



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

Participación del nervio vago en la actividad neural del ganglio celiaco mesentérico superior, en el modelo del animal con exposición al estrés por frío o con síndrome de ovario poliquístico inducido con valerato de estradiol.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

GUERRERO MEJORADA YANEELY ALINA

Directora de Tesis: Dra. Leticia Morales Ledesma



MÉXICO., D.F.

ABRIL 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

Participación del nervio vago en la actividad neural del ganglio celiaco mesentérico superior, en el modelo del animal con exposición al estrés por frío o con síndrome de ovario poliquístico inducido con valerato de estradiol.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

GUERRERO MEJORADA YANEELY ALINA

Directora de Tesis: Dra. Leticia Morales Ledesma

La realización de esta tesis contó con el apoyo financiero de

UNAM-DGAPA-PAPIIT clave: IN211813



Agradecimientos

A los miembros del jurado:

- ❖ *Dra. Patricia Rosas Saucedo*
- ❖ *Dra. Leticia Morales Ledesma*
- ❖ *Dra. María Elena Ayala Escobar*
- ❖ *M. en C. Luis Sánchez Sánchez*
- ❖ *Dra. Juana Monroy Moreno*

Por su dedicación y tiempo que dieron a este proyecto, por compartir sus conocimientos y experiencias, por las críticas constructivas para hacer de este proyecto una mejor tesis. Gracias.

A la Dra. Leticia Morales Ledesma por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo; no solo me dio las herramientas necesarias para la realización de este trabajo, sino que con su infinita paciencia y sabiduría también me dio la oportunidad de crecer y mejorar como persona. Muchas gracias.

A Rosa Linares Culebro por todo tu tiempo invertido para enseñarme lo necesario para la elaboración de este proyecto, además de brindarme tu apoyo, paciencia y consejo. Muchas gracias Rose.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Ely, Deyra, Gaby, Rose, Azu, Isa R., Noé, Aldo, Isa N., Hazael, Cesar, Daniel, Liz, Iván y a los nuevos integrantes Catalina, David, Wendy y Nayeli, ustedes hicieron mi estancia feliz. Gracias.

A la Dra. Adriana, Dra. Elizabeth, Dr. Román y a todo el personal del bioterio por el apoyo y cuidado de las ratas utilizadas en este trabajo.

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

Dedicatorias

*Esta tesis se la dedico principalmente a mis padres **José y Beni**, sin ustedes este trabajo no se hubiera podido realizar. Su amor y su apoyo incondicional han sido la mayor motivación para llegar hasta aquí. Gracias a ustedes me he convertido en la persona que soy ahora, no tengo forma de agradecerles todo lo que hacen por mí. Simplemente para mí son los mejores. Los amo infinitamente.*

*A mis hermanos **Araceli, Oscar y Hugo** porque ustedes han sido mis mejores amigos y cómplices en todo momento, por su apoyo, comprensión y amor, por todos sus cuidados y consejos, me han enseñado mucho en todos estos años. Los amo.*

*A **Guille**, por el apoyo y el cariño ilimitado que me has dado siempre. Gracias. Te adoro.*

*A **J. Luis Guzmán** por todo el cariño que me has dado, los consejos y apoyo. Te quiero mucho.*

*A **Roberto, Claudia A, J. Luis Solano, Claudia I, Lalo, Luisa y Brenda**, porque sin saberlo ustedes me han dejado mucho a lo largo de estos años de amistad. Gracias por la inmensa confianza que me han brindado. Los quiero.*

***Javier, Carlos y Marisol** sin ustedes esta etapa no hubiera sido la misma, han estado conmigo a lo largo de toda la carrera dándome el apoyo, la confianza necesarias para obtener esto; **Phany**, por todas nuestras vivencias y porque te preocupas por verme reír en todo momento; **Isa Ramírez**, como dijiste, los grandes amigos jamás juzgan y tú te convertiste en mi gran amiga en corto tiempo; **Aarón**, porque a pesar de la distancia siempre estas para mí, sigues siendo incondicional; **Noé**, por todos tus consejos y por el ánimo incomparable que me das siempre; **Sergio**, por la gran confianza que nos hemos dado te convertiste en alguien muy importante y valioso para mí; **Nathali y Viridiana**, porque ustedes no solo me han dado risas, me han brindado lo necesario para convertirse en mis grandes amigas en este tiempo, espero siga siendo así mucho tiempo más; **Isa Navarrete** porque nuestras experiencias nos han unido y espero sigan uniéndonos más; **Cesar** porque en cortísimo tiempo te volviste mi amigo y espero de corazón que nuestra amistad crezca, y a **Amadeo**, porque te has convertido en mi cómplice y mi amigo, porque llegaste en el mejor momento para apoyarme y alegrarme los días, bien dicen "lo mejor viene al final" y tú eres un claro ejemplo de eso. Te has vuelto mi fuerte y con ello te volviste indispensable.*

*A cada uno de ustedes que han hecho este tiempo único. Gracias...**Los quiero!***

| | |
|--|-----------|
| Abreviaturas..... | 7 |
| Resumen..... | 9 |
| Introducción..... | 10 |
| Marco Teórico | |
| Ciclo Estral..... | 11 |
| Ovario..... | 12 |
| Desarrollo Folicular..... | 14 |
| Ovulación y su Regulación..... | 17 |
| Esteroidogénesis Ovárica..... | 18 |
| Inervación Extrínseca..... | 20 |
| Ganglio Celiaco Mesentérico Superior..... | 24 |
| Síndrome de Ovario Poliquístico..... | 25 |
| Inductores del SOPQ..... | 27 |
| Valerato de Estradiol..... | 28 |
| Estrés..... | 29 |
| Participación de la Inervación Extrínseca en el Desarrollo del SOPQ..... | 30 |
| Planteamiento del Problema..... | 31 |
| Hipótesis..... | 32 |
| Objetivo general..... | 32 |
| Objetivos particulares..... | 32 |
| Materiales y Métodos | |
| Modelos de Inducción..... | 33 |

Índice

| | |
|--|-----------|
| Cirugía..... | 34 |
| Procedimiento de Autopsia..... | 34 |
| Cuantificación de Hormonas Esteroides..... | 35 |
| Cuantificación de Noradrenalina en Ganglio y Ovario..... | 35 |
| Análisis Estadístico..... | 36 |
| Resultados | |
| Experimento 1..... | 37 |
| Experimento 2..... | 46 |
| Discusión..... | 55 |
| Modelo..... | 62 |
| Conclusiones..... | 64 |
| Bibliografía..... | 65 |

Abreviaturas

| | |
|---------------------------------|--|
| 3βHSD: | 3 β - Hidroxiesteroide deshidrogenasa |
| 5-HT: | Serotonina |
| 5-HIAA: | Ácido 5-hidroxitriptolacético |
| 17βHSD: | 17 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa |
| Ach: | Acetilcolina |
| DA: | Dopamina |
| DHEA: | Dehidroepiandrosterona |
| E2: | Estradiol |
| EGF: | Factor de crecimiento epidérmico |
| FSH: | Hormona foliculo estimulante |
| GCRP: | Péptido relacionado con el gen de la calcitonina |
| GCMS: | Ganglio celiaco mesentérico superior |
| GnRH: | Hormona liberadora de gonadotropinas |
| hCG: | Gonadotropina coriónica humana |
| HPLC: | Cromatografía de líquidos de alta densidad |
| IGF: | Factor de crecimiento |
| LC: | Locus Coeruleus |
| LDL: | Lipoproteínas de baja densidad |
| LH: | Hormona luteinizante |
| MHPG: | 3-Methoxy-4 hidroxifenilglicol |
| NA: | Noradrenalina |
| NDR: | Núcleo dorsal del Rafe |
| NGF: | Factor de crecimiento neural |

Abreviaturas

| | |
|----------------|--|
| NOS: | Nervio ovárico superior |
| NPY: | Neuropéptido Y |
| NPO: | Nervio del plexo ovárico |
| NPV: | Núcleo paraventricular |
| NSQ: | Núcleo supraquiasmático |
| OSV: | Operación simulada ventral |
| PMSG: | Gonadotropina del suero de yegua preñada |
| RIA: | Radioinmunoanálisis |
| SBNV: | Sección bilateral del nervio vago |
| SHBG: | Globulina fijadora de hormonas sexuales |
| SNA: | Sistema nervioso autónomo |
| SOPQ: | Síndrome de ovario poliquístico |
| SP: | Sustancia P |
| T: | Testosterona |
| TA: | Testigo absoluto |
| TAO: | Tasa de animales ovulantes |
| TH: | Tirosina hidroxilasa |
| VE: | Valerato de estradiol |
| VH: | Vehículo |
| VIP: | Péptido intestinal vasoactivo |
| VMH-AN: | Núcleo Arcuato del Hipotálamo Ventromedial |

En la rata adulta la vagotomía bilateral altera el ciclo estral, aumenta el número de ovocitos liberados, bloquea la inducción del pseudo- preñez y disminuye la concentración de LH.

Cuando en la rata con síndrome de ovario poliquístico (SOPQ) se realiza la sección unilateral del nervio ovárico superior, se restablece la ovulación sólo por el ovario inervado, mientras que, la sección unilateral del nervio vago la restablece por ambos ovarios en un 70% de los animales.

En el presente estudio se decidió analizar el efecto de quitar ambos nervios vago sobre la respuesta ovulatoria, la secreción de hormonas esteroides y monoaminas en dos modelos experimentales, en el inyectado con valerato de estradiol (VE) y el sometido a estrés por frío.

En la bibliografía se plantea que el VE y estrés por frío son dos modelos que se pueden usar para inducir el SOPQ. Del presente estudio se desprende que el estrés por frío no es un buen modelo para reproducir las características que definen el SOPQ, ya que no se presentó hiperandrogenismo, la respuesta ovulatoria fue normal, al igual que la concentración de NA en el ovario y en el ganglio celiaco mesentérico superior (GCMS). En este modelo animal, el nervio vago modula de manera inhibitoria la concentración de noradrenalina (NA) y serotonina (5-HT) ovárica.

La administración de VE en la rata de 10 días de edad desarrolla las características del SOPQ cuando alcanza la edad adulta, como anovulación (Vh 100% vs VE 20%, $p < 0.05$), altas concentraciones de andrógenos (Vh 41.5 ± 8.9 vs VE 88.5 ± 16.3 , $p < 0.05$), y NA en el GCMS (Vh 3729 ± 771 vs VE 7337 ± 1523 , $p < 0.05$).

La vagotomía bilateral restablece la ovulación (VE 20% vs VE SBNV 77.77%, $p < 0.05$) y disminuye la concentración de noradrenalina en el GCMS (VE 7331 ± 1523 vs VE SBNV 2207.68 ± 609.86 , $p < 0.05$), lo que apoyaría la idea de que el nervio vago modula la actividad simpática del ganglio GCMS. En estos animales la vagotomía modifica la concentración de 5-HT (Vh 2641 ± 888 ; VE 3519.3 ± 467.3 ; VE SBNV 476.30 ± 82.96 , $p < 0.05$).

Tomando en conjunto los resultados del animal tratado con VE, podemos concluir que el nervio vago participa en la actividad neural del GCMS y en la modulación de la activación de las fibras simpáticas, por lo tanto influye en la persistencia del SOPQ.

El síndrome de ovario poliquístico (SOPQ) es un desorden heterogéneo. Del 5 al 10% de mujeres entre los 18 a 44 años son afectadas por el SOPQ, haciendo de esta la anormalidad endocrina la más común en mujeres en edad reproductiva (Goodarzi y col., 2011).

Una mujer es diagnosticada con el SOPQ cuando presenta hiperandrogenismo acompañado de anovulación o quistes foliculares. El desarrollo de alteraciones metabólicas como la resistencia a la insulina constituye un factor que puede agravar las manifestaciones clínicas ya mencionadas (Checa, 2007).

Debido a las limitaciones logísticas y éticas sobre experimentación humana, se utilizan modelos animales que reproducen los rasgos del SOPQ (Walters, 2012). Se sugiere que el síndrome es el resultado de una mayor actividad de las fibras simpáticas, dos modelos que permiten incrementar la actividad de estas fibras es la administración de valerato de estradiol (VE) y el estrés por frío.

El VE es de acción prolongada y una dosis de 2 mg a ratas pre-púberes desarrolla un síndrome caracterizado por la pérdida de la ciclicidad estral, anovulación, formación de quistes, alteraciones en las concentraciones de LH y FSH, mayor concentración de estradiol (E2) y androstenediona lo que favorece la formación de quistes foliculares. Estos síntomas son considerados similares a los presentados en las mujeres (Morales y col., 2010).

Un efecto general del estrés es el incremento de noradrenalina (NA) en el ganglio celiaco mesentérico superior (GCMS) (Nankova y col., 1996), el aumento en la actividad de los nervios simpáticos que llegan al ovario, así como de la concentración plasmática de corticosterona y el contenido de catecolaminas en la glándula adrenal (Paredes y col, 1998).

Dado que en la rata con SOPQ la sección unilateral del nervio ovárico superior (NOS) no restablece la ovulación en el ovario con una concentración baja de NA, y si lo hace en el que mantiene alta la concentración de la amina, se sugiere que en el desarrollo del síndrome participa otras vías neurales entre ellas la del nervio vago (Morales y col., 2010).

Se ha mostrado que el GCMS recibe fibras vagales (Berthoud y Powley 1996), lo que podría sugerir una comunicación entre fibras simpáticas y parasimpáticas a nivel del ganglio y modular la concentración de NA que llega al ovario por el NOS.

Por lo anterior, el objetivo del estudio fue analizar la participación del nervio vago en ratas con inyección de VE y sometidas a estrés por frío, sobre la respuesta ovárica.

Ciclo Estral

Gran parte de lo que sabemos sobre la regulación del ciclo ovárico y la ovulación de muchos mamíferos, se basa en conocimientos sobre los mecanismos de regulación del ciclo estral de la rata (Freeman y col., 1994).

A diferencia del ovario de otros mamíferos que ovulan de forma espontánea, la rata es el único que se caracteriza por tener una fase lútea breve.

Con base en cambios conductuales y citológicos Heape (1900) realiza por primera vez la clasificación del ciclo estral en cuatro etapas:

1. **Estro:** En esta etapa la hembra es sexualmente receptiva y puede llevarse a cabo la fecundación del ovocito. El frotis vaginal se distingue por un gran número de células epiteliales escamosas o cornificadas, que se producen en racimos. Estas células sin núcleos visible, contienen citoplasma granular, y regularmente hay ausencia total de leucocitos y células epiteliales nucleadas.
2. **Metaestro:** En ausencia de la concepción, el estro es seguido por un periodo de recuperación corto llamado metaestro. Se caracteriza por altas concentraciones de progesterona, en la mucosa vaginal se observan leucocitos y algunas células queratinizadas (Rodríguez J., 1993).
3. **Diestro:** Se caracteriza por el predominio de leucocitos y algunas células epiteliales cornificadas, el frotis vaginal obtenido en el metaestro y diestro son prácticamente indistinguibles, durante este tiempo, las secreciones ováricas preparan el tracto reproductivo para recibir el óvulo fecundado poco después del apareamiento en el estro. Si la fecundación no se ha producido, el mamífero continúa con su ciclo.
4. **Proestro:** Se caracteriza por el momento en que un animal entra en “calor” y por el predominio de células epiteliales redondas con un núcleo fácilmente visible, estas pueden aparecer en grupos o individualmente. Ocasionalmente pueden aparecer en el campo células epiteliales cornificadas o escamosas. En esta etapa hay ausencia total de leucocitos.

Esta descripción de las diferentes etapas reproductivas, se ha aplicado al ciclo estral de todos los mamíferos estacionales o no estacionales. Su duración y comportamiento pueden variar entre los mamíferos (Freeman y col., 1994).

Ovario

En la mujer, los ovarios son estructuras pares de color blanco rosado con forma de almendra, que miden 3 cm de largo, 1.5 de ancho y 1 cm de espesor. Antes de la pubertad la superficie del ovario es lisa pero durante la vida fértil adquiere cicatrices que son llamados cuerpos lúteos y se torna irregular a causa de las ovulaciones consecutivas.

El ovario se compone de tres zonas (figura 1):

- La **médula**, que está situada al centro del ovario y contiene tejido conjuntivo laxo, un conjunto de vasos sanguíneos de tamaño relativamente grande, vasos linfáticos y nervios.
- La **corteza** está ubicada en la periferia del ovario y rodea a la médula. La corteza contiene folículos ováricos en diferentes etapas del desarrollo incluidos en tejido conjuntivo. En el estroma que rodea los folículos hay células musculares lisas dispersas (Ross y Pawlina, 2007).
- El **Hilum**: Por esta zona entran arterias y nervios y sale la vena ovárica. Está cubierto por un epitelio cúbico simple (Rodríguez, 2005).

El límite entre la corteza y la médula no está bien definido.

La superficie del ovario esta cubierta por una capa de epitelio germinal formado de células cúbicas que en algunas partes son casi planas. Debajo de este epitelio hay una capa de tejido conjuntivo denso, la túnica albugínea, que lo separa de la corteza subyacente (Ross, 2007).

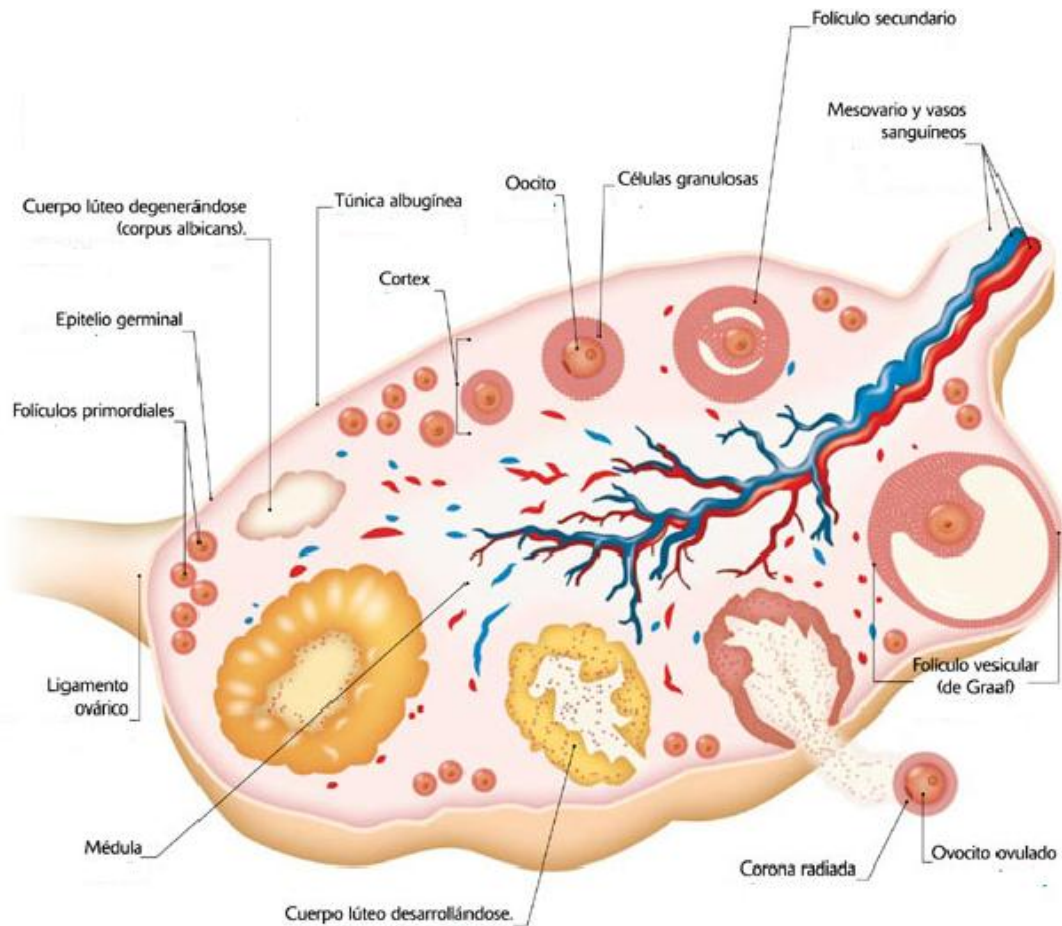


Figura 1. Zonas del ovario y folículos en desarrollo (Yen 2006).

El ovario está formado por tres compartimentos: El folicular, luteal y el tejido intersticial (Figura. 2).

El folículo ovárico es una estructura conformada por un ovocito y células derivadas del epitelio ovárico, llamadas células foliculares (Rodríguez, 2005). La FSH es la encargada de estimular este compartimento. El folículo produce estrógenos, principalmente estradiol (Botella, 1993).

El tejido intersticial está formado por las células de la teca del folículo en desarrollo, por la teca de los folículos atrésicos, por la teca cortical del ovario postmenopáusico y por las masas fibrotecales centrales del ovario que tiene como función secretar andrógenos, principalmente testosterona y androstenediona (Botella, 1993, 1995).

El cuerpo lúteo es una estructura formada por los cambios producidos en las células de la granulosa y en las células de la teca después de la ovulación (Eynard y col., 2008). Esta estructura produce progestágenos principalmente progesterona, la LH estimula la actividad del cuerpo lúteo (Botella 1993).

