



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Evaluación de la respuesta ovulatoria y la morfología ovárica en
función del bloqueo de los receptores β_2 -adrenérgicos ováricos en
ratas con síndrome de ovario poliquístico

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

C. Fernando Rodríguez Andrade

DIRECTORA: D. en C. Berenice Venegas Meneses



Marzo 2022

Agradecimientos

Cada una de las personas mencionadas en los agradecimientos tiene mis más sinceras gracias por la aportación para lograr terminar la tesis a nivel licenciatura.

La D. en C. Berenice Venegas meneses, por darme la oportunidad de trabajar bajo su tutela, por permitirme ocupar un lugar en su laboratorio y por la excelente persona que es, extendiendo su mano en momentos difíciles y enseñándome de la mejor forma lo que es hacer investigación y los retos que conlleva, pero sobre todo por siempre motivarme a no rendirme.

La D. en C. Lorena Milflores Flores, por aceptarme en el laboratorio y apoyar cuando tenía dudas sobre la investigación realizada, por enseñarme mucho en el laboratorio y apoyar a la D. Berenice Venegas en mi proyecto.

Al Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción del ICUAP, por permitirme realizar la parte experimental en sus instalaciones y aprender nueva técnicas de laboratorio por parte de sus investigadores, por permitirme el uso de su material de laboratorio y por brindarme un espacio digno para realizar la investigación.

Índice.

1- Introducción.	1
1.1- Ovario.	1
1.2- Eje hipotálamo-adenohipófisis-ovario.	3
1.3- Desarrollo folicular, ovulación y formación del cuerpo lúteo.	5
1.4- Ciclo estral	10
1.5- Síntesis de hormonas esteroides	13
1.6- Regulación nerviosa del ovario	15
1.7- Síndrome de ovario poliquístico.	18
1.8- Signos y síntomas.	21
1.9- Inducción del síndrome de ovario poliquístico en rata.	22
1.10- Regulación nerviosa en el síndrome de ovario poliquístico.	23
2- Justificación.	25
3- Hipótesis.	27
4- Objetivos.	27
4.1- Objetivo general.	27
4.2- Objetivos Particulares.	27
5- Material y métodos.	28
5.1- Diagrama de trabajo.	28
5.2- Sujetos de experimentación.	29
5.3- Inducción del síndrome de ovario poliquístico.	29
5.4- Registro del ciclo estral.	29
5.5- Procedimiento quirúrgico.	30
5.6- Procedimiento de autopsia.	30

5.7-	Conteo de ovocitos.	31
5.8-	Cortes histológicos.	31
5.9-	Análisis estadísticos.	32
6-	<i>Resultados.</i>	32
6.1-	Apertura vaginal	32
6.2-	Peso corporal al momento del sacrificio.	33
6.3-	Tasa de animales ovulantes.	35
6.4-	Número de ovocitos.	37
6.5-	Peso ovárico.	40
6.6-	Morfología ovárica.	42
7-	<i>Discusión.</i>	45
8-	<i>Conclusiones.</i>	49
9-	<i>Perspectivas.</i>	50
10-	<i>Literatura citada.</i>	50

Índice de figuras.

<i>Figura 1: Diagrama de la anatomía e histología del ovario humano durante los años reproductivos.</i>	2
<i>Figura 2: Eje hipotálamo-hipófisis-gónada.</i>	4
<i>Figura 3: Desarrollo folicular y las diferentes estructuras que lo integran.</i>	7
<i>Figura 4: Variación hormonal en las diferentes fases del ciclo estral.</i>	12
<i>Figura 5: Evaluación citológica del frotis vaginal en las fases del ciclo estral.</i>	13
<i>Figura 6: Posible mecanismo para la regulación de la secreción de testosterona, la secreción de estradiol y el flujo sanguíneo del ovario por estimulación del SON y ONP.</i>	17
<i>Figura 7: Diagrama de trabajo.</i>	28
<i>Figura 8: Apertura vaginal.</i>	33
<i>Figura 9: Peso corporal al momento del sacrificio.</i>	34
<i>Figura 10: Tasa de animales ovulantes.</i>	36
<i>Figura 11: Número de ovocitos.</i>	39
<i>Figura 12: Estructuras ováricas de ratas sacrificadas en estro dos ciclos estrales posteriores a la inyección observados con un objetivo 5x.</i>	43
<i>Figura 13: Estructuras ováricas de ratas sacrificadas en estro cuatro ciclos estrales posteriores a la inyección observados con un objetivo 5x.</i>	44

Índice de tablas.

Tabla 1. Promedio del peso ovárico en miligramos en los diferentes tratamientos.	41
---	-----------

Abreviaturas.

SOP= Síndrome de ovario poliquístico

VE= Valerato de estradiol

NGF= Factor de crecimiento nervioso

NA= Noradrenalina

VH= Vehículo

VH + But= Vehículo más butoxamina

VE + But= Valerato de estradiol más butoxamina

AV= Apertura vaginal

OI= Ovario izquierdo

OD= Ovario derecho

GnRH= Hormona liberadora de gonadotropinas

FSH= Hormona folículo estimulante

LH= Hormona luteinizante

COC= Complejo cúmulo-ovocito

AMPc= Adenosín monofosfato cíclico

ONP= Plexo nervioso ovárico

SON= Nervio ovárico superior

VIP= Péptido intestinal vasoactivo

TH= Tirosina hidroxilasa

TAO= Tasa de animales ovulantes.

NADPH= Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato.

PKA= Proteína cinasa A

PKB= Proteína cinasa B

ACTH= Corticotropina

RNAm= Ácido ribonucleico mensajero

HCG= Gonadotropina coriónica humana

GDP= Guanosín difosfato

NIH= Instituto nacional de salud.

Resumen.

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es una de las afecciones más comunes en el sistema endocrino caracterizado por la presencia de hiperandrogenismo, anovulación y quistes ováricos. El SOP tiene una etiología desconocida e inicialmente se consideraba una disfunción del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. En recientes años se ha encontrado que en mujeres con SOP hay un aumento en el tono nervioso adrenérgico, lo que sugiere al sistema nervioso simpático en la etiología del mismo. El sistema nervioso simpático regula funciones ováricas importantes como son: la esteroidogénesis y la foliculogénesis; asimismo estudios realizados en modelos animales remarcan la importancia de este sistema, dado que se ha encontrado que en ovarios de rata con SOP inducido con valerato de estradiol (VE) hay un aumento en el factor de crecimiento nervioso (NGF) y su receptor de baja afinidad p75NTR; además de un aumento en la actividad de la tirosina hidroxilasa, la enzima encargada de la síntesis de noradrenalina (NA). La NA es el principal neurotransmisor del sistema nervioso simpático que actúa sobre los receptores β -adrenérgicos del ovario, los cuales se encuentran principalmente en las células de la teca y de la granulosa, estos receptores se encargan de la señalización para la síntesis de hormonas esteroideas como los andrógenos. Se ha estudiado que un bloqueo no selectivo de los receptores β adrenérgicos ováricos con administración de propranolol, mejora la respuesta ovulatoria en el modelo de SOP inducido con VE. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la respuesta ovulatoria y la morfología ovárica al primer, segundo y cuarto ciclo estral posterior al bloqueo selectivo de los receptores β_2 -adrenérgicos ováricos con butoxamina en un modelo de rata con SOP inducido con VE. Para la realización de este trabajo se utilizaron ratas neonatas de 10 días de edad, las cuales fueron divididas en dos grupos experimentales, el grupo VE y el grupo vehículo (VH). Al grupo de animales con VE se les hizo una única administración intramuscular de VE (2 mg/0.1 mL de aceite de sésamo) para inducir un modelo de SOP. A los 14 días de edad se inició el monitoreo de la apertura vaginal (AV) y cuando los animales presentaron este signo se inició el monitoreo del ciclo estral. A los 60 días de edad, a los animales se les realizó una laparotomía para exteriorizar los ovarios y administrar en cada bursa

ovárica 100 µg/20 µL de butoxamina, un antagonista selectivo de los receptores β₂-adrenérgicos. Posteriormente se continuó el monitoreo del ciclo estral y los animales fueron sacrificados al siguiente estro vaginal precedido de un proestro (primer ciclo estral); otro grupo de animales fue sacrificado a los dos ciclos estrales posteriores de la inyección de butoxamina y el tercer grupo de animales se sacrificó a los cuatro ciclos estrales posteriores a la inyección. Los resultados muestran que los animales VH no presentan cambios en las funciones ováricas. El grupo VE adelanta la AV (14.30 ± 0.09 días), y a los 60 días de edad presentan aciclicidad y anovulación, así como morfología típica de un ovario poliquístico. En los animales adultos con inducción de SOP en la etapa infantil, el bloqueo de los receptores β₂-adrenérgicos ováricos restableció la ovulación únicamente a los ocho días (dos ciclos estrales) posteriores a la inyección (60%). La morfología ovárica de los animales ovulantes de este grupo experimental mostró la presencia de cuerpos lúteos frescos y no hubo presencia de quistes ováricos, lo que sugiere que el bloqueo de los receptores β₂-adrenérgicos ováricos reestablece las funciones ováricas en un corto periodo de tiempo, lo que hace suponer que es necesaria la administración continua de fármacos beta bloqueadores en el ovario que puedan regular el sistema simpático del ovario en el modelo de SOP con VE.

1- Introducción.

1.1- Ovario.

En humanos, el ovario es un órgano intra-abdominal pareado, en forma amigdaloides, cuyas funciones principales son la selección y maduración de los folículos, la ovulación, la formación del cuerpo lúteo y la síntesis de hormonas esteroideas y peptídicas (Pacheco, 2010). En la mujer, durante cada ciclo menstrual, el ovario libera un ovocito para su fertilización y el desarrollo embrionario y prepara a los órganos reproductores accesorios para el embarazo y el nacimiento de un bebé sano (Leung y Adashi, 2004).

Tanto en humanos como en ratas, los ovarios están localizados en la pelvis, los cuales están suspendidos en el ligamento ancho del útero por una inserción llamada mesoovario, el cual es un pliegue de peritoneo que lleva vasos sanguíneos a los ovarios (Gartner y Hiatt, 2007). Además, cada ovario está recubierto por el epitelio germinal y por debajo de este se encuentra la túnica albugínea, una cápsula de tejido conectivo poco vascularizado (Gartner y Hiatt, 2007) compuesto casi en su totalidad por fibroblastos y fibrillas de colágeno asociadas que están incrustadas en la matriz extracelular (Espey y Richards, 2006).

