADA CAMARENA  
Suplente: DRA. ANA LILIA CERDA MOLINA

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 03 de abril de 2014.



**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

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



## **AGRADECIMIENTOS**

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM** por haberme permitido ingresar en su programa de estudios en beneficio de mi formación académica y conducirme a terminar mis estudios de posgrado.

Agradezco al **CONACyT** por la beca 270095 otorgada para realizar mis estudios de maestría.

Esta Investigación fue realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM con clave del proyecto: IN211813, “Síndrome del ovario poliquístico, una patología regulada por la inervación extrínseca del ovario. La rata como modelo de estudio”. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

Agradezco a los miembros del comité tutor:

**Dra. Leticia Morales Ledesma**

**Dra. María Elena Ayala Escobar**

**Dra. Ana Lilia Cerda Molina**

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





## AGRADECIMIENTOS

A los miembros del jurado:

**Dra. María Esther Cruz Beltrán**

**Dra. María Elena Ayala Escobar**

**Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura**

**Dra. Ana Lilia Cerda Molina**

**Dra. Erika Monserrat Estrada Camarena**

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

A mi directora de tesis, **Dra. Leticia Morales Ledesma** por trabajar conmigo en la escritura, redacción y discusión del presente estudio. Por compartir conmigo sus conocimientos y experiencia que me alentaron a concluir este proyecto. >>Muchas gracias<<

A la **Dra. María Elena** y **Dra. Ana Lilia** por aceptar ser miembros de mi comité tutorial, por seguir de cerca mi desarrollo académico y en enriquecer con sus comentarios y críticas constructivas cada uno de los tutorales. Por ayudarme a corregir mis errores y compartir sus conocimientos y amistad.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio que colaboraron en la realización de esta tesis: Deyra, Elizabeth, Gaby, Rosa, a los pequeños Isa Navarrete, Isa Ramírez, Alina, Noe, Aldo, Azahel, Cesar, Dany, Liz y Cata. Por su apoyo en la parte experimental, comentarios en seminarios, pero sobre todo porque nuestra amistad crezca cada día más.

A **Juanito** por el apoyo que siempre me brindaste en el laboratorio, por todas las experiencias de vida que compartimos, por las charlas, los cafés, por todas las risas, por la bonita amistad que nos une. Te quiero Amiii.

Un agradecimiento muy especial a **Andy**. Amiga, gracias por los momentos que hemos compartido, por el infinito apoyo que me has brindado aún en los peores momentos de mí vida, siempre has estado conmigo y de tu parte nunca me ha faltado una palabra, un abrazo o una sonrisa que al final me llena de esperanza. Para mí, eres más que mi amiga, mi hermana. Te quiero mucho.

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

Al Dr. Roberto Chávira por su colaboración en las mediciones de las concentraciones hormonales.





## DEDICATORIA

### A mis padres

*Con todo mi amor para mis padres (Guadalupe Moreno y Benito Espinoza) por el amor incondicional y confianza que siempre me han brindado.*

*Les doy gracias por darme la vida, por cuidarme y siempre estar pendientes de mí. Mil gracias por todos sus consejos, por las charlas y momentos felices que pasamos juntos, en especial por la libertad que siempre me han dado para pensar, creer y actuar por mi cuenta, porque sé que aún en las adversidades, siempre están a mi lado y me respaldan con amor infinito.*

*Ustedes son mi motor, un gran motivo para superarme día con día.*

*Los amo.*





# Índice

## ÍNDICE

	Páginas
ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	4
El ovario.....	4
Regulación de las funciones del ovario.....	8
Ovulación.....	9
Biosíntesis de hormonas esteroides.....	10
Inervación ovárica.....	14
Estrés.....	15
Estresores.....	17
Estrés y reproducción.....	18
El síndrome de ovario poliquístico.....	19
Modelos para inducir el síndrome de ovario poliquístico.....	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVOS.....	25
MATERIAL Y MÉTODO.....	26
Procedimientos generales.....	26
Procedimiento del estrés por frío.....	26
Procedimiento de la autopsia.....	26
Cuantificación hormonal por radioinmunoanálisis (RIA).....	27
Cuantificación de monoaminas ováricas por HPLC.....	28
Cálculo de la tasa de animales ovulantes.....	29
Análisis estadístico.....	29

# Índice

---

	Páginas
Experimento 1 – Efectos de la exposición crónica al frío sobre el desarrollo del SOPQ.....	29
Experimento 2 – Efectos de la sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior en la rata hembra expuesta a estrés por frío.....	30
RESULTADOS.....	32
Experimento 1. Efectos de la exposición crónica al frío sobre el desarrollo del SOPQ.....	32
Resumen de resultados.....	37
DISCUSIÓN.....	38
RESULTADOS.....	45
Experimento 2.	
Efectos de la sección bilateral del nervio ovárico superior en ratas sometidas a 3 ó 5 semanas de estrés por frío .....	45
Efecto de la sección unilateral del nervio ovárico superior en ratas sometidas a 3 ó 5 semanas de estrés por frío .....	54
DISCUSIÓN.....	64
CONCLUSIONES.....	71
BIBLIOGRAFÍA.....	72

ABREVIATURAS

3 $\beta$ HSD	3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	Serotonina
ACTH	Hormona adenocorticotrópica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AN	Núcleo arcuato
ANDEVA	Análisis de varianza multifactorial
CGRP	Péptido relacionado con el gen que codifica la calcitonina
CL	Cuerpo lúteo
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DA	Dopamina
DHEA	Dehidroepiandrosterona
E <sub>2</sub>	Estradiol
EAV	Edad de apertura vaginal
FSH	Hormona folículo estimulante
GC	Ganglio celiaco
GCMS	Ganglio celiaco mesentérico superior
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
H – H – A	Hipotálamo hipófisis adrenal
H – H – G	Hipotálamo hipófisis gónada

## *Abreviaturas*

---

HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LH	Hormona luteinizante
MBH	Hipotálamo medio basal
MHPG	3-metoxi-4-hidroxifenilglicol
NA	Noradrenalina
NGF	Factor de crecimiento neural
NOS	Nervio ovárico superior
NPV	Núcleo paraventricular
NPY	Neuropéptido Y
NV	Nervio vago
OSB	Operación simulada bilateral
OSD	Operación simulada derecha
OSI	Operación simulada izquierda
P <sub>4</sub>	Progesterona
PC	Peso corporal
PO	Plexo nervioso ovárico
POA	Área preóptica
SBNO	Sección bilateral del nervio ovárico
SNOD	Sección del nervio ovárico derecho
SNOI	Sección del nervio ovárico izquierdo
SOPQ	Síndrome de ovario poliquístico
SP	Sustancia P

## *Abreviaturas*

---

T	Testosterona
TH	Tiroxina hidroxilasa
VE	Valerato de estradiol
VIP	Péptido intestinal vasoactivo

## R E S U M E N

El síndrome del ovario poliquístico (SOPQ) es una fisiopatología que afecta del 7 al 9 % de mujeres en edad reproductiva. Se caracteriza por falta de ovulación, hiperandrogenismo y presencia de ovario poliquístico. A la fecha no se conocen con precisión los factores que provocan el desarrollo del SOPQ. Para dilucidar su etiología se han diseñado diversos modelos experimentales, entre los más utilizados se encuentran la administración de valerato de estradiol (VE), el propionato de testosterona, el letrozol, la dihidrotestosterona o bien la exposición a estrés crónico por frío.

Tanto en el animal con SOPQ, inducido con VE o por estrés crónico por frío se reporta incremento en la actividad simpática del ovario; sin embargo, existe controversia en cuanto al tiempo de exposición al frío que se requiere para que los animales desarrollen las características del SOPQ e hiperactividad de las fibras nerviosas ováricas.

Por ello, ratas hembra de la cepa CII-ZV de 24 días de edad se colocaron en un cuarto frío a 4°C por tres horas, cinco días a la semana, durante 3 ó 5 semanas. Al finalizar el periodo de estrés las hembras fueron sacrificadas en el día del estro vaginal y se evaluó si estas desarrollaron hiperandrogenismo, anovulación, morfología de ovario poliquístico y aumento en la concentración de noradrenalina ovárica (indicadores de SOPQ).

En los animales expuestos a 3 semanas de estrés por frío la respuesta ovulatoria no se modificó por el frío, no se observó la presencia de quistes foliculares, la concentración de progesterona, testosterona y estradiol fue semejantes al grupo control, incrementó la concentración de noradrenalina ovárica, sin modificación en la concentración de su metabolito (MHPG) ni de serotonina. En el caso de los animales expuestos a 5 semanas de estrés por frío, no se modificaron los parámetros estudiados. Estos resultados indican que

## *Resumen*

---

el estresor usado en el presente estudio no indujo las características de diagnóstico del SOPQ.

En el segundo experimento se evaluó cómo responde el ovario del animal estresado por frío ante la falta de la información simpática aportada por el nervio ovárico superior (NOS). Para ello, al término del estrés los animales fueron sometidos a la sección del nervio ovárico izquierdo, derecho o bilateral y sus efectos fueron analizados al presentar el estro vaginal.

La denervación unilateral o bilateral del nervio ovárico superior (NOS) no modificó la respuesta ovulatoria a las 3 ó 5 semanas de exposición al frío.

En los animales expuestos a 3 semanas de estrés por frío, la sección bilateral del NOS, disminuyó la concentración plasmática de testosterona y estradiol e incrementó la de noradrenalina. Cuando el periodo de exposición al estrés fue por 5 semanas, aumentó la concentración de progesterona y disminuyó la de testosterona.

En ratas expuestas a 3 ó 5 semanas de frío, la eliminación del NOS izquierdo incrementó la concentración sérica de estradiol y únicamente a las 3 semanas incrementó la concentración de noradrenalina y serotonina ovárica. La sección del NOS derecho a hembras expuestas a 3 semanas de estrés resultó en aumento en la concentración de serotonina y noradrenalina ovárica, ésta última acompañada por la disminución en la concentración de su metabolito.

Estos resultados permiten sugerir que en el animal expuesto a estrés por frío, el NOS regula de manera diferencial la secreción de hormonas esteroides y de monoaminas.

## A B S T R A C T

The polycystic ovarian syndrome (PCOS) is a physiopathology affecting 7 – 9 % of all woman of reproductive age. Characterized by ovulatory failure, hyperandrogenism and the presence of ovarian cysts. To date is not known what factors cause the development of PCOS. To elucidate its etiology have been designed several experimental models, between the most commonly found the administration of estradiol valerate (EV), testosterone propionate, letrozole, dihydrotestosterone or by the exposure to chronic cold stress.

Both animal with PCOS, induced whit EV or chronic cold stress has been reported increases in the ovarian sympathetic activity. However, controversy exist as to the time of exposure to cold is required for animals develop the characteristics of PCOS and hyperactivity of the sympathetic nerve.

For this, female rats of the CII-ZV strain of twenty-four days old were placed in a cold room at 4 °C for three hours, for 5 days each week (Monday to Friday), for 3 or 5 weeks. The end of the stress period the females was sacrificed the day of vaginal estrus. Evaluates whether developed hyperandrogenism, anovulation, polycystic ovary morphology and increased concentration of ovarian noradrenaline (PCOS indicators).

In the animals exposed to 3 weeks of cold stress ovulatory response was not modified by cold, not observe follicular cysts, progesterone, testosterone and estradiol concentrations were similar to those of their controls, was increased concentrations of ovarian norepinephrine without changes in the concentration



## *Abstract*

---

of its metabolite (MHPG) neither in ovarian serotonin. In the case of animals exposed to 5 weeks of cold stress, the parameters studied were not modified. These results indicate that the stressor used in the present study did not induce the diagnostic features of PCOS.

In the second experiment assessed how the animal responds ovary cold stressed the absence of sympathetic input from the superior ovarian nerve (SON). For this purpose, the term stress animals underwent section of left, right or bilateral ovarian nerve and their effects were analyzed in presenting the vaginal estrus.

The unilateral and bilateral denervation of the ovary resulting from sectioning the SON did not modify ovulation rates (number of ovulating animals) nor the number of ova shed in the exposed rats to 3 or 5 weeks chronic cold stress.

The bilateral section of the SON in exposed animals to 3 weeks cold stress, decreased the testosterone and estradiol plasmatic concentration and increased the ovarian norepinephrine. When the period of stress exposure was for 5 weeks, progesterone concentration increased and decreased the testosterone.

Removal of left NOS in rats exposed to 3 or 5 weeks of cold would increase the concentration of estradiol and only at 3 weeks elevated the ovarian concentration of norepinephrine and serotonin. The right section of SON females exposed to 3 weeks of stress resulted in increased ovarian serotonin and noradrenaline concentration, the latter accompanied by a decrease in the concentration of its metabolite.

The results obtained in the present study allow us to conclude that in animals exposed to cold stress, the SON differentially regulate the secretion of steroid hormones and ovarian monoamines.

# INTRODUCCIÓN

El Síndrome del ovario poliquístico es un complejo y heterogéneo trastorno endocrino que afecta a mujeres en edad reproductiva. El desarrollo del síndrome depende de múltiples interacciones entre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, pero aún no se logra un consenso sobre las causas primarias que lo inician, sin embargo, se acepta que su etiología es multifactorial ya que involucra factores hormonales, metabólicos, genéticos y ambientales (Sir-Petermann y col., 2001).

En la mujer, el SOPQ está caracterizado por anovulación crónica, presencia de ovarios poliquísticos, amenorrea, hiperandrogenismo, altas concentraciones de hormona luteinizante (LH), mientras que la hormona folículo estimulante (FSH) puede disminuir o no modificarse (Yen y col., 2001). Existen diversos modelos experimentales para inducir el SOPQ, algunos mediante el uso de fármacos como el Valerato de Estradiol (VE), el Propionato de Testosterona, el Isoproterenol, el Letrozol o la dihidroxitestosterona (Manneras, 2007; Feng, 2009) o bien por la inducción de estrés por restricción de movimiento o por la exposición crónica al frío (Paredes y col., 1998; Dorfman y col., 2003; Araya y col., 2004). Cuando se induce el síndrome por la administración de VE o por estrés por frío, se incrementa la actividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario, lo que se traduce en la formación de quistes foliculares y mayor secreción de andrógenos y estrógenos (Rosa-e-Silva y col., 2003; Paredes y col., 1998).

A la fecha no se sabe a qué parte del eje hipotálamo-hipófisis-ovario se inicia el desarrollo del síndrome, por lo que se han formulado diversas hipótesis sobre su origen:

- *Hipotálamo – Hipófisis.* En el cual se establece que inicialmente el

## *Introducción*

---

síndrome se debe a una alteración en los pulsos de secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), los cuales van a producir en la adenohipófisis concentraciones variables de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH), lo que se traduce en el ovario en aumento en la concentración de andrógenos y la formación de quistes foliculares (Farookhi y col., 1985).

- *En el ovario:* Hay una sobre expresión del complejo enzimático P450c17 y de la enzima 3 $\beta$ -HSD, lo que se traduce en la sobre producción de andrógenos que aumentan la sensibilidad en el hipotálamo (Bremer y col., 2010)
- *Por la inervación simpática.* Se establece que inicialmente hay cambios en la homeostasis de las catecolaminas ováricas, mismos que se inician antes del desarrollo de los quistes foliculares. Estos cambios incluyen aumento en el contenido de noradrenalina (NA) ovárica y en su liberación desde las terminales nerviosas ováricas, además de disminución en los receptores  $\beta$ -adrenérgicos presentes en las células de la teca y de la glándula intersticial del ovario (Araya y col., 2004).

Para diagnosticar el SOPQ debe presentarse hiperandrogenismo, acompañado por la formación de quistes foliculares o anovulación. La inducción del síndrome mediante la administración de VE o por estrés por frío comparte algunas características como el incremento en la actividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario, la formación de quistes foliculares y el aumento en la secreción de andrógenos y estrógenos. Sin embargo, hay otros parámetros en los que difieren, con el VE, hay bloqueo de la ovulación, adelanto en el inicio de la pubertad y la citología vaginal muestra células que corresponden a la fase de estro. Con el estrés por frío, disminuye la cuota ovulatoria y los animales son acíclicos.

## *Introducción*

---

A la fecha, no es claro el tiempo de exposición al frío con el cual las hembras desarrollan las características de diagnóstico del SOPQ e hiperactividad en las neuronas simpáticas; por lo que el presente estudio tuvo como objetivos 1) evaluar si la exposición crónica a 3 ó 5 semanas de estrés por frío induce las características que definen al SOPQ; 2) analizar el papel del NOS en el animal expuesto a 3 ó 5 semanas de estrés por frío.

## MARCO TEÓRICO

### EL OVARIO

El ovario es la gónada femenina en la cual se llevan a cabo dos funciones, la producción de óvulos maduros capaces de ser ovulados y la producción de hormonas esteroides y peptídicas (Guyton, 2001). En el ovario se distinguen tres zonas:

- 1) *La corteza* en la que se encuentran los folículos en diferentes estados de maduración rodeados por el estroma, estructura formada por células del tejido conjuntivo, entre las que se encuentran fibroblastos, células del músculo liso y células intersticiales.
- 2) *La médula*. Parte más interna formada por una rica red vascular, tejido conectivo laxo con fibras elásticas, vasos linfáticos y fibras nerviosas.
- 3) *El hilio*. Zona a través de la cual se insertan la arteria y vena ovárica, los vasos linfáticos, las terminales nerviosas y las células intersticiales hiliares (Sánchez Criado, 1999).

Los folículos son la unidad funcional del ovario, están formados por el ovocito, las células de la granulosa y las células de la teca (Sánchez Criado, 1999). Las células de la granulosa son las más cercanas al ovocito mientras que las células de la teca se encuentran en la periferia del folículo, ambos tipos celulares están separados por la lámina basal (Sherwood, 2011).

## *Marco Teórico*

---

El desarrollo de los folículos es un proceso regulado por influencias parácrinas, autócrinas y por señales hormonales provenientes del sistema nervioso (Ojeda y col., 1992; Richards, 1994). Durante este proceso el ovocito incrementa su tamaño y aumentan el número de células de la granulosa y de la teca. De acuerdo a su organización estructural los folículos pueden diferenciarse en 4 tipos: *primordiales*, *primarios*, *secundarios* y *terciarios o preovulatorios* (Figura 1).

Una vez que se presenta la ovulación, la estructura folicular se reorganiza hasta la formación de un cuerpo lúteo (CL), donde las células de la granulosa y las células de la teca interna del folículo post-ovulatorio presentan cambios morfológicos y funcionales conocidos como luteinización. Las primeras ocupan las regiones más profundas y centrales del cuerpo lúteo y su secreción principal es la progesterona. Las células luteínicas de la teca se especializan en la secreción de estradiol, estrona y progesterona (Bergman y col., 1998). En los roedores, la fase lútea dura de 1 a 2 días, el CL adquiere su máximo tamaño en el día del diestro II (Freeman, 1994). El número de cuerpos lúteos presentes en el ovario indica el número de ovulaciones que varía según la especie (Tresguerres, 1999).

Sólo una pequeña fracción de los folículos ováricos presentes en el ovario logra completar su maduración, de tal forma que lo más común es que inicien un proceso conocido como atresia folicular (Rosales, 1998).

La atresia folicular es un mecanismo irreversible asociado con: desprendimiento y degeneración de las células de la granulosa, que se caracteriza por la presencia de núcleos picnóticos (Hay y col., 1976); fragmentación de la lámina basal (Bagavandoss y col., 1983); reducción en la síntesis de DNA (Greenwald, 1989); disminución de la síntesis de estrógenos (Carson y col., 1979) o reducción de la capacidad de unión de las gonadotropinas a su receptor (De Felici y col., 1993). Si bien los mecanismos involucrados en la atresia son

## *Marco Teórico*

---

inciertos, la mayor parte de las evidencias apuntan a que son los andrógenos, derivados de las células tecointersticiales, el factor primario que desencadena la atresia.

Actualmente se considera que la apoptosis es el principal mecanismo de degeneración celular durante el proceso de atresia, ya que ha sido asociada con la falla en la producción o activación de las enzimas que participan en la remodelación tisular del tejido ovárico (García y col., 1997).