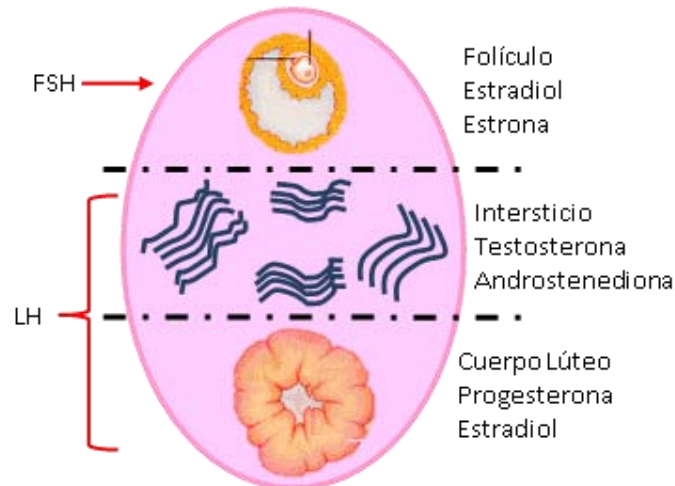


Figura 2. Muestra los tres compartimentos endocrinos del ovario y las hormonas que cada uno produce. La LH estimula el compartimiento intersticial y el cuerpo luteo, mientras que la FSH estimula el compartimento folicular (Botella, 1993).

Desarrollo Folicular

El desarrollo folicular es el proceso de maduración de un folículo. En el estroma de la corteza del ovario están distribuidos los folículos ováricos de diversos tamaños, cada uno con un sólo ovocito. El tamaño de un folículo indica el estado de desarrollo del ovocito.

De acuerdo con su estado de desarrollo los folículos ováricos se clasifican en:

- ✓ Folículos primordiales
- ✓ Folículos primarios
- ✓ Folículos secundarios
- ✓ Folículos de Graaf o folículos maduros.

En el ovario de la mujer hay folículos en todas las etapas del desarrollo (Figura. 3) pero predominan los folículos primordiales (Ross y Pawlina, 2007).

Folículos primordiales: Están en el estroma de la corteza justo por debajo de la túnica albugínea. Se caracterizan por presentar una capa de células foliculares planas que rodean al ovocito. La superficie externa de las células foliculares está cubierta por una lámina basal. En esta etapa el ovocito y las células circundantes están muy juntas. El ovocito mide unos 30 μm de diámetro y posee un núcleo excéntrico voluminoso provisto de eucromatina dispersa y un nucléolo grande (Ross y Pawlina, 2007).

En la mujer, estos folículos aparecen durante el tercer mes del desarrollo fetal (Ross y Pawlina 2007). En la rata la foliculogénesis comienza a las 48 horas de vida postnatal (Malamed, 1992). El crecimiento inicial de estos folículos es independiente de la estimulación de gonadotropinas debido a la falta de receptores en la gónada. Se ha postulado que en el proceso de foliculogénesis participa la inervación simpática del ovario, vía la noradrenalina (NA) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Malamed, 1992).

Folículo primario: La formación de este tipo de folículos tiene lugar cuando el ovocito aumenta de tamaño y las células foliculares aplanadas circundantes proliferan y se tornan cúbicas. A medida que el ovocito crece de 50 a 80 μm aproximadamente una lámina homogénea, acidófila y retráctil, llamada zona pelúcida, aparece entre él y las células foliculares continuas (Ross, 2007).

Rápidamente mediante la proliferación mitótica la capa simple de células foliculares da origen a un epitelio estratificado, la capa granulosa, que rodea al ovocito.

Conforme las células foliculares de la granulosa proliferan las células perifoliculares del estroma forman una vaina de células conjuntivas conocidas como teca folicular, por fuera de la lámina basal. La teca folicular se diferencia en dos capas (Ross, 2007):

- Teca interna: Es la capa de las células secretoras más vascularizada y más profunda. Las células de la teca interna con diferenciación completa poseen las características estructurales típicas de las células productoras de esteroides. Estas células tienen gran cantidad de receptores a LH. En respuesta a los estímulos de LH sintetizan y secretan los andrógenos que son los precursores de los estrógenos.
- Teca externa: Es la capa más superficial de células del tejido conjuntivo. Contiene células musculares lisas y haces de fibras de colágenos.

Los límites entre las dos capas tecales, externa e interna y el estroma, no son nítidos. Sin embargo, la lámina basal que hay entre las células de la granulosa y las células de la teca interna, establece un límite bien definido entre esas capas.

El folículo primario se forma más profundo en el estroma cortical conforme aumentan de tamaño, sobre todo por la proliferación, de las células de la granulosa. Los componentes necesarios para el crecimiento del ovocito y del folículo son: FSH, factores de crecimiento epidérmico (EGF), iones de calcio y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) (Ross, 2007).

Folículo secundario o Folículo antral: En este estadio del desarrollo, el ovocito mide 125 μm aproximadamente, está rodeado por 6 a 12 capas de células de la granulosa. Entre las células de la granulosa aparecen cavidades llenas de líquido folicular con abundante hialuronano, el cual al acumularse forma cavidades que da lugar al “antro” folicular (Ross, 2007).

Conforme el folículo secundario aumenta de tamaño el antro que está revestido por varias capas de células de la granulosa, también se vuelve más grande. La capa de la granulosa tiene un espesor que es relativamente uniforme excepto en la región asociada con el ovocito. Allí las células de la granulosa forman un montículo abultado, el disco prolífero o cumulo ovoforo, que se proyecta dentro del antro. Las células del disco prolífero que rodean inmediatamente al ovocito y permanecen con él en la ovulación forman la denominada corona radiada. La corona radiada está compuesta por células del cúmulo que envían microvellosidades penetrantes por toda la membrana pelúcida para comunicarse por uniones de hendidura con las microvellosidades del ovocito (Ross, 2007).

El **folículo maduro**, también conocido como **folículo de Graaf**, tiene un diámetro de 10 mm (en mujer) o más. A causa de su gran tamaño se extiende por todo el espesor de la corteza ovárica y protruye en la superficie del ovario. A medida que el ovario alcanza su tamaño máximo, la actividad mitótica de las células disminuye. La capa de la granulosa se torna más fina conforme el antro aumenta de tamaño. Mientras continúan agrandándose los espacios que hay entre las células de la granulosa, el ovocito y las células del cúmulo se separan gradualmente del resto de la capa de la granulosa, preparándose para la ovulación.

Durante este periodo de maduración folicular las capas tecales se tornan más prominentes. La LH estimula a las células de la teca a secretar andrógenos. En respuesta a la FSH las células de la

granulosa catalizan la conversión de andrógenos en estrógenos, los cuales estimulan el crecimiento del folículo mediante la proliferación celular (Ross, 2007).

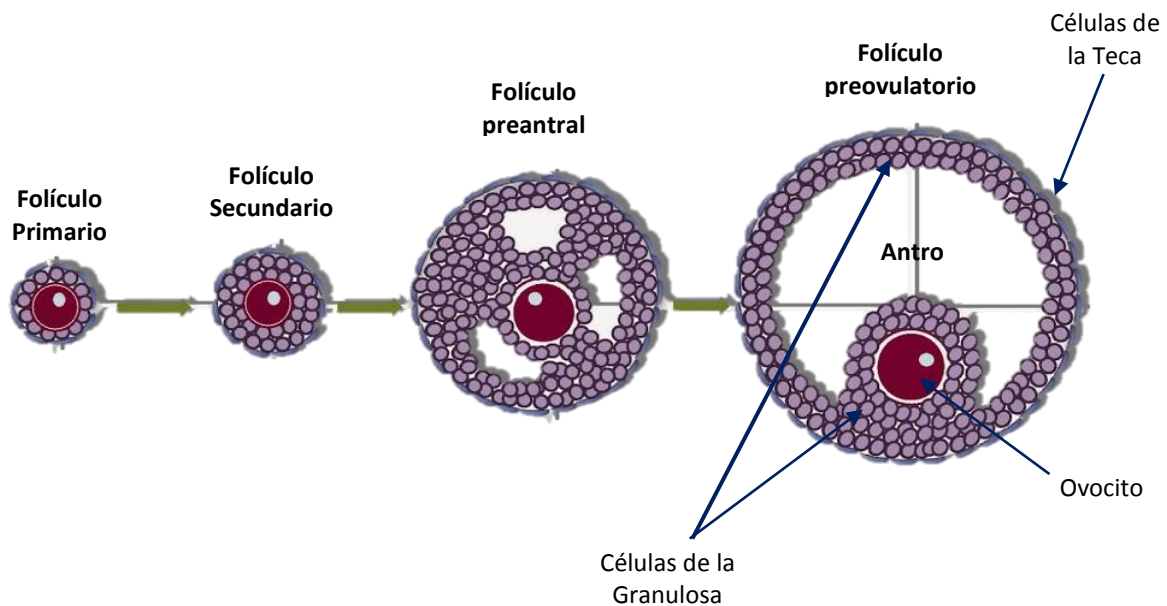


Figura 3. Estados de desarrollo de los folículos en el ovario. El más grande corresponde a un folículo preovulatorio (Tomado y modificado de carola4.blogspot.com.es/2013/09/las-telomerasas-y-los-ovarios.html).

Ovulación y su Regulación

La ovulación es el momento en el que el ovocito y el líquido folicular son proyectados, por la contracción de la musculatura lisa que rodea los folículos hacia la cavidad peritoneal cayendo cerca de las fimbrias del oviducto o trompas de Falopio (Buxadé, 1994).

La ovulación se produce por un aumento brusco de LH, la superficie del ovario comienza a presentar un abultamiento local, en cuyo vértice aparece una mancha vascular llamado estigma. La elevada concentración de LH aumenta la actividad de la colagenasa y se produce la lisis de las fibras de colágeno que rodean al folículo. Las concentraciones de prostanglandinas también se elevan en respuesta al pico de LH y causan contracciones musculares locales en la pared del ovario. Estas contracciones expulsan al ovocito que, junto con las células de la granulosa que lo rodean desde la región del cúmulo ovóforo, se desprenden y flotan fuera del ovario. Algunas de las células del cúmulo ovóforo vuelven a organizarse alrededor de la zona pelúcida y forman la corona radiada (Langman, 2007).

Después de la ovulación, las células de la granulosa que quedan en la pared del folículo roto, junto con las células de la teca interna, son vascularizadas por los vasos que la rodean. Por la influencia de la LH, estas células adquieren un color amarillo y se convierten en células luteínicas, las cuales forman el cuerpo lúteo o cuerpo amarillo y secretan progesterona (Langman, 2007).

Esteroidogénesis Ovárica

El folículo ovárico produce estrógenos, principalmente estradiol, el cuerpo lúteo produce progestágenos principalmente progesterona y el intersticio ovárico produce andrógenos principalmente testosterona (Botella, 1995).

Los estrógenos, andrógenos y progestágenos tienen un metabolismo y una biogénesis en común (Botella, 1995). Estas hormonas derivan del colesterol que se obtiene a partir de tres fuentes: el que circula en la sangre como lipoproteínas, el que se sintetiza de *novo* dentro del ovario a partir de acetil coenzima A, y el que se libera de los ésteres del colesterol almacenados en las gotas lipídicas (Tresguerres, 2003).

El colesterol unido a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) representa la fuente aislada más importante de sustrato para la esteroidogénesis ovárica (Tresguerres, 2003).

El colesterol, independientemente de su origen, se transporta a las membranas mitocondriales, donde comienza la biosíntesis (Tresguerres, 2003). El pasaje de colesterol libre desde la membrana mitocondrial externa hacia la membrana mitocondrial interna es el paso limitante en la síntesis de las hormonas esteroideas. La transferencia intramitocondrial de colesterol requiere una proteína de recambio rápido, identificada como una fosfoproteína designada proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) (Yen, 2001).

La primera enzima esteroidogénica (P450_{scc}), presente en las mitocondrias en las células de la granulosa y la teca, es la enzima que cataliza el clivaje de las cadenas laterales del colesterol y convierte el colesterol en pregnenolona (Yen, 2001).

La biosíntesis sigue después la vía Δ -4 en el cuerpo lúteo que lleva aparejada la conversión de pregnenolona en progesterona, mientras que en el folículo es preferente la vía Δ -5, ya que las células tecaes son capaces de metabolizar con más eficacia la 17-hidroxipregnenolona que la 17-hidroxiprogesteroona (Tresguerres, 2003).

La pregnenolona producida a partir del colesterol puede experimentar una 17α -hidroxilación por la enzima P450c17 para formar 17-hidroxipregnenolona o puede ser convertida en progesterona por la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β HSD). Esta enzima puede convertir pregnenolona en progesterona; dehidroepiandrosterona (DHEA) en androstenediona y androstenediol en testosterona (Yen, 2001).

La enzima P450c17 se expresa en las células de la teca del ovario, donde es necesaria para producir los andrógenos que sirven como sustrato para la aromatización a estrógenos en las células de la granulosa (Yen, 2001).

La conversión de estrona a estradiol, androstenediona en testosterona y DHEA en androstenediona es catalizada por un grupo de enzimas, denominadas 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β HSD) y, a veces, designadas 17-cetoesteroide reductasa (Yen, 2001).

La aromatización del anillo esteroide es catalizada por la enzima aromatasa (P450arom) microsomal, la cual convierte la androstenediona en estrona y la testosterona en estradiol (Yen, 2001).

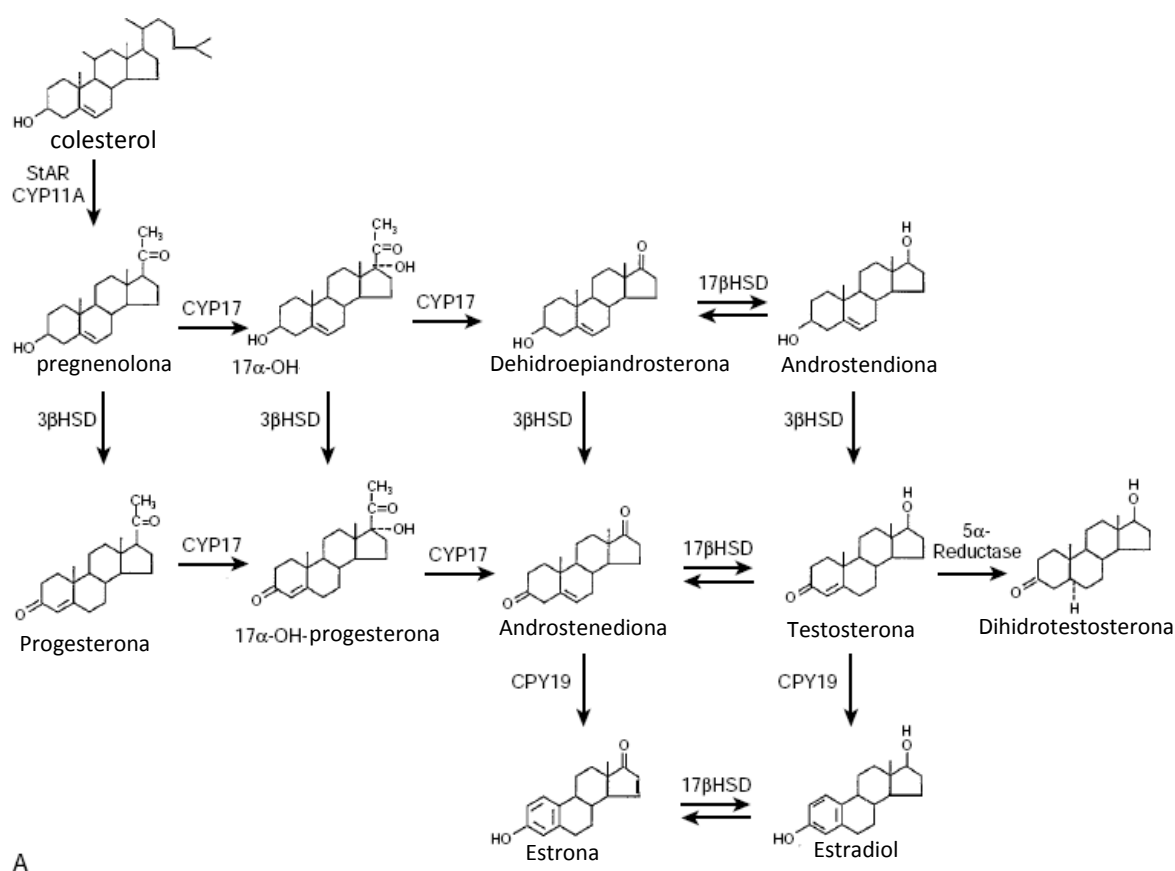


Figura 4. Esteroidogénesis en el ovario (Yen, 2001)

Los tipos de esteroides producidos y secretados dependerán de la naturaleza fisiológica de la célula esteroideogénica y de la actividad de los sistemas enzimáticos intrínsecos (Yen, 2001).

Inervación Extrínseca

La inervación que recibe el ovario no solo regula el tono vaso/motor sino también participa regulando su actividad secretora (Gerendai y col, 2002).

El sistema nervioso autónomo está conformado por dos sistemas anatómicamente separados: la división simpática y parasimpática. Los órganos del cuerpo son inervados por ambas subdivisiones y cada una tiene un efecto diferente (Carlson, 1996).

El ovario recibe fibras simpáticas y parasimpáticas, de esta última poco se sabe acerca de su distribución dentro del ovario (Ross, 2007).

- **Inervación Simpática**

La inervación simpática se origina en la región torácica T10-T13, en el segmento lumbar L-4 y L-11 de los ganglios de la cadena simpática (Burden, 1978, Dissen y Ojeda, 1999).

En la rata el ovario recibe inervación simpática de dos fuentes (Lawrence y Burden, 1980):

El **nervio del plexo ovárico (NPO)** que transcurre a través de la arteria ovárica. Las fibras del NPO son mayoritariamente perivasculares y los neurotransmisores que viajan por el son: el péptido relacionado con el gen que codifica a la calcitonina (GCRP), substancia P (SP), Neuropeptido Y (NPY) y noradrenalina (NA) (Dissen y Ojeda, 1999) (figura 4).

El **nervio ovárico superior (NOS)**, transcurre junto con el ligamento suspensorio del ovario. Sus fibras inervan la glándula intersticial y la teca de los folículos. El NOS transporta NPY, péptido intestinal vasoactivo (VIP) y principalmente NA (Dissen y Ojeda, 1999) (Figura 5).

La distribución intra-ovárica de las fibras simpáticas es similar en todas las especies, pero la densidad de las fibras varía considerablemente entre ellas. Las fibras simpáticas no inervan al cuerpo lúteo o la capa de la granulosa de los folículos en desarrollo (Araya y col., 2004), sin

embargo, presentan receptores β -adrenérgicos, lo cual les permite responder a estímulos catecolaminérgicos (Aguado y col., 1982).

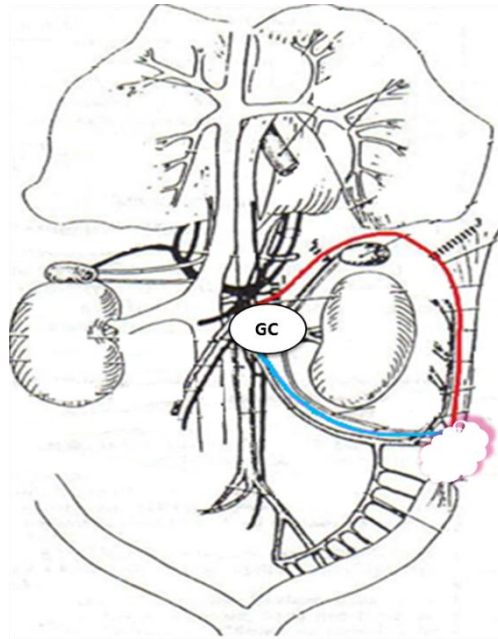


Figura 5. Inervación simpática del ovario en rojo se muestra en NOS y en azul el NPO (Lawrence y Burden, 1980).

En ratas Spraw- Dawley la sección bilateral del NOS a los 24 días de edad resulta en la disminución de la concentración de noradrenalina ovárica e incrementa el número de los receptores β - adrenérgicos, sin que se modifique su afinidad. En este modelo experimental, la alteración en el sistema noradrenérgico no modifica el inicio de la pubertad, el número de cuerpos lúteos, ni la concentración de gonadotropinas (Aguado y Ojeda, 1984).

En la rata prepúber con sección bilateral del NOS y estimulados con suero de gonadotropinas de yegua preñada (PMSG), no se modificó la respuesta ovulatoria, resultados que llevaron a los autores a sugerir que la inervación simpática no participa de manera relevante en el proceso que culmina con la ovulación, sin embargo no descartan su participación en la esteroidogénesis (Selstam y col., 1985).

La sección unilateral del NOS realizada en la rata adulta reduce el número de ovocitos liberados por el ovario denervado (Chávez y col., 1991), esta respuesta también se presenta en la rata prepúber, donde además, el ovario inervado presenta una ovulación compensadora (Morales

en 1993). Estas evidencias permiten postular que la información que transcurre por el NOS modula de manera estimulante la ovulación (Morales y col., 1993).

- Inervación parasimpática

El nervio vago se origina de cuatro núcleos del bulbo raquídeo, 1) el núcleo del tracto solitario (NTS), 2) el núcleo dorsal del nervio vago, 3) el núcleo ambiguo y 4) el núcleo espinal del nervio trigémino (Figura 6). Es un nervio motor/sensitivo, el más largo de los doce pares craneales y presenta la distribución y la variabilidad funcional más extensa. Transmite información sensorial y distribuye fibras motoras a estructuras viscerales y somáticas. El nervio vago, en combinación con los nervios glossofaríngeo y accesorio, constituye un sistema único que tiene una función parasimpática (Upledger, 2004). A diferencia con los demás nervios craneales, no solo inerva la región cefálica sino que además se dirige hacia las cavidades torácica y abdominal (König, 2008). Las fibras vagales se distribuyen a lo largo de los ganglios prevertebrales (Berthoud y Powley 1996).

Gerendai y colaboradores (2000) postulan la existencia de una comunicación neural entre el ovario y el sistema nervioso central (SNC), que podría estar dada por el nervio vago. Esta idea surge del hecho de que al inyectar el virus de la pseudorabia posterior a realizar la vagotomía ipsilateral a la inyección desaparece la marca en el núcleo del tracto solitario, núcleo ambiguo y en el núcleo dorsal del vago.