El ovario está conformado por dos partes principales, una zona central, llamada médula, la cual está rodeada por una zona periférica particularmente prominente, llamada corteza; incorporados al tejido conectivo de la corteza se encuentran los folículos que contienen los ovocitos (Erickson y Chang, 2007). De estos folículos existen diferentes tamaños, los cuales reflejan cambios específicos asociados con su crecimiento, desarrollo y destino, estos tamaños son conocidos como folículo primordial, primario, secundario, terciario (en el caso de los humanos folículo de Graaf) y atrésico (Erickson y Chang, 2007). También encontramos la bursa ovárica, en la cual, se encuentran ocultos los ovarios, formada por el mesoovario distal, el *mesosalpinx* y el ligamento propio del ovario, en esta, la altura y el ancho de la bolsa ovárica y su abertura medial (*Ostium bursae ovaricae*) presentan grandes diferencias entre las especies (Torres, 2017).

Además de estas estructuras, a lo largo del ciclo menstrual, se forman nuevas estructuras, las cuales surgen del deterioro de algunas estructuras anteriormente mencionadas (figura 1), una de ellas es el cuerpo lúteo, el cual se forma de la pared del folículo ovulante, después, si no se produce la implantación, el cuerpo lúteo se deteriora y se convierte en un nódulo de tejido conectivo denso denominado cuerpo *albicans*; también existen las células del hilio, que se encuentran en la arteria ovárica y son las productoras de testosterona. El ovario tiene dos fuentes principales de suministro arterial, las cuales son la arteria ovárica (surge de la aorta abdominal) y la arteria uterina, las cuales forman un tronco anastomótico y se convierten en la arteria de la rama ovárica (Erikson y Chang, 2007).

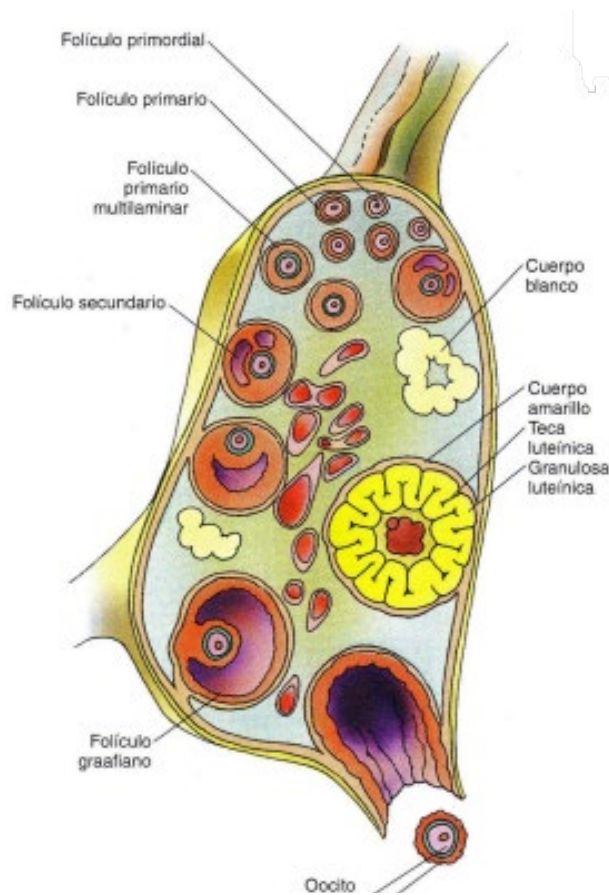


Figura 1: Diagrama de la anatomía e histología del ovario humano durante los años reproductivos. (Modificado de Gartner y Hiatt, 2007)

1.2- Eje hipotálamo-adenohipófisis-ovario.

Con la pubertad, en los mamíferos se inicia la maduración del eje hipotálamo-hipófisis-ovario y la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Ventura-Arizmendi y Hernández-Valencia, 2019); el hipotálamo y la hipófisis están comunicados por un sistema porta el cual posee una red capilar primaria, que se inicia en la eminencia media del hipotálamo, lugar a donde llegan y descargan los axones provenientes del núcleo arcuato (Teppa y Terán, 2000), de este núcleo, se libera la GnRH hacia el sistema porta hipofisario, estimulando en la hipófisis la síntesis y liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH); estas dos hormonas, actúan sobre los receptores a gonadotropinas del ovario para promover la producción de hormonas esteroides, la maduración folicular y la ovulación (Pacheco, 2010). Sin embargo, si se incrementa la frecuencia de pulsos de GnRH, ambas gonadotropinas disminuyen su concentración basal, existiendo una retroalimentación negativa de los receptores de GnRH en las células gonadotropas hipofisarias que las hace insensibles al estímulo de la misma. Asimismo, los estrógenos ejercen un efecto inhibitor en la hipófisis sobre la liberación de gonadotropinas, a la vez que incrementan su biosíntesis, de esta manera, el incremento continuo de los niveles plasmáticos de estrógenos durante el desarrollo folicular daría lugar a una disminución en los niveles de LH y FSH circulantes y un aumento de éstas a nivel hipofisario (Tresguerres y Castillo, 2005).

Existen dos fenómenos entrelazados y dependientes del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, los cuales son la esteroidogénesis y la foliculogénesis (figura 2), estos dos procesos son regulados por la red neuronal de las gonadotropinas, las cuales son liberadas desde las vesículas de las terminales eferentes de las neuronas de la eminencia media y el sistema porta hipofisario (Ventura-Arizmendi y Hernández-Valencia, 2019). Las gonadotropinas actúan sobre el ovario a través de los receptores de membrana. Se conoce que la FSH estimula la síntesis de receptores para sí misma en las células de la granulosa y los receptores para LH en las células de la teca interna, además de que el aumento de LH inhibe la síntesis de receptores para LH (Pacheco, 2010). Se sabe que la LH tiene una actividad importante en la

fase lútea por promover la secreción de progesterona, además de ser responsable de inducir la síntesis de andrógenos e iniciar la maduración del ovocito (Ventura-Arizmendi y Hernández-Valencia, 2019).

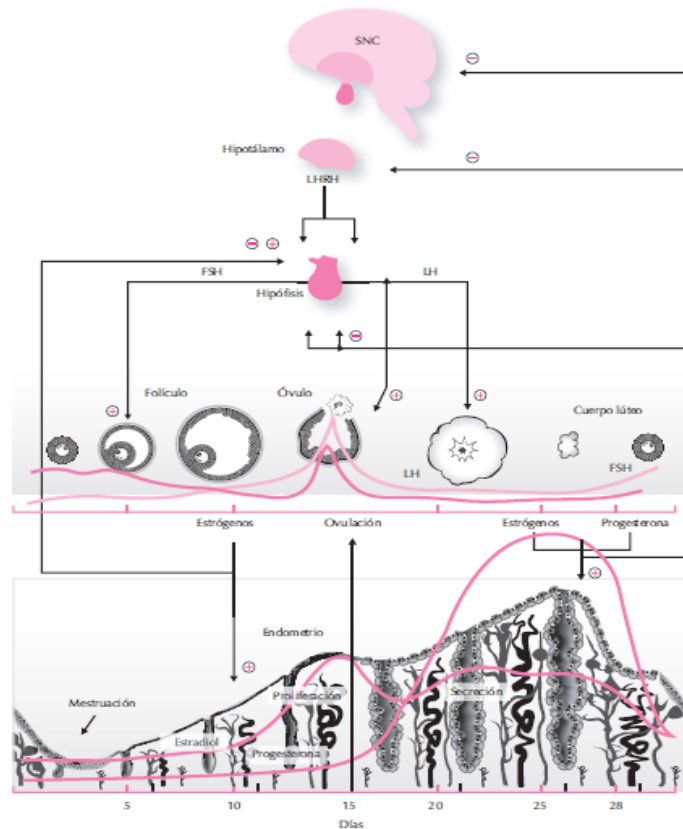


Figura 2. Eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Recuperado de Tresguerres y Castillo, 2005)

Al llegar la pubertad, la FSH ejerce su acción estimulante actuando sobre sus receptores localizados en las células de la granulosa del folículo ovárico, lo que promueve la aromatización de los estrógenos y la síntesis de inhibina, también induce la síntesis de estradiol a partir de la androstenediona sintetizada en las células locales bajo el estímulo de la LH, de igual forma interviene en el proceso de reclutamiento, crecimiento y desarrollo del folículo dominante, en el cual, los niveles aumentados de estradiol producido determinarían un incremento para los receptores para FSH, que a su vez, posibilitan que el folículo siga desarrollándose cuando los niveles de FSH empiezan a disminuir por el feedback negativo producido por los estrógenos y la inhibina (Tresguerres y Castillo, 2005).

Se ha descrito que la maduración y la sensibilización de la actividad de GnRH depende de un polipéptido denominado kisspeptina y las neuronas que lo expresan están presentes en el núcleo arcuato, el núcleo periventricular y el núcleo anteroventral periventricular del hipotálamo del ratón (Ventura-Arizmendi y Hernández-Valencia, 2019). Se ha establecido que las señales de kisspeptina en el hipotálamo son responsables de la generación de pulsos de la GnRH, ya que la ausencia de esta condiciona un estado de inmadurez en el eje hipotálamo-gónadas (Ventura-Arizmendi y Hernández-Valencia, 2019).

Además de estos mecanismos de regulación, en la mitad del ciclo aparece un pico secretor de LH y FSH, que parece ser responsable de la ovulación y de la luteinización (Tresguerres y Castillo, 2005), fase que provoca un patrón de baja amplitud y baja frecuencia, como consecuencia del incremento del tono opioide que inhibe los pulsos de GnRH, por ejemplo la β -endorfina inhibe la liberación de GnRH del hipotálamo mediobasal en humanos, el GABA también produce inhibición de GnRH, en tanto que, esta hormona está estimulada por dopamina, noradrenalina y serotonina (Prieto-Gómez, Velázquez-Paniagua, 2002), lo que hace que se suprima la secreción de gonadotropinas, lo cual asegura que no maduren otros folículos, si no se da la fecundación, se produce la regresión del cuerpo lúteo disminuyendo paulatinamente su función y bajando los niveles plasmáticos de estrógenos, inhibina y progesterona, lo que permite el regreso de los pulsos de GnRH, los cuales provocan que se suprima la inhibición de la FSH, y se comience el proceso de maduración folicular para el próximo ciclo ((Teppa y Terán, 2000),

1.3- Desarrollo folicular, ovulación y formación del cuerpo lúteo.