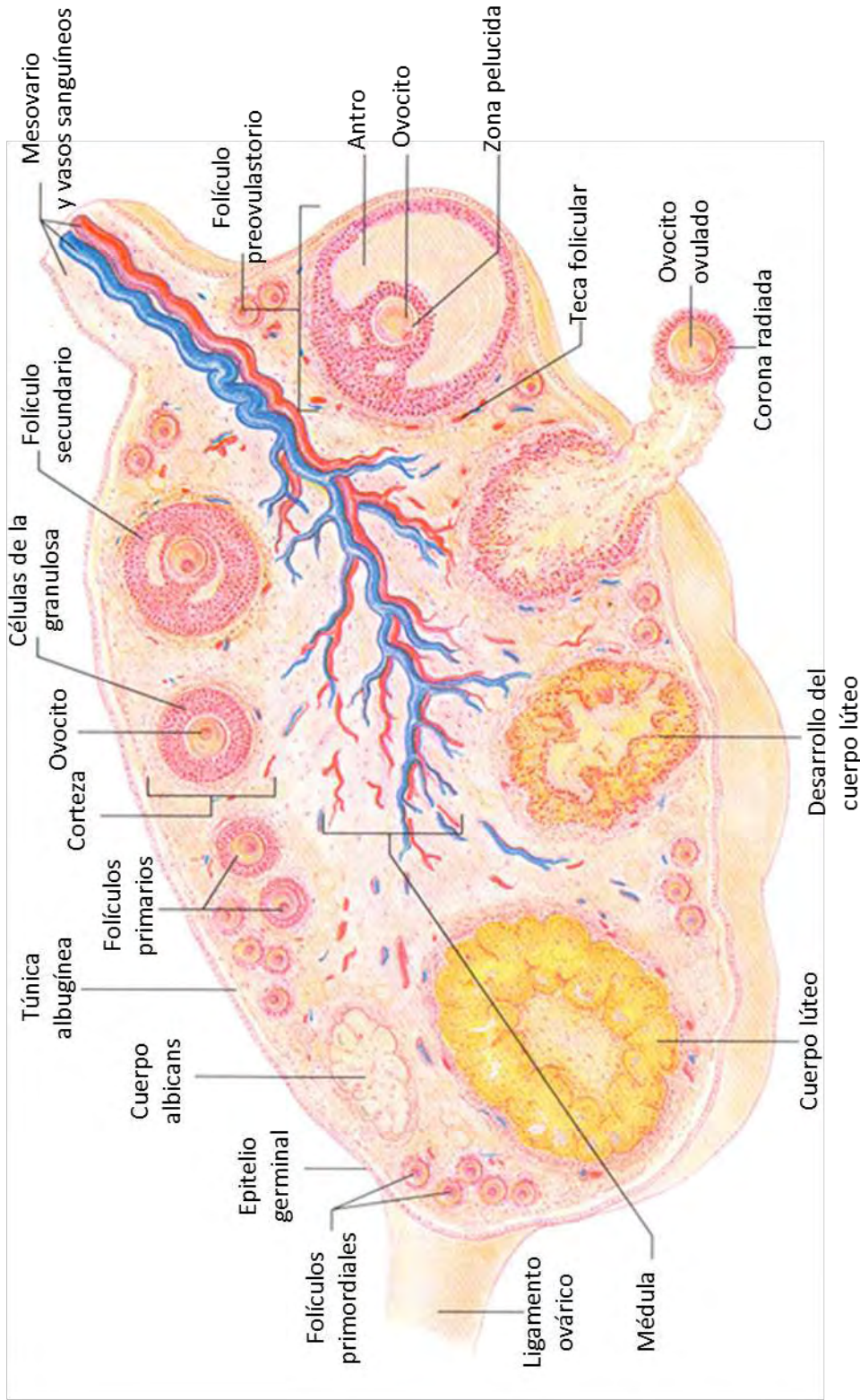


Figura 1. Esquema en el que se muestran los diferentes compartimentos ováricos, la secuencia de la maduración folicular, ovulación y formación del cuerpo lúteo (Modificado de Marieb 1992).



**REGULACIÓN DE LAS FUNCIONES DEL OVARIO**

Las funciones del ovario son reguladas en forma coordinada por mecanismos endocrinos, que se llevan a cabo en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario y por vías neurales (Figura 2).

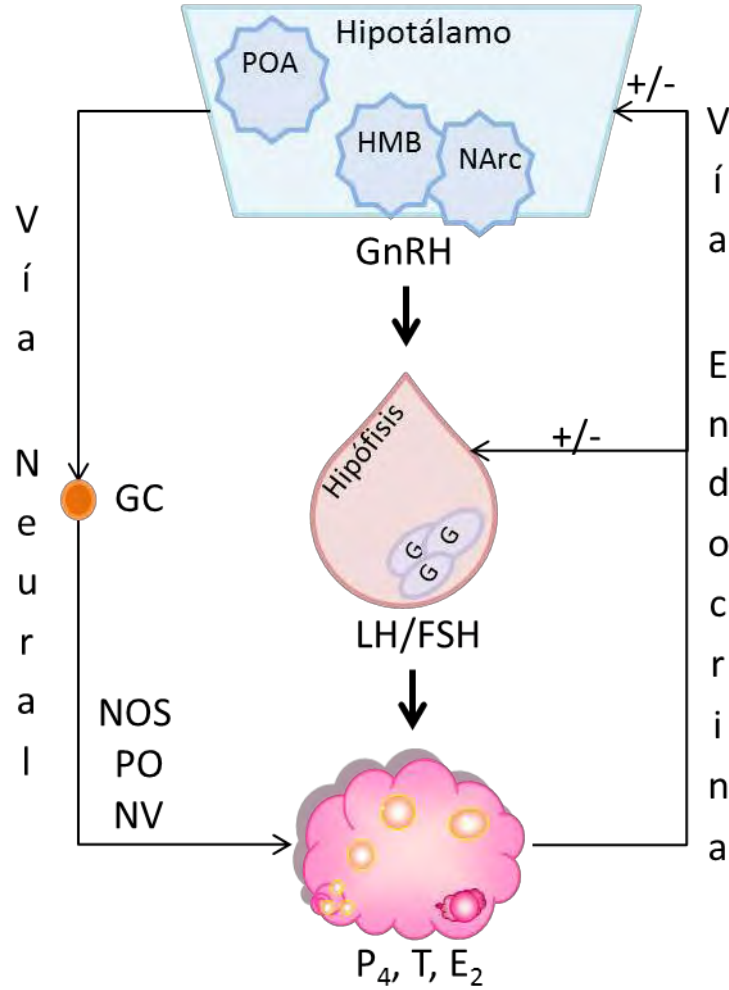


Figura 2. Esquema que muestra la regulación endocrina y neural del ovario. POA: área preóptica; HMB: hipotálamo medio basal; NArc: núcleo arcuato; GnRH: hormona liberadora de las gonadotropinas; G: gonadotropos; LH: hormona luteinizante; FSH: hormona folículo estimulante; P<sub>4</sub>: progesterona; T: testosterona; E<sub>2</sub>: estradiol; GC: ganglio celiaco; NOS: nervio ovárico superior; PO: plexo ovárico; NV: nervio vago; +: regulación estimulante; -: regulación inhibitoria.

En el área preóptica, el hipotálamo medio basal y el núcleo arcuato se ubican los somas de las neuronas que sintetizan GnRH, sus terminales nerviosas convergen en la eminencia media donde secretan la GnRH hacia los vasos que forman el sistema porta hipotálamo hipofisario. En la adenohipófisis la GnRH estimula en los gonadotropos la síntesis y liberación de la LH y FSH. En el ovario las gonadotropinas actúan sobre receptores específicos localizados en las células ováricas, regulando la ovulación y la secreción de hormonas esteroides.

### **OVULACIÓN**

En los mamíferos la ovulación está definida como el proceso biológico que inicia con la estimulación de los folículos ováricos maduros por las gonadotropinas, finaliza con la ruptura del folículo y la liberación de un ovocito fértil dentro del oviducto (Lawrence, 1999).

En la mujer se produce la liberación del ovocito alrededor del día 14 de un ciclo normal de 28 días (Ross y col., 2005), justo antes de la ovulación el flujo sanguíneo se detiene en una pequeña región de la superficie ovárica sobre el folículo que hace protusión. En la rata, el ciclo estral es de cuatro o cinco días y la ovulación se produce en el día del estro vaginal (Ojeda y Urbanski, 1994).

Días antes de la ovulación la tasa de secreción de LH aumenta de 6 a 10 veces y alcanza sus concentraciones máximas unas 16 horas antes de la ovulación. El aumento en la liberación de la LH es precedido por el aumento brusco de E<sub>2</sub> en plasma, el cual es estimulado por acción de las gonadotropinas. Al mismo tiempo, la FSH aumenta de dos a tres veces. Ambas gonadotropinas actúan de forma sinérgica lo que provoca que el folículo se hinche en días previos a la ovulación (Guyton, 2001).

## *Marco Teórico*

---

Para que se lleve a cabo la ovulación, en el folículo ocurren un conjunto de cambios que favorecen la expulsión del ovocito:

- I. Los lisosomas de las células de la teca externa comienzan a liberar enzimas proteolíticas que causan la disolución y debilitamiento de la matriz colágena de la pared folicular, esto produce una pequeña protuberancia llamada estigma.
- II. Simultáneamente crecen nuevos vasos sanguíneos hacia el interior de la pared folicular y se estimula la secreción de prostaglandinas (provocan vasodilatación) en los tejidos foliculares.
- III. Finalmente, la combinación de la hinchazón del folículo con la degeneración del estigma hacen que el folículo se rompa y el ovocito sea expulsado (Guyton, 2001).

### **BIOSINTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES**

Las hormonas ováricas participan en procesos como el desarrollo folicular, la ovulación, la fertilización y el desarrollo embrionario (Humbrey y col., 1999). El ovario utiliza al colesterol como precursor en la síntesis de hormonas esteroideas.

El colesterol puede obtenerse de tres maneras:

1. Incorporado desde el plasma sanguíneo donde es transportado unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL).
2. Del colesterol almacenado en forma de ésteres en las gotitas de lípidos.

3. Sintetizado de “novo” a partir del acetato dentro de las células.

A través de los diferentes compartimentos foliculares el colesterol se metaboliza a progestágenos, andrógenos y estrógenos (Tresguerres, 1999).

El primer paso en la biosíntesis de las hormonas esteroideas se lleva a cabo en la membrana interna de las mitocondrias de las células de la teca, donde a partir de la unión de la LH a sus receptores y por activación del citocromo p450<sub>scc</sub>, enzima que rompe la cadena lateral del colesterol, ocurre la conversión del colesterol a pregnenolona (Tresguerres, 1999) (Figura 3).

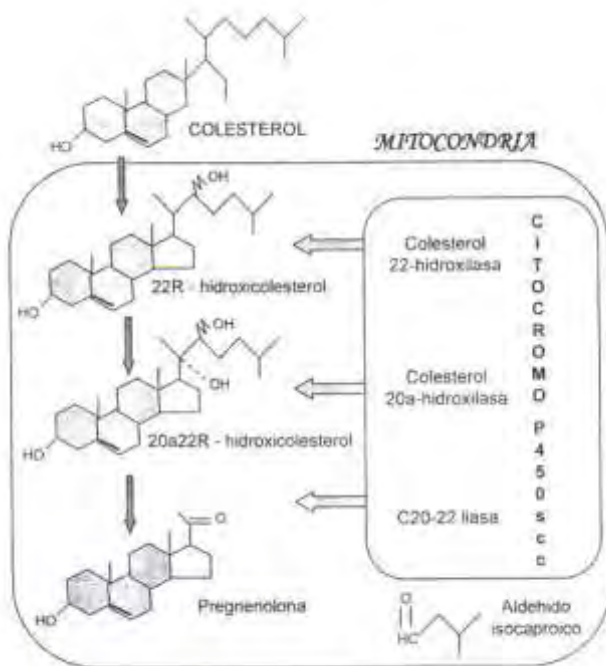


Figura 3. Esquema que muestra la ruta para la conversión del colesterol a pregnenolona. (Tomado y modificado de Pedernera, 1993).

El progestágeno de mayor importancia es la pregnenolona, la cual puede ser biotransformada a partir de dos vías la  $\Delta^4$  o la  $\Delta^5$  (Figura 4). La oxidación de la pregnenolona a  $P_4$  es catalizada a partir de la enzima  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $3\beta$ HSD) y la  $\Delta^4/\Delta^5$  isomerasa que están presente en las células tecales, de la granulosa y lúteas (Guyton, 2001; Humbhrey y col., 1999; Tresguerres, 1999).

## Marco Teórico

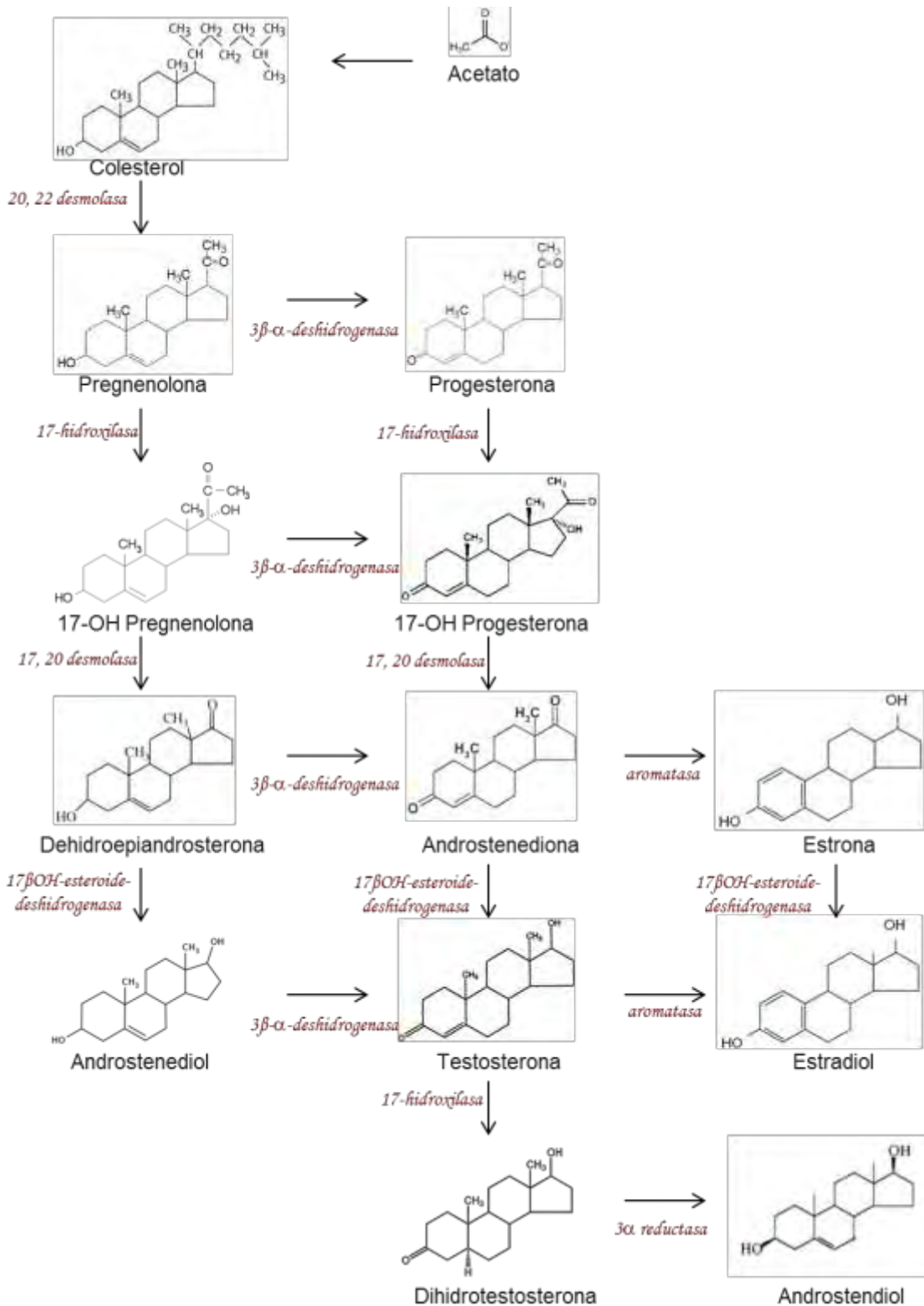


Figura 4. Esquema que muestra las rutas para la biosíntesis de las hormonas esteroides.

A partir de la 17-hidroxilasa la **pregnenolona** se convierte a **17-hidroxipregnenolona**, después por efecto de la 17, 20-desmolasa se convierte en **dehidroepiandrosterona (DHEA)**, la cual se transforma a **androstenediol** por acción de la 17- $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa y a **T** por efecto de la 3 $\beta$ - $\alpha$ -deshidrogenasa y la  $\Delta$ 4-5 isomerasa.

O bien, a partir de la 3 $\beta$ - $\alpha$ -deshidrogenasa y la  $\Delta$ 4-5 isomerasa la **pregnenolona** se convierte en **progesterona**, la cual por acción de la 17-hidroxilasa es convertida a **17-hidroxiprogesterona** después por efecto de la 17, 20-desmolasa se transforma en **androstenediona** la cual se convierte en **T** por la acción de la 17- $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa (Humbhrey y col., 1999; Tresguerres, 1999).

Los andrógenos son secretados a la vena ovárica, pero también pasan a las células de la granulosa, la mayoría de los **andrógenos** son biotransformados a **estrona y E<sub>2</sub>** por acción de las aromatasas (Tresguerres, 1999).

En la rata, al final del periodo peripuberal aumentan las concentraciones de E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> y T, siendo esta última la responsable de la canalización de la vagina (Mathews y col., 1987).

Fisiológicamente los estrógenos, especialmente la estrona y el E<sub>2</sub> son los esteroides más importantes en el ovario, aunque también hay pequeñas cantidades de estriol (Guyton, 2001; Humbhrey y col., 1999).

Los estrógenos ováricos modulan la secreción de LH y FSH por sus acciones en hipotálamo e hipófisis. El E<sub>2</sub> secretado por el compartimiento folicular durante la fase proliferativa ejerce una acción inhibitoria (retroalimentación negativa) sobre la secreción de LH y FSH, manteniendo la secreción de estas gonadotropinas en una concentración basal. Durante la fase folicular tardía, las altas concentraciones de E<sub>2</sub> secretadas por el folículo preovulatorio estimulan la secreción de LH y FSH (retroalimentación positiva) que precede a la ovulación.

El E<sub>2</sub> es fundamental para que las gonadotropinas ejerzan sus acciones sobre el ovario, permitiendo la acción de la FSH sobre las células de la granulosa y posibilitando la capacidad de la FSH para incrementar y mantener sus propios receptores (Tresguerres, 1999).

### **INERVACIÓN OVÁRICA**

El ovario y la mayoría de las glándulas endocrinas son inervadas por neuronas del sistema nervioso periférico (Dissen-Ojeda, 1999). Los ovarios de los mamíferos están inervados por neuronas simpáticas y sensoriales, con un pequeño componente parasimpático. Estas neuronas contienen fibras que llegan a los componentes estructurales de la glándula, incluyendo la vasculatura, el tejido intersticial y los folículos en desarrollo (Dissen-Ojeda, 1999).

Las fibras simpáticas posganglionares que inervan al ovario derivan de cuerpos celulares neuronales de los ganglios ováricos, los cuales se localizan en el origen de la arteria ovárica y de los cuerpos celulares del plexo celiaco y renal (Baljet y Drukker, 1976). Las fibras están asociadas con la vascularidad, viajan a lo largo del tejido intersticial y rodean a los folículos en desarrollo, pero ninguna fibra penetra el cuerpo lúteo ni a las células de la granulosa (Lara y col., 2002; Greiner y col., 2005). El ovario de la rata recibe inervación simpática a través de dos vías:

- 1) **El nervio ovárico superior (NOS)** el cual está asociado con el ligamento suspensorio y está formado por fibras que transporta catecolaminas [principalmente noradrenalina (NA)], neuropéptido Y (NPY) y péptido intestinal vasoactivo (VIP). Las fibras del NOS inervan a la glándula intersticial y la teca interna de los folículos (Lawrence y Burden, 1980).

- 2) **El plexo nervioso ovárico (PO)** el cual viaja a lo largo de la arteria ovárica, está formado por fibras sensoriales por las que transporta sustancia P (SP), el péptido relacionado con el gen que codifica la calcitonina (CGRP) (Dees y col., 1995; Klein y Burden 1988) y fibras simpáticas por las que transporta NA y VIP (McDonald y col., 1987).

La porción simpática de la inervación ovárica tiene origen en la porción de los segmentos T11 a L4 de la médula y hace sinapsis con el ganglio celiaco y mesentérico superior (Sarper y col., 1976; Lawrence y Burden, 1980; Sejnowski, 1982; Chávez y col., 1991). La conexión que existe entre el ovario y el plexo celiaco, a través del NOS ha sido confirmada usando trazadores de transporte retrógrado (Baljet y Drukker, 1980; Klein y Burden, 1988a, b).

## **ESTRÉS**

A finales del siglo XIX el fisiólogo francés Claude Bernard observó que los organismos poseen un mecanismo de autorregulación que mantiene estable su medio interno ante las presiones del medio ambiente externo (Johnson y col., 1992) y describió las bases del equilibrio dinámico, donde la constancia, un estado de equilibrio en el interior del organismo, es esencial para la supervivencia. Cuando se presentan cambios en el medio ambiente o en las fuerzas externas el organismo reacciona mediante modificaciones en su equilibrio interno para compensar tales cambios y asegurar su sobrevivencia.

Varias décadas después el fisiólogo Walter Cannon empleó el término “homeostasis” para describir los procesos fisiológicamente coordinados que mantienen en estado estable al organismo. También fue el primero en tocar el tema de especificidad de la respuesta al estrés, sin embargo Cannon nunca utilizó la palabra “estrés” (Cannon, 1929; Cannon, 1939). El término estrés fue introducido por el endocrinólogo Hans Selye quien lo definió como una respuesta inespecífica del organismo ante alguna amenaza (Selye, 1936).



Selye introdujo la expresión “síndrome general de adaptación”, en el que se definen tres fases sucesivas para la adaptación: fase de alarma, fase de resistencia y fase de agotamiento. Más tarde Selye propuso que la mayoría de los estímulos estresantes inducen dos tipos de respuestas: 1) una respuesta general de estrés, la cual es semejante para todos los estresores, e involucra la secreción de la hormona adenocorticotrópica (ACTH) y corticosterona; 2) respuesta individual al estrés mediada por “factores condicionantes” tales como predisposición genética (Selye, 1976).