El soma de las neuronas que inervan a los ovarios se origina del ganglio nodoso y del ganglio de la raíz dorsal, ubicados en el segmento lumbar T9 y T11. La inervación vagal transporta a los ovarios neurotransmisores como, SP, calcitonina, CGRP y principalmente acetilcolina (Ach) (Dissen y Ojeda, 1999).

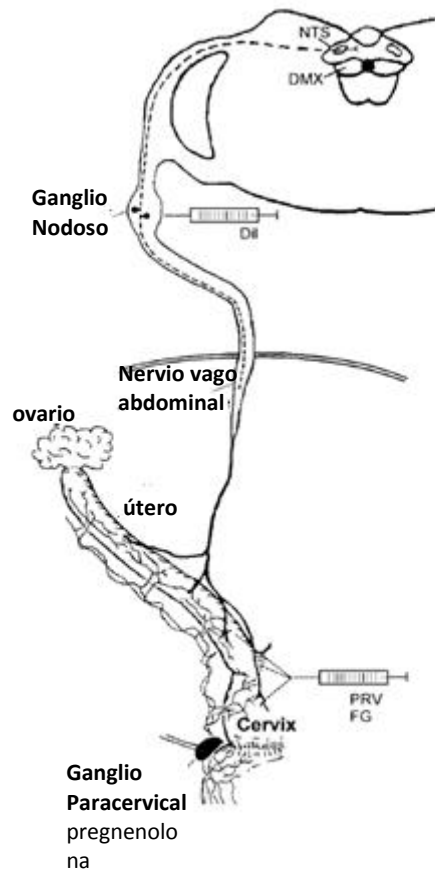


Figura 6. Fibras vagales que llegan al ovario, núcleo del tracto solitario (NTS), núcleo dorsal motor del vago (DMX) (Collins, 1999).

En la rata adulta, la sección del nervio vago izquierdo da como resultado disminución en la proporción de animales ovulantes, mientras que la sección del nervio vago derecho no la modifica. Con base en estos resultados, Cruz y colaboradores (1986), postulan que la información neural llevada por el nervio vago izquierdo está más comprometida con el proceso de ovulación que la información que transcurre por el nervio vago derecho.

Se ha sugerido que la información neural que transcurre por el nervio vago actúa de manera sinérgica con las catecolaminas. Esta idea se apoya en el hecho de que la depleción de catecolaminas por la administración de reserpina 3 horas antes de la administración de FSH, aumenta el número de ovocitos liberados. Este efecto se bloquea si se realiza la vagotomía bilateral 20 días antes de la administración de reserpina y de la FSH (Chávez y col., 1987).

En la rata adulta, la vagotomía bilateral altera el ciclo estral (Burden y Lawrence 1977; Chávez y col., 1989) aumenta el número de ovocitos liberados (Cruz y col., 1986), bloquea la inducción del pseudo- preñez (Burden y col., 1981), disminuye la concentración de LH, lo que podría explicar que en el animal preñado con vagotomía se produzca la resorción fetal (Lawrence y col., 1978).

La vagotomía bilateral en la rata prepúber, aumenta el número de ovocitos liberados (Morales y col., 2004), retrasa el inicio de la pubertad y disminuye las concentraciones de estradiol (E2) y de progesterona (P4) en respuesta a la gonadotropina coriónica humana (hCG) *in vitro* (Ojeda y Aguado 1983).

Ganglio Celiaco Mesentérico Superior

Los ganglios son cúmulos de somas neuronales ubicados fuera del SNC; las fibras nerviosas llegan a los ganglios y también salen de ellos. Los ganglios sensitivos están afuera pero cerca del SNC y contienen los somas neuronales de los nervios sensitivos que transmiten impulsos hacia ese sistema. Los ganglios autónomos son los ganglios motores periféricos del sistema nervioso autónomo (SNA) y contienen los somas neuronales de las neuronas postsinápticas (Ross, 2007). Estos ganglios también se pueden clasificar de acuerdo a su localización.

- Los ganglios paravertebrales se unen y forman las cadenas simpáticas a cada lado de la columna vertebral y se extienden por toda su longitud. El ganglio paravertebral superior (ganglio cervical superior de cada tronco simpático) se encuentra en la base del cráneo. El ganglio impar se forma más abajo, donde se unen los dos troncos, a nivel del coxis (Moore y Dalley 2008).
- Los ganglios prevertebrales están en los plexos que envuelven los orígenes de las principales ramas de la aorta abdominal (de allí su nombre) como los ganglios celiacos (Moore y Dalley 2008).

Los ganglio celiacos, tienen una forma semilunar, situados a cada lado del plano medio, entre la glándula suprarrenal y el origen del tronco celiaco, por delante de los pilares del diafragma. Por su lado externo reciben al nervio esplácnico; por el interno al vago posterior (Viso, 1998). Se han descrito dos clases distintas de neuronas en el ganglio celiaco, gránulos grandes de NA (Domínguez y col., 1989) y células SIF (Gabella 1995) que se caracterizan por ser más pequeñas

que las neuronas y por sus gránulos de NA, dopamina y serotonina (5-HT) (Matthews, 1989). Poseen una gran variedad de receptores entre ellos a catecolaminas (Klein y Burden 1988), neuropéptidos (Ecc y col., 1983), óxido nítrico (Morales y col., 1995) y acetilcolina (Eccles y col., 1961; Berthoud y Powley, 1996).

Los ganglios aórticos renales, se sitúan antero inferiormente con respecto a la arteria renal, reciben filamentos del ganglio y plexo celíaco (Viso, 1998).

El ganglio mesentérico superior, está situado en ambos lados del origen de la arteria mesentérica superior, rodea el plexo a esta arteria y la acompaña al interior del mesenterio, en donde se divide en plexos secundarios que se distribuyen por las zonas irrigadas por la arteria (Viso, 1998).

En las últimas décadas se ha vinculado a la inervación simpática con el desarrollo de patologías ováricas, tales como el síndrome de ovario poliquístico (SOPQ). Donde se ha postulado que una mayor actividad de la inervación precede a la formación de los quistes ováricos (Rosa-E-Silva y col. 2003) de manera que cuando se elimina el principal aporte de catecolaminas ováricas, por la sección bilateral del NOS, se puede restablecer la función ovulatoria (Lara y col., 1993).

Síndrome de Ovario Poliquístico

El síndrome de ovario poliquístico (SOPQ), es la patología más común que afecta al 7% de mujeres en edad adulta (Ndefo y col., 2013). El SOPQ se caracteriza por la existencia de anovulación crónica en forma de amenorrea y esterilidad, hiperandrogenismo, evidenciado por hirsutismo o acné y presencia de ovarios poliquísticos. El desarrollo de alteraciones metabólicas como la resistencia a la insulina que constituye un factor que puede agravar las manifestaciones clínicas ya mencionadas (Checa, 2007).

En el desarrollo de SOPQ también participan factores ambientales y genéticos. El síndrome se asocia a numerosos padecimientos, incluyendo complicaciones obstétricas, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares y trastornos de alimentación (Goodarzi y col., 2001).

A pesar de su impacto sobre la salud femenina su etiología de este síndrome sigue siendo poco conocida. Desde el punto de vista fisiológico se han propuesto algunas hipótesis para explicar los hallazgos clínicos del SOPQ (Matalliotakis, 2006).

- **Hipótesis de LH:** Según esta hipótesis un defecto primario en el hipotálamo lleva al aumento en la frecuencia de los pulsos de LH lo que queda como resultado un hiperandrogenismo ovárico y anovulación. Hoy en día se ha hecho evidente que en mujeres con SOPQ la LH tiende a ser elevada y la FSH baja, lo que proporciona una clara evidencia del aumento en la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Yen, 1970). El aumento de LH podría provocar un desajuste en el mecanismo de retroalimentación negativa (Matalliotakis, 2006).

El aumento de GnRH en pacientes con SOPQ se ha asociado con alteraciones en la concentración de algunos neurotransmisores implicados en la regulación de la secreción del decapeptido. Así, se reporta disminución en la concentración de 5-HT y 5-HIAA (Shi y col., 2011), de dopamina (Murdoch y col., 1984) y alteración en el metabolismo de catecolaminas (Moro y col., 2009).

- **Hipótesis de la Insulina:** Las mujeres con SOPQ desarrollan resistencia a la insulina (Matalliotakis, 2006). La hiperinsulinemia se ha asociado con el desarrollo del SOPQ, ya que se plantea que la insulina tiene un efecto similar al de la LH, estimulando en el ovario la producción de testosterona (T) y la disminución de SHBG (globulina fijadora de hormonas sexuales) y la ovulación (Panidis y col., 1999). En condiciones normales, la adición de insulina a las células de la granulosa y de la teca de mujer estimula la esteroidogénesis (Nestler y col., 2005).
- **Hipótesis del ovario:** se ha reportado en el cultivo de células de la teca la sobreexpresión de la P450c17 y la 3 β - hidroxisteroide deshidrogenasa, enzimas que participan en la esteroidogénesis ovárica. El aumento en la actividad de la enzima P450c17 ha sido implicada en la etiología del SOPQ (Bremer, 2010).
- **Hipótesis de la inervación:** Hay evidencias que una hiperactividad de las fibras simpáticas, que se traduce en altas concentraciones de noradrenalina ovárica, precede a la formación de quistes foliculares (Paredes y col., 1998; Lara y col., 2000).

La etiología y el tratamiento del síndrome son difíciles debido a su heterogeneidad (Walters, 2012). El tratamiento del SOPQ se centra en remediar los síntomas ocasionados por el hiperandrogenismo, en inducir la ovulación y en prevenir complicaciones cardiovasculares y metabólicas (Goodarzi, 2011).

Inductores del SOPQ

Debido a las limitaciones logísticas y éticas sobre la experimentación en humanos, los modelos apropiados en animales que reproducen muchos o todos los rasgos del SOPQ facilitan la investigación (Walters y col., 2012).

Modelos en roedores proporcionan una herramienta útil pues sus antecedentes genéticos son bien conocidos, tienen una corta reproducción y esperanza de vida; además de grandes similitudes en la regulación del eje hipotálamo- hipófisis- gónada, en el desarrollo folicular y en el proceso de ovulación (Walters y col., 2012).

Los modelos animales deben replicar la mayor parte de las características clínicas evaluadas en la mujer (Walters y col., 2012). Se han probado modelos con la exposición a hormonas como:

- Testosterona (Shi y Vine 2012; Walters y col., 2012).
- Propionato de testosterona (Sotomayor y col., 2011; Shi y Vine, 2012; Walters y col., 2012).
- Dihidrotestosterona (Sotomayor y col., 2011; Shi y Vine, 2012; Walters y col., 2012).
- Dehidroepiandrosterona (Shi y Vine., 2012; Walters y col., 2012).
- Letrozol (Shi y Vine, 2012; Walters y col., 2012).
- Antiprogestinas (Shi y Vine, 2012; Walters y col., 2012).
- Benzoato de estradiol (Walters y col., 2012).
- Valerato de estradiol (Sotomayor y col., 2011; Shi y Vine, 2012; Walters y col., 2012).

Los modelos con estrógenos pueden reproducir características endocrinas semejantes a las de una mujer con SOPQ (Walters y col., 2012).

La exposición a estrógenos o andrógenos interrumpe la función endocrina normal del ovario y disminuye la fertilidad en humanos y en otros animales, estos efectos pueden ser provocados

por la administración de los esteroides durante periodos sensibles a las hormonas (Sotomayor y col., 2011).

Otros de los modelos utilizados en el laboratorio para inducir el SOPQ son:

- Exposición de luz constante (Shi y Vine, 2012; Walters y col., 2012).
- Estrés por restricción de movimiento (Paredes y col., 1998).
- Estrés por frío (Paredes y col., 1998).

Todos los modelos tiene sus ventajas y desventajas por lo tanto ningún modelo ofrece una réplica completa del trastorno clínico observado en la mujer (Walters, 2012).

Valerato de Estradiol (VE)

El cerebro de los mamíferos contiene receptores a estrógenos, donde ejercen múltiples funciones. Los estrógenos pueden cruzar la barrera hemato-encefálica donde participan en la diferenciación de algunos núcleos del cerebro (Paganini, 1994).

El VE produce el aumento intra-ovárico del factor de crecimiento neural (NGF) y de su receptor de baja afinidad el p-75, el receptor internaliza al NGF en la terminal simpática del NOS y de este modo llega al ganglio celiaco mesentérico superior (GCMS), donde estimula el aumento de la enzima limitante en la síntesis de catecolaminas, tirosina hidroxilasa (TH), lo que resulta en el incremento de noradrenalina que viaja nuevamente por el NOS hacia el ovario (Lara y col., 2000). Las fibras nerviosas que transcurren por el NOS inervan las células de la teca y la glándula intersticial, estructuras productoras de andrógenos, se ha mostrado que la NA tiene un efecto mitogénico (Seya y col., 2006; Liu y col., 2007) lo que llevaría a una sobre producción de andrógenos

El VE es un fármaco de acción prolongada, una dosis de 2 mg a ratas adultas desarrolla un síndrome caracterizado por la pérdida de la ciclicidad estral con persistente cornificación vaginal, anovulación, formación de quistes, alteraciones en las concentraciones basales de LH y FSH, elevada concentración de estradiol (E2), lo que favorece a la formación de quistes foliculares. Estos síntomas son considerados similares a los presentados en las mujeres (Brawer y col., 1986; Rosa-E-silva y col., 2003; Morales y col., 2010).

Estrés

La exposición a estrés agudo o estrés crónico intermitente altera el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Este tipo de estresor resulta en el incremento de la concentración de corticosterona, el glucocorticoide primario en roedores (Dallman y col., 1987), lo que indica que se produce mayor actividad por parte de la adrenal (Otteweller y col., 1989; Pitman y col., 1988). El frío incrementa la actividad del nervio esplácnico que inerva la medula adrenal, lo que ocasiona el aumento de la liberación de catecolaminas, adrenalina y NA en plasma (Kavetnansky y col., 1992; Paredes y col., 1998). De igual manera se ha demostrado que la actividad de las enzimas que sintetizan catecolaminas, TH y feniletanolamina-N-metil transferasa (PNMT), se ve aumentada por el estrés agudo (Kavetnansky y col., 1970).

Hay evidencias de que el estrés psicológico es frecuente en pacientes con SOPQ, esto no significa que el estrés sea la única causa del síndrome, sin embargo, si podría ser un factor importante (Dorfman y col., 2003).

El efecto principal del estrés crónico por restricción al movimiento es incrementar la activación de la inervación simpática del ovario. El incremento de la actividad nerviosa se asocia con cambios en el desarrollo folicular, se observa una disminución en los folículos sanos preantrales y la aparición de quistes en el ovario (Araya, 2004).

El estrés crónico inducido por el frío más la restricción de movimiento, aumenta la actividad nerviosa simpática del ovario así como las concentraciones plasmáticas de corticosterona y el contenido de catecolaminas en la glándula adrenal (Paredes y col., 1998). El incremento de NA en el ganglio celiaco representa un efecto general del estrés en los nervios simpáticos (Nankova y col., 1996).

La exposición a estrés por frío durante 3 semanas resulta en la disminución de la concentración de NA y del número de folículos preantrales y antrales, mientras que, después de 4 semanas de frío incrementa el contenido de NA en el ovario y se observa una recuperación en la población de folículos antrales y la aparición de una nueva población de folículos que presentan una capa de células de la teca hipertrofiada, situación característica en pacientes con SOPQ (Dorfman y col., 2003).

Participación de la Inervación Extrínseca en el Desarrollo del SOPQ

A pesar de que se han realizado varios estudios encaminados a la caracterización de los diferentes componentes del síndrome, con la propuesta de algunos tratamientos que coadyuven en la respuesta ovulatoria que puedan facilitar el embarazo, poco se sabe acerca de los factores primarios que inician esta disfunción.

Se ha postulado que la inervación simpática del ovario está implicada en el desarrollo y mantenimiento del SOPQ. Esto en función de que en ratas con SOPQ inducido con VE, incrementa el contenido de NA en el ovario en respuesta a la alteración de los nervios simpáticos que ingresan a la gónada, provocando la formación de quistes foliculares y el bloqueo de la ovulación. De manera que si se corta el NOS en ambos ovarios, se restaura la respuesta esteroidogénica, la ciclicidad estral y la ovulación (Barria y col., 1993; Rosa-E- Silva y col., 2003).

Nuestro grupo de trabajo mostró que el desarrollo del SOPQ no sólo depende de una mayor actividad de las fibras simpáticas, con base en el hecho de que la sección unilateral del NOS en ratas con SOPQ restablece la ovulación por parte del ovario inervado, el cual mantiene altas concentraciones de NA. Estos resultados permitieron sugerir que existe otro tipo de inervación que regula el desarrollo del SOPQ (Morales y col., 2010).

Es posible que otras vías neurales estén implicadas en el SOPQ, tal es el caso del nervio vago. Linares y colaboradores (2013), mostraron que la sección unilateral del nervio vago es capaz de inducir la ovulación.

Planteamiento del Problema

El ovario tiene como funciones la secreción de hormonas (esteroides y proteicas) y la ovulación, funciones que son reguladas por una vía endocrina y otra nerviosa. La alteración de alguna de estas vías produce el desarrollo de patologías como el SOPQ, cuyas características de diagnóstico son: hiperandrogenismo, acompañado de anovulación o quistes foliculares.

Experimentalmente se han replicado las características que definen al síndrome en la mujer. Dos de los modelos más utilizados son la administración de VE o la exposición a estrés por frío.

En la rata sometida a estrés por frío incrementa la concentración de 5-HT en el GCMS, sin que se observen cambios en la respuesta ovulatoria, mientras que el tratamiento con VE incrementa la concentración de NA ovárica, proveniente del GCMS. Y dado que se plantea que en el ganglio existe una comunicación entre fibras simpáticas, que transcurren por el NOS, y parasimpáticas que transcurren por el nervio vago, es posible que el síndrome sea el resultado de la mayor estimulación de las fibras parasimpáticas sobre las fibras simpáticas.

Con base en lo anterior, el presente estudio tiene como finalidad analizar los efectos de la sección bilateral del nervio vago en ratas tratadas con VE o expuestas a estrés por frío, sobre el ciclo estral, la ovulación, la concentración sérica de hormonas esteroides y la concentración de catecolaminas y serotonina en GCMS y en ovario.

Hipótesis

En la rata la etiología del síndrome se ha asociado a una mayor concentración de NA proveniente del GCMS. Si el nervio vago es una vía de comunicación entre los ovarios a nivel del GCMS, entonces al seccionar ambos nervios vagos, la concentración de NA disminuirá y los animales restablecerán la función ovulatoria.

Objetivo general

Analizar en ratas tratadas con valerato de estradiol o sometidas al estrés por frío, la respuesta ovulatoria y esteroidogénica del ovario ante la vagotomía bilateral.

Objetivos particulares

Analizar el efecto de la sección bilateral del nervio vago en ratas tratadas con VE o exposición a estrés por frío sobre:

- el ciclo estral.
- la ovulación.
- la concentración sérica de progesterona, testosterona y estradiol.
- la concentración de NA, DA, 5-HT y sus metabolitos en el GCMS y en ovario.
- La tasa de recambio de NA, DA y 5-HT en GCMS.

Materiales y Métodos

Se utilizaron ratas hembras de 10 ó 24 días de edad de la cepa CII-ZV, en fotoperiodo controlado de 14 hrs de luz y 10 hrs de oscuridad (luces encendidas de 5:00 a 19:00 horas) y temperatura de 22 ± 2 °C.

Las crías fueron separadas al nacimiento en camadas de 5 hembras y un macho. Los animales se destetaron a los 24 días de edad y a partir de este momento tuvieron libre acceso al agua y al alimento, hasta el día de la autopsia. Durante el desarrollo de los experimentos se siguieron las normas establecidas por la Ley Mexicana de Protección Animal para el Uso de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y uso de los Animales de Laboratorio).

Los animales fueron divididos en los siguientes grupos experimentales.

Modelos de inducción del SOPQ.

- Animales inyectados con VE: Ratas hembras de 10 días de edad fueron inyectadas intraperitonealmente con 2.0 mg de VE, disueltos en 0.1 ml de aceite de maíz (Morales y col., 2010), que fungió como el vehículo (VH).
- Animales sometidos a estrés por frío: Se utilizaron animales de 24 días de edad que fueron colocados en un cuarto frío a una temperatura de 4 °C por 3 hrs diarias, de lunes a viernes, en un horario de 8:00 a 11:00 hrs durante 8 semanas.

Grupos de animales testigos

- Se utilizaron animales inyectados a los 10 días de edad con 0.1 ml de aceite de maíz (VH).
- Se utilizaron animales intactos que fueron sacrificados alrededor de los 80 días de edad, al presentar un estro vaginal precedido de un proestro.

Cirugías.

Al cumplir los 24 días de edad los animales con VE o sometidos al estrés por frío fueron anestesiados con éter entre las 8:00 y 12:00 hrs y se procedió a realizar alguna de las siguientes cirugías.

- **Operación simulada (OSV):** Se realizó una incisión ventral de la piel y del músculo de aproximadamente 2 cm, a lo largo de la línea media del cuerpo y sin tocar ningún órgano se suturó la herida.
- **Sección bilateral del nervio vago (SBNV):** A estos animales se les realizó la incisión de piel y músculo del mismo modo que en el caso anterior, se exteriorizó el estómago, se desplazó el hígado y se expuso el esófago. A nivel subdiafragmático se localizaron los troncos vagales y se procedió a seccionar con pinzas de micro disección el nervio vago izquierdo y el derecho y posteriormente se saturó la herida.

Todos los animales se revisaron diariamente hasta que presentaron la canalización de la vagina, momento en el que se inició la toma de frotis vaginal por un lapso de 2 semanas, el cual se reanudó 2 semanas antes de que las ratas fueran sacrificadas, con el fin de contar con un registro del patrón del ciclo estral de los animales.