Antes del inicio de la pubertad todos los folículos de la corteza ovárica se encuentran en la etapa de folículo primordial (Gartner y Hiatt, 2007). Estos constan de un ovocito arrestado en la profase I de la meiosis y una sola capa de células de la granulosa aplanadas (Fortune, 1994), estos folículos, en el caso de los roedores, se desarrollan durante el periodo neonatal temprano; una vez que los tipos de folículos

han sido establecidos, estos gradual y continuamente dejan la fase de arresto para seguir creciendo, hasta llevarse la ovulación o la atresia (Fortune, 1994).

El inicio de la pubertad está caracterizado por una serie de cambios orgánicos y funcionales necesarios para la reproducción de la especie, antes de que inicie la pubertad, existe una liberación intermitente de la GnRH que ocurre cada 90 min aproximadamente y su vida media en el torrente sanguíneo sólo es de unos 2 a 4 min, lo que da por resultado una liberación intermitente de la FSH y LH, lo que demarca el inicio de los ciclos estrales en ratas y ciclos menstruales en humanos, estas liberaciones intermitentes también culminan en el desarrollo folicular y el comienzo del ciclo ovárico (Gartner y Hiatt, 2007). En las ratas hembras este periodo empieza alrededor del día 20 postnatal y culmina entre los días 36 y 39 postnatal, cuando se da la apertura vaginal (AV) la cual, coincide con la primera ovulación (Arata, *et. al.*, 1981).

A lo largo del desarrollo folicular se identifican cuatro etapas: folículo primordial, primario, secundario y preovulatorio (figura 3). En estas etapas el folículo crece y desarrolla el ovocito (Gartner y Hiatt, 2007).

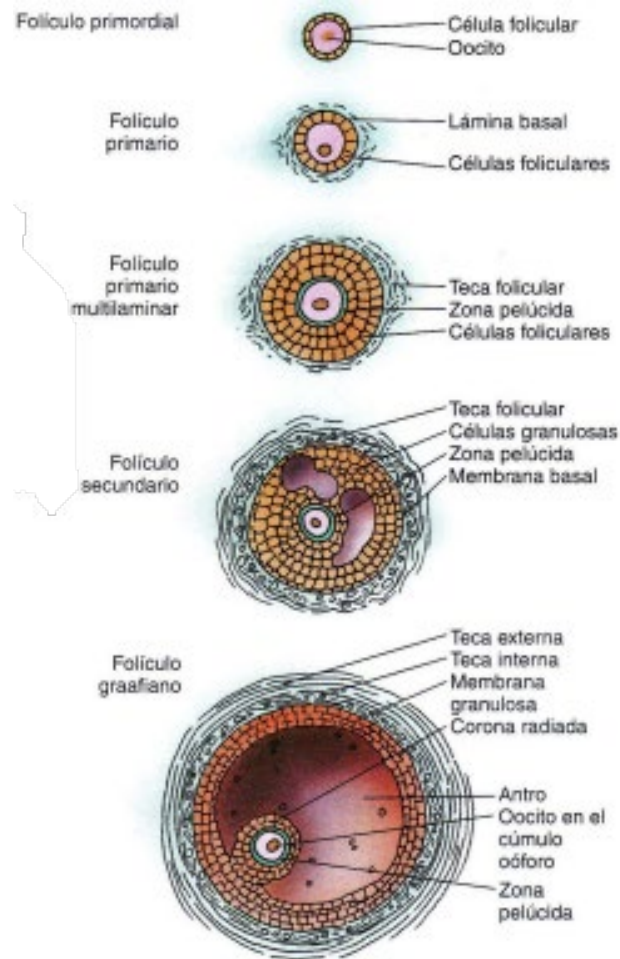


Figura 3. Desarrollo folicular y las diferentes estructuras que lo integran. (Modificado de Gartner y Hiatt, 2007)

Los folículos primordiales están compuestos por un ovocito primario, el cual, se caracteriza por ser una célula esférica de unos 25 μm de diámetro, con un núcleo acéntrico grande y un nucléolo; además está rodeado por una capa de células foliculares escamosas (figura 3) (Gartner y Hiatt, 2007). El folículo primario es la primera etapa del desarrollo folicular, donde el ovocito primario crece hasta unos 100 a 150 μm de diámetro, las células foliculares se tornan de forma cuboides, que cuando empiezan a proliferar se estratifican y forman varias capas de células alrededor del ovocito primario, llamándose células de la granulosa. Posterior a la capa de células de la granulosa se encuentra la zona pelúcida la cual está compuesta por tres glucoproteínas diferentes ZP1, ZP2 y ZP3, y que el ovocito

secreta, esta zona es invadida por microvellosidades del ovocito y filopodios de las células foliculares que entran en contacto entre sí y forman uniones de intersticio a través de las cuales se comunican durante el desarrollo folicular. A continuación, el folículo cuenta con una capa de células denominada teca interna, la cual se da gracias a que las células del estroma se organizan alrededor del folículo primario. En la teca interna se produce la androstenediona, la cual penetra en las células de la granulosa, donde la enzima aromatasa la convierte a estradiol (Gartner y Hiatt, 2007). Finalmente, el folículo cuenta con una la capa de las células denominada teca externa, la cual es una capa de tejido conjuntivo de colágeno que se limita a la capa externa de un folículo maduro (Espey y Richards, 2006).

El folículo secundario se forma cuando aumenta su tamaño hasta los 200 μm de diámetro, se desarrollan algunos espacios intercelulares dentro de la masa de células de la granulosa, el cual se llena de un líquido llamado líquido folicular (Gartner y Hiatt, 2007). Estos tienen varias capas de células de granulosa que están rodeadas por células de la teca. El espacio lleno de líquido folicular confluye en una cavidad llamada antro folicular; las células de la granulosa segregan mucopolisacáridos que forman un halo protector (zona pelúcida) alrededor del ovocito (Filipiak, *et. al.*, 2016).

Por último, el folículo preovulatorio (maduros) se caracteriza por presentar células de la granulosa que siguen proliferando, además se sigue formando el líquido folicular hasta el punto en el que el folículo alcanza los 2.5 cm de diámetro. Las células foliculares de la pared del folículo forman la membrana granulosa y la formación continua de líquido folicular origina el desprendimiento de su base del *cumulus oophorus*, compuesto por el ovocito primario, la corona radiada y las células foliculares (Gartner y Hiatt, 2007).

Después de estas cuatro etapas del desarrollo folicular se produce la ovulación, para este proceso se necesita que un folículo ovárico maduro sea estimulado por un aumento ovulatorio de gonadotropinas hipofisarias, que reaccionan con receptores acoplados a proteínas G en las membranas plasmáticas de las células de la granulosa y las células de la teca interna (Espey y Richards, 2006). El aumento

súbito en la concentración de LH provoca un mayor flujo sanguíneo que llega a los ovarios, lo que genera que los capilares de la teca externa comiencen a filtrar plasma y generar un edema, asimismo se libera histamina, prostaglandinas y colagenasa cerca del folículo preovulatorio (Gartner y Hiatt, 2007). Durante las primeras horas en las que un folículo es estimulado por un pico ovulatorio no hay ningún cambio visible en la apariencia del folículo, sin embargo, a las cuatro horas del proceso, este comienza a ruborizarse, existiendo evidencia de que los capilares de la pared del folículo empezaron a dilatarse y el tejido se vuelve hiperémico, después de esto, no existe otra indicación morfológica de ruptura pendiente hasta una o dos horas antes de que la pared del folículo estalle (Espey y Richards, 2006). Posteriormente, el vértice del folículo maduro sobresale cada vez más por encima de la superficie del ovario y la pared del folículo se vuelve más delgada, la porción más apical del folículo se vuelve traslúcida, se hincha y forma un estigma, las células del epitelio superficial desarrollan vacuolas necróticas en su citoplasma y parecen estar unidas con menos firmeza a la túnica albugínea, en la teca interna los capilares adyacentes a las células secretoras contienen más leucocitos, el estiramiento del vértice del folículo causa el desprendimiento de algunas células de la granulosa hacia el antro folicular y las células se vuelven más activas esteroideogénicamente (Espey y Richards, 2006). Cinco minutos antes de que ocurra la ruptura del folículo, la matriz extracelular de la túnica albugínea y la teca externa es escasa y los fibroblastos de estas, están bastante disociados entre sí, los capilares de la teca interna se rompen o contienen trombos que afectan el flujo sanguíneo, las células de la granulosa se han desprendido hacia el líquido folicular o se han retraído hacia la base del estigma (Espey y Richards, 2006) y varios minutos después de la formación del estigma el folículo se rompe. La ovulación se completa cuando se descarga el complejo expandido de cúmulo-ovocito (COC), dos minutos después de la explosión de la pared del folículo (Espey y Richards, 2006). Además, el folículo maduro colapsa y se pliega, algunos de los vasos sanguíneos rotos vierten sangre hacia la cavidad folicular formando el cuerpo hemorrágico y a medida que los fagocitos eliminan el coagulo, concentraciones altas y constantes de LH convierten el cuerpo hemorrágico en el cuerpo amarillo, que actúa como una glándula

endocrina (Gartner y Hiatt, 2007). El cuerpo lúteo está compuesto por células de la granulosa luteínicas y células de la teca luteínicas; las primeras permanecen en la región central del cuerpo amarillo, producen progesterona y convierten los andrógenos elaborados por las células de la teca en estrógenos, por su parte, las células de la teca luteínicas, se sitúan en la periferia del cuerpo amarillo, estas producen progesterona, algunos estrógenos y andrógenos. La progesterona y los estrógenos producidos por las células de la granulosa luteínicas y de la teca luteínicas inhiben la secreción de LH y FSH respectivamente; el que la FSH sea inhibida provoca que no se dé el desarrollo folicular y la inhibición de la LH ocasiona la degeneración del cuerpo amarillo. Las células de la granulosa y de la teca interna pasan a ser células granulosas luteínicas y células de la teca luteínicas, las cuales producen de manera activa progesterona (Gartner y Hiatt, 2007).