A la fecha no se ha alcanzado un consenso sobre la definición precisa de “estrés”, en términos biológicos una definición sencilla hace referencia a cualquier estímulo, real o percibido, que pueda amenazar la homeostasis (Rivest y Rivier, 1995). Möstl y Palme (2002) definen al factor causante del estrés como cualquier estímulo ambiental capaz de afectar la homeostasis, mientras que la respuesta del animal ante ello es denominada respuesta al estrés.

Ante una situación que genera estrés, se activan mecanismos fisiológicos y conductuales dirigidos a conservar la homeostasis de dicho organismo, si estos mecanismos resultan inadecuados por prolongados o excesivos, se pueden presentar consecuencias negativas sobre otras funciones fisiológicas como la función reproductiva.

Diferentes situaciones estresantes activan el eje hipotálamo hipófisis adrenal (H-H-A) ya que neuronas localizadas en el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo secretan la hormona liberadora de corticotropina (CRH), misma que al llegar a la hipófisis estimula en los corticotropos la secreción de la ACTH, misma que estimula la secreción de glucocorticoides (cortisol en el caso del humano y corticosterona en los roedores) desde la corteza adrenal.

La activación del eje H-H-A pueden afectar los mecanismos que regulan la reproducción al actuar en el hipotálamo, la hipófisis o las gónadas. En el hipotálamo se afecta la secreción de la GnRH, en la hipófisis se inhibe la secreción de gonadotropinas principalmente de LH y en la gónada se altera la función folicular, luteal y testicular (Tilbrook y col., 2000).

El funcionamiento correcto de un organismo vivo se mantiene gracias a un equilibrio dinámico y complejo conocido como homeostasis, que constantemente es desafiado por situaciones exógenas denominados estresores; cuando dichos estresores alteran la homeostasis provocan una respuesta conocida como estrés.

### **ESTRESORES**

El termino estresor se refiere a una situación que perturba la homeostasis y puede ser percibida como un peligro real o aparente (Pacák y Palkovits, 2001). La presencia de un estresor produce inmediatamente la activación del sistema nervioso periférico (glándulas suprarrenales, sistema cardiovascular, respiratorio y metabólico) y ciertos procesos en el sistema nervioso central (amígdala, hipotálamo, hipocampo, septum, corteza prefrontal, entre otras) (Mercier y col., 2003).

Los estresores pueden dividirse en cuatro categorías:

- 1) Estresores físicos
- 2) Estresores psicológicos
- 3) Estresores sociales
- 4) Estresores que alteran la homeostasis cardiovascular y metabólica (McCarty, 1989; Pacák y col., 1998; Van de Kar y Blair, 1999).

Entre los estresores físicos se incluyen el frío, el calor, la radiación intensa, el ruido, la vibración, entre otros. Los estresores psicológicos afectan profundamente los procesos emocionales y pueden resultar en cambios de comportamiento como ansiedad, miedo, o frustración. El estrés de tipo social para un animal es equivalente a la colocación de éste en el territorio de un animal dominante y en los seres humanos, al desempleo y la separación matrimonial, entre otros. Los estresores que perturban la homeostasis cardiovascular o metabólica incluyen el ejercicio, la inclinación vertical, la hipoglucemia, y la hemorragia.

En términos de duración, los estresores pueden dividirse en dos categorías principales:

- a) Estresores agudos donde el estímulo estresante se aplica una sola vez y el tiempo de su duración es limitado.
- b) Estresores crónicos donde la exposición al estresante puede ser intermitente y con exposición prolongada o continua (Pacák y Palkovits, 2001).

Las respuestas de adaptación que se producen por estrés incluyen procesos fisiológicos y de comportamiento que son esenciales para restablecer el equilibrio homeostático (Pacák y Palkovits, 2001).

### **ESTRÉS Y REPRODUCCIÓN**

A mediados del siglo pasado Selye (1939) propuso que la actividad del eje H-H-A era capaz de inhibir al eje hipotálamo hipófisis gonadal (H-H-G). El CRH es un péptido que puede tener efectos directos sobre la reproducción. Los glucocorticoides inhiben aspectos de reproducción. La administración periférica de CRH no interrumpe la liberación de GnRH ni de LH, mientras que la

inyección intercerebroventricular o en eminencia media inhiben la secreción hipofisaria de LH, respuesta que se debe a que el CRH no atraviesa la barrera hematoencefalica (Li y Col., 2010).

Los mecanismos por los cuales el CRH regula la actividad de la GnRH involucran la combinación de mecanismos directos e indirectos. El CRH puede modular al eje H-H-G por activación del sistema nervioso simpático, por la activación del eje H-H-A (con la liberación de glucocorticoides) (Li y Col., 2010).

### **EL SÍNDROME DEL OVARIO POLIQUÍSTICO (SOPQ)**

El SOPQ es un desorden endocrino y metabólico que afecta a mujeres en edad reproductiva. Está considerado como síndrome no como enfermedad, el cual se manifiesta por signos y síntomas clínicos heterogéneos (Xita y col., 2002).

Este síndrome es la causa más frecuente de esterilidad anovulatoria hiperandrogénica. Se manifiesta clínicamente por una combinación de hiperandrogenismo con anovulación crónica y aumento de la relación LH: FSH. El hiperandrogenismo se traduce en hirsutismo, acné, en casos raros alopecia dependiente de los andrógenos asociados con un aumento de la concentración en suero de testosterona y androstenediona. La anovulación crónica se asocia con oligomenorrea o amenorrea y con la presencia de ovarios poliquísticos bilaterales (Yen y col., 2001).

Estudios previos han mostrado que el SOPQ se asocia con secreción irregular de gonadotropinas. Comparado con la fase folicular del ciclo menstrual normal, las mujeres con el síndrome presentan una secreción de LH muy elevada y concentraciones reducidas y constantes de FSH (Yen y col., 2001).

En la mujer con este síndrome, la morfología ovárica se caracteriza por aumento del tamaño de ambos ovarios y por la presencia de una cápsula

regular pero engrosada y desprovista de vascularización. En ocasiones puede observarse un cuerpo lúteo o un cuerpo albicans. Los quistes por lo general presentan hiperplasia de las células de la teca y pocas capas de células de la granulosa (Almahbobi y col., 1996). Los ovarios poliquísticos asociados con este síndrome presentan alteraciones funcionales, como la hiperactividad esteroidogénica de las células tecales y la hipofunción de las células de la granulosa (Erickson y col., 1979; Ehrmann y col., 1995; Franks, 1995).

Tanto en la clínica como en el laboratorio se ha visto que para considerar la existencia del SOPQ se debe presentar hiperandrogenismo, y por lo menos una de las siguientes características: anovulación o formación de quistes foliculares.

### **MODELOS UTILIZADOS PARA INDUCIR EL SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO**

Se han desarrollado numerosos modelos experimentales para estudiar la etiología del SOPQ. Algunos mediante el uso de sustancias hormonales (Manneras, 2007; Feng, 2009) o bien por la inducción de estrés (Paredes y col., 1998; Dorfman y col., 2003; Araya y col., 2004).

En la rata, la inducción del síndrome mediante la administración de una dosis de 2mg de valerato de estradiol (VE), estrógeno de larga actividad que tiene una vida media de 15 días, produce hiperandrogenismo, anovulación y formación de quistes ováricos (Hemming y col., 1983; Brawer y col., 1986).

Estudios realizados por el grupo de Lara (2000) mostraron que la administración de VE provoca en el ovario, incremento en la concentración del factor de crecimiento neural (NGF) y de su receptor de baja afinidad, el p75. El NGF, sintetizado en las células de la teca (Dissen y col., 1996) se une a su receptor transmembranal el p-75, localizado en el botón terminal de las células nerviosas

(Anesetti y col., 2009), y tiene la particularidad de viajar de manera retrograda hasta el núcleo del soma neuronal que se encuentra en el ganglio celiaco (GC). Estas señales modifican la expresión de genes que codifican para ciertas proteínas (Campenot y MacInnis, 2004) como la tiroxina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de catecolaminas. El incremento en la TH resulta en mayor liberación de NA, la cual llega al ovario a través del NOS. Resultados que han sido interpretados como mayor actividad de las fibras simpáticas.

Se ha visto que en animales con el síndrome inducido mediante la administración de VE y sometidos a la sección bilateral del NOS, la concentración de NA ovárica disminuye y los animales recuperan sus funciones ováricas, esto debido a la eliminación de la principal fuente noradrenérgica del ovario. Resultados que llevaron a los autores a sugerir que el SOPQ se origina en respuesta al mayor tono simpático (Lara y col., 1993; Sotomayor y col., 2008).

Cuando se realiza la sección unilateral del NOS, sea izquierdo o derecho, esta respuesta es diferente puesto que el ovario inervado es el que recupera la respuesta ovulatoria, aun cuando la concentración de NA sigue siendo alta. Resultados que nos permitieron sugerir que el SOPQ no se debe exclusivamente a la hiperactividad de las fibras simpáticas ováricas, y que posiblemente existen otras vías neurales por las que el ovario está regulando sus funciones (Morales y col., 2010).

Otro modelo de inducción de SOPQ que no utiliza la administración de hormonas como factor primario es el inducido mediante estrés crónico por frío, en el cual se ha observado la formación de quistes foliculares, aumento en la secreción de andrógenos y estrógenos, así como el incremento en la actividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario (Paredes y col., 1998; Dorfman y col., 2003; Araya y col., 2004).

## *Marco Teórico*

---

Cuando las ratas son expuestas a estrés por frío el desarrollo de características propias del síndrome, dependen del periodo al que estén sometidas al estrés (Paredes y col., 1998; Dorfman y col., 2003; Bernuci y col., 2008; Dofman y col., 2009).

La inducción del síndrome mediante la administración de VE o por estrés por frío comparten algunas características como: incremento en la actividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario por el NOS, la formación de quistes foliculares, aumento en la secreción de andrógenos y estrógenos. Sin embargo, hay otros parámetros en los que difieren, por ejemplo: sólo con VE se adelanta el inicio de la pubertad; el estrés por frío no modifica el ciclo estral, mientras que, el VE induce estro vaginal persistente. En cuanto a la ovulación, la administración de VE la bloquea completamente, mientras que el estrés por frío sólo disminuye la cuota ovulatoria (Rosa-e-silva y col., 2003; Paredes y col., 1998).

En el presente estudio se analizó si el modelo de estrés crónico por frío a 3 ó 5 semanas, induce las características diagnóstico del SOPQ, así como la participación del NOS en la respuesta ovárica de la rata expuesta al frío.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años se ha incrementado la incidencia de trastornos reproductivos e infertilidad en humanos. En la mujer la patología reproductiva más frecuente es el SOPQ, el cual se caracteriza por hiperandrogenismo, formación de quistes ováricos y anovulación. Éste síndrome puede ser originado por factores genéticos, hormonales, ambientales, nutricionales e incluso por factores estresantes a los que está expuesta la mujer, razón por la cual se le considera de origen multifactorial.

Con el uso de modelos experimentales se ha reportado que la formación de los quistes foliculares es precedida por la mayor actividad de las fibras simpáticas que arriban al ovario, evaluado por el incremento en la concentración de NA ovárica, y no sólo por alteraciones hormonales en el eje de regulación hipotálamo-hipófisis-ovario.

A diferencia de lo que se ha reportado con VE, donde la administración de una dosis es capaz de inducir el SOPQ, la respuesta al estrés por frío es muy variable, debido probablemente a que se utilizan diferentes períodos de exposición.

En estudios previos de nuestro laboratorio mostramos que la exposición al estrés por frío durante 8 semanas no induce el SOPQ, por lo que sugerimos que los animales se adaptaron al estresor. Para analizar si la exposición al frío por períodos más cortos es capaz de inducir el síndrome, en el presente estudio se mantuvieron a los animales por un período de 3 ó 5 semanas.

La exposición al estrés por frío es capaz de inducir el incremento en la actividad de las fibras simpáticas del ovario, y la concentración de serotonina en el GCMS, por lo que en un segundo experimento se analizó, como responde el ovario del animal sometido al estrés por frío a la disminución del aporte NAérgico, por la sección uni o bilateral del NOS.



## HIPÓTESIS

Si en la rata hembra, el estrés por frío desencadena hiperactividad en las neuronas simpáticas que inervan al ovario, y si es uno de los factores que desencadena el síndrome del ovario poliquístico en la etapa adulta, entonces ante la eliminación de uno o ambos nervios ováricos, se podrá restablecer la respuesta ovulatoria y la capacidad esteroidogénica.

## OBJETIVOS

1. Analizar el efecto del estrés por frío en la inducción del SOPQ, caracterizado por:

- ❖ La concentración sérica de testosterona
- ❖ La ovulación
- ❖ La formación de quistes ováricos
- ❖ La concentración ovárica de noradrenalina y su metabolito.

Además de:

- ❖ La concentración sérica de progesterona y estradiol
- ❖ La concentración de serotonina

2. Analizar en el modelo de estrés por frío, los efectos de la sección bilateral o unilateral del nervio ovárico superior, realizada en la etapa adulta, sobre:

- ❖ La tasa de animales ovulantes
- ❖ El número de ovocitos liberados
- ❖ La concentración sérica de progesterona, testosterona y estradiol
- ❖ La concentración ovárica de NA, 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) y serotonina (5-HT)

## MATERIALES Y MÉTODO

### ***Procedimientos generales.***

Se utilizaron ratas hembra de la cepa CII-ZV recién nacidas, mantenidas en condiciones controladas de iluminación con 14 hrs de luz por 10 hrs de oscuridad (luces encendidas de las 0:500 a las 19:00) y temperatura de  $22 \pm 2$  °C. En todos los casos se siguió lo establecido por la Norma Mexicana de Protección Animal para el Uso de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999), especificaciones técnicas para la protección, cuidado y uso de los animales de laboratorio. El Subcomité del Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM aprobó el protocolo experimental.

Los animales fueron colocados en camadas de seis individuos por caja (cinco hembras y un macho), tuvieron libre acceso a la madre hasta los 24 días de edad y a partir de este momento con alimento y agua *ad libitum*.

### ***Procedimiento del estrés por frío.***

Animales de 24 días de edad fueron sometidos a estrés por frío, que consistió en mantenerlos de lunes a viernes de 8:00 a 11:00 horas a 4°C, tal y como se ha reportado en la bibliografía (Bernuci y col., 2008; Dofman y col., 2011). Como grupos de comparación se incluyó un grupo que fue mantenido en condiciones de bioterio a temperatura de  $22 \pm 2$  °C.

### ***Procedimiento de la Autopsia.***

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación al presentar el estro vaginal, se colectó la sangre del tronco y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos. Se separó el suero y se almacenó a -20 °C hasta el momento en que se cuantificaron las concentraciones de progesterona, testosterona y estradiol por radioinmunoanálisis de fase sólida (RIA). Las concentraciones ováricas de NA, MHPG y 5-HT se cuantificaron por cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC).

## *Materiales y método*

---

Al momento de la autopsia se disecaron los oviductos donde se buscó la presencia de ovocitos con la ayuda de un microscopio estereoscópico, siguiendo la metodología habitual del laboratorio. Los ovarios de 7 animales por cada grupo experimental fueron congelados a  $-70^{\circ}$  C para la cuantificación de NA, MHPG y 5-HT, los ovarios restantes de cada grupo experimental fueron fijados y posteriormente teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina para analizar la presencia de quistes foliculares.

### ***Cuantificación Hormonal por Radioinmunoanálisis (RIA).***

La cuantificación de hormonas esteroides (progesterona, testosterona y estradiol) se realizó por RIA de fase sólida, con estuches comerciales Cuat-A-Count (Diagnostic products, Los Angeles, CA, USA). Los estuches contienen tubos de polipropileno impregnados con anticuerpos específicos: anti-progesterona- $I^{125}$ , anti-testosterona- $I^{125}$  o anti-estradiol- $I^{125}$  y calibradores para la curva patrón de cada hormona. En el caso de progesterona y estradiol, a cada tubo se le adicionan 100  $\mu$ l de suero problema y para testosterona se adicionó 50  $\mu$ l del suero, más 1 ml de la hormona radiactiva ( $I^{125}$ ). Para facilitar la reacción, los tubos se agitaron en un vortex durante un minuto y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 hrs. La muestra fue decantada, se retiró el sobrenadante y los tubos se colocaron en un contador de centelleo gamma modelo Cobra 5005 Packard<sup>TM</sup> para la determinación de la concentración de la hormona en la muestra problema, en función de las cuentas por minuto y de la curva de calibración. La concentración de progesterona se expresó en ng/ml, mientras que la de testosterona y estradiol en pg/ml de suero.

Los coeficientes de variación intra e interespecíficos fueron 8.35% y 9.45% para progesterona, 9.65% y 10.2% para testosterona y 8.12% y 9.28% para estradiol. La sensibilidad del análisis fue de 0.02 ng/ml para progesterona, de 4 ng/ml para testosterona y de 8 pg/ml para estradiol.

## *Materiales y método*

---

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

### ***Cuantificación de monoaminas ováricas por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia (HPLC).***

La concentración de noradrenalina, 5-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) y serotonina (5-HT), se cuantificó en los ovarios de los animales de los diferentes grupos experimentales, por el sistema de HPLC. Los ovarios que fueron almacenados a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se pesaron y se homogenizaron en  $500\text{ }\mu\text{l}$  de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) al  $0.1\text{ N}$ , se centrifugaron a  $12,500\text{ rpm}$ , a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos; el sobrenadante se filtró a través de filtros de celulosa regenerada de tamaño de poro  $0.2\text{ }\mu\text{m}$ ; se inyectaron  $20\text{ }\mu\text{l}$  del filtrado al sistema de cromatografía.

El equipo de HPLC se compone de una bomba isocrática (modelo L-250, Perkin Elmer), una válvula de inyección (Reodine modelo 7125 con capacidad de  $20\text{ }\mu\text{l}$ ), una precolumna de sílica ( $3.5\text{ cm} \times 4.6\text{ mm}$ ) y una columna C18 de fase reversa ( $25\text{ cm} \times 4.6\text{ mm}$ ) conectado a un detector electroquímico amperométrico LC-4C (Bioanalytical System Inc. USA) acoplado a un inyector Nelson 1020 (Perkin Elmer). La concentración de monoaminas fue expresada en  $\text{ng/mg}$  de ovario.

El equipo de HPLC identifica automáticamente el neurotransmisor, en este caso compara el tiempo de retención de un estándar y realiza el cálculo de su concentración mediante la comparación del área bajo la curva de las muestras problema, con el área del estándar del neurotransmisor.

### **Cálculo de la Tasa de Animales Ovulantes**

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

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

### **Análisis Estadístico.**

Los resultados del peso corporal, la concentración de NA, MHPG y 5-HT en el ovario y la concentración sérica de hormonas esteroides se analizó por la prueba de Análisis de Varianza Multifactorial (ANDEVA) seguida por la prueba de Tukey. Cuando se realizó la comparación entre dos grupos se utilizó la prueba "t" de Student.

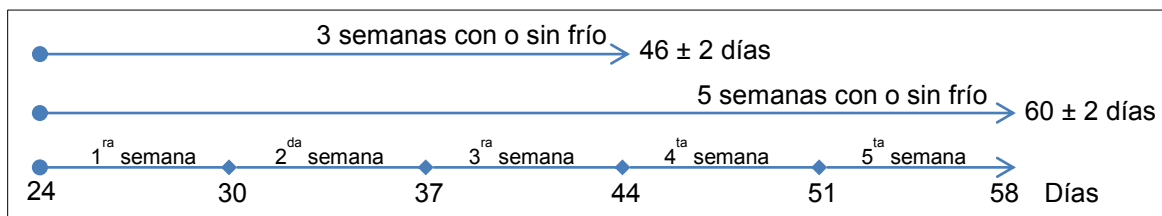
La edad de apertura vaginal y el número de ovocitos liberados fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la prueba de U de Mann-Whitney.

La tasa de animales ovulantes (TAO) fue analizada por la prueba de la probabilidad exacta de Fisher para proporciones. Se consideraron como estadísticamente significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor a 0.05.

### **Experimento 1.**

#### **Efectos de la exposición crónica a estrés al frío, sobre el desarrollo del SOPQ.**

Para contestar si el estrés por frío es capaz de inducir el SOPQ, animales de 24 días de edad fueron sometidos a estrés por frío durante 3 ó 5 semanas. Como grupo de comparación se utilizó animales intactos sacrificados aproximadamente a los  $46 \pm 2$  días de edad ó  $60 \pm 2$  días de edad, al presentar un estro vaginal (Figura 5). Cada grupo estuvo formado por 10 animales.