Procedimiento de Autopsia

Cuando los animales cumplieron 80 días de edad y presentaron un estro vaginal se registró el peso corporal y fueron sacrificados por decapitación. Se colectó la sangre del tronco y se dejó coagular a temperatura ambiente, se centrifugó a 3500 r.p.m. y el suero se dividió en alícuotas, las que inmediatamente se congelaron a -20 °C hasta el momento de su determinación. En el momento de la autopsia, se disecaron y pesaron las adrenales, GCMS y ovarios. Se disecaron los oviductos y en ellos se contaron los ovocitos con la ayuda de un microscopio estereoscópico, siguiendo la metodología habitual del laboratorio (Morales y col., 1998).

De cada grupo experimental los GCMS y los ovarios de cinco animales por grupo fueron congelados a -70° C para la cuantificación de la concentración de NA, DA, 5-HT y sus metabolitos la cual fue determinada por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC).

Cuantificación de hormonas esteroideas

Las concentraciones séricas de progesterona, testosterona y estradiol fueron cuantificadas por RIA de fase sólida, mediante estuches comerciales de Coat-A-Count (Diagnostic Products, Los Ángeles, CA, USA). En tubos de polipropileno que ya contienen el anticuerpo específico: anti-progesterona, o anti- estradiol se adicionaron 100 µl de la muestra problema, en el caso de los tubos que contenían anti- testosterona se adicionaron 50 µl de muestra. En todos los casos, se adicionó 1 ml de la hormona marcada con I ¹²⁵. Para facilitar la reacción, la mezcla se agitó en un vortex durante un minuto y se incubó durante 3 hrs a temperatura ambiente. Luego se decantó el sobrenadante y se determinó la cantidad de radiactividad con la ayuda de un contador de rayos gamma modelo Cobra 5005. Mediante una curva estándar se calculó la concentración de hormona en la muestra problema. 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.

Cuantificación de catecolaminas y serotonina en GCMS y Ovarios.

La determinación de NA, DA, 5-HT y sus metabolitos 4-hidroxi-3-metoxifenil glicol (MHPG), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el GCMS y los ovarios de los diferentes grupos experimentales, fue realizada por el sistema de HPLC. Los tejidos fueron pesados y homogenizados en 300 µl y 500 µl de ácido perclórico 0.1 M y subsecuentemente centrifugados a 12,500 rpm por 30 minutos a - 4 °C. El sobrenadante fue filtrado usando filtros de celulosa regenerada. Posteriormente 20 µl de este extracto fue inyectado en el sistema de HPLC para su análisis. 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 µl), una precolumna de sílica (3.5cm x 4.6mm) y una columna C18 de fase reversa (25cm x 4.6 mm) conectado a un detector electroquímico amperométrico LC-4C (Bionaltical System Inc. USA) acoplado a un inyector Nelson 1020 (Perkin Elmer). La fase móvil consistió en un buffer de citrato al 0.1M (pH 3.0). El sistema fue calibrado con una curva estándar obtenida por la inyección de una solución stock en concentraciones desde 0.1 hasta 1 ng/µl.

La concentración de NA, DA, 5-HT y sus metabolitos fue determinada por la comparación de picos de muestras desconocidas con sus respectivos estándares. La sensibilidad de todos los neurotransmisores fue de 0.01 ng. Los resultados fueron obtenidos como nanogramos de neurotransmisor por miligramo de tejido (ng/mg). Los valores son expresados como picogramos de neurotransmisor por miligramo de tejido (pg/mg). La actividad neural fue estimada como sigue $\text{Actividad Neural} = \text{concentración del metabolito del neurotransmisor} / \text{concentración del neurotransmisor}$.

Análisis estadístico

Los resultados de peso corporal y peso relativo de los órganos (ovarios y adrenales), contenido de NA, DA, 5-HT y sus metabolitos en el ganglio y ovarios y la concentración sérica de hormonas esteroides se analizaron por la prueba de Análisis de Varianza Multifactorial (ANDEVA) seguida de la prueba de Tukey. Cuando se realizó la comparación entre dos grupos se utilizó la prueba de “t” de Student.

El número de ovocitos liberados se analizó por la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn. Cuando se realizó la comparación entre dos grupos se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney. La tasa de animales ovulantes (número de animales que ovulan/ número total de animales) se analizó por la prueba exacta de Fisher para proporciones.

Se consideraron como estadísticamente significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor a 0.05.

Experimento 1

Efecto de la sección bilateral del nervio vago en animal expuesto a estrés por frío, sobre el ciclo estral, la respuesta ovulatoria, concentración de hormonas esteroides y monoaminas en el GCMS y ovarios.

Ciclo estral

En animales sometidos a estrés por frío no se modificó de manera significativa la duración de las diferentes etapas del ciclo estral (figura 7).

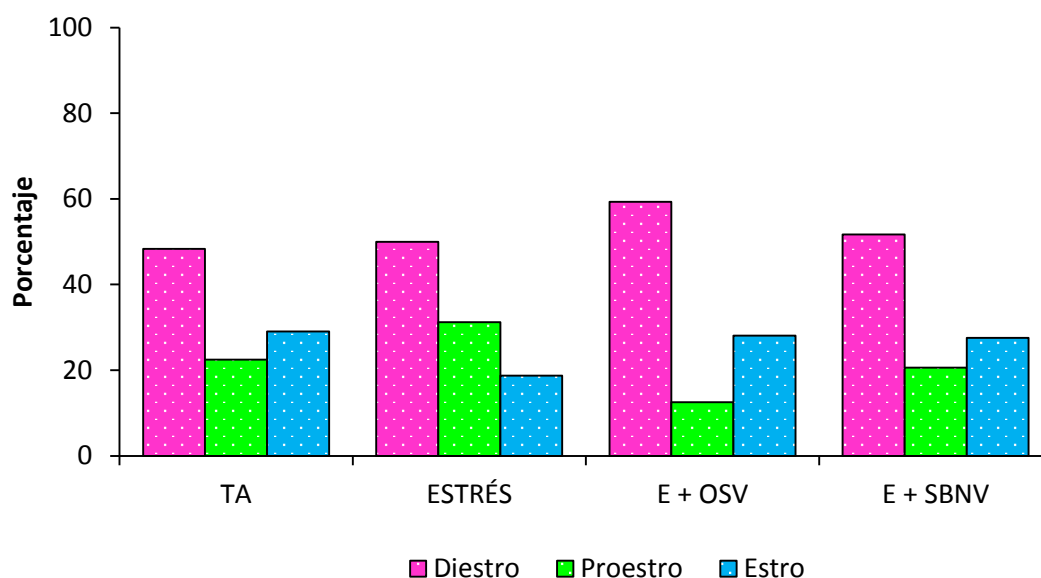


Figura 7. Porcentaje de días en diestro, proestro y estro de ratas hembras sin tratamiento (TA) o expuestas a los 24 días de edad a estrés por frío (E) y sometidas a la operación simulada ventral (E+OSV) o a la sección bilateral del nervio vago (E+SBNV), autopsiadas a los 80 días de edad.

Ovulación

Tasa de animales ovulantes y Número de ovocitos liberados.

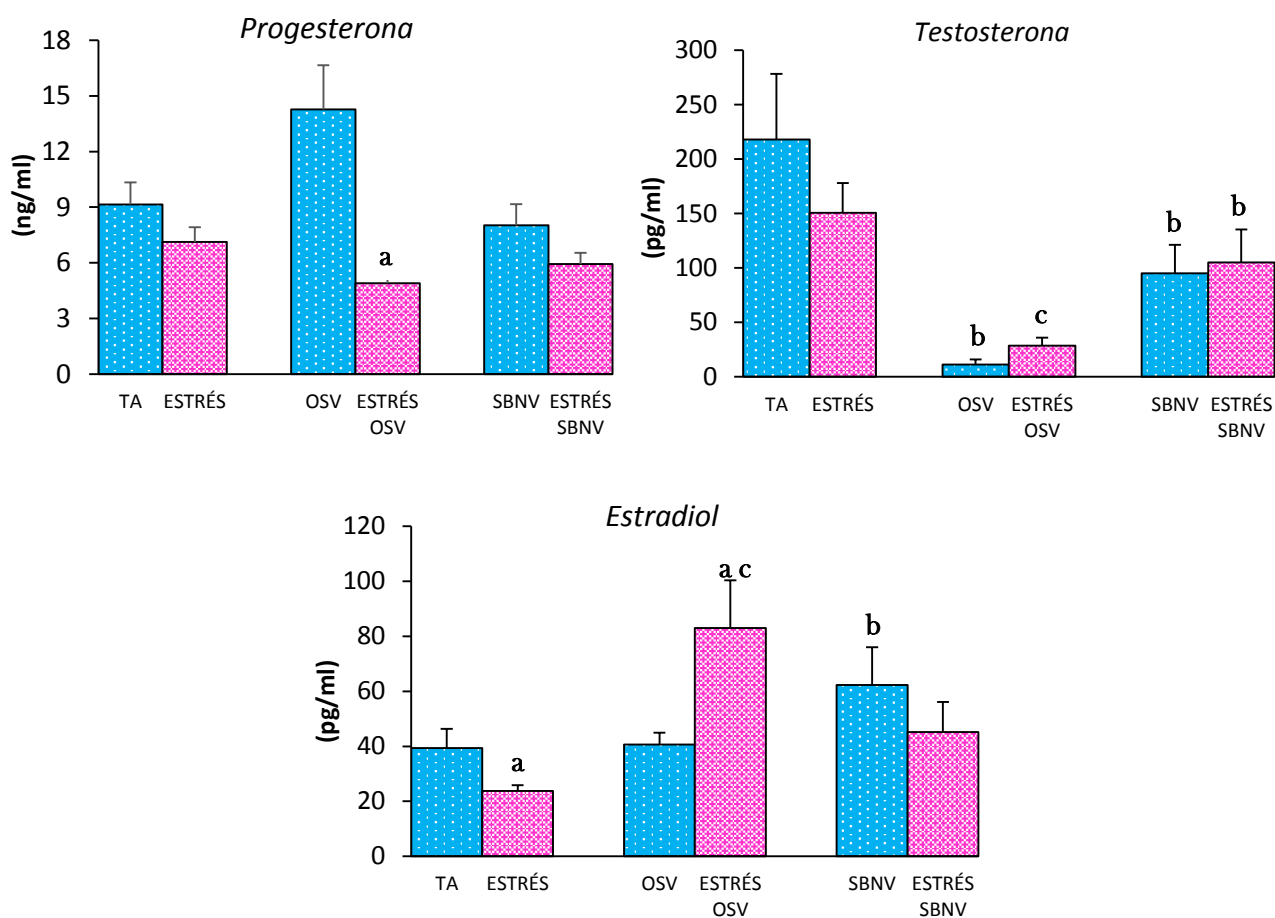
En animales sometidos a estrés por frío la operación simulada o la vagotomía bilateral no modificó el porcentaje de animales ovulantes. Sólo con la operación simulada ventral disminuyó el número de ovocitos liberados (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tasa de animales ovulantes y número de ovocitos liberados de ratas hembras sin tratamiento (TA) o expuestas a los 24 días de edad a estrés por frío y sometidas a la operación simulada ventral (E+OSV) o a la sección bilateral del nervio vago (E+SBNV), autopsiadas a los 80 días de edad.

| Grupos | Tasa de Animales Ovulantes Total (%) | Número de Ovocitos Liberados Total |
|---------------|---|---|
| TA | 100 | 10.5 ± 1.5 |
| Estrés | 90 | 7.9 ± 1.0 |
| OSV | 91 | 10.0 ± 1.3 |
| E + OSV | 60 | 6.7 ± 0.4 |
| SBNV | 90 | 9.2 ± 0.9 |
| E + SBNV | 88 | 8.4 ± 2.08 |

Concentración de Hormonas Esteroides

Respecto a los animales TA el estrés disminuyó estradiol, sin cambios en progesterona y testosterona. En animales estresados la OSV disminuyó la concentración de progesterona e incrementó la de estradiol, respecto a su grupo de comparación. La OSV en hembras no estresadas o estresadas, disminuyó la concentración de testosterona, respecto a sus grupos control. La SBNV incrementó la concentración de testosterona y estradiol, respecto al grupo con OSV. El efecto de la vagotomía no se modificó por el estrés (figura 8).



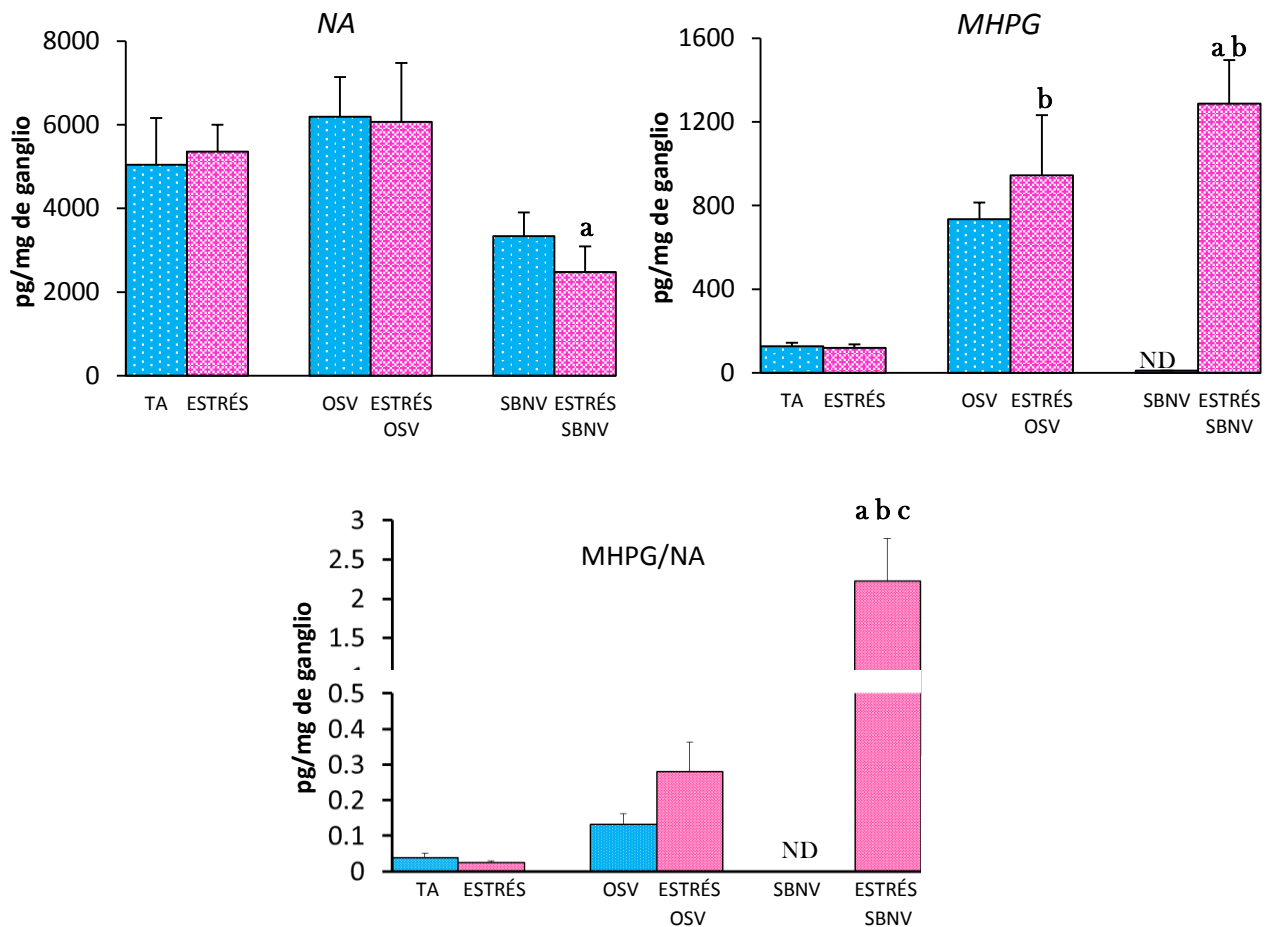
a p<0.05 vs. su grupo inmediato; b p< 0.05 vs. su grupo control; c p<0.05 vs. su respectivo grupo con OSV (prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey o prueba “t” de Student).

Figura 8. Media ± e.e.m de la **concentración de progesterona, testosterona y estradiol** de hembras sin tratamiento (TA) o expuestas a los 24 días de edad a estrés por frío y sometidas a la operación simulada ventral (E+OSV) o a la sección bilateral del nervio vago (E+SBNV), autopsiadas a los 80 días de edad.

Concentración de monoaminas en el ganglio celiaco mesentérico superior

Noradrenalina, 3-Methoxy-4-hidroxifenylglicol (MHPG) y Tasa de recambio MHPG/NA

En comparación con animales testigo absoluto, el estrés por frío no modificó la concentración de NA, MHPG ni la tasa de recambio. La vagotomía realizada en animales expuestos al estrés disminuyó la concentración de NA, e incrementó la de MHPG y la tasa de recambio (figura 9).



a $p < 0.05$ vs. su grupo de comparación; b $p < 0.05$ vs. su grupo control; c $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo con OSV (prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey o prueba “t” de student)

Figura 9. Media \pm e.e.m de la **concentración de noradrenalina (NA), 3-Metoxi-4-hidroxyfenylglicol (MHPG) y la tasa de recambio NA/MHPG** de hembras sin tratamiento (TA) o expuestas a los 24 días de edad a estrés por frío y sometidas a la operación simulada ventral (OSV) o a la sección bilateral del nervio vago (SBNV), autopsiadas a los 80 días de edad.

Dopamina, DOPAC y Tasa de recambio DOPAC/DA

Respecto al grupo de animales intactos, el estrés por frío no modificó la concentración de dopamina, de su metabolito ni la tasa de recambio. En animales estresados la OSV o la SBNV no modificó la concentración del neurotransmisor ni de su metabolito, mientras que la tasa de recambio disminuyó tanto con OSV como con la SBNV (cuadro 2).

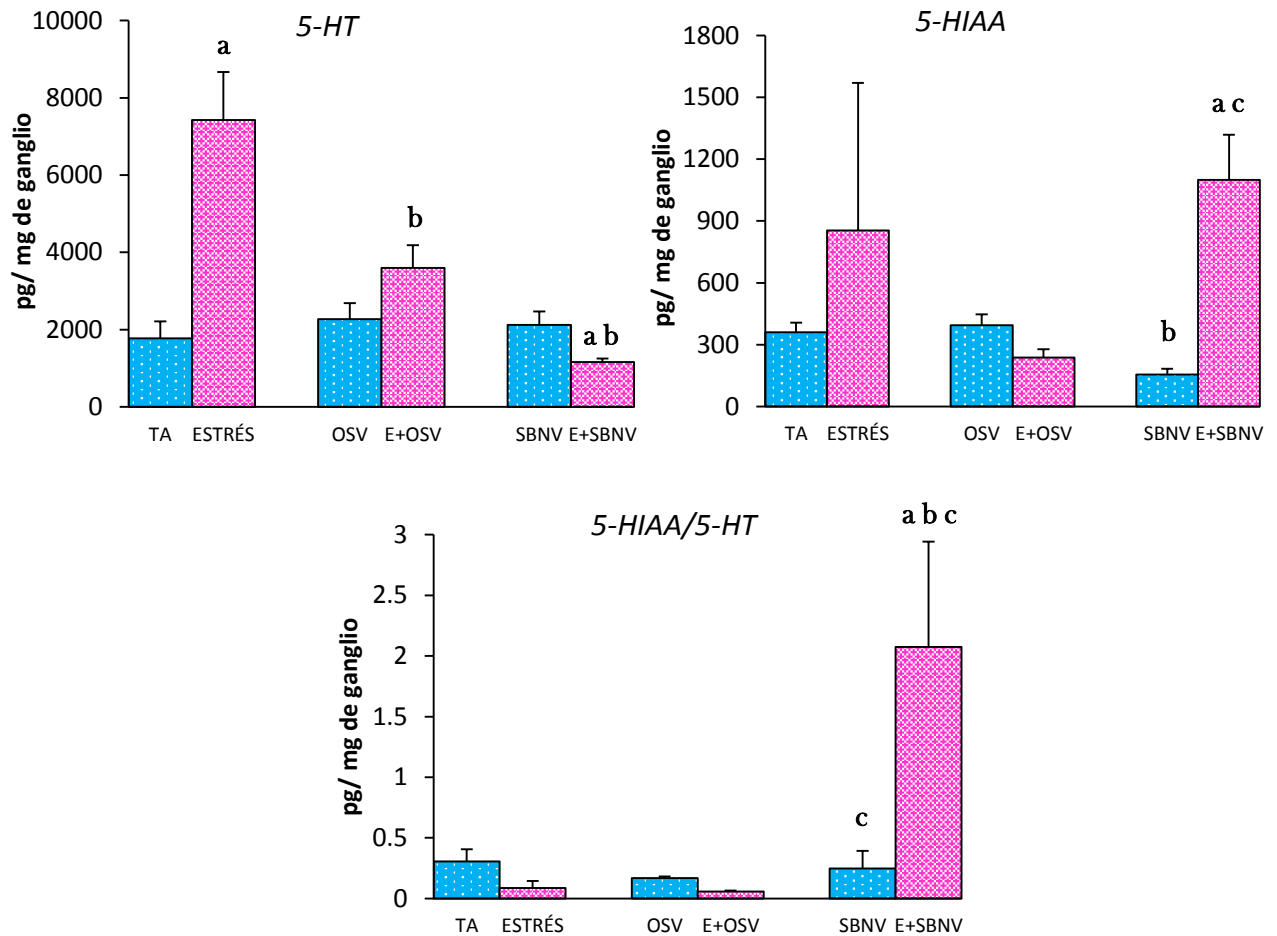
Cuadro 2. Media \pm e.e.m de la **concentración de dopamina, DOPAC y la tasa de recambio (DOPAC/DA)** de hembras sin tratamiento (TA) o expuestas a los 24 días de edad a estrés por frío y sometidas a la operación simulada ventral (OSV) o a la sección bilateral del nervio vago (SBNV), autopsiadas a los 80 días de edad

| Grupos | Dopamina (pg/mg de ganglio) | DOPAC (pg/mg de ganglio) | DOPAC/Dopamina (pg/mg de ganglio) |
|---------------|--|-------------------------------------|--|
| TA | 382 \pm 111 | 697 \pm 237 | 1.6 \pm 0.4 |
| ESTRÉS | 453.5 \pm 154.7 | 360.7 \pm 56.9 | 1.9 \pm 1.1 |
| OSV | 384.1 \pm 80.7 | 378.1 \pm 56.4 | 1.4 \pm 0.2 |
| E + OSV | 410.2 \pm 78.1 | 273.3 \pm 14.9 | 0.8 \pm 0.03 a |
| SBNV | 341.9 \pm 68.6 | 193.6 \pm 24.5 | 0.99 \pm 0.07 |
| E + SBNV | 387.5 \pm 92.9 | 212.7 \pm 83.8 | 0.4 \pm 0.04 a |

a $p < 0.05$ vs. su grupo de comparación (prueba de "t" de Student)

Serotonina, Ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y Tasa de recambio 5-HIAA /5-HT

Respecto al grupo testigo absoluto, el estrés por frío aumentó la concentración de serotonina. En el grupo estresado y sometido a la OSV incrementó la concentración de 5-HT y disminuyó la tasa de recambio. La vagotomía practicada en animales estresados disminuyó la concentración de 5-HT respecto a un animal estresado, mientras que la concentración del metabolito aumentó respecto al grupo con OSV (figura 10).