La atresia es un proceso de degeneración y reabsorción de folículos que ocurre de manera normal en los ovarios de todos los vertebrados (Flores, *et. al.*, 2012). Durante este proceso, una vez que un folículo maduro se rompe y libera su ovocito secundario, los folículos maduros restantes experimentan atresia, los cuales serán fagocitados por macrófagos. Esto quiere decir que el 2% del total de los folículos alcanzan la etapa de maduración y la ovulación, pero solo el 5-6% de estos lo logra (Gartner y Hiatt, 2007).

1.4- Ciclo estral

La ovulación en ratas esta dictada por el ciclo estral, este a su vez, está regulado por varias hormonas del eje hipotálamo-adenohipofisario-ovario, que secreta estrógenos y progesterona. En ratas jóvenes, el ciclo estral tiene una duración de 4 a 5 días y comprende cuatro fases: proestro, estro, metaestro y diestro. Cada una de estas fases se distinguen por cambios hormonales característicos (Cruz, *et. al.*, 2016).

El proestro se inicia con la regresión del cuerpo lúteo anterior, con esto se produce una caída en los niveles de progesterona y la retroalimentación negativa en el hipotálamo desaparece (Rippe, 2009); además, existe un aumento preovulatorio en los niveles circundantes de 17- β -estradiol y un aumento en la prolactina (figura 4,

proestro, panel izquierdo), este aumento en 17- β -estradiol estimula indirectamente las neuronas de la GnRH en el hipotálamo y el tabique que, a su vez, activan las células sensibles en la hipófisis anterior para liberar LH y la FSH a la circulación (McLean, *et. al.*, 2012) (figura 4, proestro, panel izquierdo), durante esta fase, será seleccionado el folículo dominante, el cual es el que llegará a la ovulación y se diferencia de los demás porque este es influenciado por las hormonas LH y FSH, incrementando así la producción y síntesis de estrógenos, los cuales van llenando la cavidad antral y hacen que aumente el diámetro folicular (Guáqueta, 2009), durante el proestro podemos encontrar células epiteliales nucleadas como característico en un frotis vaginal (Navarrete, 2014) (figura 5); En la madrugada del estro ocurre la ovulación, el cual es precedido por un pico preovulatorio de LH en la noche del ciclo anterior y antes de que se produzca la salida del ovocito hay edema en la teca interna y aumento de las prostaglandinas como respuesta inflamatoria (Navarrete, 2014), de igual forma existe un pico de la FSH, hormona necesaria para el reclutamiento de folículos antrales, al igual que hace que las células de la teca produzcan andrógenos y esto, a su vez, estimulando la activación de la enzima aromatasa en las células de la granulosa transformando los andrógenos a estradiol (Gigli, *et. al.*, 2006), en esta fase los niveles de 17- β -estradiol disminuyen y la prolactina alcanza su pico máximo (figura 4, estro, panel izquierdo), dentro de las células de la teca se produce y libera inhibina, la cual se encarga de bloquear la liberación de FSH desde la hipófisis (Guáqueta, 2009), durante esta fase se producen cambios anatómicos, como el aumento de tamaño del útero y acumulación de líquido luminal en respuesta a la actividad hormonal, podemos encontrar en un frotis vaginal la acumulación de células cornificadas y con núcleo degenerado (Navarrete, 2014) (figura 5); Después de esto existe un continuo aumento en los niveles de progesterona, lo cual nos indica el inicio del metaestro (figura 4, metaestro, panel izquierdo), en este, gracias a que las células de la teca y de la granulosa sensibilizan el folículo colapsado a la acción de la LH ocurre formación del cuerpo lúteo (Guáqueta, 2009) y un pequeño aumento en la 17- β -estradiol en respuesta a esto, gracias a la formación del cuerpo lúteo ocurren cambios en la mucosa vaginal observándose leucocitos en el frotis vaginal

(Navarrete, 2014) (figura 5). Por último, en el diestro, la progesterona alcanza su pico máximo, en esta fase ocurre la regresión del cuerpo lúteo, lo que causa una caída brusca en los niveles de progesterona circulante (figura 4, diestro, panel izquierdo) (McLean, *et. al.*, 2012), en esta fase se observan cambios anatómicos, como que los cuernos uterinos se ven pequeños y ligeramente contraídos, la pared vaginal presenta una mucosa delgada invadida por leucocitos (Navarrete, 2014), siendo estos cambios en la tipología celular un indicativo de eventos endocrinos adyacentes (McLean, *et. al.*, 2012) (figura 5).

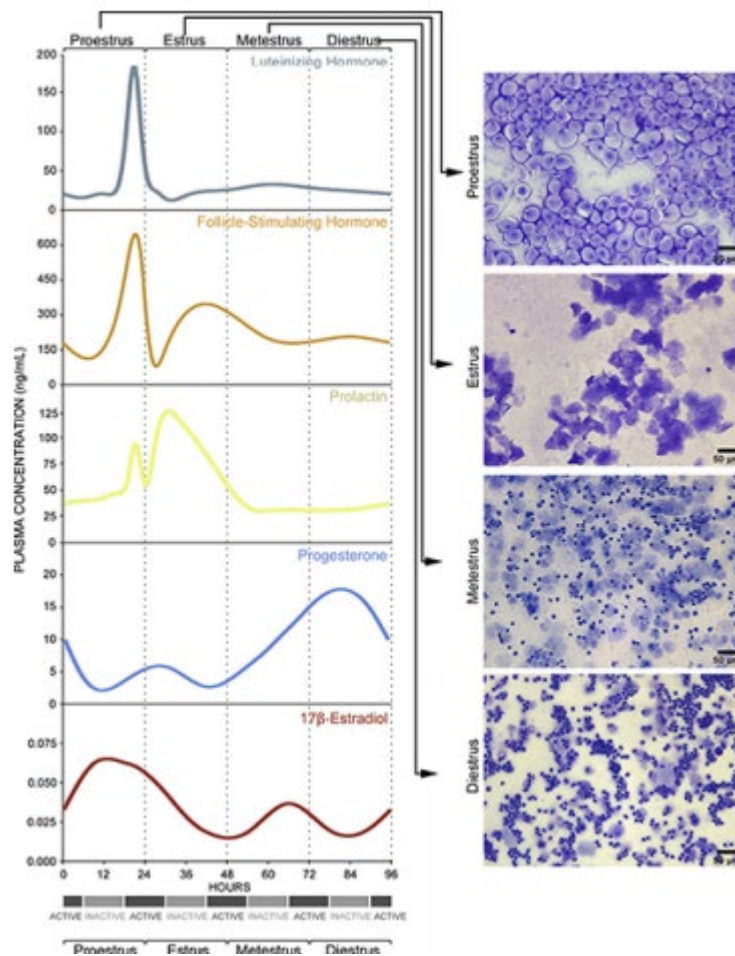


Figura 4. Variación hormonal en las diferentes fases del ciclo estral. Se identifican los diferentes picos de cada una de las hormonas involucradas en el ciclo estral, lo cual conlleva a cambios en la citología de la mucosa vaginal. (Mclean, *et. al.*, 2012)

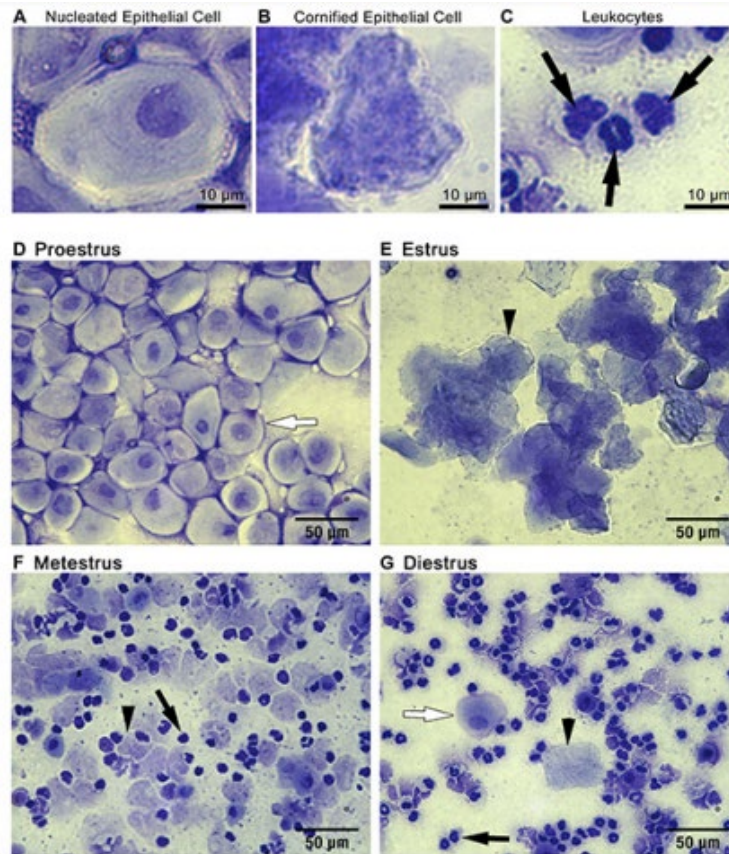


Figura 5. Evaluación citológica del frotis vaginal en las fases del ciclo estral. Se muestran tres tipos principales de células en las fotomicrografías: (A) células epiteliales nucleadas, (B) células epiteliales escamosas cornificadas y (C) leucocitos. La proporción de estos tipos de células presentes en el frotis se puede utilizar para identificar ratas en (D) proestro, (E) estro, (F) metestro o (G) diestro. Las puntas de flecha negra en E, F y G apuntan a células epiteliales escamosas cornificadas representativas. Las flechas negras en C, F y G apuntan a leucocitos representativos. Las flechas blancas en D y G resaltan las células epiteliales nucleadas representativas (Tomado de Mclean, *et. al.*, 2012)

1.5- Síntesis de hormonas esteroides

Las hormonas esteroides se clasifican en esteroides sexuales (andrógenos, estrógenos y progesterona), glucocorticoides (cortisol) y mineralocorticoides (aldosterona) (Gómez-Chang, *et. al.*, 2012), cuya síntesis tiene lugar principalmente, en los ovarios, en células específicas de la corteza adrenal y la placenta de las mujeres embarazadas (Palacios, 2016). Los esteroides sexuales,

proviene del colesterol, que por acción de diferentes enzimas se convierte en diferentes esteroides sexuales, según el órgano donde tiene lugar la transformación, las adrenales, los ovarios o el testículo (Becerro, 2008).