**Figura 5.** Escala que muestra la edad en que los animales de los diferentes grupos experimentales fueron sacrificados. La escala inicia el día 24, el cual fue considerado el día 1 de exposición al estrés

### ***Experimento 2.***

#### **Efectos de la sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior en la rata hembra expuesta a estrés por frío.**

Para analizar el papel del NOS en la regulación de las funciones ováricas del animal expuesto a estrés por frío, 10 animales por grupo fueron asignados a alguno de los siguientes grupos experimentales:

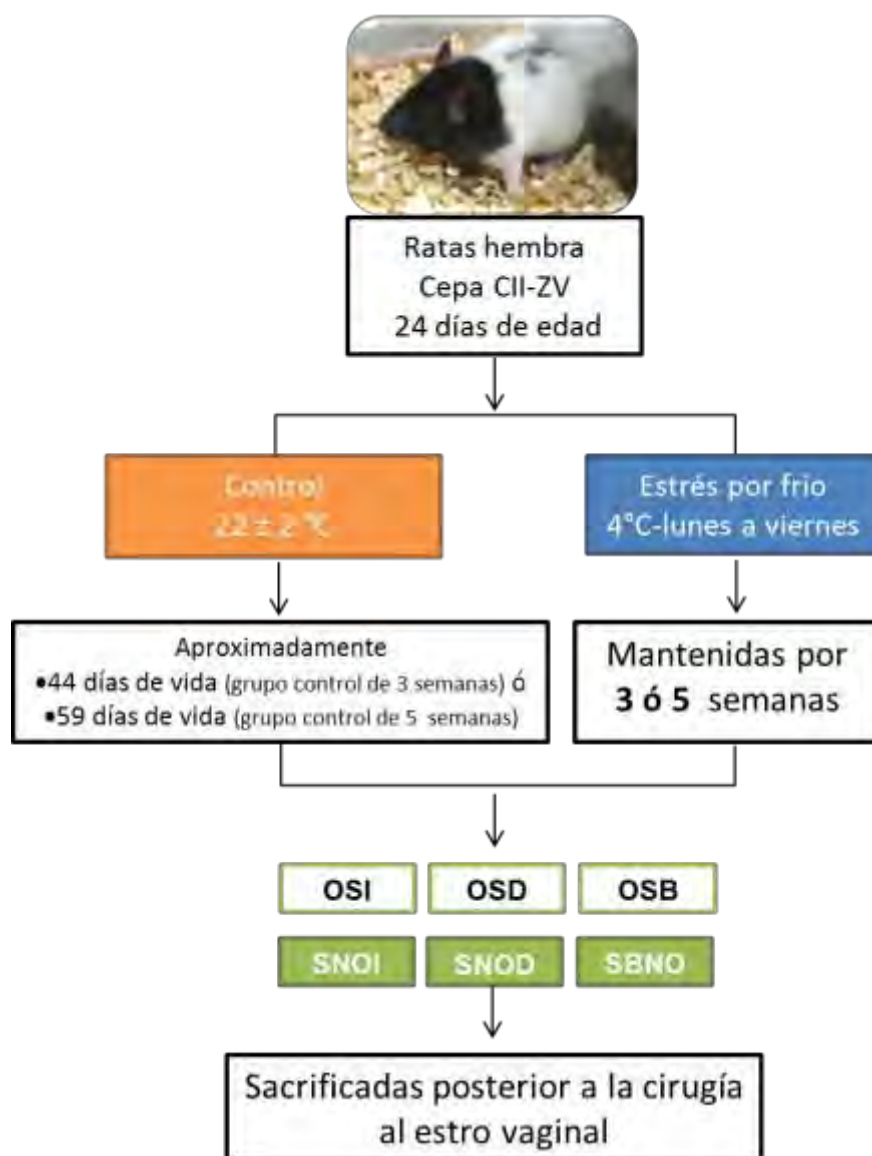
- ❖ **Sección del NOS:** Animales mantenidos a  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  o animales expuestos a estrés por frío durante 3 ó 5 semanas, fueron sometidos a la Sección del NOS Izquierdo o Derecho. Para ello, los animales fueron anestesiados con éter, posteriormente se les realizó una incisión dorso lateral de piel y músculo de aproximadamente 1 cm de largo, a través de la cual se exteriorizó el ovario unido al útero, se identificó el ligamento suspensorio, por el cual transcurre el nervio ovárico superior y se procedió a realizar la sección del nervio. Finalmente el ovario fue regresado a la cavidad peritoneal y se suturó la herida.

En el caso de los grupos con Sección Bilateral se procedió como en el caso anterior, solo que en el mismo acto quirúrgico se realizó la sección de ambos nervios, iniciando con el izquierdo.

## *Materiales y método*

- ❖ **Operación Simulada:** Animales mantenidos a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  o animales expuestos a estrés por frío durante 3 ó 5 semanas, se les sometió a la Operación Simulada Izquierda, Derecha o Bilateral. Para ello, los animales fueron anestesiados con éter y se les realizó una incisión dorso lateral en piel y músculo de aproximadamente 1 cm y sin tocar ningún órgano se suturó la herida.

### ***Esquema que muestra los diferentes grupos experimentales realizados en el experimento 2.***





## RESULTADOS

### EXPERIMENTO 1

#### EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A 3 Ó 5 SEMANAS DE ESTRÉS POR FRÍO

##### ***Peso corporal.***

El estrés crónico por frío por 3 ó 5 semanas no modificó el *peso corporal*, en comparación con su grupo sin estrés (Tabla 1).

##### ***Inicio de la Pubertad***

En los animales sometidos a 5 semanas de estrés por frío se retrasó la *edad de apertura vaginal* respecto a su grupo sin estrés, este parámetro no se modificó en los animales estresados por 3 semanas (Tabla1).

**Tabla 1.** Media  $\pm$  e.e.m. del **peso corporal (P.C.)** y **edad de apertura vaginal (EAV)** de animales sin estrés (S/E) o sometidos a los 24 días de vida a 3 ó 5 semanas de estrés crónico por frío.

GRUPO	n	P.C. (gramos)	E.A.V. (días)	EDAD AUTOPSIA (días)
3s (S/E)	10	148.4 $\pm$ 10.20	34.86 $\pm$ 0.8	46 $\pm$ 2
3s estrés	12	140.00 $\pm$ 2.67	34.00 $\pm$ 0.45	46 $\pm$ 2
5s (S/E)	10	191.00 $\pm$ 4.89	35.89 $\pm$ 0.31	60 $\pm$ 2
5s estrés	10	196.57 $\pm$ 11.85	37.14 $\pm$ 0.26*	60 $\pm$ 2

\* $p < 0.05$  vs. su grupo control (prueba de U de Mann-Whitney)

##### ***Respuesta ovulatoria.***

En los animales sometidos a estrés crónico por frío durante 3 ó 5 semanas no se modificó el porcentaje de animales ovulantes, ni el número de ovocitos liberados (Tabla 2).

## Resultados

**Tabla 2. Porcentaje de Animales Ovulantes (%AO) y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados por ovario de animales sin estrés (S/E) o sometidos a los 24 días de vida a 3 ó 5 semanas de estrés crónico por frío.**

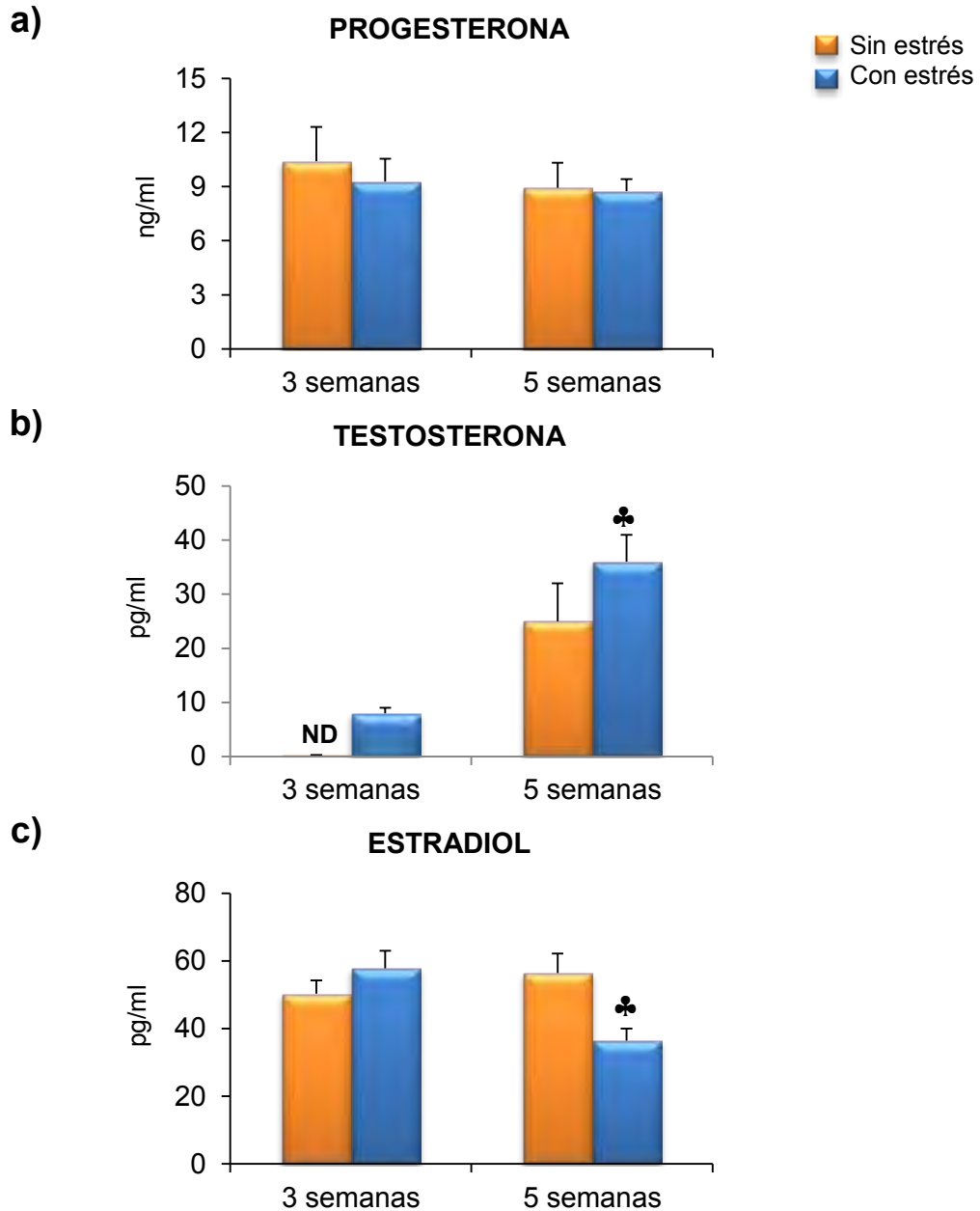
GRUPO	%AO	OVOCITOS LIBERADOS POR OVARIO		TOTALES
		IZQUIERDO	DERECHO	
3s (S/E)	100	4.0 $\pm$ 0.31	5.43 $\pm$ 0.57	9.43 $\pm$ 0.93
3s estrés	100	5.80 $\pm$ 0.68	5.40 $\pm$ 0.64	11.20 $\pm$ 0.93
5s (S/E)	100	6.67 $\pm$ 0.47	6.11 $\pm$ 0.42	12.78 $\pm$ 0.36
5s estrés	100	6.67 $\pm$ 1.06	7.71 $\pm$ 0.81	14.17 $\pm$ 0.95

### **Concentración de Hormonas Esteroides.**

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de **progesterona, testosterona y estradiol** de los animales estresados por 3 ó 5 semanas, respecto a su grupo control (Grafica 1a, b y c).

En los animales sometidos a 5 semanas de estrés, la concentración de testosterona fue mayor y la de estradiol fue menor que la de los animales estresados por 3 semanas (Grafica1 a, b y c).

## Resultados



♣ $p < 0.05$  vs. grupo de 3 semanas (prueba "t" de Student);  
ND: valor por debajo del límite de la curva.

**Grafica 1.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración plasmática de a) *progesterona*, b) *testosterona* y c) *estradiol* de animales sin estrés o sometidos a 3 ó 5 semanas de estrés por frío.

## *Resultados*

---

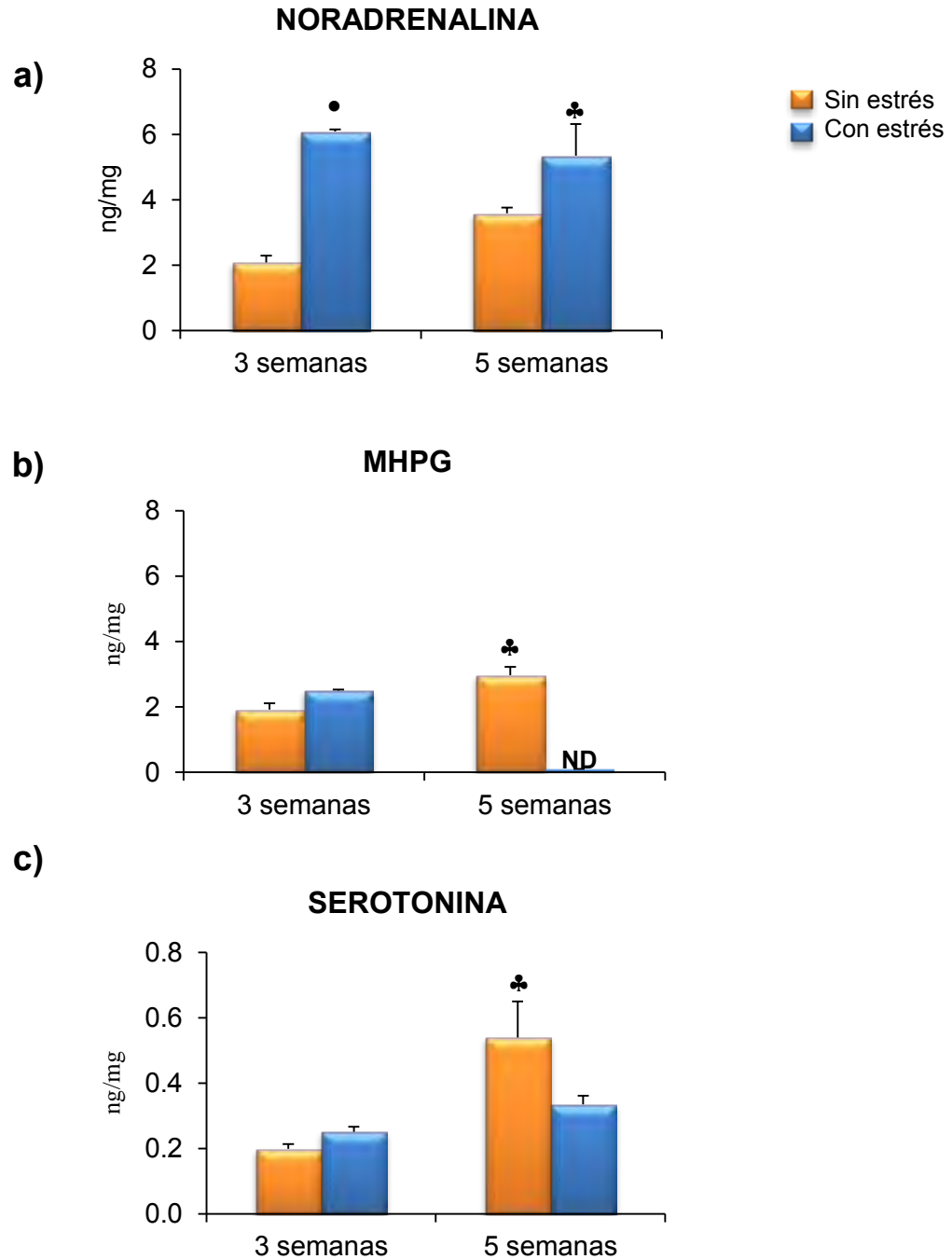
### ***Concentración de noradrenalina, MHPG y serotonina en ovario.***

En los animales sin estrés, mantenidos por 5 semanas, la concentración de ***Noradrenalina, MHPG*** y ***serotonina*** ovárica fue mayor, respecto a los mantenidos por 3 semanas (Grafica 2a, b y c).

Las ratas expuestas a 3 semanas de estrés por frío presentaron concentraciones más altas de ***noradrenalina*** que las no estresadas, este efecto no se observó en el grupo estresado por 5 semanas (Grafica 2a).

No se modificó la concentración de MHPG o serotonina en el grupo estresado por 3 semanas respecto su control sin estrés. A las 5 semanas de exposición al frío no se detectó el contenido del metabolito (valores por debajo del límite inferior de la curva) y la concentración de serotonina no presentó cambios respecto a su grupo control (Grafica 2b y c).

## Resultados



♣ $p < 0.05$  vs. grupo de 3 semanas; • $p < 0.05$  vs. su control sin estrés (prueba “t” de Student);

ND: valor por debajo del límite de la curva.

**Grafica 2.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración total de **a) Noradrenalina**, **b) MHPG** y **c) Serotonina** en ovario de animales sin estrés o sometidos a 3 ó 5 semanas de estrés por frío.

**RESUMEN DE RESULTADOS**

<b>PARÁMETRO</b>	<b>3 SEMANAS DE ESTRÉS VS. CONTROL</b>	<b>5 SEMANAS DE ESTRÉS VS. CONTROL</b>
Peso corporal	=	=
EAV	=	Adelanto
<b>No. Total de ovocitos liberados</b>	=	=
Progesterona	=	=
<b>Testosterona</b>	=	=
Estradiol	=	=
Noradrenalina	↑	=
MHPG	=	ND
Serotonina	=	=
<b>Quistes/Prequistes</b>	<b>X</b>	<b>X</b>

## DISCUSIÓN

### **MODELO PARA EL ESTUDIO DEL SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO.**

La exposición al frío por 3 semanas resulta en una mayor actividad simpática del ovario, ya que aumenta la concentración de noradrenalina en el ovario. Esta hiperactividad neural no se presentó en los animales expuestos a 5 semanas de estrés. Aun cuando hay mayor actividad simpática ésta no facilita el desarrollo del hiperandrogenismo ni la formación de quistes foliculares, además los animales ovulan de manera normal, razón por la cual concluimos que el modelo experimental empleado no desarrolla las características que definen al SOPQ.

En la mujer con SOPQ y en la rata tratada con VE se produce el fenómeno conocido como anovulación crónica (Brawer y col., 1986; Yen, 2001). En el presente estudio observamos que el someter a estrés por frío a ratas hembra por 3 ó 5 semanas no modificó la ovulación ni la morfología ovárica. Resultados semejantes hemos reportado cuando el período de exposición es de 8 semanas (Linares, 2012). Efectos diferentes han sido reportados por el grupo de Bernuci, quienes señalan una disminución en el número de ovocitos liberados cuando los animales son expuestos a 8 semanas de estrés por frío. Los autores lo explican por la disminución en el número de folículos preovulatorios y la acumulación de folículos antrales pequeños, o bien al incremento en la transición de folículos preovulatorios a folículos quísticos (Bernuci y col., 2008).

## *Discusión*

---

En la rata adulta, la inducción del estrés por la exposición al frío por 3 semanas o por la combinación del frío y restricción de movimiento, no modifica la concentración de progesterona (Paredes y col., 1998; Dorfman y col., 2003). Sin embargo, cuando los animales son expuestos por un período de 4 semanas, aumenta la concentración de la hormona (Dorfman y col., 2003). En el presente estudio, en la rata juvenil el estrés crónico por frío durante 3 ó 5 semanas, no modificó la concentración de progesterona. Resultados que nos permiten pensar que el tipo de estresor utilizado no modificó la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. A este respecto se ha mostrado que el estrés por frío no modifica la secreción de ACTH, corticosterona o progesterona (Pacak y col. 1998). Con todas estas evidencias no se puede descartar que la capacidad del ovario para sintetizar progesterona dependa del período al que el animal es expuesto al frío.

Histológicamente se ha observado que una de las características del animal que desarrolla el SOPQ es la aparición de una nueva población de folículos antrales, caracterizados por presentar menor número de capas de células de la granulosa rodeadas por una gruesa capa de células de la teca, lo cual se ha relacionado con aumento en la concentración de progesterona. En el presente estudio se observaron los cortes histológicos de los animales expuestos a 3 ó 5 semanas de estrés por frío, y en ninguno de los casos se observó la presencia de esta población folicular (datos no mostrados), lo que se podría asociar con el hecho de que la concentración de progesterona no se haya modificado.



## *Discusión*

---

El desarrollo del SOPQ en la mujer (Greenblatt y Mahesh, 1976; Burghen y col., 1980; Goldzieher, 1981) y en la rata (Ward y col., 1978) ha sido también atribuido al incremento en la concentración de los andrógenos plasmáticos. Estudios clínicos y en animales han llevado a sugerir que el SOPQ se desarrolla por un exceso de andrógenos en la etapa fetal o en la vida prepuberal, donde algunos tejidos son reprogramados y se manifiesta el síndrome en la adolescencia o en la adultez (Xita y Tsatsoulis 2006; Walters y col., 2008; Steekler y col., 2009). El hiperandrogenismo es considerado un criterio esencial para diagnosticar la presencia del SOPQ. Al parecer, en los modelos animales sometidos a estrés por frío, el desarrollo del hiperandrogenismo va a depender del tiempo al que son expuestos al estresor. Cuando ratas hembra adultas permanecen exclusivamente en frío por 3 semanas, la concentración de andrógenos no se modifica, a las 4 semanas disminuye (Dorfman y col., 2003), y a las 8 aumenta (Bernuci y col., 2008). Cuando el estrés por frío es acompañado por la restricción de movimiento por un período de 3 u 11 semanas la concentración de testosterona aumenta, y sólo en las hembras que permanecieron con el estresor por 3 semanas desarrollaron quistes foliculares (Paredes y col., 1998). En nuestra cepa de animales el estrés por frío durante 3 ó 5 semanas no modificó la concentración de testosterona, cuando se le compara contra el grupo de ratas no estresadas. Esto lo atribuimos a la ausencia de quistes foliculares, como respuesta a mecanismos de adaptación intraováricos que evitaron la formación de folículos quísticos y aseguraron la ovulación.