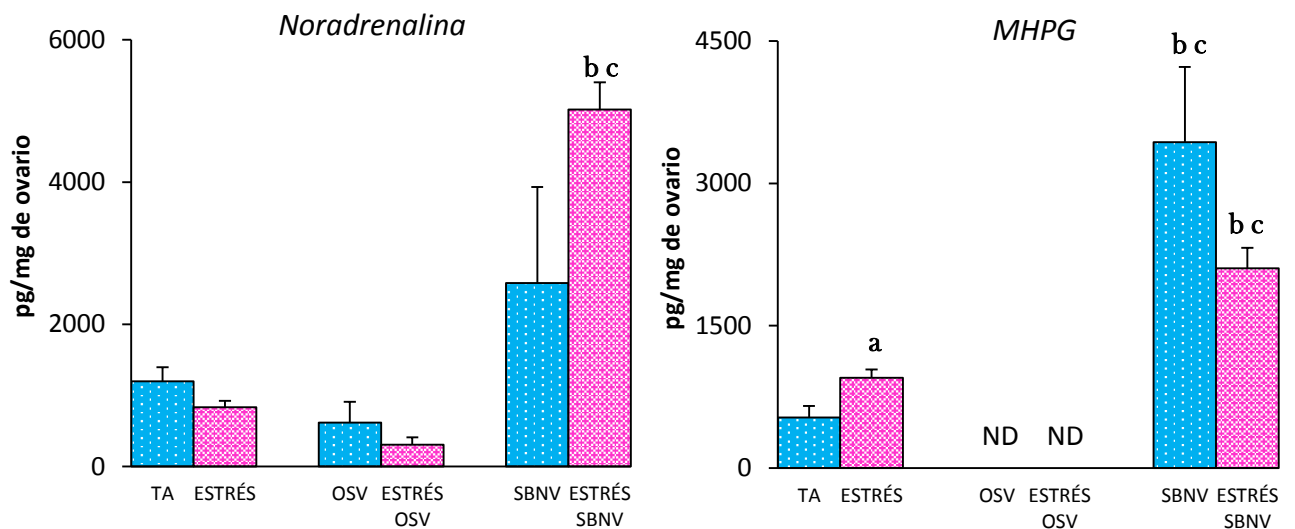
a $p < 0.05$ vs. su grupo de comparación; **b** $p < 0.05$ vs. su grupo control; **c** $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo con OSV (prueba de "t" de Student)

Figura 10. Media \pm e.e.m de la **concentración de serotonina (5-HT), Ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y la tasa de recambio 5-HT/5-HIAA** de hembras sin tratamiento (TA) o expuestas a los 24 días de edad a estrés por frío y sometidas a la operación simulada ventral (OSV) o a la sección bilateral del nervio vago (SBNV), autopsiadas a los 80 días de edad.

Concentración de monoaminas en el ovario.

Noradrenalina y 3-Metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG)

Respecto al grupo testigo absoluto, el estrés por frío no modificó la concentración de NA pero incrementó la del metabolito. En animales estresados no se modificó la concentración del neurotransmisor. La vagotomía incrementó de manera no significativa la NA ovárica, y se hace significativa en la concentración del metabolito. La vagotomía bilateral en animales expuestos al frío incrementó tanto la NA como su metabolito (figura 11).



a p < 0.05 vs. su grupo de comparación; b p < 0.05 vs su respectivo grupo con OSV; c p < 0.05 vs. su grupo control (prueba de ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

Figura 11. Media ± e.e.m de la **concentración de noradrenalina (NA) y 3-Metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) en ovario** de hembras sin tratamiento (TA) o expuestas a los 24 días de edad a estrés por frío y sometidas a la operación simulada ventral (OSV) o a la sección bilateral del nervio vago (SBNV), autopsiadas a los 80 días de edad.

Dopamina y DOPAC

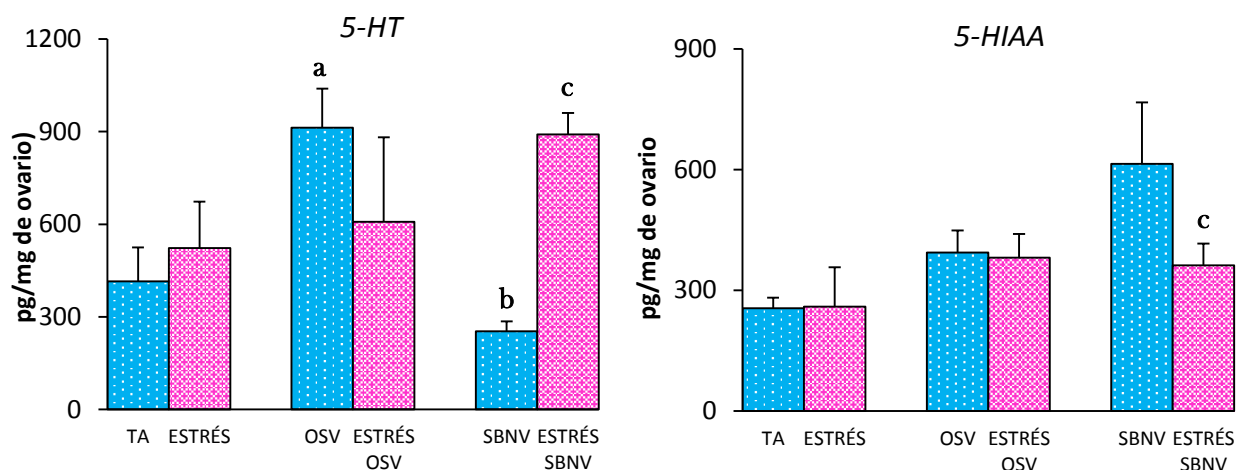
El estrés por frío no modificó la concentración de dopamina ovárica ni de su metabolito. Esta misma respuesta se observó cuando se realizó la OSV en animales estresados. En el grupo con vagotomía en animales expuestos al estrés por frío no fue posible determinar la concentración del neurotransmisor ni de su metabolito (cuadro 3).

Cuadro 3. Media \pm e.e.m de la **concentración de dopamina y DOPAC en ovario** de hembras sin tratamiento (TA) o expuestas a los 24 días de edad a estrés por frío y sometidas a la operación simulada ventral (OSV) o a la sección bilateral del nervio vago (SBNV), autopsiadas a los 80 días de edad.

| Grupos | Dopamina | DOPAC |
|----------|------------------|-------------------|
| TA | 50.8 \pm 14.9 | 72.1 \pm 5.4 |
| ESTRÉS | 70.4 \pm 13.2 | 203.2 \pm 97.3 |
| OSV | 78.4 \pm 13.4 | 631.0 \pm 404.2 |
| E + OSV | 109.5 \pm 22.6 | 183.9 \pm 45.2 |
| SBNV | ND | ND |
| E + SBNV | ND | ND |

Serotonina y Ácido 5-hidroxindolacético (5-HIAA)

El estrés por frío no modifica las concentraciones de serotonina ovárica. La operación simulada aumenta la concentración de serotonina, mientras que la vagotomía restablece la concentración del neurotransmisor, sin embargo la vagotomía en animales estresados aumenta serotonina (figura 12).



a $p < 0.05$ vs. su grupo de comparación; **b** $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo con OSV; **c** $p < 0.05$ vs. su grupo de comparación (prueba de ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

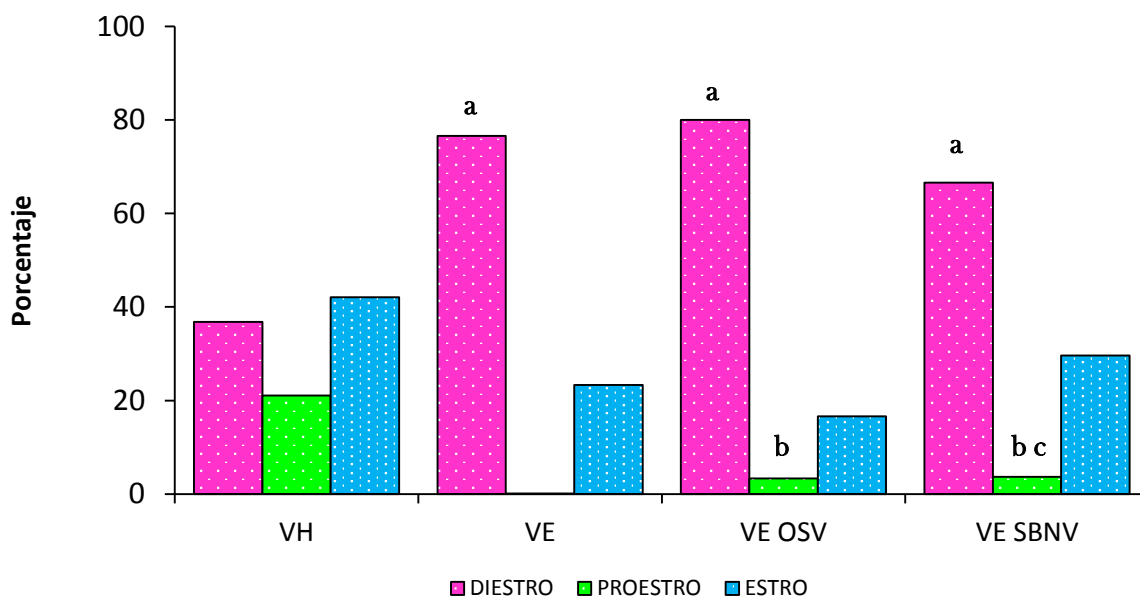
Figura 12. Media \pm e.e.m de la **concentración de serotonina (5-HT) y Ácido 5-hidroxindolacético (5-HIAA) en ovario** de hembras sin tratamiento (TA) o expuestas a los 24 días de edad a estrés por frío y sometidas a la operación simulada ventral (OSV) o a la sección bilateral del nervio vago (SBNV), autopsiadas a los 80 días de edad.

Experimento 2

Efecto de la sección bilateral del nervio vago en el modelo del animal con SOPQ inducido con VE, sobre el ciclo estral, la respuesta ovulatoria, la concentración sérica de hormonas esteroides y de monoaminas en el GCMS y ovarios

Ciclo estral

En las hembras inyectadas con VE se observó una persistencia en la etapa de diestro y una ausencia de proestro. Este patrón de ciclicidad no se modificó en respuesta a la vagotomía bilateral, sólo que ya presentan en algún momento células típicas del proestro (figura 13).

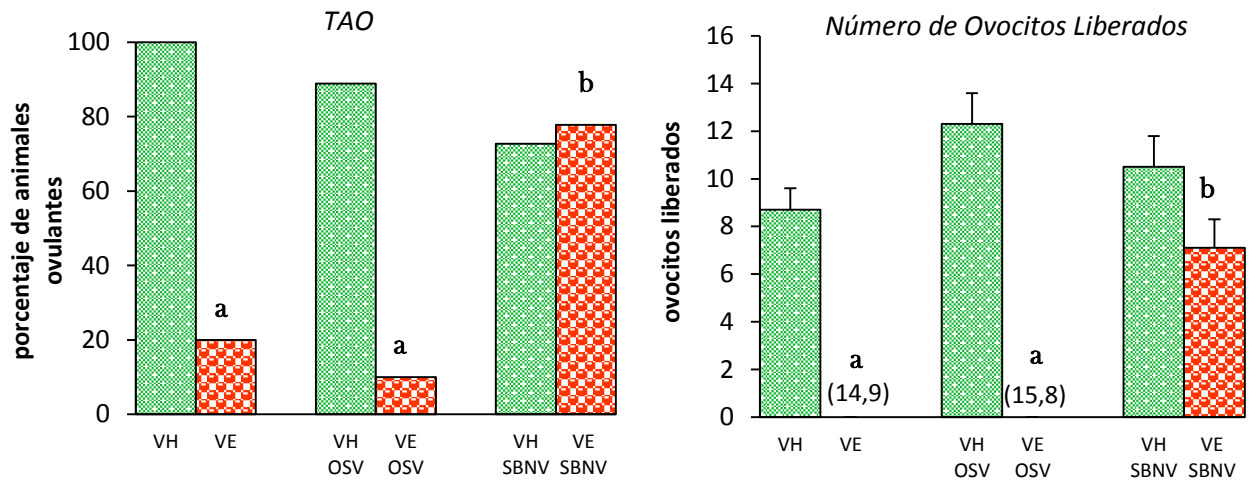


a $P < 0.05$ vs diestro VH; **b** $P < 0.05$ vs proestro VH; **c** $P < 0.05$ vs proestro VE (prueba de X^2).

Figura 13. Porcentaje de días en diestro, proestro o estro de animales inyectados con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) y sometidos a los 24 días de edad a la operación simulada ventral (OSV) o a la sección bilateral del nervio vago (SBNV), autopsiados a los 80 días de edad.

Ovulación

La inyección de VE produjo un bloqueo de la ovulación, ya que sólo ovularon dos animales con una cuota ovulatoria promedio de 12 ovocitos. Esta respuesta no se modificó por la OSV. En las hembras con VE la vagotomía restableció la respuesta ovulatoria similar a lo que ocurrió en el animal con VH y vagotomizado (figura 14).

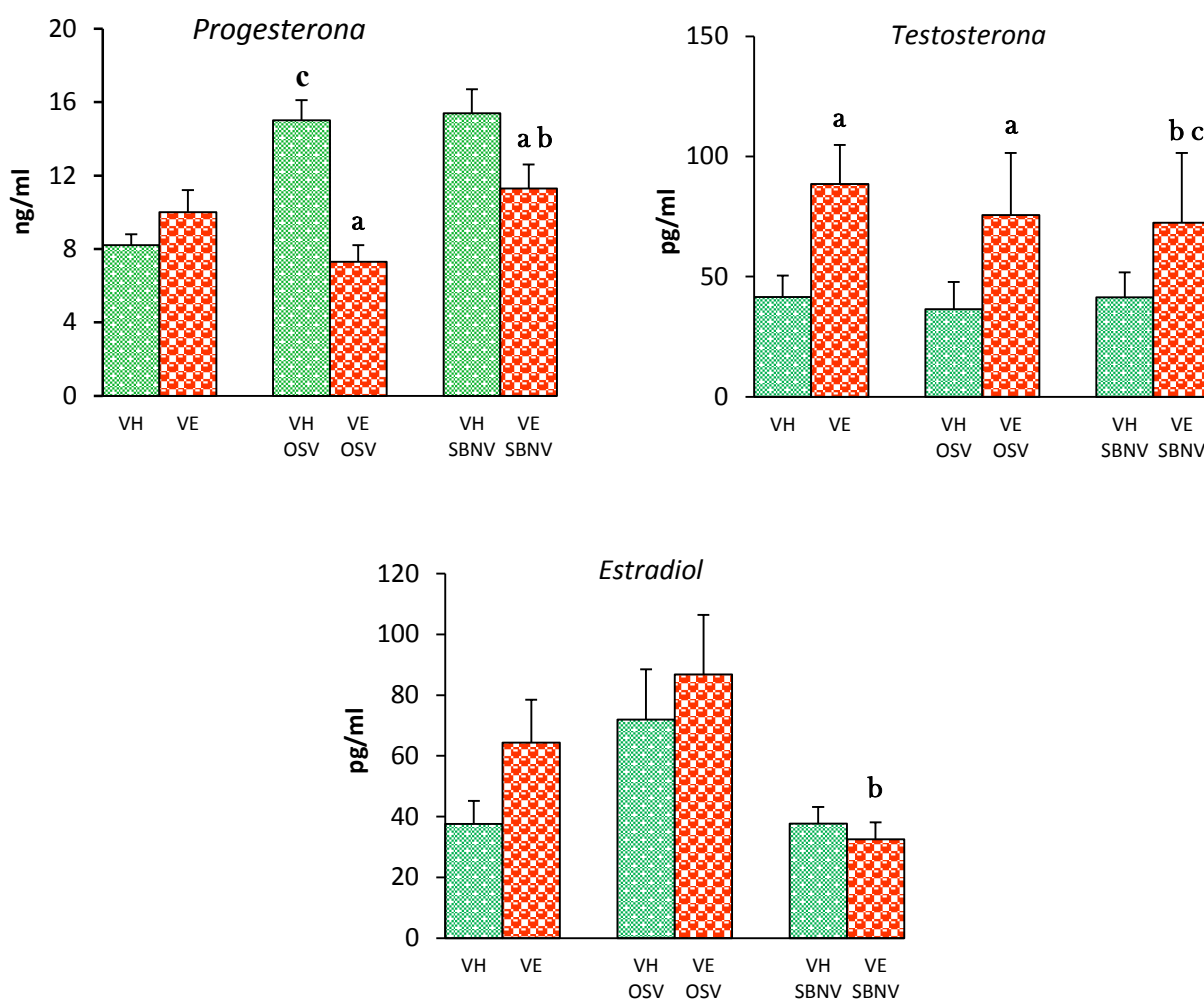


a $p < 0.05$ vs su grupo de comparación; **b** $p < 0.05$ vs su respectivo grupo con OSV (prueba de Fisher en TAO; prueba de Kruskal-Wallis en ovocitos). El número entre paréntesis indica el número de ovocitos liberados por dos animales.

Figura 14. Porcentaje de animales ovulantes (TAO) y media \pm e.e.m del **número de ovocitos liberados** por ambos ovarios de animales inyectados con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) y sometidos a los 24 días de edad a la operación simulada ventral (OSV) o a la sección bilateral del nervio vago (SBNV), autopsiados a los 80 días de edad.

Concentración de Hormonas Esteroides

La administración de VE aumentó sólo la concentración de testosterona. En el grupo con VE la OSV disminuyó la concentración de progesterona e incrementó testosterona, respecto al grupo con VH. La vagotomía en el animal con VE resultó en la disminución de progesterona e incremento de testosterona, mientras que la de estradiol no se modificó, en comparación con el grupo con VH (Figura 15).



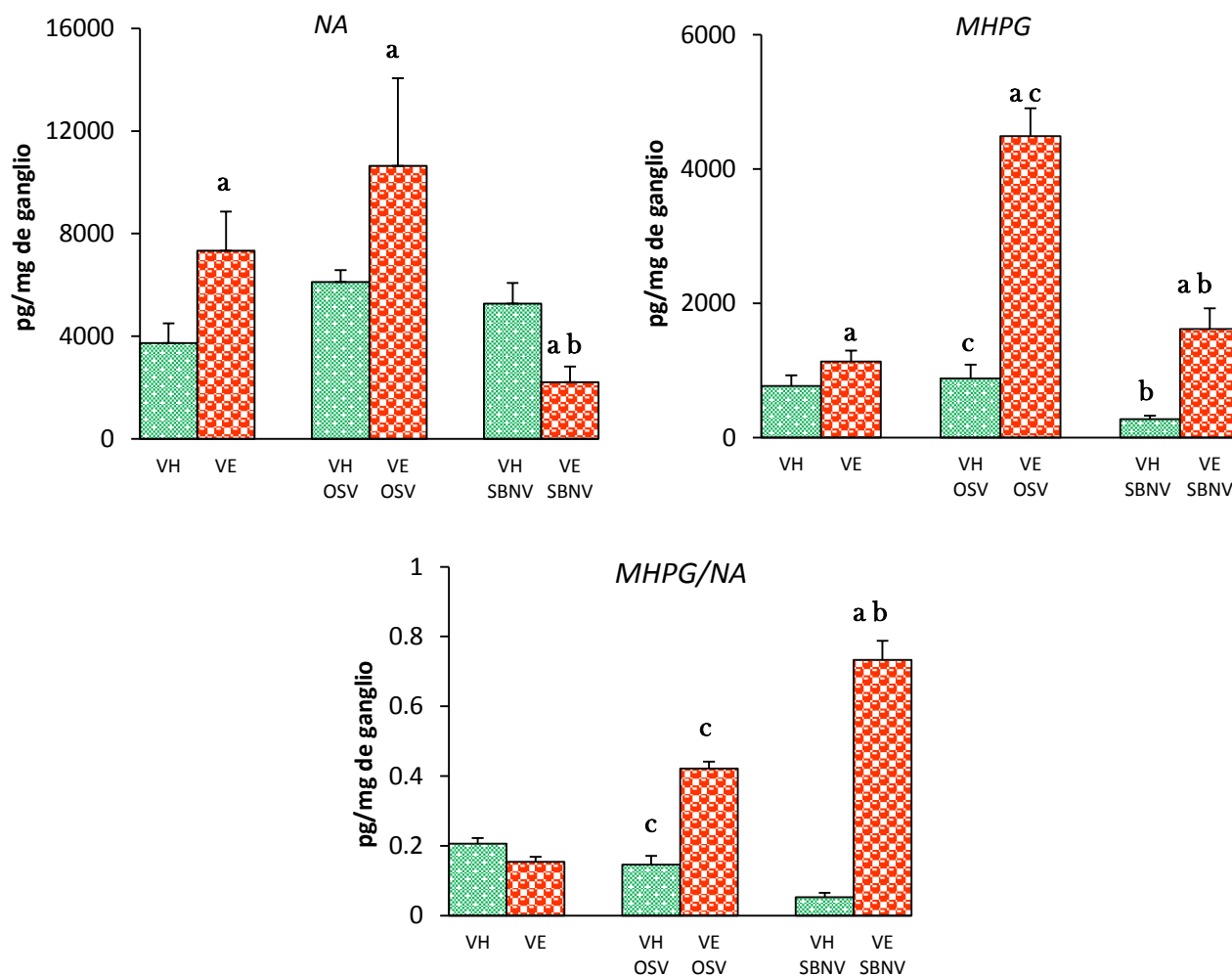
a $p < 0.05$ vs su grupo de comparación; **b** $p < 0.05$ vs su respectivo grupo con OSV; **c** $p < 0.05$ vs grupo con VH (prueba de ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

Figura 15. Media \pm e.e.m de la **concentración de progesterona, testosterona y estradiol** de animales inyectados con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) y sometidos a los 24 días de edad a la operación simulada ventral (OSV) o a la sección bilateral del nervio vago (SBNV), autopsiados a los 80 días de edad.