La producción de los esteroides en los ovarios es crucial para el desarrollo y la función normal de varios tejidos, estos poseen efectos locales sobre este tejido, los cuales son esenciales para la función ovárica normal, como sucede con la acción del estradiol en el desarrollo folicular (Becerro, 2008).

El precursor metabólico de las hormonas esteroideas es el colesterol y la activación de la síntesis de hormonas esteroideas implica la estimulación de la hidrólisis de los ésteres de colesterol y captación del colesterol en las mitocondrias de las células del órgano diana (Palacios, 2016). Es decir, las células teca y las granulosa expresan la molécula StAR, la cual transporta el colesterol a la membrana mitocondrial, donde se encuentran la mayor parte de las enzimas implicadas en la esteroidogénesis (Becerro, 2008).

El primer paso de esta biosíntesis, es la transformación del colesterol en pregnenolona, el cual se lleva a cabo por la acción de la enzima P450 11A1, esta transformación implica una hidroxilación inicial en las posiciones C20 y C22, seguido de la escisión de la cadena lateral del colesterol; La pregnenolona se convierte en progesterona gracias a la acción de la 3β -hidrosteroides deshidrogenasa (Palacios, 2016).

Los precursores inmediatos de los estrógenos son los esteroides androgénicos, a los cuales, una enzima denominada P450 aromatasa transforma los andrógenos en estrógenos mediante un complejo proceso de aromatización en el que para las hidroxilaciones se utiliza O_2 y NADPH; esta aromatasa actúa con dos sustratos, el primero es la testosterona, en el cual el producto es el estradiol y el segundo es la androstenediona, en el cual se da estrona. Las fuentes principales de los esteroides ováricos son: las células de la teca como la fuente de 17α -hidroxiprogesterona y androstendiona, las células de la granulosa son la fuente principal de estradiol y el cuerpo lúteo sintetiza y secreta progesterona, aunque también produce algo de estradiol (Palacios, 2016).

La producción de estrógenos por las células de la teca, requiere de la síntesis de androstendiona a partir del colesterol, bajo la acción de la LH, los andrógenos difunden hacia el compartimiento avascular de las células de la granulosa, a este nivel, y por efecto de la FSH, los andrógenos son biotransformados a estrógenos por acción de la aromatasa (Gómez-Chang, *et. al.*, 2012).

Las células de la granulosa luteinizadas se encargan de la producción de progesterona, hormona responsable de los cambios durante la fase lútea del ciclo menstrual. Una vez ocurrida la ovulación, las células del folículo ovárico van a construir el cuerpo lúteo, el cual sintetiza progesterona en respuesta a la LH a través de la vía MPc/PKA (Gómez-Chang, *et. al.*, 2012). Además, se sabe que existen otras vías de señalización que se activan de forma dependiente de AMPc, pero independiente de PKA, como en las células de la granulosa, donde a través de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina se activan Las vías MAPK (implicada en la regulación de la esteroidogénesis utilizando LH y Hcg), P13-K y PKB (Gómez-Chang, *et. al.*, 2012).

Las células de la teca y de la granulosa expresan receptores α - y β -adrenérgicos y su activación regula, por ejemplo, los niveles de AMPc y la producción de esteroides (Merz, *et. al.*, 2015). Ahora bien, estos en el ovario son en su mayoría del subtipo β_2 y, al actuar sobre estos receptores, la NA modifica el desarrollo folicular y las secreciones de esteroides; por lo tanto, se asocia con el desarrollo y mantenimiento de estructuras quísticas (Fernandois, *et. al.*, 2012).

1.6- Regulación nerviosa del ovario

Se sabe que el sistema nervioso controla las funciones de las gónadas a través del sistema hipotálamo-hipófisis, los nervios autónomos hacia y desde el ovario también se ven involucrados en una regulación del control vasomotor de los vasos sanguíneos y juegan un papel fisiológico en el control de la secreción hormonal del órgano (Gerendai, *et. al.*, 2005), también se sabe que la inervación ovárica participa en la foliculogénesis y la esteroidogénesis y que una denervación produce una disminución en la secreción de hormonas esteroides (Hernández, 2008). Además, se conoce que en ambos sexos las gónadas y otros órganos del sistema

reproductivo están inervados por fibras simpáticas y parasimpáticas eferentes pertenecientes al sistema nervioso autónomo (Gerendai, *et. al.*, 2005). Las neuronas preganglionares simpáticas están localizadas en la columna intermediolateral del segmento toracolumbar de la espina dorsal y las fibras nerviosas derivan del nervio vago (Gerendai y Halász, 2000) y normalmente, el ovario recibe fibras simpáticas postganglionares que derivan de cuerpos neuronales del ganglio ovárico y el ganglio celiaco y renal. En las ratas, el ovario recibe su inervación simpática de dos fuentes, el plexo nervioso ovárico (ONP) y el nervio ovárico superior (SON), los cuales viajan a través del tejido intersticial y alrededor de los folículos en desarrollo (figura 6), pero no penetran el cuerpo lúteo, además, estudios de histofluorescencia sugieren que las fibras son principalmente noradrenérgicas (Arrayya, *et. al.*, 2004). El SON, es el que lleva la mayor cantidad de la innervación simpática al ovario (Lara, *et. al.*, 1993; Barria, *et. al.*, 1993) y sus fibras se distribuyen principalmente en la capa perifolicular de la teca, en estrecha relación con las células de la teca interna, pero las células de la granulosa y las células lúteas no están directamente inervadas (Aguado, 2002).

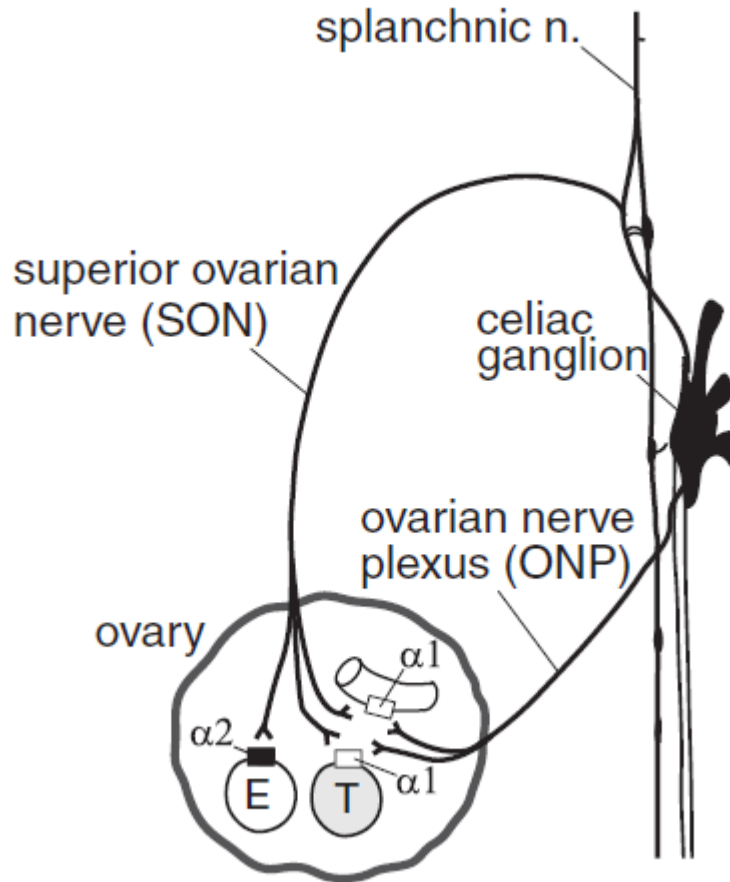


Figura 6. Posible mecanismo para la regulación de la secreción de testosterona, la secreción de estradiol y el flujo sanguíneo del ovario por estimulación del SON y ONP. La célula E y la célula T son células productoras de estradiol y testosterona, respectivamente. (Recuperado de Uchida y Kagitani, 2014).

El ovario recibe fibras nerviosas del tipo noradrenérgicas, colinérgicas, gabaérgicas y peptidérgicas (Tóth, *et. al.*, 2007) y en las ratas, las acciones más importantes se realizan a través de la noradrenalina (NA) y del péptido intestinal vasoactivo (VIP), los cuales, están contenidos y son liberados de las fibras nerviosas (Grainer, 2008) y para que estos neurotransmisores actúen en el ovario y esta acción tenga una acción fisiológica deben existir estructuras aptas para la transducción de la información y estos son los receptores adrenérgicos específicos (Aguado, 2002), los cuales han sido caracterizados como receptores α_{1a} , α_{1b} , α_{1d} (Manni, *et.al.*, 2005)

y β_2 (Aguado, 2002), la NA, actúa sobre estos receptores, presentes en las células de la granulosa y en las células de la teca, estimulando la producción de progesterona y andrógenos; y el VIP actúa sobre sus propios receptores, estimulando la liberación de estradiol y progesterona (Grainer, *et. al.*, 2008). El número total de los receptores β_2 adrenérgicos varían durante el ciclo estral, alcanzando su pico más alto en el proestro tardío y cayendo estos niveles, coincidiendo con el pico preovulatorio de gonadotropinas, después de esto, se mantienen bajos hasta el estro y alcanzando sus niveles máximos durante el estro (Aguado, 2002).

Asimismo, la cantidad de receptores esta modulada por la inervación y no por las catecolaminas circulantes, de modo que cuando éstas llegan al ovario, deberían actuar sobre una cantidad de receptores previamente determinada y que la regulación de estos es provocada por los neurotransmisores que llegan a las vías neurales de manera negativa (regulación a la baja) (Aguado, 2002).

1.7- Síndrome de ovario poliquístico.

El síndrome de ovario poliquístico, es una de las afecciones más comunes en el sistema endocrino, afectando del 9-18% de las mujeres en edad reproductiva (Paixão, *et. al.*, 2017). La etiología del síndrome de ovario poliquístico sigue siendo incierta, y en base a la heterogeneidad en su presentación a veces se ve como una combinación de varios trastornos. Las características más comunes son altos niveles en el flujo de andrógenos y estrógenos, así como una resistencia a la insulina (Maliqueo, *et. al.*, 2014).