## *Discusión*

---

El grupo de Bernuci, (2008) mostró que la exposición a 8 semanas de estrés crónico por frío resulta en la formación de prequistes, quistes y aumento en la concentración de andrógenos y estradiol. Alteraciones que parecen depender del tiempo de exposición al frío. A este respecto, Dorfman (2003) realizó el mismo protocolo de estrés durante 3 ó 4 semanas sin observar la formación de prequistes o quistes, mientras que la concentración de estradiol no se modificó y la de andrógenos disminuyó a las 4 semanas del estrés. Al parecer cuando el tiempo de exposición al frío es corto, se requiere un estresor más para inducir cambios en la morfología ovárica como fue probado por Paredes (1998), quien mostró que la exposición por 3 semanas de estrés por frío más restricción de movimiento resulta en la formación de prequistes y aumento en la concentración de andrógenos y estradiol. Existe evidencia que indica que las respuestas neuroquímicas varían en función del tipo de estrés, donde se ha observado que el estrés por frío provoca aumento de NA y no modifica la concentración de ACTH y adrenalina mientras que el estrés por restricción de movimiento aumenta las tres hormonas (Pakac y col., 1998).

El SOPQ ha sido atribuido a cambios que ocurren en la homeostasis de las catecolaminas ováricas, lo cual precede la formación de quistes foliculares. Cuando ratas hembra son sometidas al estrés por frío más restricción de movimiento en el mismo acto durante 11 semanas, aumenta la concentración de noradrenalina ovárica. Los autores lo atribuyen a un efecto local del estrés que incrementa la liberación de noradrenalina del ovario. Aunque no descartan

## *Discusión*

---

que la NA ovárica sea de origen adrenal, ya que en esta glándula incrementa la actividad de la tiroxina hidroxilasa, o por la hiperactividad de las neuronas catecolaminérgicas presentes en el ganglio celiaco (Paredes y col., 1998). En este modelo experimental la hiperactividad de las fibras simpáticas no se traduce en la formación de quistes foliculares aunque si hay hiperandrogenismo.

Se ha sugerido que el frío es capaz de inducir cambios inmediatos en la homeostasis de la NA ovárica. La exposición a frío por 48 horas reduce la concentración de NA ovárica, y a las 68 horas la restablece en el ovario pero incrementa en el ganglio celiaco, hecho que ha sido explicado por los autores como resultado de un efecto compensador de las neuronas simpáticas localizadas en el ganglio y que van a ser proyectadas al ovario (Fiedler y col., 2006).

La exposición al frío no siempre se traduce en el incremento de la actividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario, así cuando los animales fueron colocados en el cuarto frío por 8 semanas, la concentración de NA en ovario y ganglio celiaco no se modificó (Navarrete, 2014), resultados similares a los que observamos a las 5 semanas. Cuando el estrés duró 3 semanas aumentó la concentración de NA ovárica, lo cual puede estar asociado con un aumento en el NGF en el ganglio celiaco donde es capaz de estimular la transcripción de tirosina hidroxilasa, enzima limitante en la biosíntesis de NA, tal y como ya ha

## *Discusión*

---

sido mostrado (Bhatnagar y col., 1995). La hiperactividad noradrenérgica que se produce en el ganglio celiaco en respuesta al frío, es similar a la que se reporta después de tratar a los animales con VE para inducir el SOPQ, donde el estradiol estimula la expresión de genes del NGF y su receptor de baja afinidad el p75. A pesar de esto, parece haber diferencias al inducir el SOPQ mediante estrés por frío del inducido con VE, en este último los estrógenos tienen efecto trófico caracterizado por mantener incrementada la actividad noradrenérgica ovárica (Dorfman y col., 2003).

Se ha observado que en la rata hembra adulta, sometida a 8 semanas de estrés por frío, no se modifica la concentración ovárica del metabolito de la noradrenalina, el MHPG (Bernuci y col., 2008). En el presente trabajo observamos un efecto semejante ante la exposición a 3 ó 5 semanas al estrés por frío, este efecto quizá se debe a que el frío no es capaz de modificar la actividad de enzimas como la monoamino oxidasa o la catecol-O-metiltransferasa, las cuales están involucradas en la degradación de la noradrenalina por desaminación oxidativa o metilación respectivamente (Peaston y Weinkove, 2004).

La inervación serotoninérgica del hipotálamo se origina en los núcleos dorsal y medial del Rafe. La serotonina es un neurotransmisor que regula la secreción de GnRH y de LH (Arias y col., 1990). Si bien, no se ha relacionado al sistema serotoninérgico con el desarrollo del SOPQ, existe un reporte que indica que la

## *Discusión*

---

administración de una dosis de VE a ratas hembras neonatas, en las primeras 12 horas de vida, incrementa la concentración de 5-HT en el núcleo arcuato y ventromedial del hipotálamo en la etapa adulta. Los autores señalan que la exposición al VE antes de la diferenciación hipotalámica puede inducir cambios permanentes en la densidad o actividad de neuronas hipotalámicas, y que la serotonina podría modular de manera estimulante o inhibitoria la secreción de GnRH (Sotomayor-Zárate y col., 2011). Estudios de nuestro laboratorio, utilizando el modelo de exposición a estrés por frío durante 8 semanas, revelaron aumento en la concentración de serotonina en el ganglio celiaco sin modificación en la concentración ovárica (Navarrete, 2014). En la presente investigación no observamos cambios en la concentración ovárica de 5-HT de los animales expuesto por 3 ó 5 semanas al frío. Al momento, no contamos con información sobre el papel de la serotonina en el ovario del animal sometido a estrés crónico por frío, por lo que se requiere de más estudios que expliquen su participación en la regulación de las funciones ováricas.

RESULTADOS

EXPERIMENTO 2

EFFECTO DE LA SECCIÓN BILATERAL DEL NERVIO OVÁRICO SUPERIOR  
EN RATAS SOMETIDAS A 3 Ó 5 SEMANAS DE ESTRÉS POR FRÍO

*Respuesta ovulatoria*

Ni la Operación Simulada Bilateral o la Sección Bilateral del NOS modificó el porcentaje de animales ovulantes ni el número total de ovocitos liberados en los animales sin estrés o sometidos a 3 ó 5 semanas de estrés por frío (Tabla 3).

**Tabla 3. Porcentaje de animales ovulantes** y media  $\pm$  e.e.m. del número de **ovocitos liberados por ambos ovarios** de animales intactos, con Operación Simulada Bilateral (OSB) o Sección Bilateral del Nervio Ovárico Superior (SBNO), sometidos o no al estrés crónico por frío por 3 ó 5 semanas.

GRUPO	% ANIMALES OVULANTES		OVOCITOS LIBERADOS POR AMBOS OVARIO	
	3 SEMANAS	5 SEMANAS	3 SEMANAS	5 SEMANAS
Intactos	100	100	9.43 $\pm$ 0.93	12.78 $\pm$ 0.36
OSB	78	67	10.40 $\pm$ 0.89	12.75 $\pm$ 0.25
SBNO	78	100	11.83 $\pm$ 0.87	12.00 $\pm$ 1.40
Estrés	100	100	11.20 $\pm$ 0.90	14.17 $\pm$ 0.95
Estrés OSB	90	100	11.63 $\pm$ 0.59	12.57 $\pm$ 0.43
Estrés SBNO	90	100	11.29 $\pm$ 0.71	13.00 $\pm$ 1.29

## *Resultados*

---

### **Secreción de Hormonas Esteroides**

En los experimentos realizados a las 3 semanas, la operación simulada bilateral, disminuyó la concentración de **progesterona**, respecto al grupo de animales intactos, mientras que la sección bilateral del NOS restableció la concentración de la hormona. Efectos semejantes se observan cuando las ratas fueron expuestas a estrés por frío (Grafica 3a).

No se reportó la concentración de **testosterona** del grupo control para los animales de 3 semanas ya que los valores se encontraron por debajo del límite inferior de sensibilidad del método.

En los animales sin estrés, la sección bilateral del NOS disminuyó la concentración de **testosterona** respecto al grupo con operación simulada bilateral. Cuando las hembras fueron expuestas al frío, la operación simulada bilateral resultó en el aumento de **testosterona**, mientras que la sección bilateral del NOS disminuyó la concentración de la hormona. Al comparar la concentración de testosterona de los animales estresados con los no estresados observamos concentraciones menores de **testosterona** en los estresados (Grafica 3b).

En los animales sin estrés, tanto la operación simulada como la sección bilateral del NOS disminuyeron la concentración sérica de **estradiol**, respecto al grupo de animales intactos. En las hembras expuestas a 3 semanas de estrés y sometidas a la operación simulada bilateral, la concentración de la hormona es mayor que el de las hembras no estresadas y sometidas a la operación simulada bilateral. La sección bilateral del NOS resultó en menor concentración de estradiol cuando se compara contra el grupo únicamente estresado. (Grafica 3c).

En los experimentos realizados a las 5 semanas, los animales sometidos a la operación simulada o a la sección bilateral del NOS presentaron

## *Resultados*

---

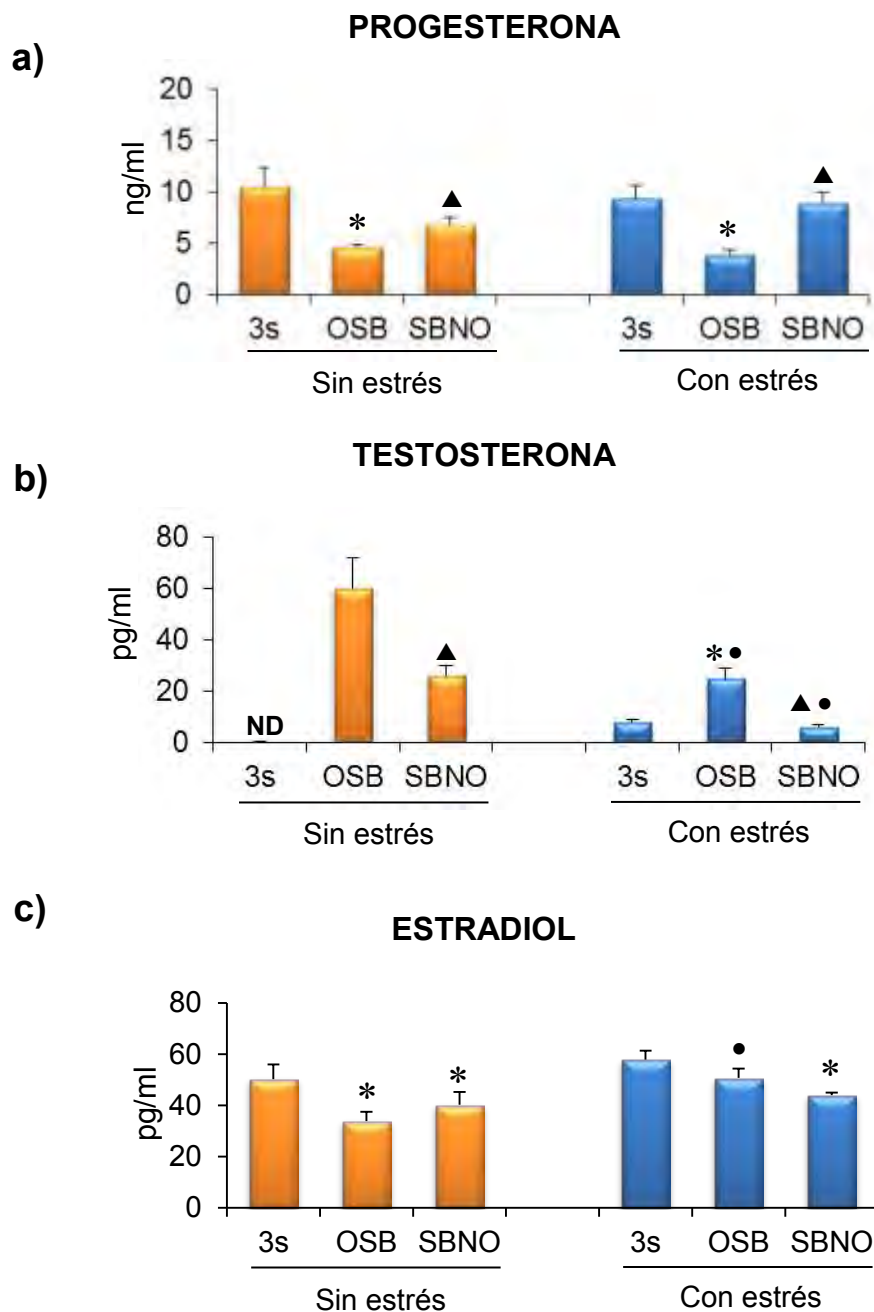
concentraciones más altas de **progesterona** que los animales intactos. Esta respuesta es diferente en el animal estresado, donde la operación simulada disminuyó la concentración de la hormona y la sección bilateral del NOS la aumentó (Grafica 4a).

En los animales sin estrés, ni la operación simulada o la sección bilateral del NOS modificaron la concentración sérica de **testosterona**, mientras que en el animal estresado, la operación simulada no modificó la concentración de la hormona y la sección bilateral del NOS la disminuyó (Grafica 4b).

Ni la operación simulada o la sección bilateral del NOS modificaron la concentración de **estradiol** en los animales sin estrés o con estrés (Grafica 4c).



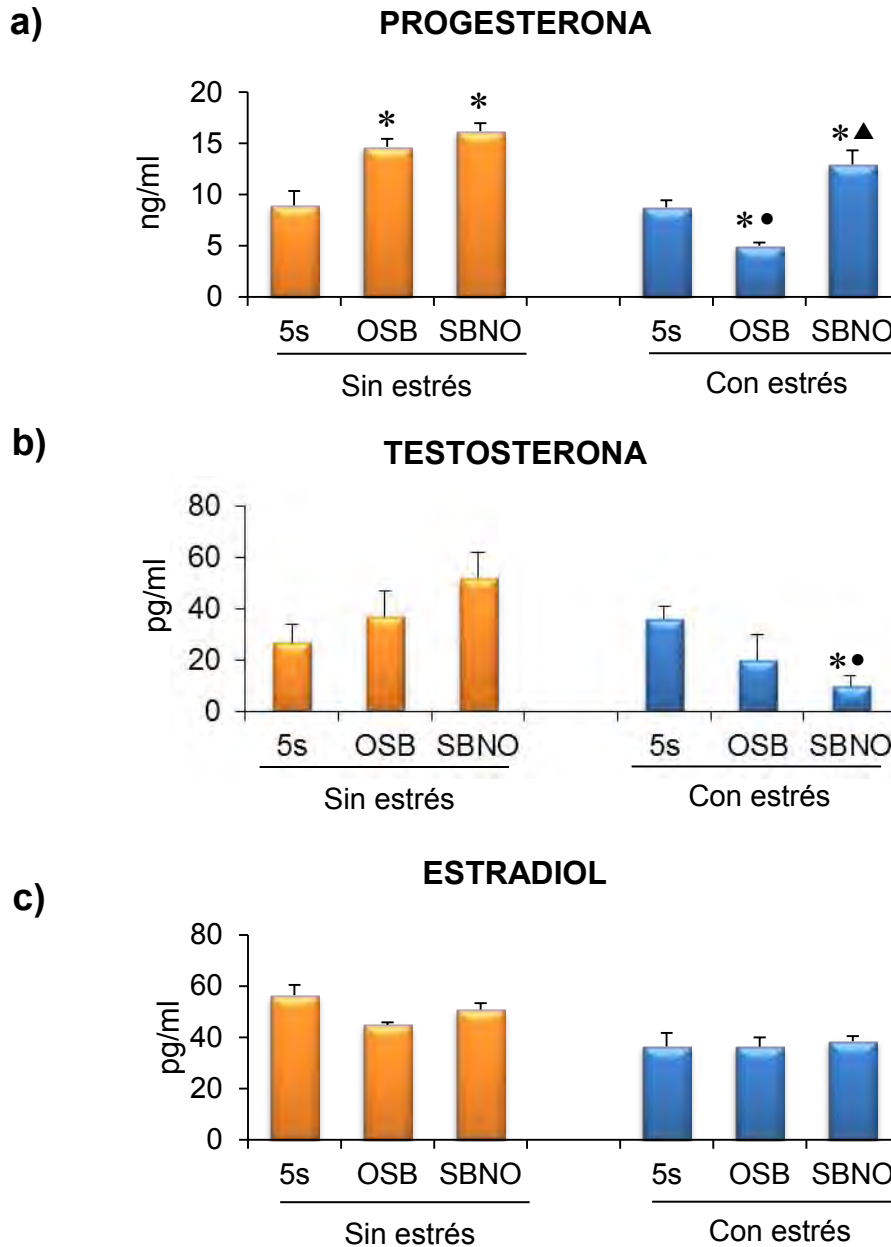
## Resultados



\* $p < 0.05$  vs. su grupo de 3s; <sup>▲</sup> $p < 0.05$  vs. su grupo con estrés; <sup>●</sup> $p < 0.05$  vs. su grupo sin estrés (prueba "t" de Student); ND: valor por debajo del límite de la curva.

**Grafica 3.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración plasmática de **a) progesterona**, **b) testosterona** y **c) estradiol** de animales sin estrés o con 3 semanas de estrés por frío sometidos a la Operación Simulada Bilateral (OSB) o a la Sección Bilateral del Nervio Ovárico Superior (SBNO).

## Resultados



\* $p < 0.05$  vs. su grupo de 5s; ▲ $p < 0.05$  vs. su grupo con OSB; ● $p < 0.05$  vs. su grupo sin estrés (prueba "t" de Student); ND: valor por debajo del límite de la curva.

**Grafica 4.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración plasmática de **a) progesterona**, **b) testosterona** y **c) estradiol** de animales sin estrés o con 5 semanas de estrés por frío sometidos a la Operación Simulada Bilateral (OSB) o a la Sección Bilateral del Nervio Ovárico Superior (SBNO).

## *Resultados*

---

### **Concentración de Noradrenalina, MHPG y Serotonina en Ovario.**

En los experimentos realizados a las 3 semanas, en animales sin estrés la operación simulada bilateral y la sección bilateral del NOS, aumentó la concentración de **noradrenalina**. Al exponer a los animales al estrés por frío, la concentración de la amina fue mayor que en los animales no estresados; la operación simulada bilateral resultó en la disminución de la amina, mientras que la sección bilateral del NOS la incrementó (Grafica 5a).

En los animales sin estrés, la operación simulada bilateral resultó en el aumento de la concentración de **MHPG**. La concentración de este metabolito fue normalizado por la sección bilateral del NOS. En los animales estresados no se modificó la concentración de MHPG ni por la operación simulada ni la sección bilateral del NOS (Grafica 5b).

En animales sin estrés, la operación simulada bilateral y la sección bilateral del NOS aumentó la concentración de **serotonina**. El animal estresado responde de manera diferente, donde la operación simulada bilateral disminuyó la concentración ovárica de serotonina y la sección bilateral del NOS la aumentó (Grafica 5c)

Los grupos de ratas sin estrés, estudiadas por 5 semanas presentaron concentraciones semejantes de **noradrenalina**, independientemente de la cirugía realizada. Todos los animales estresados presentaron aumento en la concentración ovárica de la amina, el cual se acentuó cuando fueron sometidos a la operación simulada bilateral (Grafica 6a).

En los animales sin estrés la operación simulada no modificó la concentración de **MHPG**, cuando los animales fueron seccionados bilateralmente del NOS, disminuyó significativamente la concentración ovárica del metabolito, respecto al grupo sin cirugía. En los animales únicamente estresados, la concentración

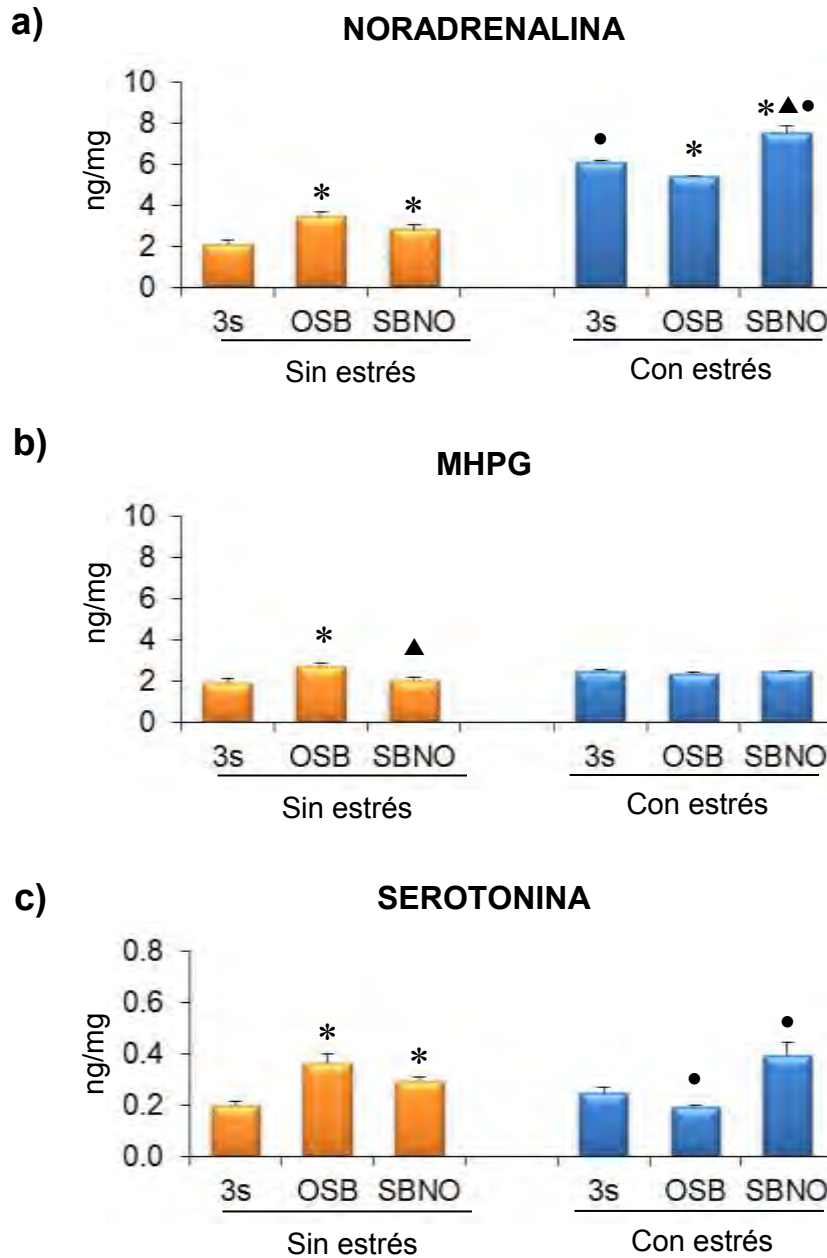
## *Resultados*

---

del metabolito se encontró por debajo del límite inferior de sensibilidad del método. No hubo diferencias significativas al comparar al grupo seccionado bilateralmente contra su control con operación simulada (Grafica 6b).