Concentración de monoaminas en el ganglio celiaco mesentérico superior

Noradrenalina (NA), 3-Metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) y MHPG/NA

La administración de VE resultó en el aumento de la concentración de NA y su metabolito. En animales con VE la operación simulada aumentó MHPG y la tasa de recambio. La sección bilateral del nervio vago disminuyó la concentración de noradrenalina, pero aumentó MHPG y la tasa de recambio, respecto a su grupo con VH (figura 16).



a $p < 0.05$ vs Su grupo par; **b** $p < 0.05$ vs su respectivo grupo con OSV; **c** $p < 0.05$ vs su grupo control (prueba de ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

Figura 16. Media \pm e.e.m de la **concentración de noradrenalina (NA)** y **3-Metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG)** y la **tasa de recambio (MHPG/NA)** de animales inyectados con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) y sometidos a los 24 días de edad a la operación simulada ventral (OSV) o a la sección bilateral del nervio vago (SBNV), autopsiados a los 80 días de edad.

Dopamina, DOPAC y DOPAC/DA

La concentración de dopamina no se modificó bajo ningún tratamiento ni cirugía. En animales con VE aumentó la concentración de DOPAC, lo que se reflejó en el aumento de la tasa de recambio. En las hembras con VE y OSV hubo una tendencia a disminuir la concentración de DOPAC lo que hizo que disminuyera la tasa de recambio. La vagotomía en animales con VE no modificó la concentración de los metabolitos (cuadro 4).

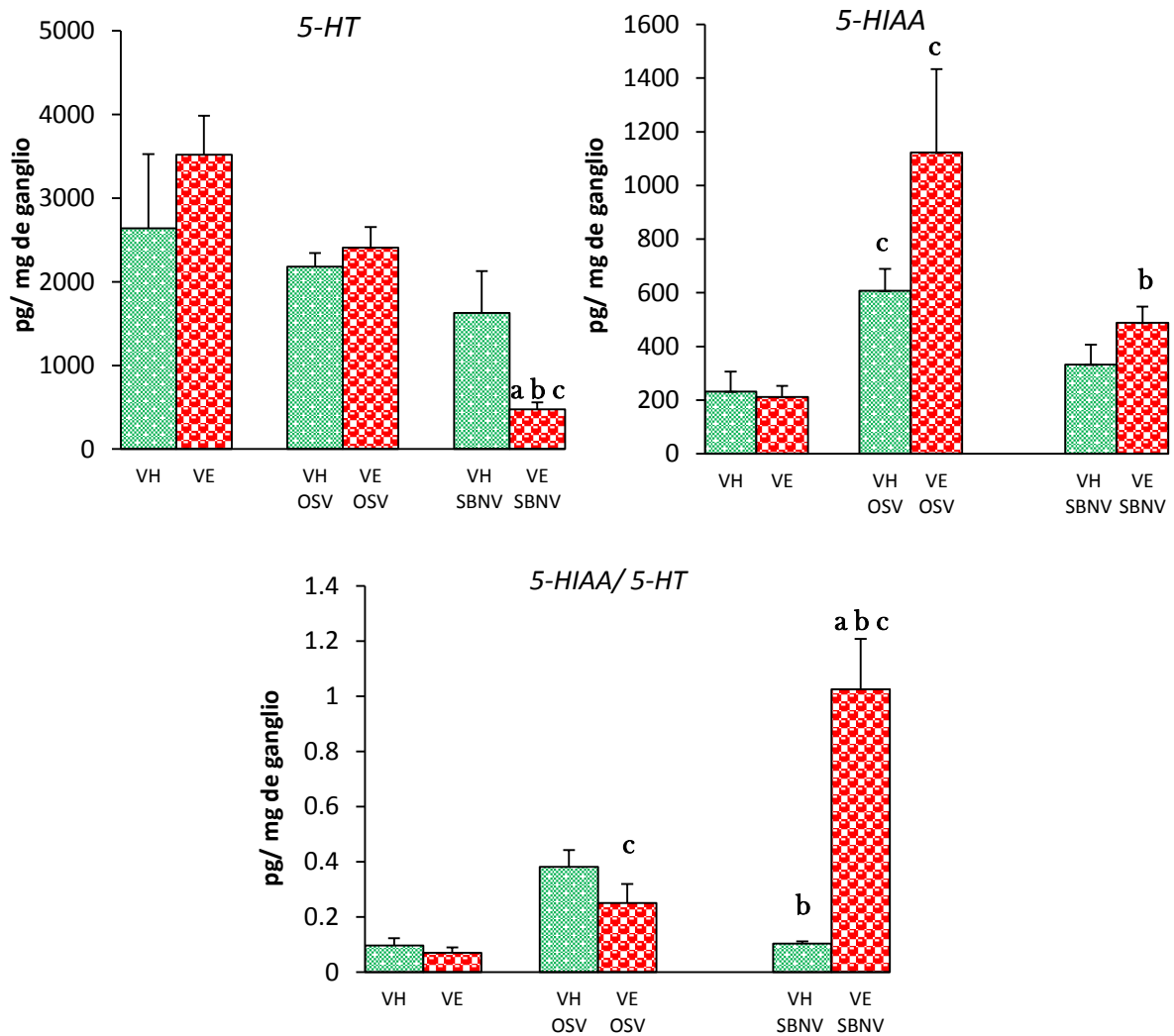
Cuadro 4. Media \pm e.e.m de la **concentración de dopamina, DOPAC y tasa de recambio (DOPAC/DA)** de animales inyectados con vehículo (VH) o valerato de estradiol (VE) y sometidos a los 24 días de edad a la operación simulada ventral (OSV) o a la sección bilateral del nervio vago (SBNV), autopsiados a los 80 días de edad.

| Grupos | Dopamina | DOPAC | DOPAC/Dopamina |
|---------|------------------|----------------------------|--------------------------|
| VH | 390 \pm 141 | 175 \pm 57 | 0.45 \pm 0.05 |
| VE | 425 \pm 106 | 690.1 \pm 160.3 a | 1.62 \pm 0.30 a |
| VH OSV | 378 \pm 75 | 737.3 \pm 223.9 c | 1.94 \pm 0.20 c |
| VE OSV | 458.5 \pm 88.8 | 562.5 \pm 154.1 | 1.23 \pm 0.16 a |
| VH SBNV | 399.5 \pm 77.4 | 221.5 \pm 36.2 b | 0.55 \pm 0.29 b |
| VE SBNV | 439.1 \pm 82.6 | 420.9 \pm 113.4 | 0.96 \pm 0.07 |

a $p < 0.05$ vs Su grupo par (prueba de “t” de student); **b** $p < 0.05$ vs su respectivo grupo con OSV; **c** $p < 0.05$ vs su grupo control (prueba de ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

Serotonina y Ácido 5-hidroxitindolacético (5-HIAA) y 5-HIAA/5-HT

La administración de VE no modificó la concentración de serotonina ni de su metabolito. En estos animales la operación simulada aumentó la concentración del metabolito y la tasa de recambio, en comparación con el grupo con VE. La vagotomía disminuyó la concentración de serotonina que se reflejó en el incremento de la tasa de recambio, respecto al grupo con VE o con VH y vagotomía (figura 17).



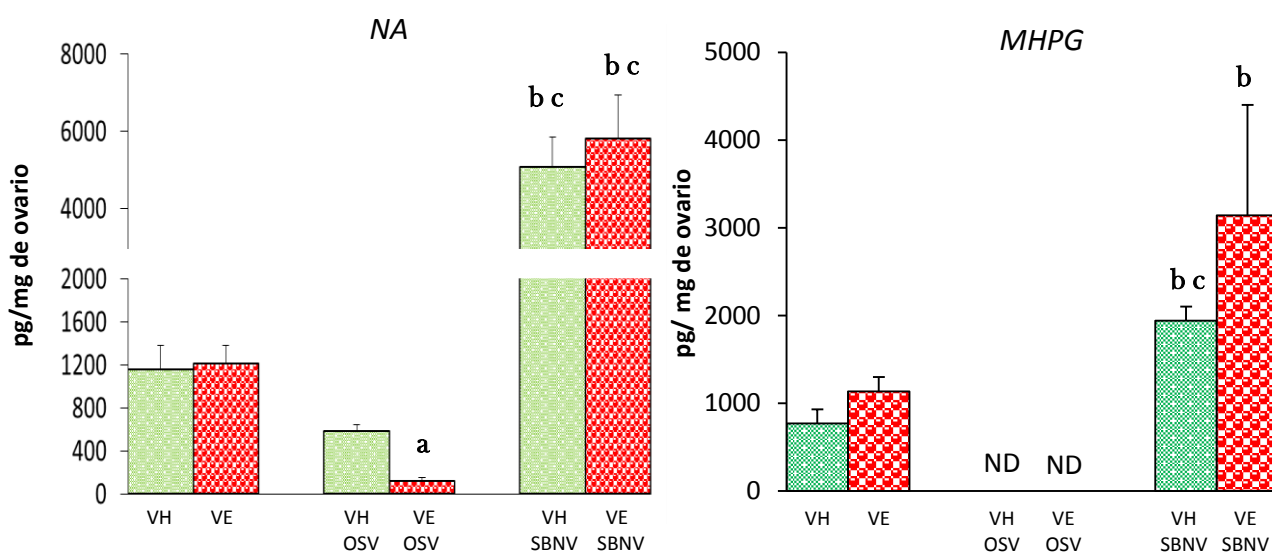
a $p < 0.05$ vs Su grupo de comparación; **b** $p < 0.05$ vs su respectivo grupo con OSV; **c** $p < 0.05$ vs su grupo control (prueba de ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

Figura 17. Media \pm e.e.m de la **concentración de serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxitindolacético (5-HIAA) y de la tasa de recambio de 5-HT/5-HIAA** de animales inyectados con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) y sometidos a los 24 días de edad a la operación simulada ventral (OSV) o a la sección bilateral del nervio vago (SBNV), autopsiados a los 80 días de edad.

Concentración de monoaminas en el ovario.

Noradrenalina (NA) y 3-Metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG)

La administración de VE no modificó la concentración de noradrenalina y su metabolito en el ovario. La operación simulada disminuyó la concentración de noradrenalina, en comparación al grupo con VH y OSV. En las hembras inyectadas con VE la vagotomía aumentó significativamente la concentración de noradrenalina, similar a lo que se observó en el grupo con VH y vagotomía (figura 18).

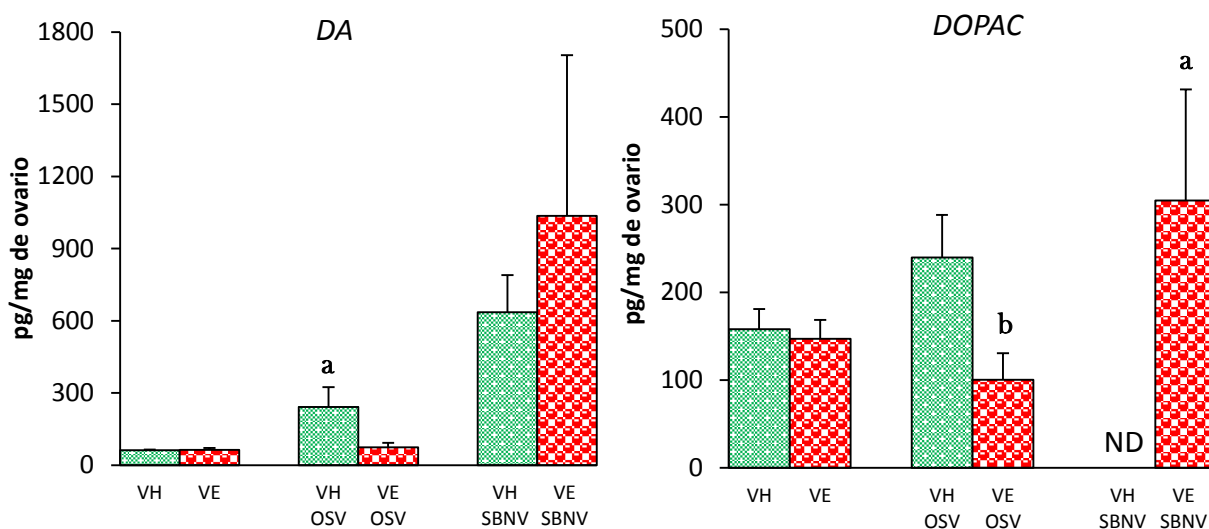


a $p < 0.05$ vs su grupo de comparación; **b** $p < 0.05$ vs su respectivo grupo con OSV; **c** $p < 0.05$ vs su grupo control (prueba de ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

Figura 18. Media \pm e.e.m de la **concentración de noradrenalina y 3-Metoxi-4-hidroxyfenilglicol (MHPG)** de animales inyectados con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) y sometidos a los 24 días de edad a la operación simulada ventral (OSV) o a la sección bilateral del nervio vago (SBNV), autopsiados a los 80 días de edad.

Dopamina y DOPAC

La administración de VE no modificó la concentración de dopamina ovárica ni de su metabolito. En animales con VE la operación simulada disminuyó la concentración de DOPAC. La sección del nervio vago no modificó la concentración de dopamina pero incrementó la de su metabolito (figura 19).

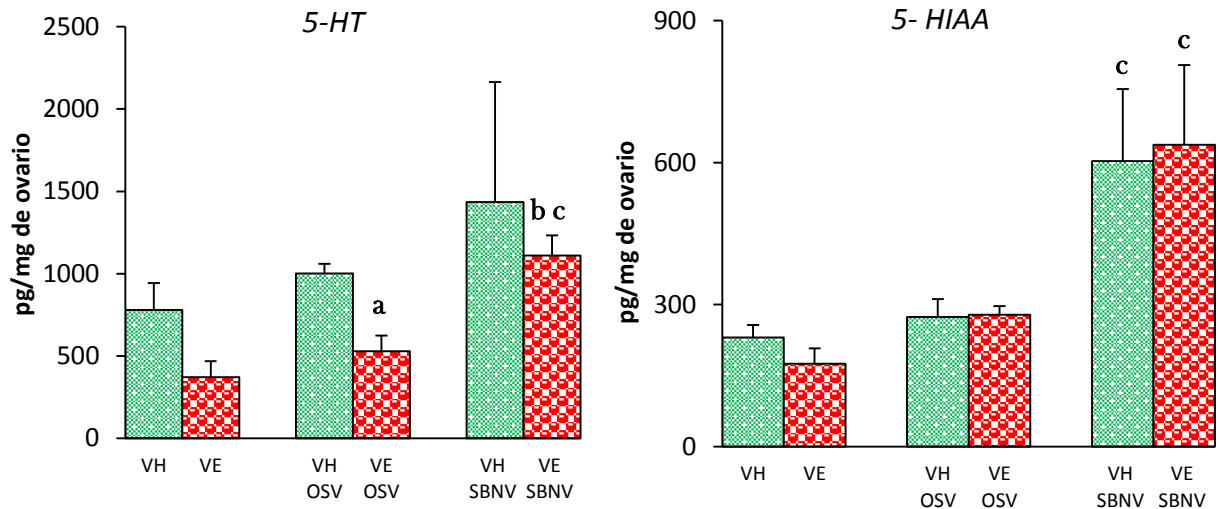


a $p < 0.05$ vs. su grupo control (prueba de ANDEVA seguida de la prueba de Tukey-Kramer); **b** $p < 0.05$ vs. su grupo de comparación (prueba de “t” de Student).

Figura 19. Media \pm e.e.m de la **concentración de dopamina y DOPAC** de animales inyectados con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) y sometidos a los 24 días de edad a la operación simulada ventral (OSV) o a la sección bilateral del nervio vago (SBNV), autopsiados a los 80 días de edad.

Serotonina y Ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA)

En las hembras inyectadas con VE no se modificó en el ovario la concentración de serotonina ni del metabolito. La operación simulada en animales con VE resultó en la disminución de la concentración de serotonina, respecto al grupo con VH y OSV, mientras que con la vagotomía aumentó la concentración de serotonina y del metabolito al compararse con las hembras tratadas con VE (figura 20).



a $p < 0.05$ vs. su grupo de comparación (prueba de "t" de Student); **b** $p < 0.05$ vs su respectivo grupo con OSV; **c** $p < 0.05$ vs. grupo VH o VE (prueba de ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

Figura 20. Media \pm e.e.m de la **concentración de serotonina (5-HT) y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA)** de animales inyectados con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) y sometidos a los 24 días de edad a la operación simulada ventral (OSV) o a la sección bilateral del nervio vago (SBNV), autopsiados a los 80 días de edad.

Los resultados del modelo del animal con SOPQ, inducido por el VE, apoyan la hipótesis de la participación de la inervación parasimpática aportada por el nervio vago en la regulación de la actividad noradrenérgica a nivel del GCMS. Mientras que el estrés por frío no es capaz de activar las fibras simpáticas del ganglio.

En los animales sometidos a estrés por frío se observó pérdida de la ciclicidad estral. Probablemente en este modelo animal la aciclicidad se pueda explicar como resultado de una mayor secreción de estradiol. En la literatura se plantea que el frío induce la alteración del ciclo estral como resultado de una mayor secreción de testosterona y estradiol (Bernucci y col., 2008). En este modelo animal la información del nervio vago no parece participar en la regulación del ciclo estral, ya que la vagotomía bilateral no es capaz de restablecer la ciclicidad.

En los animales inyectados con VE induce alteraciones en el patrón del ciclo estral, que se caracterizó por la presencia prolongada de diestro y prácticamente la ausencia del proestro. Esta alteración en el ciclo estral puede ser el reflejo de la mayor secreción de testosterona y coincide con lo ya reportado por otros investigadores y por nuestro laboratorio (Lara y col., 1993; Rosa -E- Silva y col., 2003; Morales y col., 2010). En estos animales tratados con VE la sección bilateral del nervio vago no restableció el patrón del ciclo estral, ya que se observó la presencia de dos estros continuos, resultados que llevan a plantear que la información vagal no está participando en la regulación del ciclo estral, idea que ya ha sido sugerida para el animal cíclico (Cruz y col., 1986).

En el presente estudio se observó que la vagotomía bilateral a los 24 días de edad no alteró la respuesta ovulatoria cuando el animal alcanzó la etapa adulta, sin embargo con estos resultados no descartamos la participación del vago en la regulación de la ovulación. La falta de efectos podría indicar que existen mecanismos neuro-hormonales que permitieron el restablecimiento de la ovulación, ya que se postula que la participación del nervio vago en la regulación de los mecanismos que culminan con la ovulación depende del estado de maduración del animal y del tiempo transcurrido entre la cirugía y la autopsia. Así, cuando en la rata de 24 días de edad se practica la vagotomía unilateral o bilateral no se altera la respuesta ovulatoria, mientras que si se realiza a los 28 días de edad sólo con la vagotomía bilateral incrementa el número de ovocitos liberados al primer estro vaginal. Estos resultados llevaron a sugerir que es suficiente con mantener intacta la información parasimpática que transcurre por uno de los nervios vagos para regular los mecanismos que llevan a la primera ovulación (Morales y col., 2004). Mientras que en ratas adultas cíclicas, el nervio vago modula de manera asimétrica la

respuesta ovulatoria. Esto se apoya en el hecho de que con la sección del nervio vago izquierdo disminuye la tasa de animales ovulantes, efecto que no se observa con la sección del nervio vago derecho, mientras que con la vagotomía bilateral aumenta el número de ovocitos liberados (Cruz y col., 1986).

Existen varios reportes que señalan que el SOPQ es el resultado de una mayor actividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario (Paredes y col., 1998; Dorfman y col., 2003; Araya y col., 2004; Jara y col., 2010). Metodológicamente se puede inducir ésta hiperactividad por la administración de VE (Brawer y col., 1986; Barria y col., 1993; Rosa- E- Silva 2003) o por la exposición a estrés por frío (Paredes y col., 1998; Dorfman y col., 2003; Bernucci y col., 2008; Jara y col., 2010).