La descripción inicial del síndrome de ovario poliquístico por Stein y Leventhal en 1935, se hizo con base en el cuadro clínico de amenorrea e hirsutismo, y en las características morfológicas de los ovarios observados por neumoperitoneo, como también por cirugía y estudios de histopatología. Posteriormente se demostró la presencia en suero de mayores concentraciones de andrógenos de origen ovárico y suprarrenal, también presentan mayor secreción de la LH con relación a la FSH (Morán, *et. al.*, 2006). Además, se sabe que el síndrome de ovario poliquístico está caracterizado por una reducción en la fertilidad, debido a la maduración folicular

disfuncional y ovulación y aborto involuntario, desregulación en hormonas reproductivas incluyendo la LH e hiperandrogenismo, que causa acné e hirsutismo (Walters, *et. al.*, 2012).

Sobre el diagnóstico de este síndrome, se han realizado diferentes consensos, en los cuales se dieron pautas para poder llegar a un diagnóstico acertado, el primero de estos fue realizado en 1990, por el Instituto Nacional de la Salud (NIH) de los Estados Unidos, en este se llegó a la conclusión de que se define al SOP por la presencia de hiperandrogenismo y anovulación crónica (Winnykamien, *et. al.*, 2017), en el año 2003, se realiza el segundo consenso, en el cual 27 expertos en Rotterdam (Holanda), auspiciados por la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología y la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva, en el cual, se estableció que una paciente tiene SOP frente a la presencia de 2 de 3 de los siguientes factores: 1) Hiperandrogenismo clínico o bioquímico, 2) anovulación crónica, 3) poliquistosis ovárica por ecografía (Winnykamien, *et. al.*, 2017); gracias a este consenso, se logró tener un aumento en la frecuencia de diagnóstico del síndrome. Posteriormente, en 2006, la Sociedad de Exceso de Andrógenos reunió 5 investigadores, los cuales llegaron a la conclusión de que el SOP es un trastorno predominantemente de exceso de andrógenos y su diagnóstico debe basarse en la presencia de hiperandrogenismo. El hecho de tener tres diferentes consensos, generó mayor dificultad y controversia en el diagnóstico, por eso, en 2012, el NIH reunió 29 expertos, en el cual se recomendó el uso del criterio más amplio, el consenso de Rotterdam de 2003 (Winnykamien, *et. al.*, 2017).

Sobre su etiología, existen diferentes teorías, la teoría central es una teoría, la cual, trata de explicar la etiología de este síndrome, explica que durante el ciclo menstrual, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es liberada de forma pulsátil por neuronas hipotalámicas especializadas y estimular la síntesis y secreción de LH y FSH por la hipófisis, durante el ciclo, existen dos fases, la fase folicular, en la cual, existe una secreción preferencial de FSH, la cual estimula el desarrollo folicular e induce receptores LH y activa aromatasa en las células de la teca, en la segunda fase predomina la secreción de LH. Ahora bien, en las mujeres

con SOP, se observa un aumento en la frecuencia de secreción de pulsos de GnRH, lo que produciría una mayor frecuencia y amplitud de LH (que, mantenido en forma crónica, podría promover hiperandrogenismo) y niveles bajos de FSH, insuficientes para la foliculogénesis y la ovulación (Mira, 2005). La segunda teoría es la teoría ovárica, en esta se postuló que en pacientes con SOP hay una alteración enzimática en P450c17, el cual es una enzima bifuncional, dado que tiene una actividad 17 α hidroxilasa y 17,20 liasa, en las células de la teca, este convierte a la progesterona en 17-hidroxiprogesterona y después a testosterona; existe un estado de hiperandrogenismo funcional ovárico en el 80% de los pacientes con SOP, el cual está caracterizado por una respuesta tecal aumentada a la síntesis de andrógenos consecuencia de una actividad aumentada de la enzima P450c17 (Fux, *et. al.*, 2013). Por la parte adrenal, se sabe que entre el 50 al 70% de las mujeres con SOP tienen una producción excesiva de andrógenos adrenales (Mira, 2005) y existe evidencia que sustenta un aumento en la actividad de la enzima P-450c17 en la zona reticular de la glándula suprarrenal en las pacientes con hiperandrogenismo adrenal funcional y se ha demostrado que existe un aumento en los niveles séricos de precursores de esteroides sexuales adrenales y se postula que el exceso de insulina podría amplificar la acción enzimática y la síntesis de andrógenos adrenales (Fux, *et. al.*, 2013). La resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia se encuentra ampliamente relacionada con el SOP, teniendo una prevalencia del 60-80 % y cumpliendo un rol importante ya que, la hiperinsulinemia compensatoria puede contribuir al hiperandrogenismo. Se sabe que la insulina aumenta la actividad de la enzima P450c17 estimulando la producción de andrógenos *in vitro*, en el ovario esto lo hace cuando de forma directa sobre sus propios receptores. La insulina inhibe la síntesis de la hemoglobina transportadora de hormonas sexuales y actúa en conjunto con la LH para incrementar la producción de andrógenos por parte de las células de la teca y en la medula suprarrenal potencia la acción de la ACTH que tiene el mismo efecto que en las células de la teca (Fux *et. al.*, 2013). La parte genética es otro tipo de factores que se cree que están relacionados con la etiología del síndrome, existe múltiple evidencia de que los factores genéticos están implicados en el SOP, existe especial interés en los genes relacionados con el eje

hipotálamo hipófisis ovario, los involucrados con el metabolismo de andrógenos y de la insulina (Mira, 2005), un estudio reciente identificó al gen CAPN10, considerado como el primer poligén asociado a la diabetes mellitus II (DMII) y se está estudiando la posible asociación entre los alelos y haplotipos de este gen con las características del SOP, este gen codifica para la calpaína, una proteína relacionada con la resistencia a la insulina (Fux, *et. al.*, 2013). Por último, existe una relación entre el sistema nervioso simpático y el SOP, dado que existe una resistencia a la insulina, obesidad y AOS en pacientes con SOP, las cuales son consecuencia de la hiperactividad del sistema nervioso simpático, se ha encontrado evidencia en animales tratados con valerato de estradiol que estos presentan una mayor expresión de RNAm de los receptores α_{1a} y niveles más bajos de RNAm de α_{2a} (simpatoinhibidor), lo cual es un indicador de una hiperactividad de este sistema, también presentan morfología ovárica alterada, anovulación y niveles altos de LH, pero no presentan resistencia a la insulina grasa abdominal o hiperandrogenismo, todo esto desdeña que el tratamiento con valerato de estradiol aumenta el flujo de salida simpático en el ovario, provocando un down regulation de los receptores adrenérgicos y finalmente produciendo quistes, teniendo como consecuencia funcional un aumento en la respuesta de la progesterona y los andrógenos a la gonadotropina coriónica humana y un agonista de los adrenorreceptores beta, otros estudios demuestran que un tratamiento con estradiol aumenta la síntesis ovárica del factor de crecimiento ovárico (NGF) y este, acompañado de una hiperactividad ovárica parecen tener un papel importante en la morfología ovárica y además, se ha comprobado que una sección del SON restaura la ciclicidad y la capacidad ovulatoria (Lansdown y Ress, 2012).

1.8- Signos y síntomas.

Los pacientes que sufren SOP generalmente tienen obesidad, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hiperandrogenemia, dislipidemia, aumento de los niveles de activador del plasminógeno y aumento de la presión sanguínea. Se sugiere que el síndrome de ovario poliquístico es una enfermedad metabólica y endocrinológica, el 15% de los pacientes que presentan el síndrome que tienen pruebas iniciales de tolerancia a la glucosa, se les diagnostica una alteración en la tolerancia a la glucosa

o diabetes mellitus tipo 2 en un periodo de 5-7 años. El porcentaje de pacientes con resistencia a la insulina en con el síndrome es 43-76%. En estos pacientes, se ha demostrado que hay un aumento en la tasa de diabetes mellitus tipo 2 y alteración de la tolerancia a la glucosa a una tasa de 5-30%, se han realizado diversos estudios con los niveles de glucosa, insulina y marcadores de estrés oxidativo, los cuales sugieren que los niveles de glucosa e insulina son significativamente más altos en pacientes con síndrome de ovario poliquístico que en la población normal (Dikmen, *et. al.*, 2012).

1.9- Inducción del síndrome de ovario poliquístico en rata.

Ahora bien, los sistemas reproductivos del humano y de otros vertebrados son muy similares, particularmente en el ovario, los procesos bioquímicos y fisiológicos son idénticos, no solo en la estructura anatómica, sino en la también en la formación de células germinales el posterior desarrollo y crecimiento de folículos primordiales a folículos de terciarios, y eventual ovulación. Como las roedores hembras tienen un ciclicidad ovárica de 4 o 5 días, con distintas fases en el ciclo estral, las cuales son, proestro, estro y diestro, los modelos de síndrome de ovario poliquístico con ratas inducido experimentalmente, son utilizados frecuentemente para estudiar la fisiopatología del síndrome y la validez de estos ha sido descrita muchas veces en el literatura, entre los modelos de ratas propuestos se encuentran: la androgenización neonatal, la administración de hCG a ratas hipotiroideas, la inyección de valerato de estradiol y mantener a los animales en constante luz (Dikmen, *et. al.*, 2012).

El valerato de estradiol es un estrógeno eficaz y bien tolerado, adecuado para el tratamiento de ciertos síntomas neurovegetativos, psicógenos y somáticos que se derivan del cambio de la actividad endocrina del ovario. El valerato de estradiol induce efectos hormonales específicos sobre los órganos reproductores y también sobre otros órganos (Carreto, 2004). Cuando se administra como dosis única (2 mg) a ratas hembras con ovarios intactos provoca estro persistente asociado con ovarios poliquístico y paralelamente una lesión histológica identificable en el núcleo arcuato hipotalámico, concretamente disminuye las concentraciones de β -endorfinas, a los

60 días que se administra (Valenzuela, 2010). Se ha demostrado en ratas con SOP inducido con valerato de estradiol produce cambios en la homeostasis de las catecolaminas que comienzan antes de la formación del quiste, aumenta la concentración y liberación de noradrenalina (NA) de las terminales simpáticas hacia el ovario y aumenta la actividad de la enzima limitante para la síntesis de catecolaminas la tirosina hidroxilasa (TH), así mismo se presenta una down-regulation de los receptores β_2 -adrenérgicos en las células de la teca, este es un elemento de respuesta para los esteroides, en ese caso el estradiol tendría un sustrato génico sobre el que actúa y provoca los cambios en la actividad nerviosa. De igual forma se sabe que los neurotransmisores que actúan en el ovario son las catecolaminas, estos se activan vía la activación de los receptores β_2 -adrenérgicos, los cuales presentan cambios en su concentración durante el ciclo estral normal, siendo su mayor expresión en el diestro y mínima en estro. Su compromiso en la regulación del ovario se ha demostrado tanto a nivel esteroidogénico (principalmente secreción de progesterona) como folículo-génico, la activación de los receptores β_2 -adrenérgicos aumenta la secreción de esteroides en presencia de gonadotropinas (Fernandois, 2011).