La concentración de **serotonina** en los grupos de ratas sin estrés, sometidas a la operación simulada o a la sección bilateral del NOS, se encontró por debajo del límite inferior de sensibilidad del método. En el animal sometido a estrés por frío, ni la operación simulada o la sección bilateral del NOS, modificaron la concentración de **serotonina** (Grafica 6c).

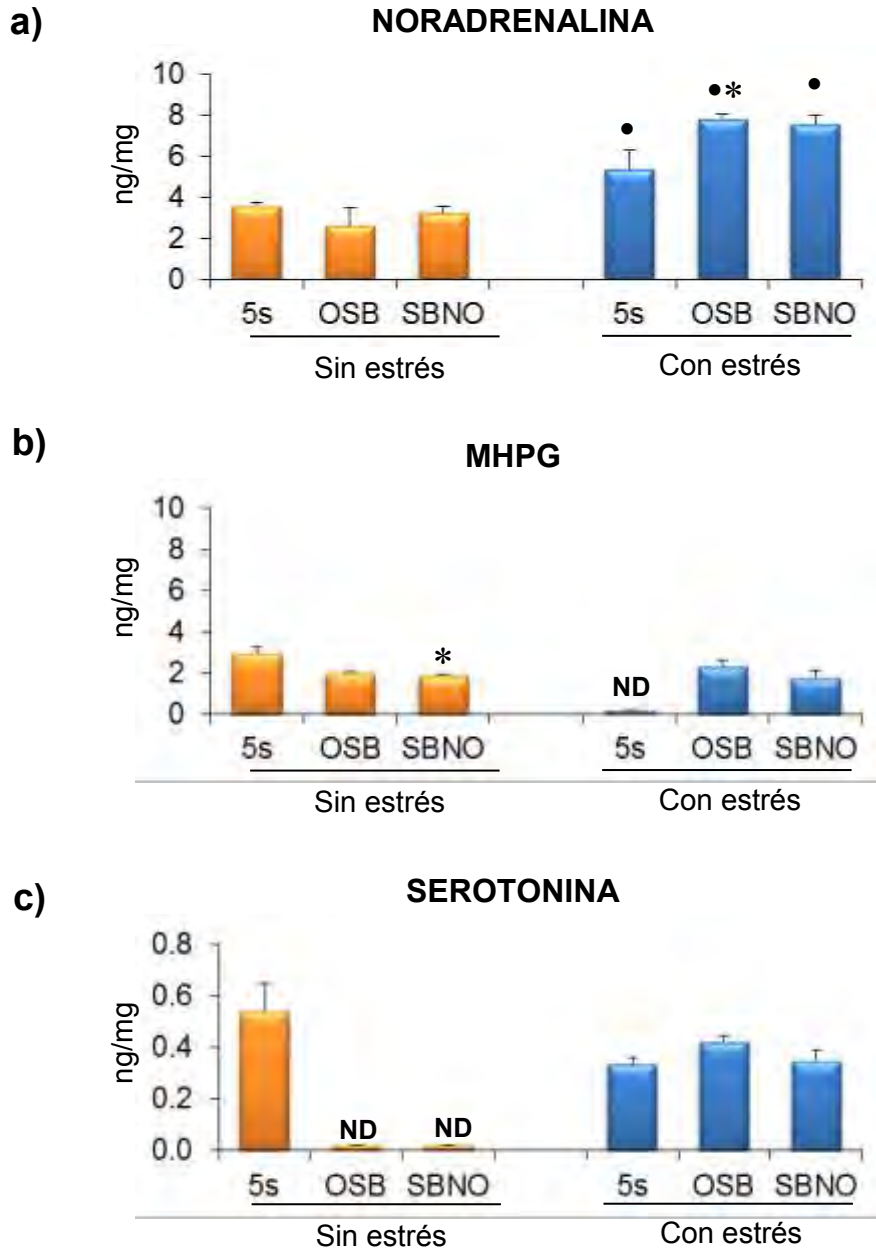
## Resultados



\* $p < 0.05$  vs. su grupo de 3s; ▲ $p < 0.05$  vs. su grupo con OSB; • $p < 0.05$  vs. su grupo sin estrés  
(prueba "t" de Student);

**Grafica 5.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración total de **a) Noradrenalina**, **b) MHPG** y **c) Serotonina** en ovario de animales sin estrés o con 3 semanas de estrés por frío sometidos a la Operación Simulada Bilateral (OSB) o a la Sección Bilateral del Nervio Ovárico Superior (SBNO).

## Resultados



\* $p < 0.05$  vs. su grupo de 5s;  $\blacktriangle p < 0.05$  vs. su grupo con OSB;  $\bullet p < 0.05$  vs. su grupo sin estrés (prueba "t" de Student); ND: valor por debajo del límite de la curva.

**Grafica 6.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración total de **a) Noradrenalina**, **b) MHPG** y **c) Serotonina** en ovario de animales sin estrés o con 5 semanas de estrés por frío sometidos a la Operación Simulada Bilateral (OSB) o a la Sección Bilateral del Nervio Ovárico Superior (SBNO).

## Resultados

### EFFECTO DE LA SECCIÓN UNILATERAL DEL NERVIIO OVÁRICO SUPERIOR EN RATAS SOMETIDAS A 3 Ó 5 SEMANAS DE ESTRÉS POR FRÍO

#### Respuesta Ovulatoria

En animales sin estrés con operación simulada izquierda o derecha o sección del NOS izquierdo o derecho, no se modificó la tasa de animales ovulantes. Este efecto fue similar en los animales sometidos a estrés por frío por 3 ó 5 semanas (Tabla 4).

**Tabla 4. Porcentaje de animales ovulantes** de animales intactos, con Operación Simulada Izquierda o Derecha (OSI; OSD) o Sección del Nervio Ovárico Superior Izquierdo o Derecho (SNOI; SNOD), sometidos o no al estrés crónico por frío por 3 ó 5 semanas.

GRUPO	% ANIMALES OVULANTES (SIN ESTRÉS)		% ANIMALES OVULANTES (CON ESTRÉS)	
	3 SEMANAS	5 SEMANAS	3 SEMANAS	5 SEMANAS
Intactos	100	100	100	100
OSI	100	100	70	100
SNOI	100	100	100	100
OSD	88	100	100	100
SNOD	92	100	86	92

En los animales sin estrés la operación simulada izquierda disminuyó el número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo, comparado con su grupo control. La operación simulada unilateral no modificó el número de ovocitos liberados entre el ovario izquierdo y derecho. La sección del NOS izquierdo no modificó el número de ovocitos liberados, respecto al grupo con operación simulada, mientras que, al cortar el NOS derecho el ovario denervado liberó menos ovocitos que el innervado (Grafica 7).

## *Resultados*

---

En los animales expuestos al frío, la operación simulada izquierda o derecha resultaron en la liberación de un menor número de ovocitos por parte del ovario izquierdo, comparado con su ovario derecho. Ni la sección del NOS izquierdo o derecho modificó el número de ovocitos liberados cuando se compara entre el ovario inervado y el denervado, si se comparan con el grupo con operación simulada, la sección del nervio derecho resultó en un mayor número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo (Grafica 7).

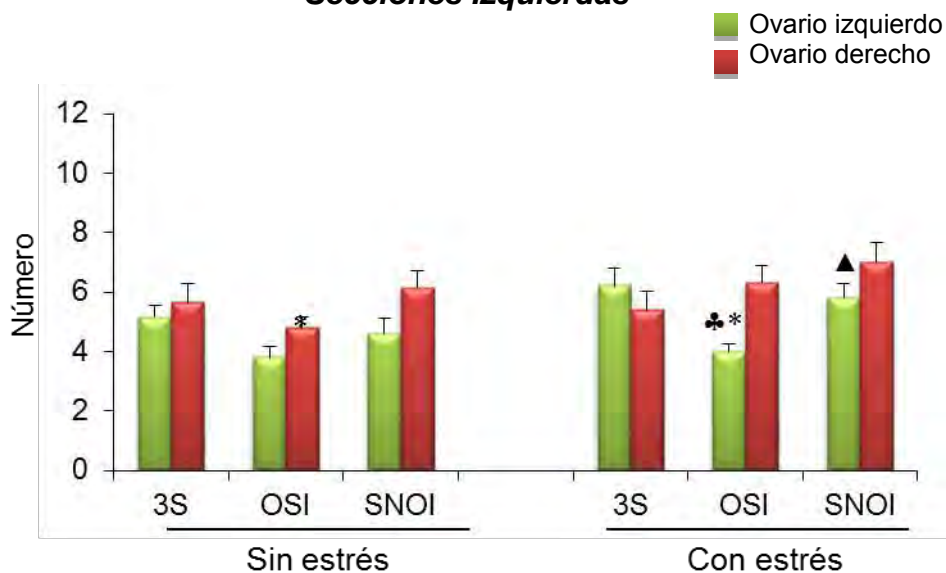
En los animales sin estrés la operación simulada derecha resultó en un mayor número de ovocitos liberados por parte del ovario derecho, efecto que no se observa al realizar la operación simulada izquierda. La sección del NOS izquierdo resultó en un menor número de ovocitos liberados por parte del ovario denervado. La sección del nervio derecho no modificó la ovulación, al comparar la cuota ovulatoria del ovario izquierdo con el derecho (Grafica 8).

Cuando los animales fueron expuestos al frío y sometidos a la operación simulada izquierda o derecha, el número de ovocitos liberados fue semejante entre ovario izquierdo y derecho. La sección derecha del NOS resultó en la liberación de un número menor de ovocitos por parte del ovario denervado, mientras que la sección izquierda no modificó este parámetro (Grafica 8).

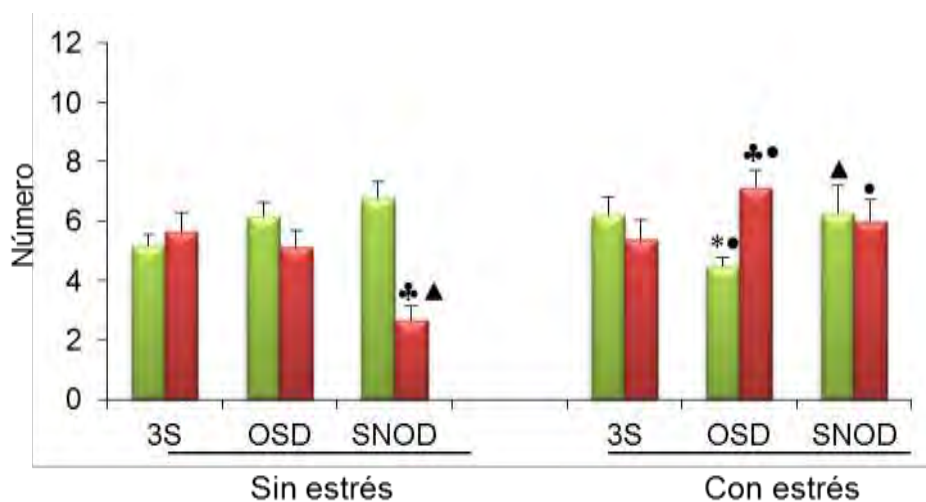


## Resultados

### Secciones Izquierdas



### Secciones Derechas

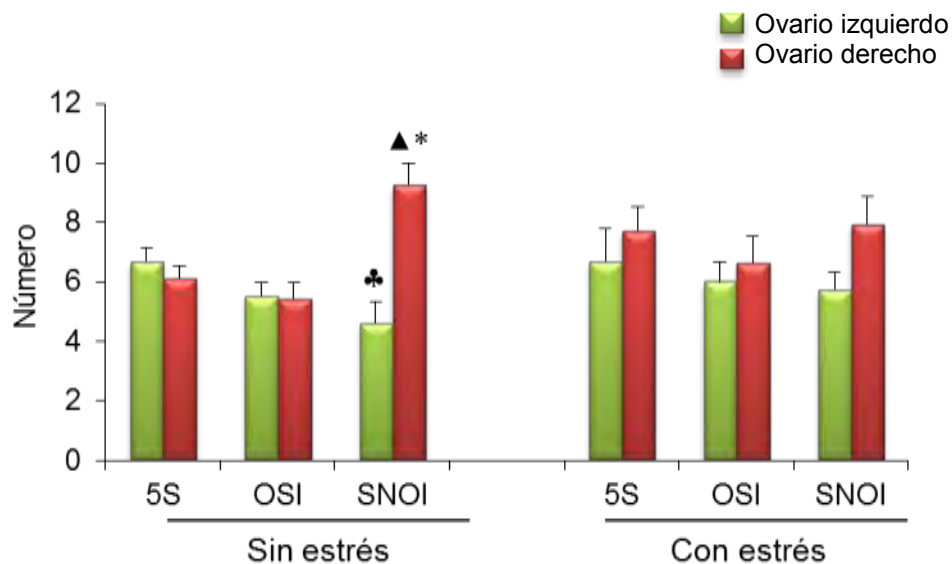


♣  $p < 0.05$  vs. su ovario contralateral; \*  $p < 0.05$  vs. su grupo de 3s; ▲  $p < 0.05$  vs. su grupo con OS;  
●  $p < 0.05$  vs. su respectivo grupo sin estrés (prueba "U" de Mann-Whitney).

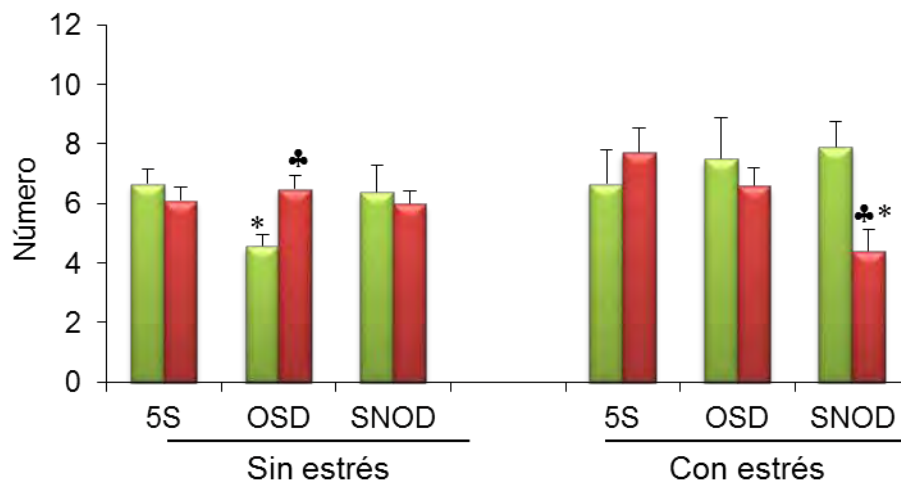
**Grafica 7.** Media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados por ovario de animales sin estrés o con 3 semanas de estrés por frío sometidos a la Operación Simulada Izquierda (OSI) o a la Sección del Nervio Ovárico Superior Izquierdo (SNOI) (**panel superior**) o a la Operación Simulada Derecha (OSD) o a la Sección del Nervio Ovárico Superior Derecho (SNOD) (**panel inferior**).

## Resultados

### Secciones Izquierdas



### Secciones Derechas



♣  $p < 0.05$  vs. su ovario contralateral; \* $p < 0.05$  vs. su grupo de 5s; ▲ $p < 0.05$  vs. su grupo con OS (prueba "U" de Mann-Whitney).

**Grafica 8.** Media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados por ovario de animales sin estrés o con 5 semanas de estrés por frío sometidos a la Operación Simulada Izquierda (OSI) o a la Sección del Nervio Ovárico Superior Izquierdo (SNOI) (*panel superior*) o a la Operación Simulada Derecha (OSD) o a la Sección del Nervio Ovárico Superior Derecho (SNOD) (*panel inferior*).

### **Secreción de Hormonas Esteroides**

La operación simulada izquierda, realizada al grupo sin estrés, resultó en la disminución de la concentración plasmática de **progesterona**. Al seccionar el NOS izquierdo, la concentración de la hormona regreso a valores de un animal intacto. El animal sometido a estrés crónico por frío por 3 semanas respondió de manera semejante ante la operación simulada izquierda (Grafica 9a).

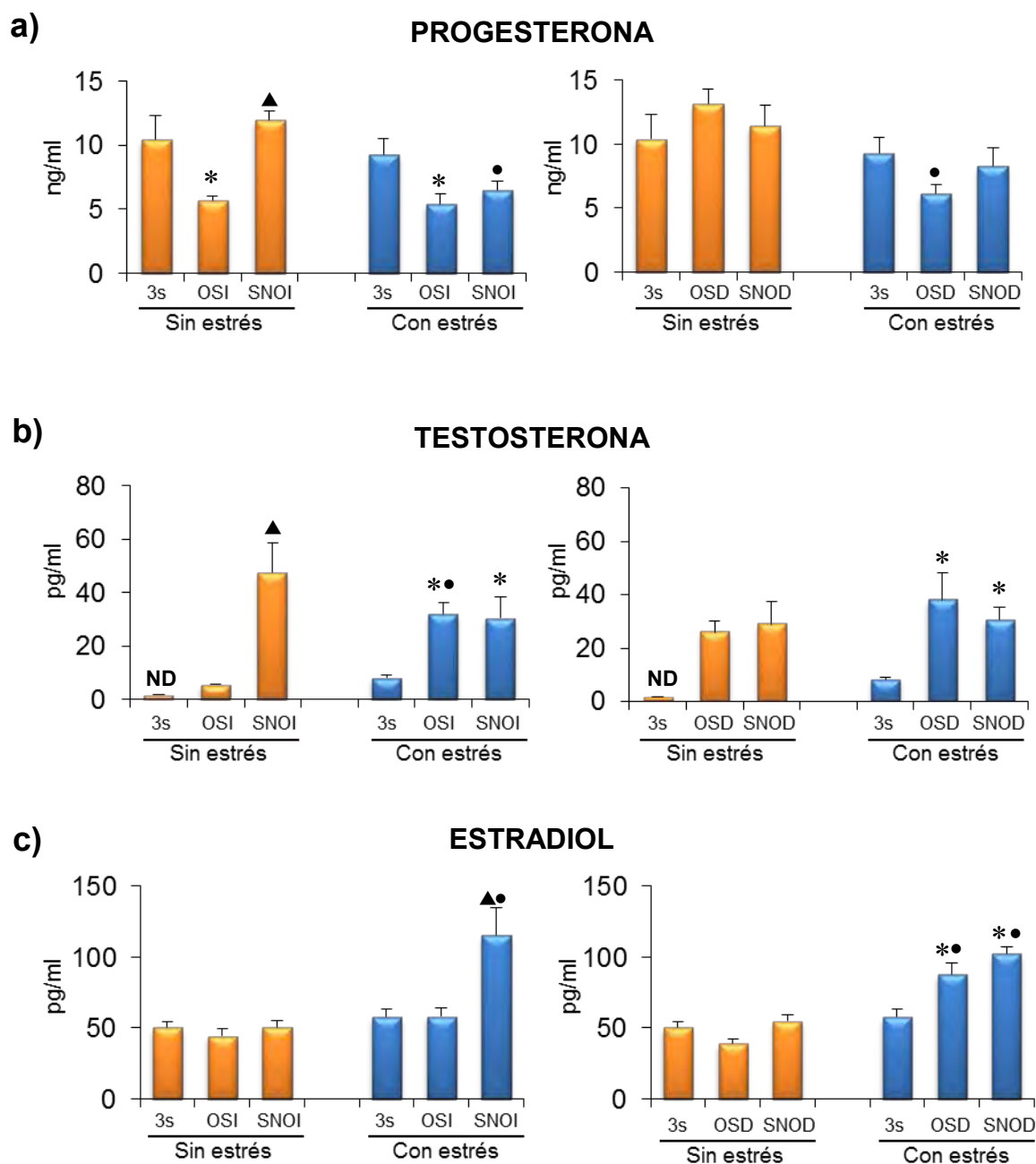
En el grupo de ratas sin estrés, ni la operación simulada o la sección del NOS derecho, modificaron la secreción de progesterona, efecto semejante se observó en los animales estresados y sometidos a la operación simulada derecha o a la sección del NOS derecho. Cuando se comparan con respecto al grupo no estresado, las hembras con operación simulada derecha presentaron menor concentración de progesterona (Grafica 9a).