Bernucci y colaboradores en el 2008 exponen a ratas adultas a estrés por frío durante ocho semanas observando una disminución en el número de ovocitos liberados. Los autores lo atribuyen a la disminución en el número de folículos preovulatorios, ya que parte de éstos se convirtieron en quistes foliculares. En el presente estudio la exposición al frío a partir de los 24 días de edad, por ocho semanas, no modificó la respuesta ovulatoria. La discrepancia puede ser atribuida a la edad de los animales en la cual se inició la exposición al estrés, indicando que los animales jóvenes desarrollan mecanismos de adaptación. Esta idea se apoya en el hecho de que en animales de 24 días de edad expuestos al frío por tres semanas incrementa la concentración de NA ovárica, pero a las cinco semanas ya no se observa la hiperactividad de las fibras simpáticas (Espinoza, 2014).

En la rata infantil la administración de VE resulta en una falta de ovulación y formación de quistes foliculares (Rosa-E-Silva y col., 2003). Resultados semejantes se observaron en el presente estudio, donde la administración de VE provocó el bloqueo de la ovulación, respuesta que no se modifica por efecto de la operación simulada.

Estudios recientes de nuestro laboratorio muestran que la inervación parasimpática que recibe el ovario, vía el nervio vago, participa en la persistencia del síndrome de ovario poliquístico, inducido por la administración de VE. Donde la participación de cada vago es diferencial en la regulación de la ovulación, ya que en el animal sin el nervio vago izquierdo el número de ovocitos liberados se restablece al valor del grupo con VH, mientras que si falta la información del vago derecho el número de ovocitos liberados corresponde al 80% del grupo testigo, pero superior a la que se observa en el animal con el SOPQ y la inervación vagal intacta (Linares y col., 2013). Los resultados del presente estudio muestran que la vagotomía bilateral

realizada a los 24 días de edad en animales con SOPQ, inducido por la inyección de VE, restablece la ovulación en ambos ovarios, con una cuota ovulatoria semejante a lo reportado para el animal con sección del vago derecho (Linares y col., 2013). Estos resultados nos permiten postular que en el animal con SOPQ, se requiere la integridad del nervio vago derecho para que la ovulación sea normal.

En la rata adulta la exposición al estrés por frío por ocho semanas no modifica la concentración de progesterona en plasma (Bernuci y col., 2008). Diversos autores han propuesto que a pesar de que incrementa la concentración de NA plasmática no se altera el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Pacak y col., 1998; Pacak y Palkovits 2001; Andresen y col., 2004). En nuestros animales con estrés por frío y con operación simulada se observó disminución en la concentración de progesterona, efecto inducido por el frío, ya que la sola laparotomía no modifica la concentración de la hormona. Esto podría indicar que el frío disminuyó la actividad de la adrenal.

Como ya se mencionó, en el presente estudio las hembras tratadas con VE no ovularon y en el ovario no se observaron cuerpos lúteos, a pesar de ello, la concentración de progesterona es similar al grupo testigo, el cual si ovuló. Con estas evidencias, sugerimos que la progesterona determinada en suero es de origen adrenal y no ovárico. En apoyo a esta idea, se sabe que en el animal con ovariectomía bilateral no se modifica la concentración de progesterona, mientras la adrenalectomía resulta en una disminución significativa (Flores y col., 2008).

La vagotomía bilateral aumenta la concentración de progesterona en los animales inyectados con VH. Resultados que llevan a sugerir que el nervio vago modula de manera inhibitoria la secreción de la hormona por parte de la adrenal, ya que ésta glándula recibe inervación vagal proveniente del ganglio celíaco (Coupland y col., 1989). La modulación que ejerce el nervio vago va a depender del estado neuroendócrino del animal, ya que cuando presenta el SOPQ el vago participa de manera estimulante en la secreción de la hormona.

La exposición al frío por ocho (Bernuci y col., 2008) o tres semanas (Pardes y col., 1998) aumenta la concentración de testosterona. Estos resultados difieren a lo reportado en el presente estudio, donde no observamos cambios en la concentración de la hormona. La falta de efectos puede ser atribuida a que en nuestro caso se inició el estrés en la etapa juvenil, mientras que en los otros reportes se utilizó a la rata adulta. La operación simulada en animales con exposición al frío disminuyó la concentración de testosterona a un valor similar al del grupo con laparotomía y sin estrés por frío. Estos resultados indican que la exposición al frío no modificó la secreción de

la hormona y que fue el abrir el peritoneo lo que pudo haber modificado la actividad de la adrenal, tal y como ya ha sido sugerido (Barco y col., 2003), y como resultado disminuyó la concentración de testosterona. La concentración de testosterona en el animal con vagotomía es menor que un animal intacto, esto puede ser el resultado de una disminución en la concentración de LH o de la menor actividad de la 3β -HSD, enzima encargada de convertir progesterona en androstenediona y androstenediol en testosterona, tal y como ya ha sido reportado (Lawrence y Burden 1978). La concentración de LH y la actividad de la enzima parecen no modificarse por el estrés ya que no se modificó la concentración de testosterona.

En la mujer, una de las características necesarias en el diagnóstico del SOPQ es el hiperandrogenismo (Azzi y col., 2006; 2009). En la rata, la administración de una dosis de VE es capaz de inducir el aumento en la concentración de testosterona (Barria y col., 1993; Morales y col., 2010), tal y como lo mostramos en el presente estudio. El hiperandrogenismo puede ser explicado a partir del incremento en la concentración de NA ovárica, inducido por la administración de VE (Lara y col., 2000). Así la NA al actuar en las células de la teca estimula la producción de andrógenos (Dyer y Erickson, 1985)

Bernuci y col. (2008) proponen que la exposición al frío por un período de ocho semanas ocasiona que incremente la concentración sérica de estradiol, a pesar de la disminución en el número de folículos preovulatorios sanos. Nuestro grupo de trabajo mostró que en la rata juvenil el estrés por frío modifica la dinámica del crecimiento de los folículos, ya que disminuye el número de folículos preantrales, antrales y preovulatorios sanos (Navarrete 2014). Esta disminución en la población folicular podría explicar por qué observamos disminución en la concentración de estradiol.

En las hembras expuestas al frío la operación simulada resultó en el incremento de la concentración de estradiol, al momento no contamos con reportes que nos ayuden a interpretar esta respuesta, sin embargo sugerimos que el frío puede estar incrementando la actividad de las aromatasas, lo que se traduciría en una menor concentración de testosterona y aumento en la de estradiol, como lo muestran nuestros resultados. En el presente estudio, el frío no modificó la concentración de NA en el ovario ni la concentración de testosterona, mientras que disminuyó la de estradiol. Tomando en conjunto estas evidencias, sugerimos que en el animal con frío y operación simulada no siempre la concentración de hormonas esteroideas se correlaciona con las altas concentraciones de NA ya que el estrés no modificó este neurotransmisor.

Cuando los animales expuestos al estrés por frío son sometidos a la vagotomía bilateral la concentración de estradiol se normaliza, resultados que nos hacen pensar que a la falta del nervio vago se aceleró el crecimiento de los folículos y como resultado la concentración de la hormona fue similar al grupo control. Esta idea surge a partir de los resultados de Cruz y col. (1986) quienes postularon que la información que transcurre por ambos nervios vago modula de manera inhibitoria el desarrollo folicular.

La administración de VE resulta en el incremento en la concentración de estradiol (Barria y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003; Morales y col., 2010). En el presente estudio se observó tendencia al incremento, que no llegó a ser significativo por la dispersión de los datos. Es posible que en los animales con SOPQ, el nervio vago module de manera estimulante la secreción de estradiol, esta idea se ve reforzada por el hecho de que al seccionar ambos nervios vago, la concentración de la hormona se normaliza a valores similares a las de un animal control.

La exposición al frío puede resultar en el incremento en la concentración de NA ovárica si el período de exposición se prolonga por 3 semanas, sin embargo, si la exposición se extiende por 11 semanas el animal presenta una adaptación que se traduce en la normalización de la concentración de NA (Paredes y col., 1998). Por las evidencias reportadas es posible deducir que en la rata expuesta al frío no siempre la concentración de NA se refleja en una mayor actividad esteroideogénica, así, cuando la rata adulta permanece por ocho semanas a 4°C no hay cambios en la NA ovárica pero si incrementa la concentración de testosterona y estradiol, respuesta que se mantiene aun cuando el animal es sometido a una operación simulada del cráneo (Bernucci y col., 2008). Al parecer, la participación de la NA en la esteroideogénesis va a depender del animal en estudio, ya que un animal cíclico la noradrenalina que actúa sobre las células de la teca estimula la secreción de andrógenos, que actúan como sustrato en la biosíntesis de estradiol (Barria y col., 1993; Dyer y Erickson, 1985).

El hecho de que a nivel de ovario incremente la concentración de NA en respuesta a la administración de VE (Morales y col., 2010) o a la exposición al estrés por frío por 3 semanas (Paredes y col., 1998) puede ser un indicador de una mayor actividad de las fibras que se originan en el GCMS. Así el grupo de Lara (2000) mostró que el VE es capaz de incrementar la concentración de Tirosina Hidroxilasa (TH) y con ello de NA en el ganglio. Es posible que la actividad de las neuronas noradrenérgicas del ganglio sea modulada por la información neural que transcurre por el nervio vago. Esta idea surge a partir de evidencias con marcadores fluorescentes, donde se muestra que en el GCMS existen fibras vagales en aposición con las

neuronas simpáticas (Berthoud y Powley 1996). Estas evidencias nos permiten explicar el por qué disminuye la concentración de NA en el ganglio después de realizar la vagotomía bilateral en el animal con SOPQ.

El estrés agudo altera al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal lo que se traduce en aumento en la concentración de ACTH por la adenohipófisis y como resultado incrementa la liberación de corticosterona en plasma (Dallman y col., 1987). Al mismo tiempo, se incrementa la actividad de los nervios simpáticos que inervan la médula adrenal, lo que resulta en el incremento en la liberación de NA por la glándula (Eliason 1984). Sin embargo, en nuestra cepa de ratas el estrés por frío no aumentó la concentración de NA ovárica ni en el GCMS como se ha reportado en anteriores estudios (Paredes y col., 1998; Bernucci y col., 2008; Jara y col., 2010). Esta discrepancia puede ser explicada por la diferencia del estímulo al que fue expuesto el animal, su intensidad y tipo de estresor, tal y como lo muestra el grupo de Pacak (2012).

La administración de VE o la exposición a estrés por frío no modificó la concentración de DA en ovario o en el GCMS. Esto posiblemente responda a que en la rata la concentración de ésta amina es muy baja y sólo se ha descrito la presencia de gránulos de NA en el ganglio celiaco (Gabella 1995).

En ratas adultas sin ninguna patología, la estimulación eléctrica del nervio vago aumenta la tasa de disparo de las neuronas 5-HT del núcleo dorsal del rafe (NDR) y la actividad de las neuronas NA en el locus coeruleus (LC). Los autores sugieren que el efecto de la estimulación del nervio vago sobre las neuronas 5-HT es indirecta, y podría ser mediada por la activación del sistema NA presente en el LC (Manta y col., 2009), además de que el propio NDR envía proyecciones al LC y de esta manera se podría establecer una modulación cruzada entre el NDR y el LC (Dorr y Debonel 2005).

El LC junto con el núcleo paraventricular (NPV) participan en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, mediando la respuesta de los individuos a cambios estresantes (Valentino y col., 1993; Chrousos y Gold 1992). El LC se activa por una variedad de factores estresantes, entre ellos el estrés por frío (Daiguji y col., 1982; Yuan y col., 2002). Estas evidencias podrían ayudar a explicar el incremento de 5-HT en el GCMS en respuesta al estrés por frío, ya que partiríamos del hecho de una mayor actividad de LC, el cual a su vez activa a las neuronas del NDR.

En nuestros grupos el VE inyectado a los 10 días de edad no modificó la concentración de serotonina en el GCMS ni en ovario. Al momento, sólo contamos con un reporte que indica que la administración de VE en ratas neonatas aumenta la concentración de serotonina en el núcleo arcuato del hipotálamo ventromedial (VMH-AN) (Sotomayor y col., 2011). No descartamos que este efecto también se observe en nuestros animales.

En nuestros animales con SOPQ inducido con VE, o expuestos al frío, la sección bilateral del nervio vago disminuye la concentración de serotonina en el CGMS, mientras que en el ovario la aumenta. Estos resultados permiten sugerir que en los dos modelos experimentales el nervio vago participa en la secreción de serotonina por parte del GCMS y del ovario, donde la modula de manera estimulante en el GCMS y de manera inhibitoria en el ovario.

Resumiendo, aún cuando en la bibliografía se utiliza el estrés por frío para inducir el SOPQ, los resultados del presente estudio permiten señalar que solo en los animales tratados con VE se reproducen las características del síndrome, y que el estrés por frío es un modelo completamente diferente, en donde no observamos los parámetros que definen la patología. En la Figuras 21 y 22 planteamos la participación del nervio vago en la regulación de la ovulación y la esteroidogénesis ovárica en los dos modelos estudiados.

Estrés por frío

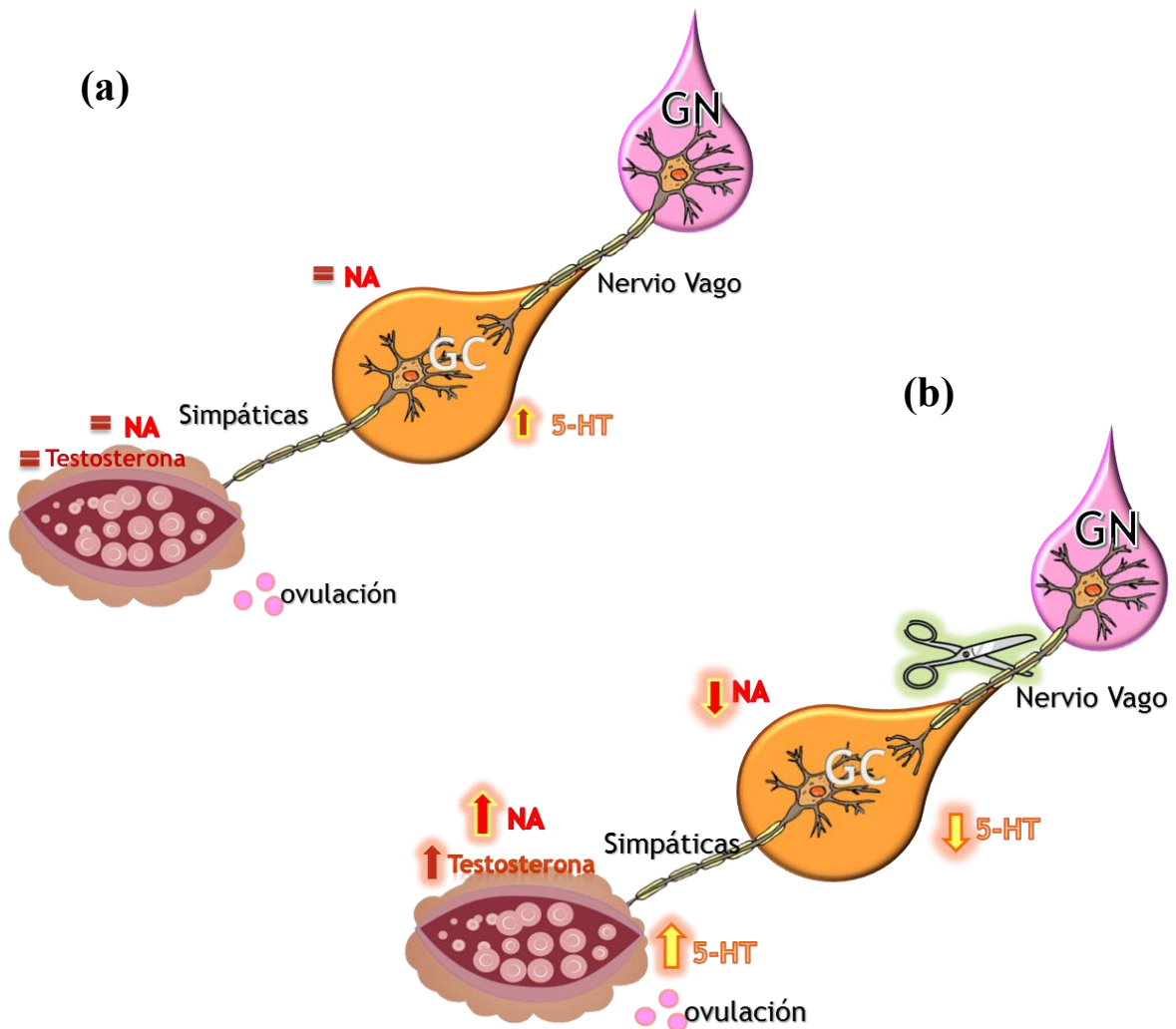


Figura 21. Modelo del animal sometido a estrés por frío.

- a) La regulación de la función ovárica por el nervio vago no es modificada por el estrés por frío.
- b) La falta de la información vagal disminuye la actividad de las fibras simpáticas del ganglio celiaco e incrementa la NA ovárica que se traduce en un aumento en la concentración de testosterona.

Valerato de estradiol

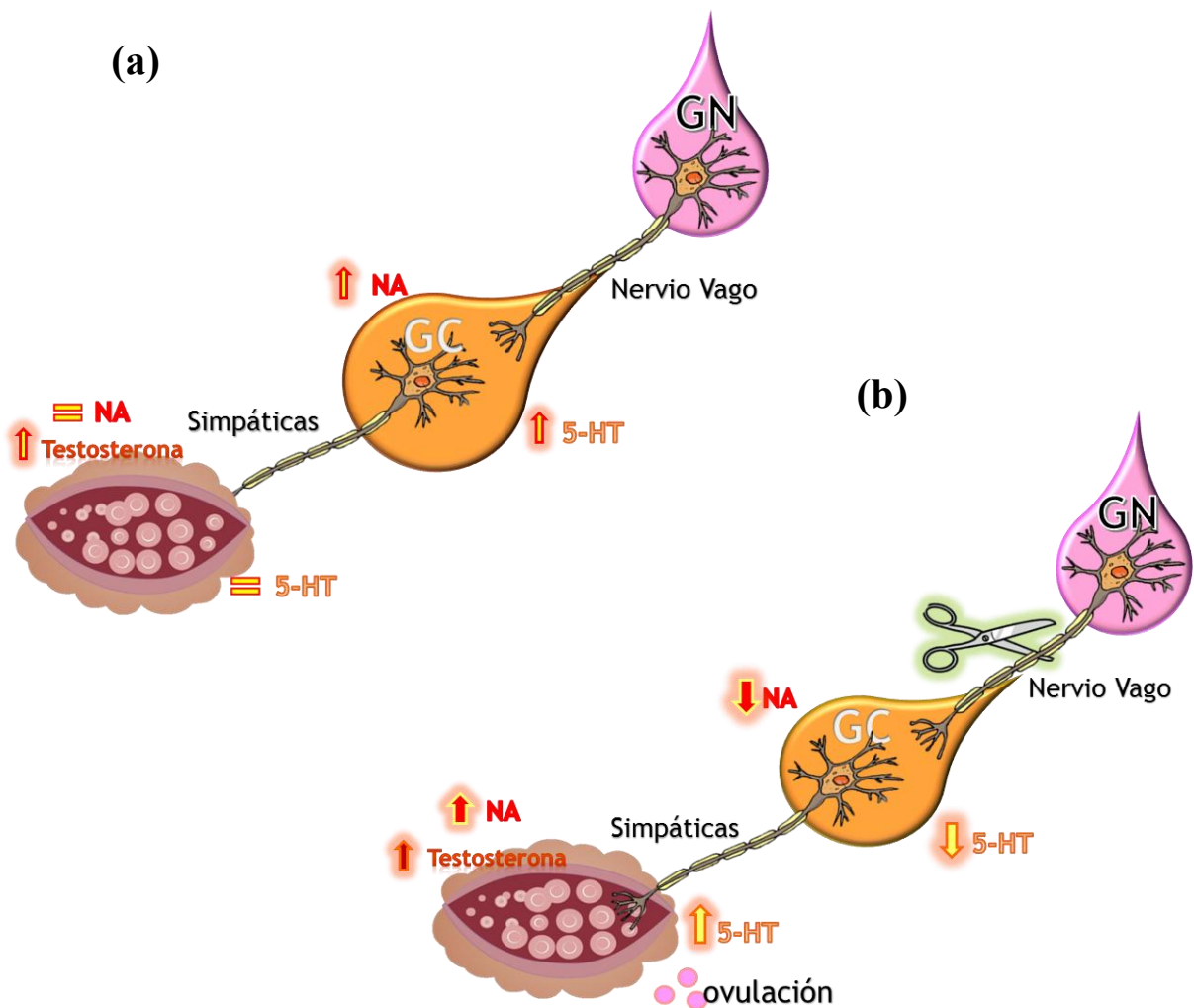


Figura 22. Modelo del animal tratado con valerato de estradiol

- a) Se plantea que la información del nervio vago, proveniente del ganglio nodoso estimula la actividad de las fibras simpáticas del ganglio celiaco, lo que a su vez resulta en un hiperandrogenismo y la falta de ovulación.
- b) La falta de inervación vagal disminuye el tono simpático del ganglio celiaco que se acompaña por un incremento en la concentración de NA ovárica, evento que culmina con la ovulación

- En la rata cíclica, sin patología, el nervio vago modula de manera inhibitoria la esteroidogénesis.
- En la rata juvenil el estrés por frío no modifica la concentración de testosterona, la ovulación ni las concentraciones de NA, por lo que no es un buen inductor del SOPQ.
- En la rata hembra sometida al estrés por frío, el nervio vago modula de manera estimulante la concentración de NA y 5-HT en el GCMS, mientras que en el ovario la modulación es tipo inhibitoria.
- El nervio vago modula de manera estimulante la actividad simpática del CGMS, por lo que la vagotomía bilateral revierte la condición quística en animales tratados con VE.
- En la rata con SOPQ la información vagal modula de manera estimulante la actividad del sistema serotoninérgico del GCMS, mientras que es inhibitorio en el ovario.
- En animales con SOPQ el nervio vago modula de manera diferencial la secreción de las hormonas esteroideas.