Los receptores β_2 -adrenérgicos son receptores acoplados a proteínas G, que cuando su ligando se une, se favorece el intercambio de guanósín difosfato (GDP) por guanósín trifosfato (GTP) en las subunidades $G\alpha$, que por consiguiente se disocian de los dímeros $\beta\gamma$. Las subunidades libres $G\alpha$ y $\beta\gamma$ interactúan con efectores (como adenilil ciclase o fosfolipasas) para desencadenar cascadas de transducción de señales (Oliver, *et. al.*, 2019). Ahora bien, la butoxamina es un antagonista selectivo de los receptores β_2 -adrenérgicos, el cual se une a los receptores, pero no activa la enzima adenilato ciclase, la unión es específica y al unirse, el receptor es incapaz de formar un complejo ternario con la proteína G (Velasco, *et. al.*, 2002) provocando que las casadas de señalización no ocurran.

1.10- Regulación nerviosa en el síndrome de ovario poliquístico.

La etiología del SOP es desconocida, se considera una suma de varios factores y principalmente una disfunción en el eje hipotálamo-hipofisis-gónada. En recientes

años, se ha tomado en cuenta al sistema nervioso simpático en el desarrollo de este síndrome y de su morfología ovárica distintiva, dado que los ovarios con SOP, presentan una gran densidad de fibras nerviosas catecolaminérgicas con aumento de actividad del sistema nervioso simpático, lo que hace que se plantee que el incremento de actividad nerviosa simpática puede contribuir al aumento de secreción de andrógenos ováricos (Ladrón de Guevara, et al., 2013). Existe evidencia de que si ocurre una estimulación de los nervios extrínsecos al ovario se reduce el flujo sanguíneo a través del ovario, mientras que la estimulación del SON, pero no del ONP, reduce la producción de estrógenos (Kagitani, et. al., 2011), lo cual apoya a la hipótesis de que el sistema nervioso simpático se ve involucrado en el desarrollo del SOP. Otro punto que apoya a esta hipótesis es que, por diversos factores, dentro y fuera del eje hipotálamo-hipófisis, se genera una hiperactividad de las células de la teca interna, con aumento de la actividad de la enzima P450c17, por lo que se aumenta la síntesis de andrógenos, e inactividad de células de la granulosa, con disminución de la actividad de la enzima P450 aromatasas, lo que conlleva a una menor conversión de andrógenos a estrógenos, resultando en hiperandrogenismo (Apablaza, 2000). También se sabe que la secreción de estradiol en el ovario es inhibida directamente por el SON mediante la activación de los receptores α_2 -adrenérgicos en lugar de la influencia indirecta de la reducción del flujo sanguíneo ovárico. Además, se ha demostrado que los efectos inhibidores del SON sobre la secreción de estradiol ovárico se activan en ratas anestesiadas por estrés físico (Uchida y Kagitani, 2016). Algunos resultados sugieren que los nervios ováricos autónomos regulan la secreción de estradiol ovárico, sin embargo, ningún informe ha examinado el efecto de la estimulación directa de los nervios autónomos que inervan el ovario sobre la secreción de estradiol en condiciones fisiológicas in vivo (Uchida, 2015).

Estudios han demostrado que el desarrollo y el funcionamiento de la inervación ovárica simpática depende de la capacidad de las células de la pared folicular de sintetizar el factor de crecimiento nervioso (NGF) y de la activación de sus receptores de baja afinidad p75 NTR (Lara, et. al, 2000). En un modelo de inducción de SOP con valerato de estradiol se ha demostrado que existe un aumento en la

síntesis de NGF y su receptor de baja afinidad p75NTR en el ovario y que un bloqueo de las acciones de estos restaura la morfología ovárica (Lara, *et. al.*, 2000). Otro trabajo realizado por Dissen y colaboradores en el 2000, en el cual, utilizaron células injertadas las cuales producían NGF, encontraron que el aumento en la cantidad de este factor es suficiente para iniciar el desarrollo de alteraciones estructurales y funcionales asociadas con el desarrollo de quistes ováricos, característicos del SOP y menciona que la actividad simpática elevada está relacionada con el aumento del NGF y p75NTR. Ambos autores encontraron también un aumento en la actividad de la tirosina hidroxilasa (TH), enzima involucrada en la síntesis de NE, lo cual también indica una actividad del sistema nervioso simpático aumentada. Estudios han demostrado que un aumento en la liberación de NE y en la actividad de TH antes y durante la formación de quistes indica que los folículos ováricos están sujetos a un tono noradrenérgico aumentado ejercido por la inervación simpática y que los receptores β -adrenérgicos están regulados a la baja cuando existe un aumento en las catecolaminas (Lara, *et. al.*, 1993). Todas estas observaciones encontradas, apoyan la noción de que, el sistema nervioso simpático, está relacionado con la etiología del SOP.

2- Justificación.

El SOP es una de las afecciones más comunes de las mujeres en edad reproductiva (Paixão, *et. al.*, 2017), es un síndrome de etiología desconocida el cual es considerado una combinación de varios trastornos neuroendocrinos (Maliqueo, *et. al.*, 2014) caracterizado por una falla ovulatoria, hiperandrogenismo, niveles variables de gonadotropinas y quistes foliculares (Manni, *et. al.*, 2005). Estudios realizados durante varias décadas toman en cuenta muchas causas por las cuales este síndrome se puede originar, pero recientemente se le está dando énfasis a la teoría que relaciona la hiperactividad del sistema nervioso simpático, dado que se ha encontrado una gran cantidad de fibras catecolaminérgicas en pacientes con SOP (Ladrón de Guevara, *et al.*, 2013). El sistema nervioso simpático se encarga de actividades importantes en el funcionamiento del ovario, como lo son la

esteroidogénesis y la foliculogénesis (Gerendai, *et. al.*, 2005; Hernández, 2008) que fallan en el SOP, además está relacionado con la resistencia a la insulina y la apnea obstructiva del sueño (AOS). Estudios previos han encontrado que existe una hiperactividad del sistema nervioso simpático al encontrar una elevada concentración de NA que actúa sobre los receptores adrenérgicos (Lara, *et. al.*, 1993; Barria, *et. al.*, 1993; Kagitani, *et. al.*, 2011), y que ocasiona una regulación a la baja de estos receptores en el ovario (Lara, *et. al.*, 1993; Aguado, 2002; Lansdown y Ress, 2012) y la formación de quistes ováricos (Lara, *et. al.*, 1993; Barria, *et. al.*, 1993, Lara, *et. al.*, 2000, Manni, *et. al.*, 2005). De acuerdo con Lara y cols., 2000, relacionan el factor de crecimiento nervioso (NGF) y su receptor de baja afinidad (p75NTR) con la hiperactividad del sistema nervioso simpático presente en el modelo de SOP inducido por VE, además, mencionan que el desarrollo y funcionamiento de la inervación simpática depende de la capacidad de sintetizar este factor de crecimiento por las fibras que inervan al ovario. Asimismo, se ha observado un aumento en la actividad de la tirosina hidroxilasa, enzima involucrada en la síntesis de NA, uno de los neurotransmisores más abundantes en el sistema nervioso simpático (Lara, *et. al.*, 1993). La actividad aumentada del sistema nervioso simpático provoca un aumento en el volumen de catecolaminas, e induce que los receptores β -adrenérgicos estén regulados a la baja (Lara, *et. al.*, 1993). Los receptores β -adrenérgicos son receptores acoplados a proteínas G (Oliver, *et. al.*, 2019) y se encuentran en las células de la teca y de la granulosa, y tienen un papel regulador en la producción de hormonas esteroides (Merz, *et. al.*, 2015); en su mayoría se encuentran los receptores del subtipo β_2 , los cuales tienen un papel en la regulación del ovario a nivel esteroidogénico (secreción de progesterona) y foliculogénico (Fernandois, 2011). La activación de los receptores β_2 -adrenérgicos, aumenta la secreción de esteroides en presencia de gonadotropinas (Hernández, 2008). Por lo anterior en un modelo animal con inducción de SOP con VE en la edad infantil, el bloqueo selectivo de los receptores β_2 -adrenérgicos con un antagonista selectivo como la butoxamina en la etapa adulta, producirá una disminución de la actividad de dichos receptores que dará como resultado que la actividad de la NA como neurotransmisor del sistema nervioso simpático disminuya la formación de

quistes ováricos, y por ende, se generará un restablecimiento en la síntesis de andrógenos ováricos que dará como resultado la ovulación.

3- Hipótesis.

El bloqueo selectivo de los receptores β_2 -adrenérgicos ováricos en la etapa adulta, inducirá la recuperación del funcionamiento ovárico y la morfología ovárica al primer, segundo y cuarto ciclo estral, en un modelo de rata con SOP inducido con VE en la etapa infantil.

4- Objetivos.

4.1- Objetivo general.

- Evaluar la respuesta ovulatoria y la morfología ovárica al primer, segundo y cuarto ciclo estral posterior al bloqueo selectivo de los receptores β_2 -adrenérgicos ováricos, en un modelo de rata con SOP inducido con VE en la etapa infantil.

4.2- Objetivos Particulares.

- Analizar si al primer ciclo estral del bloqueo selectivo de los receptores β_2 -adrenérgicos ováricos en la etapa adulta, se reestablecen las funciones ováricas: tasa de animales ovulantes, número de ovocitos, peso de ovarios y morfología ovárica, en el modelo de SOP inducido con VE en la etapa infantil.
- Analizar si al segundo ciclo estral del bloqueo selectivo de los receptores β_2 -adrenérgicos ováricos en la etapa adulta, se reestablecen las funciones ováricas: tasa de animales ovulantes, número de ovocitos, peso de ovarios y morfología ovárica, en el modelo de SOP inducido con VE en la etapa infantil.
- Analizar si al cuarto ciclo estral del bloqueo selectivo de los receptores β_2 -adrenérgicos ováricos en la etapa adulta, se reestablecen las funciones ováricas: tasa de animales ovulantes, número de ovocitos, peso de ovarios y morfología ovárica, en el modelo de SOP inducido con VE en la etapa infantil.