En los animales sin estrés, la sección del NOS izquierdo resultó en aumento en la concentración de **testosterona**, respecto al grupo con operación simulada izquierda. En las ratas estresadas las cirugías unilaterales resultaron en el aumento de la concentración plasmática de testosterona (Grafica 9b).

En las ratas sin estrés, la sección del NOS derecho no modificó la concentración de testosterona. En los animales estresados por 3 semanas, la operación simulada y la sección del NOS derecho incrementó la concentración de la hormona (Grafica 9b).

En el grupo de animales no estresados la sección del NOS izquierdo o derecho no modificó la concentración de estradiol. En animales estresados, la sección del NOS izquierdo resultó en el aumento de la concentración de **estradiol** (Grafica 9c).

## Resultados



\* $p < 0.05$  vs. su grupo de 3s; <sup>▲</sup> $p < 0.05$  vs. su grupo con OS; <sup>●</sup> $p < 0.05$  vs. su grupo sin estrés (prueba "t" de Student); ND: valor por debajo del límite de la curva.

**Grafica 9.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración plasmática de **a) progesterona**, **b) testosterona** y **c) estradiol** de animales sin estrés o con 3 semanas de estrés por frío sometidos a la Operación Simulada Izquierda o Derecha (OSI; OSD) o a la Sección del Nervio Ovárico Superior Izquierdo o Derecho (SNOI; SNOD).

## *Resultados*

---

La sección del NOS izquierdo en los animales sin estrés, disminuyó la concentración sérica de **progesterona**. Cuando los animales son estresados la operación simulada izquierda resultó en la disminución de la hormona que es normalizada por la sección del NOS izquierdo (Grafica 10a).

En los animales sin estrés, la operación simulada derecha disminuyó la concentración de progesterona en suero, mientras que en los animales estresados no la modificó (Grafica 10a).

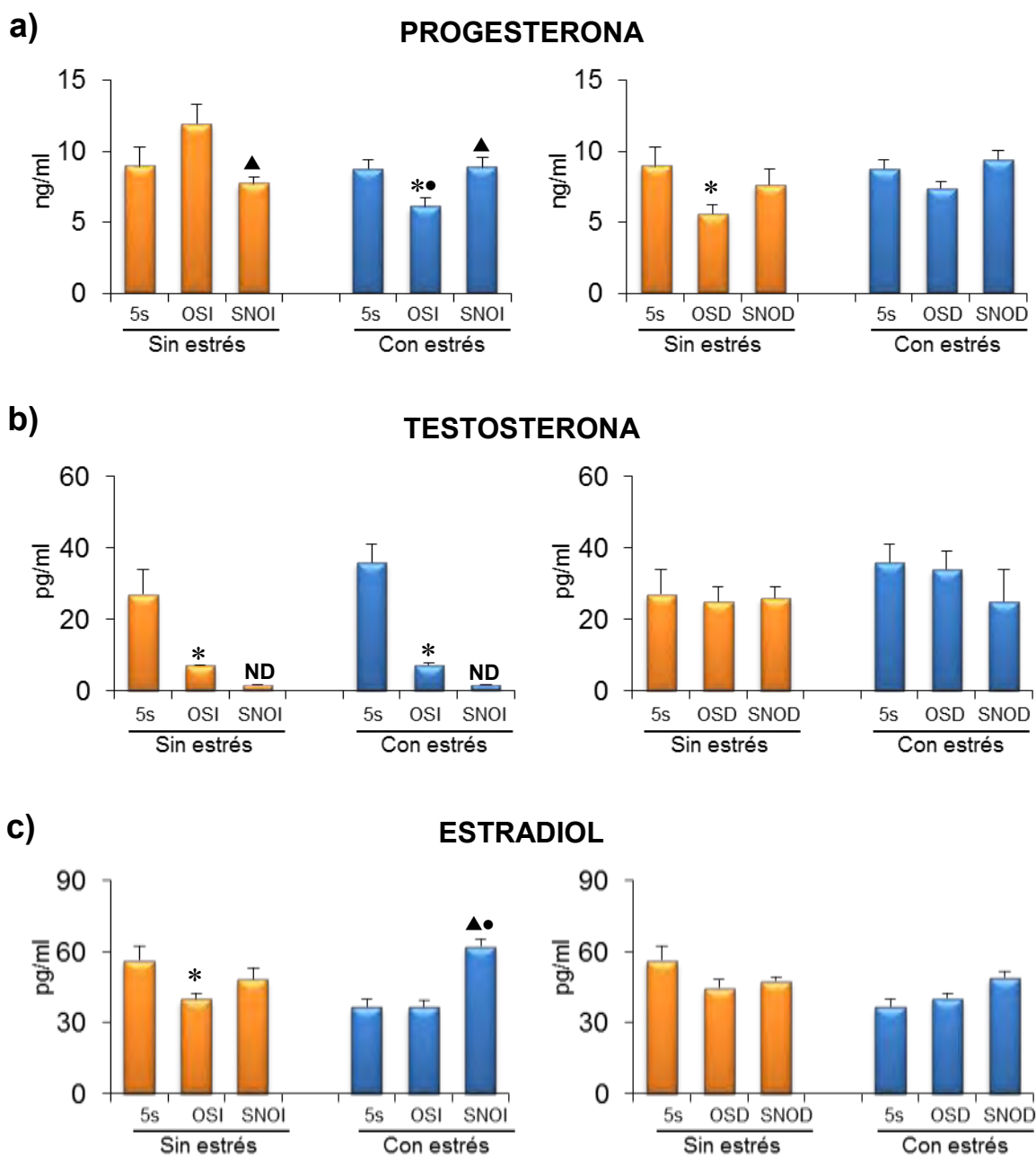
La concentración de **testosterona** disminuyó con la operación simulada izquierda, en animales estresados o no estresados (Grafica 10b).

La sección del NOS derecho no modificó la concentración de testosterona en los animales con o sin estrés (Grafica 10b).

En los animales no estresados, la operación simulada izquierda resultó en la disminución de la concentración sérica de **estradiol**. Cuando el animal es sometido a estrés por frío, la sección del NOS izquierdo resultó en el aumento de la hormona (Grafica 10c).

La sección del NOS derecho no modificó la concentración de estradiol en los animales con o sin estrés (Grafica 10c).

## Resultados



\*p<0.05 vs. su grupo de 5s; ▲p<0.05 vs. su grupo con OS; ●p<0.05 vs. su grupo sin estrés (prueba "t" de Student); ND: valor por debajo del límite de la curva.

**Grafica 10.** Media ± e.e.m. de la concentración plasmática de **a) progesterona**, **b) testosterona** y **c) estradiol** de animales sin estrés o con 5 semanas de estrés por frío sometidos a la Operación Simulada Izquierda o Derecha (OSI; OSD) o a la Sección del Nervio Ovárico Superior Izquierdo o Derecho (SNOI; SNOD).

---

## *Resultados*

---

### ***Concentración de Noradrenalina, MHPG y Serotonina en Ovario.***

En los animales sin estrés, la operación simulada izquierda disminuyó la concentración de **NA**, mientras que la sección del NOS izquierdo la aumentó. En los animales estresados, tanto la operación simulada izquierda como la sección del NOS izquierdo, aumentó la concentración de NA (Grafica 11a).

La sección del NOS derecho realizada a animales sin estrés, disminuyó la concentración ovárica de NA, mientras que en el animal con estrés, la aumentó (Grafica 11a).

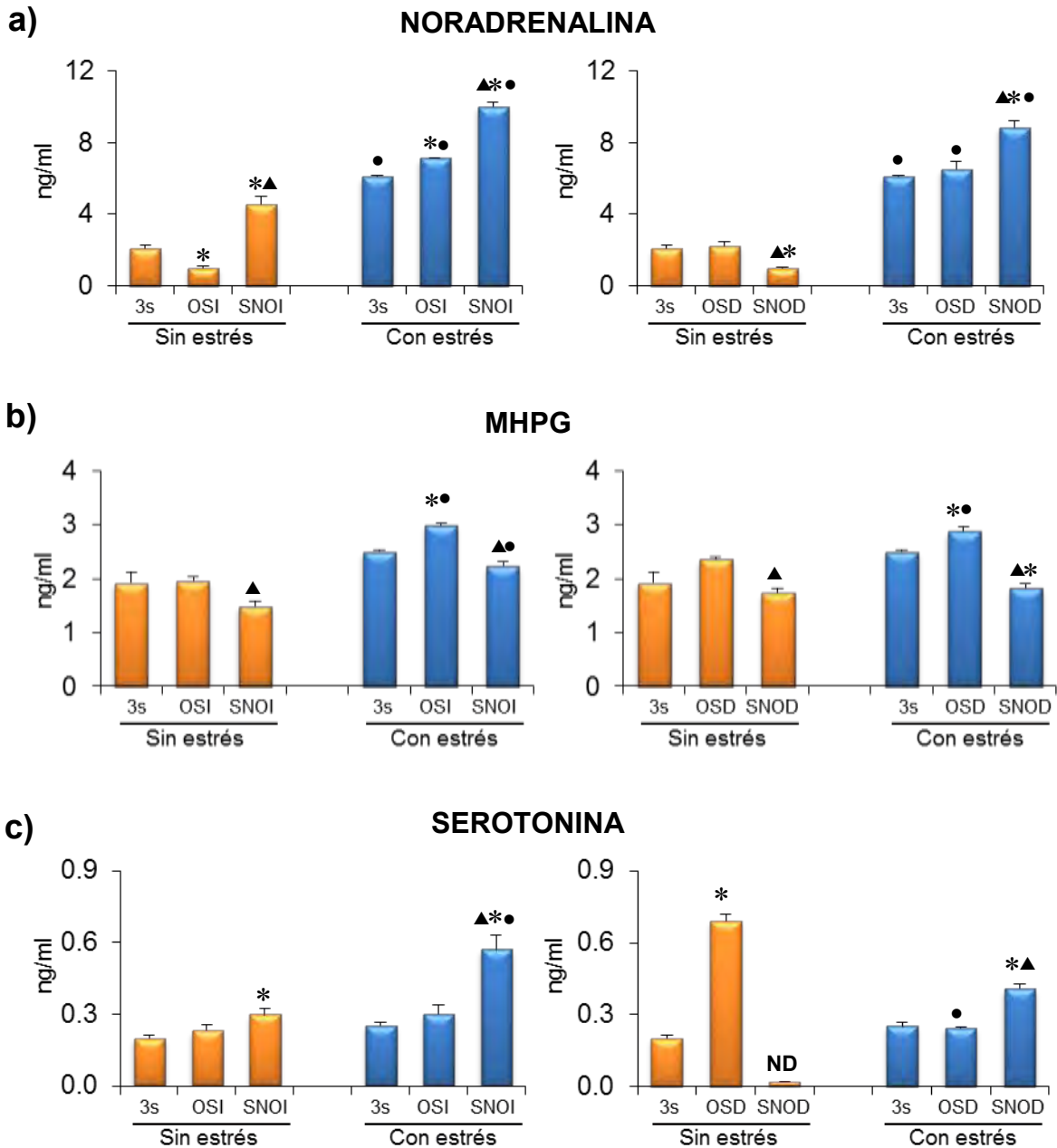
En el grupo de ratas no estresadas, la sección del NOS izquierdo disminuyó la concentración ovárica del metabolito de noradrenalina. Cuando las ratas son estresadas, la operación simulada izquierda aumentó la concentración del **MHPG** y la sección del NOS izquierdo la disminuyó (Grafica 11b).

La sección del NOS derecho disminuyó la concentración de MHPG en ratas no estresadas. En las hembras sometidas a estrés, la operación simulada derecha aumentó la concentración del metabolito, mientras que la sección del NOS derecho la disminuyó (Grafica 11b).

Observamos aumento en la concentración de **serotonina** en los animales sin estrés y sometidos a la sección del NOS izquierdo, efecto que persiste en los animales estresados (Grafica 11c).

La operación simulada derecha realizada en animales sin estrés aumentó la concentración de serotonina. En los animales sometidos al estrés por frío, la sección del NOS resultó en el aumento de dicho neurotransmisor (Grafica 11c).

## Resultados



\* $p < 0.05$  vs. su grupo de 3s; ▲ $p < 0.05$  vs. su grupo con OS; ● $p < 0.05$  vs. su grupo sin estrés (prueba "t" de Student); ND: valor por debajo del límite de la curva.

**Grafica 11.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración total de **a) Noradrenalina**, **b) MHPG** y **c) Serotonina** en ovario de animales sin estrés o con 3 semanas de estrés por frío sometidos a la Operación Simulada Izquierda o Derecha (OSI; OSD) o a la Sección del Nervio Ovárico Superior Izquierdo o Derecho (SNOI; SNOD).



**PARTICIPACIÓN DE NERVIO OVÁRICO SUPERIOR EN EL  
ANIMAL SOMETIDO A ESTRÉS CRÓNICO POR FRÍO.**

En la rata adulta la sección bilateral o unilateral del NOS resulta en la disminución del porcentaje de animales ovulantes y de la cuota ovulatoria (Chávez y Col., 1991). Resultado que permitió a los autores sugerir que la inervación simpática que llega al ovario a través del NOS, modula de manera estimulante la ovulación. En la rata prepúber, la sección bilateral no modifica la ovulación, lo que llevó a plantear en un inicio que la información simpática no participa en los mecanismos que regulan la primera ovulación (Aguado y Ojeda 1984; Selstam y col., 1985).

En el presente estudio la sección bilateral del NOS no modificó la ovulación. Esta respuesta se mantiene aun cuando los animales son sometidos a 3 ó 5 semanas de estrés por frío. En las hembras con o sin estrés sometidas a los 45 días a la sección del NOS izquierdo no se modificó la liberación de ovocitos entre ovario izquierdo o derecho. En las hembras sin estrés la sección del NOS derecho disminuyó el número de ovocitos liberados por parte del ovario denervado, respuesta que no se presenta en los animales expuestos a estrés. Con estas evidencias apoyamos la idea de que en la rata sin estrés el NOS derecho modula de manera estimulante la ovulación, mientras que en el animal estresado, la regula de manera inhibitoria.

## *Discusión*

---

En la hembra de 59 días de edad, el NOS izquierdo modula de manera estimulante la ovulación. En la hembra estresada la respuesta a la sección del NOS izquierdo es semejante a la que se presenta en el animal sin estrés, aunque es de menor magnitud. En el animal sin estrés el NOS derecho parece no participar en la regulación de la ovulación, a diferencia de lo que ocurre en el animal expuesto al frío, donde el NOS derecho modula de manera estimulante la ovulación por parte del ovario denervado.

En la rata adulta en el día del proestro, la información que lleva el NOS participa en la regulación de la secreción de progesterona y estradiol de manera estimulante, mientras que no parece participar en el día del estro (Aguado y Ojeda., 1984). Estudios de nuestro laboratorio utilizando la rata prepúber de 32 días de edad, muestran que la concentración sérica de progesterona es regulada de manera diferente por la información neural que transcurre por el NOS izquierdo y derecho (Morales-Ledesma, 2012). En la presente investigación mostramos que en el animal púber, el NOS modula de manera inhibitoria la secreción de progesterona, ya que la eliminación de ambos nervios ováricos resulta en una mayor concentración de la hormona, respecto al grupo con operación simulada. Efectos similares observamos cuando las ratas son previamente expuestas a 3 ó 5 semanas de estrés por frío. Estos resultados nos permiten sugerir que la información nerviosa que modula la secreción de progesterona no se modifica ante este tipo de estresor.

## *Discusión*

---

Cuando realizamos la denervación del NOS izquierdo en un animal sin estrés aumenta la concentración sérica de progesterona. El grupo de Weiss (1982) mostró que la estimulación eléctrica del nervio ovárico superior regula la producción de progesterona de manera estimulante, mediante la activación de receptores beta, o de manera inhibitoria vía estimulación de receptores alfa. En los animales expuestos al frío por tres semanas, la sección unilateral del NOS no modifica la concentración de progesterona, lo que nos lleva a pensar que en éste modelo los receptores beta-adrenérgicos que se encuentran en células de la granulosa pueden haber perdido sensibilidad ante el estímulo adrenérgico. Idea que se apoya en el hecho de que en estos animales la concentración de NA ovárica fue mayor que en los animales sin estrés. La modulación que ejerce el NOS en la regulación de la secreción de progesterona depende del período de exposición al frío, así, cuando se mantuvieron por 5 semanas el NOS izquierdo modula de manera inhibitoria la secreción de la hormona.

En la rata neonata la eliminación de ambos nervios ováricos resulta en cambios de la concentración de androstenediona que dependen del período de evolución, donde inicialmente se observa una modulación de tipo inhibitorio y posteriormente es de tipo estimulante (Forneris y Aguado 2002). Este comportamiento diferencial se observa cuando la denervación se practica en la rata juvenil y se evalúa el efecto de manera aguda (Morales-Ledesma y col., 2012). En la presente investigación cuando se realizó la sección bilateral del NOS en la rata de 45 días de edad, la secreción de testosterona es regulada de

## *Discusión*

---

manera estimulante por el nervio, mientras que parece no participar cuando el animal inicia la etapa adulta. El modelo de denervación unilateral nos permite mostrar que cada nervio regula de manera diferente la secreción hormonal, esto con base en el hecho de que el NOS izquierdo regula inicialmente de manera inhibitoria, y el NOS derecho parece no participar. La regulación asimétrica en la esteroidogénesis ovárica por parte del NOS puede ser atribuido al número de fibras que lleva cada nervio (Klein y Burden 1988).

La participación de la información neural que transcurre por el NOS en la regulación de la secreción de testosterona, no se ve modificado cuando los animales son expuestos previamente al estrés por frío, independientemente del período.

Estudios de nuestro grupo de trabajo han mostrado que en la rata adulta, la información neural que transcurre por el NOS participa en la regulación de la secreción de las hormonas esteroides, lo que va a depender del día del ciclo estral (Flores y col., 2011). Así, para la mañana del proestro se plantea que la modula de manera estimulante (Aguado y Ojeda 1984), y existe controversia sobre su participación en el día del estro, hay quienes señalan que no participa (Aguado y Ojeda., 1984) y quienes dicen que lo hace de manera inhibitoria (Kagitani y col.,2008). En la rata prépuber puede modularla de manera estimulante o inhibitoria, en función del nervio seccionado y del período transcurrido entre la denervación y la autopsia (Morales-Ledesma y Col., 2012).

## *Discusión*

---

En el presente estudio no observamos modificación en la secreción de estradiol, ante la sección bilateral o unilateral del NOS en las ratas sin estrés. Esta respuesta pueda ser atribuida a que los animales fueron sacrificados en la mañana del estro, y tal como lo señala el grupo de Aguado (1984) al estro vaginal, el NOS no participa en la regulación de la secreción de estradiol.

En los animales expuestos a 3 semanas de estrés por frío, la sección bilateral disminuyó la secreción de estradiol, lo que nos lleva a pensar que el ovario es más sensible a la falta de inervación simpática. No descartamos la posibilidad de que al cortar el NOS haya disminuido la concentración de VIP, neuropéptido que transcurre por NOS, neurotransmisor que estimula la actividad de las aromatasas (George y Ojeda, 1987), y con ello la concentración de estradiol. En la rata expuesta al frío, la regulación que ejerce el NOS-izquierdo o derecho sobre la secreción de estradiol es diferente, donde la información neural que lleva el NOS-izquierdo inhibe la secreción de la hormona, mientras que parece no ser fundamental la que transcurre por el nervio derecho.

La sección bilateral del NOS realizada en ratas neonatas de 4 días de vida aumenta la concentración de noradrenalina ovárica cuando se sacrifican a los 41 días de vida (Forneris y Aguado 2002), mientras que en la rata prepúber, la disminuye hasta en un 60% (Aguado y Ojeda 1984). En la presente investigación la sección bilateral del NOS no modificó la concentración de NA ovárica, resultados que nos llevan a pensar que al eliminar el NOS, se produjo

## *Discusión*

---

una respuesta compensadora por parte del plexo ovárico, otro nervio que transporta NA al ovario. En apoyo a esta idea el grupo de Klein (1989) mostró que ante la estimulación eléctrica del NOS se produce incremento en la actividad neural del plexo ovárico ipsilateral al nervio estimulado.

Cuando los animales son previamente expuestos a 3 ó 5 semanas de estrés por frío incrementa la concentración de NA ovárica, sin cambios en la concentración de su metabolito. Este efecto es aún mayor cuando los animales son denervados 3 semanas después de terminado el estrés por frío. El incremento de NA ovárica puede ser explicado a partir de dos fuentes: 1) el que se produce a nivel del ganglio celíaco mesentérico superior (Navarrete, 2014) y 2) por el aumento en la actividad de la tiroxina hidroxilasa de la glándula adrenal, lo que permitiría que una mayor concentración de la amina sea liberada al torrente sanguíneo y llegue al ovario (Paredes y col., 1998).

La sección unilateral del NOS se traduce en la caída de la noradrenalina ovárica por parte del ovario denervado, que se produce inmediato a la denervación (Chávez y col., 1994) o hasta 60 días post-denervación (Linares, 2011). Estos resultados difieren a los reportados en el presente estudio, donde encontramos que después de la sección del NOS izquierdo aumenta la concentración total de la amina en ovario y disminuye la del metabolito. Mientras que con la sección del NOS derecho tanto la amina como el metabolito se ven disminuidos. Con estas evidencias sugerimos que la capacidad del ovario para metabolizar la noradrenalina disminuye a la falta del NOS.