- Aguado LI, Petrovic SL, Ojeda SR. 1982. **Ovarian β -adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization distribution and coupling to steroidogenic responses.** *Endocrinology* 110: 1124-1132.
- Aguado LI, Ojeda SR. 1984. **Prepubertal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. Role of noradrenergic innervation.** *Endocrinology* 114: 1845-1853.
- Andersen ML, Bignotto M, Machado RB, Tufik S. 2004. **Different stress modalities result in distinct steroid hormone responses by male rats.** *Braz J Med Biol Res* 37:791–797.
- Anselmo-Franci JA, Rocha-Barros VM, Franci CR, McCann SM. 1999. **Locus ceruleus lesions block pulsatile LH release in ovariectomized rats.** *Brain Res* 833:86–92
- Anselmo-Franci JA, Franci CR, Krulich L, Antunes-Rodrigues J, McCann SM. 1997. **Locus coeruleus lesions decrease norepinephrine input into the medial preoptic area and medial basal hypothalamus and block the LH, FSH and prolactin preovulatory surge.** *Brain Res* 767:289–296.
- Araya V, Jara P, Lara HE. 2004. **Cerebro, estrés y ovario poliquístico. Participación de la innervación simpática en el desarrollo de ovario poliquístico.** *Rev. Endocrinol Nutr.* 51(8): 473-477
- Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W. 2006. **Criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline.** *J Clin Endocrinol Metab*; 91: 4237-4245
- Barco AI, Flores A, Chavira R, Matsumura PD, Domínguez R, Cruz ME. 2003. **Asymmetric Effects of Acute Hemiovariectomy on Steroid Hormone Secretion by the In Situ Ovary.** *Endocrine.* 21(3): 209–215.
- Barria A, Leyton V, Ojeda S, y Lara H. 1993. **Ovarian Steroidal Response to Gonadotropins and Adrenergic Stimulation Is Enhanced in Polycystic Ovary Syndrome: Role of Sympathetic Innervation.** *Endocrinology.* 133(6):2696-2703.
- Becu-Villalobos. 1990. **Control Hormonal Del Desarrollo Puberal En La Rata Hembra.** *Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 40: 1-17.
- Bernuci MP, Szawka RE, Helena CVV, Leite CM, Lara HE, Anselmo JA. 2007. **Locus Coeruleus Mediates Cold Stress-Induced Polycystic Ovary in Rats.** *Endocrinology* 149(6):2907–2916.

- Berthoud HR y Powley T. 1996. *Interaction between parasympathetic and sympathetic nerves in prevertebral ganglia: Morphological evidence for vagal efferent innervation of ganglion cells in the rat*. Microscopy Research and Technique 35: 80-86.
- Botella J. Calvero J. 1993. *Tratado de Ginecología*. Ediciones Díaz Santos S.A., 14 edición., Madrid. Pág. 45-47.
- Botella I.J. 1995 *El ovario fisiología y patología*. Edit. Díaz Santos, Madrid. Pág. 194-197.
- Bremer A. 2010. *Polycystic Ovary Syndrome in the Pediatric Population*. Metabolic syndrome and related disorders. 8 (5): 375–394.
- Burden HW.1978. *Ovarian innervation. In: The vertebrate ovary: comparative biology and evolution*. Plenum Press, New York. Pág. 615–638
- Burden HW, Lawrence IE Jr: 1977. *The effect of denervation on compensatory ovarian hypertrophy*. Neuroendocrinology, 23:368–378
- Burden HW, Lawrence J, Louis TM, Hodson CA. 1981. *Effects of abdominal vagotomy on the estrous cycle of the rat and the induction of pseudopregnancy*. Neuroendocrinology, 33:218–222.
- Buxadé C. 1994. *Zootecnia Bases de Producción Animal Tomo VII*. Ediciones mundiprensa. Madrid.
- Brawer JR, Munoz M y Farookhi R. 1986. *Development of the Polycystic Ovarian Condition (PCO) in the Estradiol Valerate-Treated Rat*. Biology of Reproduction 35: 647-655.
- Carlson NR. 1996. *Fundamentos de psicología fisiológica*. Edit. Pearson. 3era edición. México. Pág. 105-106.
- Chávez R, Cruz MA, Domínguez R. 1987. *Modifications on the ovarian response to gonadotropins induced by catecholamine depletion in vagotomized adult rats*. Rev. Invest. Clín. 39: 149-153.
- Chávez R, Sánchez S, Ulloa-Aguirre A, Domínguez R. 1989. *Effects on oestrus cyclicity and ovulation of unilateral section on the vagus nerve performed on different days of the oestrus cycle in the rat*. J Endocrinol. 123:441–444.
- Chávez R. Carrizosa L. Domínguez R.1991. *Effects of superior ovarian nerve section on spontaneous and induced ovulation in adult rats*. Med Sci Res. 19: 41-42
- Checa V. 2007. *Síndrome del ovario poliquistico*. Editorial Panamericana. Madrid, pág. 13-23.

- Chrousos GP, Gold PW. 1992. *The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis*. JAMA 267:1244–1252.
- Collins J, Lin C, Berthoud H, y Papka R. 1. 1999. *Vagal afferents from the uterus and cervix provide direct connections to the brainstem*. Cell Tissue Res 295:43-54.
- Coupland RE, Parker TL, Kesse WK, Mohamed AA: 1989. *The innervation of the adrenal gland. III. Vagal innervation*. J Anat 163:173–181.
- Cruz ME, Chávez R, Domínguez R. 1986. *Ovulation follicular growth and ovarian reactivity to exogenous gonadotropins in adult rats with unilateral or bilateral section of the vagi nerves*. Rev Invest Clin (Mex).38:167–171.
- Dallman MF, Akana SF, Cascio CS, Darlington DN, Jacobson L, Levin N. 1987. *Regulation of ACTH secretion: Variations on a theme of B*. Recent Progress in Hormone Research 43: 113-172.
- Daiguji M, Okada F, Yamashita I. 1982. *Dopamine β -hydroxylase activity in the locus coeruleus and hypothalamus in cold-stressed rats*. Psychoneuroendocrinology 7:223–227
- Dalsgaard CJ, Hokfelt T, Schultzberg M, Lundberg JM, Terenius L, Dockray GJ, Goldstein M. 1983. *Origin of peptide-containing fibers in the inferior mesenteric ganglion of the guinea pig: immunohistochemical studies with antisera to substance P, enkephalin, vasoactive intestinal polypeptide, cholecystikinin and bombesin*. Neuroscience 9:191–211.
- Dissen GA y Ojeda SR. 1999. *Ovarian Innervation*. Encyclopedia of Reproduction 3:583-589.
- Domínguez, R, Cruz, ME, y Chávez R. 1989. *Growth factors and the ovary*. Hirshfield, A. M. (ed.). Plenum Press: New York, pp. 321–325
- Dorfman M, Arancibia S, Fiedler J.L, Lara H.E. 2003 *Chronic Intermittent Cold Stress Activates Ovarian Sympathetic Nerves and Modifies Ovarian Follicular Development in the Rat*. Biology of Reproduction. 68 (10.1095): 2038-2043.
- Dorr EA y Debonnel G. 2006. *Effect of Vagus Nerve Stimulation on Serotonergic and Noradrenergic Transmission*. the Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 318 (2): 890-898.
- Dyer CA y Erickson GF. *Norepinephrine Amplifies Human Chorionic Gonadotropin-Stimulated Androgen Biosynthesis by Ovarian Theca- Interstitial Cells*. Endocrinology. 116 (4): 1645-1652.

- Eccles RM y Libet B. 1961. **Origin and blockade of the synaptic responses of curarized sympathetic ganglia.** Journal of Physiology 157: 484–563.
- Eliason K. 1984. **Stress and Catecholamines.** Act. Med. Scand. 215: 197-204.
- Espinoza M. 2014. **Participación del nervio ovárico superior en la respuesta ovárica con síndrome de ovario poliquístico inducido por estrés por frío.** Tesis de maestría, FES-Zaragoza, UNAM
- Eynard AR. Valentich MA. Rovasio RA. 2008. **Histología y Embriología del Ser Humano Bases Celulares y Moleculares.** Editorial Panamericana. 4ta edición. Argentina, pág. 524-525.
- Fiedler J, Jara P, Luza S, Dorfman M, Grouselle D, Rage F, Lara HE, Arancibia s. 2006. **Cold Stress Induces Metabolic Activation of Thyrotrophin- Releasing Hormone-Synthesising Neurons in the Magnocellular Division of the Hypothalamic Paraventricular Nucleus and Concomitantly Changes Ovarian Sympathetic Activity Parameters.** Journal of Neuroendocrinology. (18): 367–376.
- Flores A, Gallegos AI, Velasco J, Mendoza FD, Montiel C, Everardo PM, Cruz ME, Domínguez R. **The acute effects of bilateral ovariectomy or adrenalectomy on progesterone, testosterone and estradiol serum levels depend on the surgical approach and the day of the estrous cycle when they are performed.** Reproductive Biology and Endocrinology doi:10.1186/1477-7827-6-48: 1-17.
- Freeman ME. 1994. The Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. The Physiology of Reproduction. 2da ed. Edited E. Knobil and J.D. Neil. Págs. 613-644.
- Gabella G. 1995. **The rat nervous system.** Paxinos, G.(2da ed.). Academic Press: San Diego, CA. Págs. 81-103.
- Gerendai I., Toth I., Boldogko Z., Medveczky I., Halász B. 2000. **CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function.** Journal of the Autonomic Nervous System. 80: 40–45
- Gerendai I., Kocsis K. y Halász B. 2002. **Supraspinal Connections of the Ovary: Structural and Functional Aspects.** Microscopy research and technique. 59:474–483
- Goodarzi, M. O., Dumesic, D. A., Chazenbalk, G. y Azziz, R. 2011. **Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis.** Endocrinology. 7:219-231
- Hape W. 1900. **“The sexual season” of mammals and the relation of the “por-oestrus” to menstruation.** QJ MicrSci 44:1_70.

- Jara P., Rage F., Dorfman M., Grouselles D., Barra R., Arancibia S. y Lara H. 2010. ***Cold-induced Glutamate Release in vivo from the Magnocellular Region of the Paraventricular Nucleus is Involved in Ovarian Sympathetic Activation.*** Journal of Neuroendocrinology. 22:979-986.
- Kavetnansky R. y Mikulaj L. ***Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress.*** Endocrinology. 87: 738-743.
- Kavetnansky R, Goldstein DS, Weise VK, Holmes C, Szemerédi K, Bagdy G, Kopin J. 1992. ***Effects of Handling or Immobilization on Plasma Levels of Dopa, Catecholamines and Metabolites in Rats.*** J. Neurochem. 58: 2296- 2302
- Köing E y Liebich HG. 2005. ***Anatomía de los Animales Domésticos.*** Editorial Panamericana. 2da edición. Argentina. Págs. 249-253.
- Klein CM y Burden HW. ***Anatomical Localization of Afferent and Postganglionic sympathetic neurons Innervating the Rat Ovary.*** Neuroscience Letters. 85: 217-222
- Langman Sadler. 2007. ***Embriología Médica con Orientación Clínica, edit. Panamericana,*** 10ª edición, Madrid pág. 33-37
- Lara HE, Ferruz JL, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR ***Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome.*** Endocrinology. 1993. 133:2690–2695
- Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler LJ, Ojeda SR. ***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 (3): 1059- 1072.
- Lawrence IE, Burden HW, Louis TM: 1978. ***Effect of abdominal vagotomy of the pregnant rat on LH and progesterone concentration and fetal resorption.*** J Reprod Fertil 33:131–136
- Lawrence IE, Burden HW. 1980. ***The Origin of the Extrinsic Adrenergic Innervation to the Rat Ovary.*** The Anatomical Record 196: 51-59.
- Linares R., Hernández D., Morán C., Chavira R., Cárdenas M., Domínguez R. y Morales L., 2013. ***Unilateral or bilateral vagotomy induces ovulation in both ovaries of rats with polycystic ovarian syndrome.*** Repro. Biol. and Endocrinology .11 (68):1-9
- Liu, N., Zhang, X. L., and Tian, X. P. 2007. ***Effects of norepinephrine on hepatic stellate cell proliferation and apoptosis.*** Zhong hua Gan Zang Bing Za Zhi 15:746–748.
- Malamed S, Gibney JA, Ojeda SR. 1992. ***Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat.*** Cell Tissue Res. 270:87-93.

- Manta S, Dong J, Debonnel G, Blier P. 2009. *Enhancement of the function of rat serotonin and norepinephrine neurons by sustained vagus nerve stimulation.* J Psychiatry Neurosci. 34(4):272-280.
- Matalliotakis L, Kourtis A, Koukoura, Panidis D. 2006. *Polycystic ovary syndrome: etiology and pathogenesis.* Arch Gynecol Obstet. 274:187–197.
- Matthews, M.R., 1989. *Small, intensely fluorescent cells and the paraneuron concept.* J. Electron Microsc. Tech. 12, 408–416.
- McMahon A, Kavetnansky R, Fukuhara K, Weise VK, Kopin IJ, Sabban E. 1992. *Regulation of tyrosine hydroxylase and dopamine β -hydroxylase mRNA levels in rat adrenals by a single and repeated immobilization stress.* J Neurochem 58: 2124-2130.
- Moore KL y Dalley AF. 2008. *Anatomía con Orientación Clínica.* 5ta edición. Editorial Panamericana. Madrid. Págs.58-62.
- Morales L, Chávez R, Domínguez R. 1993. *Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve.* Med Sci Res, 21:15-17.
- Morales MA, Holmberg K, Xu ZQ, Cozzari C, Hartman BK, Emson P, Goldstein M, Elfvin LG, Hokfelt T. 1995. *Localization of choline acetyltransferase in rat peripheral sympathetic neurons and its coexistence with nitric oxide synthase and neuropeptides.* Proc Natl Acad Sci USA, 92(25):11819-11823
- Morales L, Betanzos R, Domínguez R. *Unilateral or Bilateral Vagotomy Performed on Prepubertal Rats at Puberty Onset of Female Rat Deregulates Ovarian Function.* Archives of medical research. 2004. (35): 279-283.
- Morales L., Linares R., Rosa G., Moran C., Chavira R., Cardenas M., Dominguez R., *Unilateral sectioning of the superior ovarian nerve of rats with polycystic ovarian syndrome restores ovulation in the innervated ovary.* Repro. Biol. and Endocrinology, 2010; 8:99.
- Moro C, Pasarica M, Elkind-Hirsch K, Redman LM. 2009. *Aerobic exercise training improves atrial natriuretic peptide and catecholamine-mediated lipolysis in obese women with polycystic ovary syndrome.* J Clin Endocrinol Metab 94:2579–2586
- Murdoch AP, Dunlop W, Kendall-Taylor P, Watson MJ. 1984. *The acute effects of a dopamine antagonist (domperidone) on luteinising hormone, follicle stimulating hormone, prolactin and thyrotrophin secretion in polycystic ovarian syndrome: differential effect of ovulation.* Clin Endocrinol (Oxf) 21:611–619

- Nankova B, Kvetnansky E, Hiremagalur B, Sabban B, Rusnak M, Sabban EL.1996. *Immobilization stress elevates expression for catecholamine biosynthetic enzymes and some neuropeptides in rat sympathetic ganglia: effects of adrenocorticotropin and glucocorticoides*. Endocrinology; 137: 5597-604.
- Navarrete M. 2014. *Modificación de las funciones ováricas en el animal con síndrome de ovario poliquístico inducido por la administración de valerato de estradiol o la exposición a estrés por frío*. Tesis de licenciatura, FES-Zaragoza, UNAM.
- Nestler JE, Jakubowicz DJ, de Vargas AF, Brik C, QuinteroN, Medina F. 1998. *Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycysticovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycanmediators as the signal transduction system*. J. Clin Endocrinol Metab. 83:2001–2005.
- Ndefo UA, PharmD, Eaton A, Robinson MG. 2013. *Polycystic Ovary Syndrome A Review of Treatment Options With a Focus on Pharmacological Approaches*. P&T. 38(6): 336-355.
- Ojeda SR, White SS, Aguado LI, Advis JP, Andersen JM: *Abdominal vagotomy delays the onset of puberty and inhibits ovarian function in the female rat*. Neuroendocrinology 1983, 36:261–267.
- Ottenweller JE, Natelson BH, Pitman DL, Drastal SD. 1989. *Adrenocortical and behavioral responses to repeated stressors. Toward an animal model of chronic stress and stress related mental illness*. Biol. Psychiatry 26: 829-842.
- 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 275:1247–1255.
- Pacak K, Palkovits M. 2001. *Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders*. Endocr Rev 22:502–548
- Paganini-Hill A, Henderson VW. 1994. *Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease*. Am J Epidemiol. 140:256– 261
- Panidis DK, Rouso DH, Matalliotakis IM, KourtisAI,Vlassis GD, Koumantakis E. *Hyperinsulinemia does not influence androgens/estrogens ratio in patients with polycystic ovary syndrome*. Int J Fertil Womens Med. 1999. 44:301–306.
- Paredes A, Gálvez A, Leyton V, Aravena G, Fiedler J, Bustamante D, Lara HE.1998. *Stress Promotes Development of Ovarian Cysts in Rats*. Endocrine. (3.): 309-315.

- Pitman DL, Ottenweller JE, Natelson BH. 1988. *Plasma Corticosterone Levels During Repeated Representation of Two Intensities of Restraint stress: Chronic Stress and Habituation*. *Physiol Behav* 43: 47-55.
- Robertson JL, Clifton DK, Iglesia HO, Steiner RA, Kauffman AS. Circadian *Regulation of Kiss1 Neurons: Implications for Timing the Preovulatory Gonadotropin- Releasing Hormone/ Luteinizing Hormone Surge*. *Endocrinology* 150(8): 3664-3671.
- Rodríguez J.1993. *Manual de clases de prácticas de fisiología animal*. editores J. de Costa y J.A., Universidad de Murcia Madrid. Págs. 95-110.
- Rodríguez Solano A. 2005. *Guía de Laboratorio de Histología*. Editorial Universidad de Costa Rica. 1era edición. Costa Rica. Págs. 110-115.
- Rosa-E-Silva A., Guimaraes M., Padmanabhan V. y Lara H. 2003. *Prepubertal Administration of Estradiol Valerate Disrupts Cyclicity and Leads to Cystic Ovarian Morphology during Adult Life in the Rat: Role of Sympathetic Innervation*. *Endocrinology*.144(10):4289–4297.
- Ross Pawlina. 2007. *Histología texto y atlas color con Biología celular y molecular*. Edit. Panamericana. 5ta ed. Madrid. Págs. 830-839.
- Selstam G, Norjavara E, Tegenfelt T, Lundberg S, Sandström C, Ake-Persson S. 1985. *Partial Denervation of the Ovaries by Transection of the Suspensory Ligament Does Not Inhibit Ovulation in Rats Treated With Pregnant Mare Serum Gonadotropin*. *The Anatomical Record* 213: 392-395.
- Seya, Y., Fukuda, T., Isobe, K., Kawakami, Y., and Takekoshi, K. 2006. *Effect of norepinephrine on RhoA, MAP kinase, proliferation and VEGF expression in human umbilical vein endothelial cells*. *Eur. J. Pharmacol.* 553, 54–60. doi:10.1016/J.EJPHAR.09.048.
- Shi D, Vine D. 2012. *Animal models of polycystic ovary syndrome: a focused review of rodent models in relationship to clinical phenotypes and cardiometabolic risk*. *Reproductive Biology* 98 (1): 185-193
- Shi X., Zhang L., Fu S., Li N. 2011. *Co-involvement of psychological and neurological abnormalities in infertility with polycystic ovarian syndrome*. *Arch Gynecol Obstet* 284:773–778.
- Sotomayor ZR, Dorfman M, Paredes A, Lara HE. 2011. *Neonatal Exposure to Estradiol Valerate Programs Ovarian Sympathetic Innervation and Follicular Development in the Adult Rat*. *Biology of Reproduction* 78: 673–680.

- Tresguerres JAF. *Fisiología del Sistema Endocrino*. Editorial Mc Graw Hill. 3era ed. Madrid. Págs. 794-1063.
- Upledger JE. 2004. *Terapia Craneosacra II. Más Allá de la Duramadre*. Editorial Paidotribo. 1era ed. Barcelona. Págs. 126-134.
- Valentino RJ, Foote SL, Page ME. 1993. *The Locus Coeruleus as a Site for Integrating Corticotropin-Releasing Factor and Noradrenergic Mediation of Stress Responses*. Ann NY Acad Sci 697:173–188.
- Viso RJ. 1998. *Nomenclatura Anatómica Moderna*. Universidad Central de Venezuela. 1era ed. Caracas. Págs. 431-433.
- Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. 2012. *Rodent Models for Human Polycystic Ovary Syndrome*. Biology of Reproduction 86(5):149, 1–12
- Yen SSC, Vela P, Rankin J. 1970. *Inappropriate Secretion of Follicle Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone in Polycystic Ovarian Disease*. J Clin Endocrinol. Metab 30:435–42.
- Yen SSC. 2001. *Síndrome de Ovario Poliquístico: Anovulación Crónica Hiperandrogénica*. Editorial Panamericana. 4ta ed. México. Págs. 455-510.
- Yuan L, Brewer C, Pfaff D. 2002. *Immediate-early Fos Protein Levels in Brainstem Neurons of Male and Female Gonadectomized Mice Subjected to Cold Exposure*. Stress 5:285–294