## *Discusión*

---

En la rata el estrés por frío induce incremento de la concentración de NA en el ovario, este efecto es modulado de manera inhibitoria por la información que transcurre por el NOS, ya que la sección del nervio izquierdo o derecho se traduce en el aumento de la concentración de la amina.

La serotonina es una monoamina que participa en la regulación de la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (Arias y Col., 1990; Jannes y Col., 1982), de las gonadotropinas (Moguilevsky y Col., 1985) y de las funciones ováricas. En la rata hembra prepúber de 30 días, la administración por vía sistémica de fluoxetina hidroclicorada, inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina, desde el día 30 hasta el 33, no modifica la concentración de serotonina en el hipotálamo anterior o medio pero si en el ovario. Por lo que los autores plantean que la serotonina en ovario ejerce un efecto inhibitorio en los mecanismos que culminan con la primera ovulación, lo que se refleja en disminución del número de ovocitos liberados (Romero, 2010). No contamos con evidencias que indiquen si la sección del NOS modifica el sistema serotoninérgico del ovario, en la presente investigación mostramos que el NOS izquierdo modula de manera inhibitoria la secreción de 5-HT. Esta modulación se mantiene en el animal sometido a estrés por frío. Probablemente el aumento en la actividad serotoninérgica en los animales sometidos a la sección unilateral del NOS, este relacionado con un mecanismo de regulación intraovárico que asegure el éxito en el proceso ovulatorio.

## CONCLUSIONES

- ❖ En la rata hembra, la exposición a 3 ó 5 semanas de estrés por frío no desarrolla las características endocrinas y morfológicas del ovario que describen al síndrome de ovario poliquístico.
- ❖ En el animal expuesto a estrés crónico por frío, el NOS no participa en los mecanismos que regulan el proceso ovulatorio.
- ❖ En el animal expuesto a 3 semanas de estrés por frío, el NOS regula de manera inhibitoria la secreción de noradrenalina.
- ❖ En la rata expuesta a 3 ó 5 semanas de estrés por frío, la regulación en la secreción de testosterona depende de la integridad del NOS.
- ❖ En la rata hembra expuesta a 3 ó 5 semanas de estrés por frío, el NOS izquierdo regula de manera inhibitoria la secreción de estradiol, mientras que el nervio derecho parece no regular la secreción de la hormona.
- ❖ En el animal expuesto a 3 semanas de estrés por frío, el NOS regula de manera inhibitoria la concentración de serotonina ovárica.



BIBLIOGRAFÍA

- ❖ **Aguado LI, y Ojeda SR.** (1984). *Prepubertal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. Role of noradrenergic innervation*, Endocrinology 114; 1845.
- ❖ **Almahbobi G, Anderiesz C, Hitchinson P, et al.** (1996) *Functional integrity of granulosa cells from polycystic ovaries*. Clin. Endocrinol (Oxf) 44: 571.
- ❖ **Anesetti G, Lombide P, Chávez-Genaro R.** (2009) *Prepuberal estrogen exposure modifies neurotrophin receptor expression in celiac neurons and alters ovarian innervation*. Anatomic Neuroscience: Basic and clinical. 145: 35-43.
- ❖ **Araya V, Jara P, Lara HE.** (2004) *Cerebro, estrés y ovario poliquístico. Participación de la inervación simpática en el desarrollo de ovario poliquístico*. Endocrinol Nutr. 51(8):473-477.
- ❖ **Arias PB, Szwarcfarb DC, Carbone SR, Sverlik R, Moguilevsky JA** (1990) *In vivo and in vitro studies on the effect of the serotonergic system on luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone secretion in peripuberal female rats*. Brain Res. 523:57-61
- ❖ **Bagavandoss P, Midgley Jr AR, Wicha M.** (1983) *Developmental changes in the ovarian follicular basal lamina detected by immunofluorescence and electron microscopy*. J Histochem Cytochem 31: 633-640.
- ❖ **Baljet B, Drukker J.** (1980) *The extrinsic innervation of pelvic organ in the female rat*. Acta Anatomica 107: 241-567.
- ❖ **Baljet B, Drukker J.** (1976) *Extrinsic innervation of the abdominal organs in the female rat*. Acta Anat 104:243-267.
- ❖ **Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE.** (1993) *Ovarian steroidal response to gonadotropins and  $\beta$ -adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation*. Endocrinology 133: 2696-2703.
- ❖ **Bergman RA, Afifi AK, Hildger Jr PM.** (1998) *Histología*, McGraw-

## Bibliografía

---

Hill•Interamericana. México.

- ❖ **Bernuci MP, Szawka RE, Helena CV, Leite CM, Lara HE, Anselmo-Franci, JA.** (2008) *Locus Coeruleus Mediates Cold Stress-Induced Polycystic Ovary in Rats.* Endocrinology 149:2907-2916.
- ❖ **Brawer JR, Muñoz M, Farookhi R.** (1986) *Development of the polycystic ovarian condition (POC) in the Estradiol Valerate-treated rat.* Biology of Reproduction 35: 647-655.
- ❖ **Brawer JR, Muñoz M, Farookhi R.** (1986) *Development of the polycystic ovarian condition (POC) in the Estradiol Valerate-treated rat.* Biology of Reproduction 35: 647-655.
- ❖ **Brawer JR, Naftolin F, Martin J, Sonnenschein C.** (1978) *Effects of a single Injection of Estradiol Valerate on the Hypothalamic Arcuate Nucleus and on Reproductive Function in the Female Rat.* Endocrinology 107: 274 - 279.
- ❖ **Burghen GA, Givens JR y Kitabchi AE.** (1980) *Correlation of hyperandrogenism and hyperinsulinism in polycystic ovarian disease.* J. Clin. Endocrinol. Metab. 50:113-116.
- ❖ **Campenot RB, MacInnis BL.** (2004) *Retrograde transport of neurotrophins: fact and function.* J. Neurobiol. 58:217-278.
- ❖ **Carson RS, Findlay JK, Burger HG, Trounson AO.** (1979) *Gonadotropin receptors of the ovine ovarian follicle during follicular growth and atresia.* Biol. Reprod. 21: 75-87.
- ❖ **Chávez R, Morales L, González Ma E, y Domínguez R.** (1994) *Ovarian norepinephrine content in prepubertal rats with superior ovarian nerve section: temporal studies.* Medical Science Research. 22:789-790.
- ❖ **Chávez R, Carrizosa L, Domínguez R.** (1991) *Effects of superior ovarian nerve on spontaneous and induced ovulation in adult rats.* Medical Science Research. 19: 41-48.
- ❖ **Chrousos GP, Gold PW.** (1992) *The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis.* Jama 267:1244-1252.
- ❖ **De Felici M, Dolci S, Pesce.** (1993) *Proliferation of mouse primordial*

## Bibliografía

---

*germ cells in vitro: a key role for cAMP.* Dev. Biol. 157: 277-280.

- ❖ **Dees WL, Hiney CE, Schulte TD, Mayerhofer A, Danilchik M, Dissen GA, Ojeda SR.** (1995) *The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptors.* Endocrinology. 136:5760-5768
- ❖ **Dissen GA, Hill DF, Costa ME, Dees WL, Lara HE, Ojeda SR.** (1996) *A role for trkA nerve growth factor receptors in mammalian ovulation.* Endocrinology. 137: 198-209.
- ❖ **Dissen GA, Ojeda SR.** (1999) *Ovarian Innervation.* Encyclopedia of Reproduction. 3: 583-589.
- ❖ **Dorfman M, Arancibia S, Fiedler JL, Lara HE.** (2003) *Chronic intermittent cold stress activates ovarian sympathetic nerves and modifies ovarian follicular development in the rat.* Biology of Reproduction. 68:2038-2043.
- ❖ **Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL.** (1995) *Polycystic ovary syndrome as a form of functional ovarian hyperandrogenism due to dysregulation of androgen secretion.* Endocr. Rev. 16: 322.
- ❖ **Erickson GF, Hsueh AJW, Quigley ME, et al.** (1979) *Functional studies of aromatase activity in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries.* J Clin Endocrinol Metab. 49: 514.
- ❖ **Farookhi R, Hemmings R, Brawer JR.** (1985) *Unilateral Ovariectomy restores ovulatory cyclicity in rats with a polycystic ovarian condition.* Biology of Reproduction. 32: 530-540.
- ❖ **Feng Y, Johanson J, Shao R., Manneras L, Fernandez-Rodriguez J, Billing H y Stener-Victorin E.** (2009) *Hypothalamic neuroendocrine functions in rats with dyhidrotosterone-induced PCOS: effects of low frequency electroacupuncture.* Journal of Endocrinology 10:1371.
- ❖ **Forneris LM, y Aguado L.** (2002). *Neonatal superior ovarian nerve transection disturbs the cyclic activity of the female rats.* Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 82: 75-82.
- ❖ **Franks S.** (1995) *Polycystic ovary syndrome.* N Engl. J Med. 333: 1435.
- ❖ **Freeman ME.** (1994) *The Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle*

## Bibliografía

---

- of the Rat*. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) *The Physiology of Reproduction*. 2nd edition. Editorial Raven Press. New York. Vol. 2 Cap. 46 pp. 615 – 620.
- ❖ **García R, Ballesteros LM, Hernandez-Perez O, Rosales AM, Espinosa R, Soto H, Diaz de Leon L, Rosado A.** (1997) *Metalloproteinase activity during growth, maturation and atresia in the ovarian follicles of the goat*. *Anim. Reprod. Sci.* 47: 211-228.
  - ❖ **Gerendai I, Kocsis K, Halász B** (2002) *Supraspinal Connections of the Ovary: Structural and Functional Aspects*. *Microscopy research and technique* 59:474–483
  - ❖ **Goldzieher JW.** (1981) *Polycystic ovarian disease*. *Fertil. Steril.* 35:371-394.
  - ❖ **Greenblat RB y Mahesh VB.** (1976) *The androgenic polycystic ovary*. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 125:712-728.
  - ❖ **Greenwald GS.** (1989) *Temporal and topographic changes in DNA synthesis after induced follicular atresia*. *Biol. Reprod.* 41: 175-181.
  - ❖ **Greiner M, Paredes A, Araya V, Lara HE.** (2005) *Role of stress and sympathetic innervation in the development of polycystic ovary syndrome*. *Endocrine.* 28(3): 319-324.
  - ❖ **Guyton AC.** (2001) *Tratado de fisiología medica*. Editorial Interamericana-McGraw-Hill, México. pp. 1115-1132.
  - ❖ **Hay MF, Cran DG, Moor RM.** (1976) *Structural changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles*. *Cell Tissue Res.* 169: 515-288.
  - ❖ **Hemmings R, Farookhi R, Brawer JR.** (1983) *Pituitary and ovarian responses to luteinizing hormone releasing hormone in rat with polycystic ovary*. *Biol. Reprod.* 29: 239-48.
  - ❖ **Humbrey HC, Yao y Janice MB** (1999) *Ovary, Ovarview*. *Encyclopedia of Reproduction* 3: 590-597.
  - ❖ **Humbrey HC, Yao y Janice MB.** (1999) *Ovary, Ovarview*. *Encyclopedia of Reproduction* 3: 590-597.
  - ❖ **Jannes L, Beckman WC, Stumpf WE, Grzanna R.** (1982) *Anatomical*

## Bibliografía

---

- relationships of serotonergic and noradrenergic projections with the GnRH system in septum and hypothalamus. Exp. Brain. Res. 46: 331-338.*
- ❖ **Johnson, EO Kamilaris, TC, Chrousos, GP, Gold, PW.** (1992) *Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 16. 115–130.*
  - ❖ **Jolly PD, Tisdall DJ, Heath DA, Lun S, McNatty KP.** (1994) *Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cAMP responses to FSH and LH and follicular atresia. Biology Reproduction 51:934-944.*
  - ❖ **Klein CM, Burden HW.** (1988) *Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. Neurosci. Lett. 85: 217-222.*
  - ❖ **Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, Ojeda SR.** (2000) *An Increased Intraovarian Synthesis of Nerve Growth Factor and its Low Affinity Receptor is a Principal Component of Steroid-induced Polycystic Ovary in the Rat. Endocrinology. 141: 1059-1072.*
  - ❖ **Lara HE, Dorfman M, Venegas M, Luza SM, Luna SL, Mayerhofer A, 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, Ferruz J, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR.** (1993) *Activation of Ovarian Sympathetic Nerves in Polycystic Ovary Syndrome. Endocrinology 133: 2690 - 2695.*
  - ❖ **Lawrence IE, Burden HW.** (1980) *The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. The Anatomical Record. 196: 51-59.*
  - ❖ **Lawrence LE.** (1999) *Ovulation, Encyclopedia of Reproduction Vol. 3, Academic Press pp. 605-614.*
  - ❖ **Linares R** (2011) Tesis de Maestría: Interacción entre los Nervios Ovárico Superior y Vago en la Regulación de la Ovulación y la Secreción Hormonal. La rata con Síndrome de Ovario Poliquístico como modelo estudio. Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional

## *Bibliografía*

---

Autonoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México DF.

- ❖ **Linares R, Rosas G, Ayala ME, Morales L y Domínguez R.** (2012). *The Polycystic ovarian syndrome induced by Estradiol Valerate or Chronic Cold Exposure Affects in Different Way the monoamines concentration in the Celiac-superior mesenteric ganglia.* Cartel presentado en el LV Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas y la Federación de asociaciones Latinoamericanas del Caribe de Neurociencias (FALAN) y Asociación Civil Neurociencias y Neurobiología de México (NNM), celebrado del del 04 al 09 de noviembre de 2012, Cancún, Quintana Roo.
- ❖ **MaDonald JK, Dees WL, Ahmed CE, Noe BD, Ojeda SR.** (1987) *Biochemical and immunocytochemical characterization of neuropeptide y in the immature rat ovary.* *Endocrinology.* 120: 1703-1710.
- ❖ **Magnusson C, Bar Ami S, Braw R, Tsafiriri A.** (1983) *Oxigen consumption by rat oocytes and cumulus cell during induced atresia.* *Journal Reproduction Fertil.* 68:93-103
- ❖ **Mannerås L, Cajander S, Agneta H, Zamira S, Theodore L, Malin L y Stener-Victorin E.** (2007) *A New Rat Model Exhibiting Both Ovarian and Metabolic Characteristics of Polycystic Ovary Syndrome.* *Endocrinology* 148: 3781–3791.
- ❖ **Marieb EN.** (1992) *System reproductive.* En: *Human Anatomy and Physiology.* 2a ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California. Cap 28.
- ❖ **Mathews D, Andrews WW, Parker RJr, Ojeda SR.** (1987) *A role for aromatizable androgens in female puberty.* *Biol. Reprod.* 36: 836-843.
- ❖ **McCarty R.** (1989) *Stress research: principles, problems and prospects.* In: Van Loon GR, Kvenansky R, McCarty R, Axelrod J, eds. *Stress: neurochemical and humoral mechanisms.* New York: Gordon and Breach Science Publishers; 3–13
- ❖ **McEwen BS.** (1998) *Protective and damaging effects of stress mediators.* *N Engl J Med* 338:171-179
- ❖ **Mercier S, Canini F, Buguet A, Cespuglio R, Martin S y Bourdon L.**

## *Bibliografía*

---

- (2003). *Behavioural changes after an acute stress: stressor and test types influences*. Behavioral Brain Research. 139:167-175.
- ❖ **Moguilevsky JA, Faigon MR, Scacchi P, Szwarcfarb B.** (1885) *Effect of the serotonergic system on luteinizing hormone secretion in prepuberal female rats*. Neuroendocrinology 40: 135-138
  - ❖ **Morales-Ledesma L, Linares R, Rosas G, Morán C, Chavira R, Cárdenas M, Domínguez R.** (2010) *Unilateral sectioning of the Superior Ovarian Nerve of Rats with Polycystic Ovarian Syndrome restores Ovulation in the Innervated Ovary*. Reproductive Biology and Endocrinology. 8:99.
  - ❖ **Morales-Ledesma L, Vieyra E, Ramírez D, Trujillo A, Chavira R, Cárdenas M y Domínguez R.** (2012) *Effects on steroid hormones secretion resulting from the acute stimulation of sectioning the superior ovarian nerve to pre-puberal rats*. Reproductive Biology and Endocrinology 10:88
  - ❖ **Navarrete MI.** (2014) Tesis de licenciatura: Modificación de las funciones ováricas en el animal con Síndrome de Ovario Poliquistico inducido por la administración de valerato de estradiol o la exposición de estrés por frío. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México DF.
  - ❖ **Ojeda SR, Dissen GA, Malamed S, Hirshfield AN.** (1992) *Neurotrophic factors and female sexual development*. In: Ganong WF, Mertini L. (eds) *Frontiers in Neuroendocrinology*. Vol. 13, Raven Press, New York pp. 120-162.
  - ❖ **Ojeda SR, Urbanski HF.** (1994) *Puberty in the Rat*. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) *The Physiology of Reproduction*. 2nd edition. Raven Press, Ltd. New York. Vol. 2 Cap. 40 pp. 363 - 409.
  - ❖ **Pacák K y Palkovits M.** (2001) *Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders*. The Endocrine Society. 22(4):502–548
  - ❖ **Pacak K, Palkovits M, Yadid G, Kvetnansky R, Kopin IJ, Goldstein DS.** (1998) *Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity*. Am J Physiol 275:R1247–R1255.

## Bibliografía

---

- ❖ **Paredes A, Gálvez A, Leyton V, Aravena G, Fiedler JL, Bustamante D, Lara HE.** (1998) *Stress promotes development of ovarian cystic in rats.* Endocrine. 8(3):309-315.
- ❖ **Peters H, Byskov AG, Himelstein-Braw R.** (1975) *Follicular growth in fetal and pubertal ovaries of human and other primates.* En Ross GT, Lipsett MB. (1978) (eds.) *Gynecological Endocrinology* Saunders, London pp. 469-485.
- ❖ **Petrus P.** (1978) *Gonadotrophin-target cell interactions: A model based on morphological localization.* En *The gonadotrophins: structure and function.* KW Macherns. Plenum Pub Co, Nueva York, pp 577-589.
- ❖ **Richards JS.** (1994) *Hormonal control of gene expression in the ovary.* Endocr. Rev. 15: 725-751.
- ❖ **Rosales AM.** (1998) *Atresia Folicular.* En *Biología de la Reproducción,* Ed. Javier Velázquez Moctezuma. UAM-I 223:261.
- ❖ **Ross MH, Gordon IK, Wojciech P.** (2005) *Histología, texto y atlas a color con biología molecular y celular.* Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires, Argentina pp. 736.
- ❖ **Sánchez Criado J.E.** (1999) *Fisiología del Ovario.* En: Tresguerres J.A. (Ed.) *Fisiología Humana.* 2a edición. Editorial McGraw-Hill•Interamericana. Madrid. Cap. 75 pp. 1020-1032.
- ❖ **Sarper CB, Loewy AD, Swanson LW, Cowan WM.** (1976) *Direct hypothalamo-autonomic connections.* Brain Research. 117: 305-316.
- ❖ **Sejnowski T.** (1982) *Peptidergic synaptic transmission in sympathetic ganglia.* Federation Proceedings 13: 2923-2928.
- ❖ **Selye H.** (1936). *A syndrome produced by diverse nocuous agents.* Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences. 10: 230-231
- ❖ **Sherwood L** (2011) *Fisiología Humana. De las células a los sistemas.* 7ª ed. Editorial Cengage Learning, México, Cap 20.
- ❖ **Sir-Petermann T, Maliqueo MY, Pérez-Bravo F, Ángel B, Carvajal FP, Del Solar MP, Benítez RM** (2001) *Polycystic ovary syndrome: The importance of establishing diagnosis.* Revista médica Chile 129:7.



## *Bibliografía*

---

- ❖ **Sotomayor-Zarate, Dorfman M, Paredes A, y Lara HE.** (2008) *Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat.* *Biology of Reproduction.* 78: 673-680.
  
- ❖ **Steekler TI, Herkimer C, Dumesic DA, Padmanabhan V.** (2009) *Developmental programming: excess weight gain amplifies the effects of prenatal testosterone excess on reproductive cyclicity implication for polycystic ovary syndrome.* *Endocrinology* 150: 1456-1465.
  
- ❖ **Tresguerres JA.** (1999) *Fisiología Humana.* 2a edición. Editorial McGraw-Hill•Interamericana. Madrid. Cap. 75 pp. 1020-1032.
  
- ❖ **Van de Kar LD, Blair ML.** (1999) *Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion.* *Front Neuroendocrinol.* 20:1–48
  
- ❖ **Walters KA, Allan CM, y Handelsman DJ.** (2008). *Androgen actions and the ovary.* *Biology of Reproduction* 78: 380-389.
  
- ❖ **Ward RC, Costoff A y Mahesh VB.** (1978) *The induction of polycystic ovaries in mature cycling rats by the administration of dehydroepiandrosterone (DHA).* *Biol. Reprod.* 18: 614-623.
  
- ❖ **Weiner H.** (1991) *Behavioral biology of stress and psychosomatic medicine.* In: Brown MR, Koob GF, Rivier C eds. *Stress Neurobiology and neuroendocrinology.* New York:: Marcel Dekker; 23-51
  
- ❖ **Xita N, Georgiou I, Tsatsoulis A.** (2002) *The genetic Basic of polycystic ovary syndrome.* *Eu J Endocrinol.* 147: 717-725.
  
- ❖ **Yen SSC, Vela P, Rankin J.** (2001) *Inappropriate secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in polycystic ovarian disease.* *J Clin. Endocrinol. Metab.* 30: 435.