5- Material y métodos.

5.1- Diagrama de trabajo.

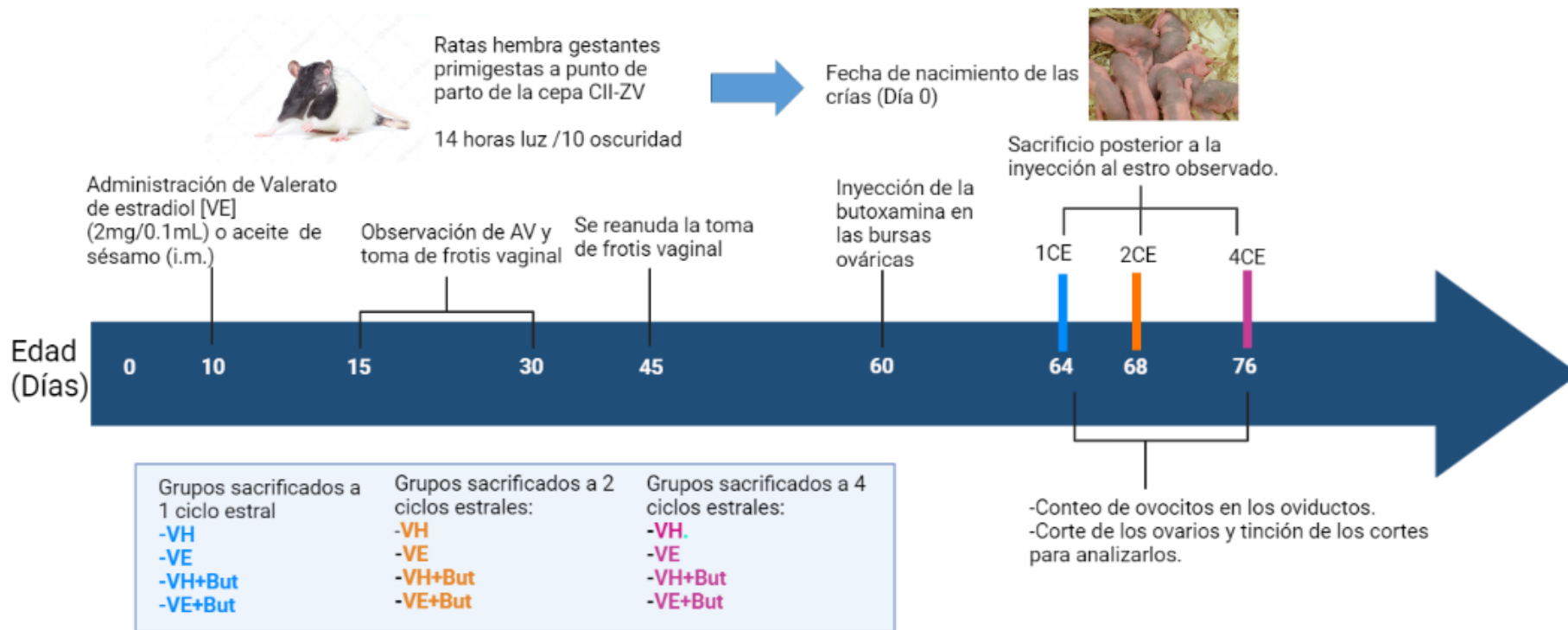


Figura 7. Diagrama de trabajo.

5.2- Sujetos de experimentación.

Todos los procedimientos descritos fueron desarrollados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana del cuidado y manejo de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y fueron aprobados por el Comité del Bioterio "Claude Bernard" de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Se solicitaron 10 ratas gestantes primigestas de la cepa Long Evans (CII-ZV), de las crías obtenidas se utilizarán exclusivamente las hembras, las cuales fueron mantenidas en fotoperiodo controlado de 14 h luz y 10 h de oscuridad (luces encendidas de las 05:00 a 19:00 h) con acceso a agua y alimento ad libitum. Los animales fueron colocados en cajas de acrílico en grupos de cinco.

5.3- Inducción del síndrome de ovario poliquístico.

A los 10 días post-natal, se realizaron dos administraciones, una a los grupos vehículo y otra a los grupos SOP, a estos se les administró una dosis de 2 mg de VE diluido en 0.1 mL de aceite de sésamo por vía intramuscular; las ratas del grupo vehículo se les administró 0.1 mL aceite de sésamo vía intramuscular.

5.4- Registro del ciclo estral.

Se realizó el registro de los cambios del epitelio vaginal por medio de frotis obtenidos de la mucosa vaginal, a partir de los 15 postnatales en los grupos SOP, el registro se realizó diariamente entre las 9:00 y 11:00 h a lo largo de 15 días, para corroborar la correcta inducción del SOP, transcurridos estos 15 días se pausaba el registro del ciclo estral y cuando las ratas cumplían los 45 días de edad, se retomaban los frotis vaginales a los grupos SOP y se comenzaban los frotis a los grupos vehículo, dado que estos animales tenían su AV en esos días, el segundo registro se realizó diariamente durante 15 días entre las 9:00 y 11:00 h. En el estudio se utilizaron animales que presentaban estro constante en el caso del grupo VE y que presentaron al menos tres ciclos consecutivos de cuatro días de duración: estro, diestro-1, diestro-2 y proestro (animales cíclicos) en los grupos vehículo.

5.5- Procedimiento quirúrgico.

Las cirugías se realizaron en animales anestesiados con pentobarbital debido a que los anestésicos convencionales son antagonistas adrenérgicos, los cuales afectan los resultados experimentales. Las cirugías se realizaron entre las 9:00 y 10:00 h cuando los animales presentaban un estro constante en los grupos VE y cuando presentaban un estro precedido de 3 ciclos estrales.

Una vez anestesiados los animales, se les practico una incisión dorsal en el lado izquierdo o derecho que abarcó piel y músculo, y se exteriorizó el ovario respectivo localizando en la bursa ovárica, en donde se introdujo una jeringa Hamilton de 100 μ L (Hamilton, USA) con una aguja de 29 mm. Con ayuda de una bomba de infusión nanomolar Nano-injector, Stepper Motorized d (Stolting Co., USA), calibrada para administrar 20 μ L en 20 segundos, se inyectó el antagonista de acuerdo al grupo experimental a trabajar.

El antagonista selectivo utilizado en este estudio fue:

Butoxamina [100 μ g/20 μ L] (Sigma-Aldrich Co. USA) un antagonista selectivo de los receptores β_2 - adrenérgicos.

Como índice de comparación, se incluyeron grupos control en los que se administró solución salina. Estos animales fueron divididos en tres grupos experimentales, grupo 1CE, grupo 2CE y grupo 4CE a su vez, estos grupos experimentales fueron divididos en 4 grupos de animales (n=5), a los cuales, a dos grupos (un grupo VE y un grupo VH) se les inyectó la butoxamina en la bursa ovárica con la finalidad de analizar los efectos del bloqueo de los receptores β_2 - adrenérgicos.

Al término de la cirugía, la herida fue tratada con antiséptico y los animales fueron devueltos a su caja de acrílico correspondiente. Al día siguiente se reanudo la toma de frotis vaginal. Los animales fueron sacrificados según su grupo experimental, al siguiente ciclo estral, a los dos ciclos estrales o a los cuatro ciclos estrales.

5.6- Procedimiento de autopsia.

Los animales fueron pesados en una balanza granataria, se les tomó frotis vaginal e inmediatamente fueron sacrificados por decapitación entre las 9:00 y 11:00 h del

estrogeno vaginal esperado. De los animales sacrificados se obtuvo la sangre del tronco y fue almacenada a -20 °C, se obtuvo el peso de cada ovario, peso del útero, pesos de las adrenales y peso de la hipófisis, se disecaron los ovarios y el útero y fueron conservados en paraformaldehído al 4% para la realización de cortes histológicos.

En otros grupos experimentales se realizó una perfusión intracardiaca con solución salina para la exanguinación seguida de la perfusión con paraformaldehído al 4% (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) para la fijación del tejido ovárico y realización de cortes histológicos.

5.7- Conteo de ovocitos.

De los animales sacrificados por decapitación, se disecaron los oviductos y se inspeccionaron para buscar ovocitos bajo el microscopio estereotáxico, los cuales fueron contados siguiendo la metodología del grupo de investigación de Morales y colaboradores, del resultado obtenido, se calculó la tasa de animales ovulantes.

5.8- Cortes histológicos.

Se utilizaron ovarios obtenidos de todos los grupos experimentales, para proceder a realizar los cortes, el primer paso fue pasarlos de paraformaldehído al 4% a sacarosa al 10% por 24 horas, transcurridas esas 24 horas, los ovarios se colocaron en sacarosa al 20% durante 24 horas y, por último, se pusieron en sacarosa al 30% por otras 24 horas para proceder a realizar los cortes histológicos. Para la realización de los cortes histológicos se utilizó un criogel de la marca Leica, después con ayuda del criostato (Microtome cryostat HM 500, MICROM International GmbH) se procedió a realizar los cortes de 10 μm de grosor a una temperatura de -20 °C, temperatura en la cual el gel fijaba el corte a los portaobjetos para que posteriormente se realizara el tren de tinción de hematoxilina-eosina, técnica en la cual se necesitan un colorante básico y otro ácido, la hematoxilina es el colorante básico, la cual tiñe las estructuras ácidas como el núcleo de un color azul púrpuro y la eosina, al ser un colorante ácido, tiñe de una tonalidad rosa a las estructuras básicas, tales como la mayoría de las proteínas citoplasmática (Cruz-Castán, *et. al.*, 2014), esto con el fin de identificar estructuras características del síndrome de ovario

poliquístico y estructuras características de un ovario normal con ayuda de un microscopio.

5.9- Análisis estadísticos.

La tasa de animales ovulantes fue analizado con la prueba de probabilidad exacta de Fisher. El número de ovocitos se analizó por medio de la prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba U Mann-Whitney, el peso corporal se analizó con una ANOVA de una vía, el peso de los ovarios se analizó con una prueba Kruskal-Wallis y la apertura vaginal se analizó con una prueba U Mann-Whitney.

6- Resultados.

6.1- Apertura vaginal

Se monitoreó la AV en los animales a partir de la administración de VH o VE. La AV de los animales del grupo VH fue de 38.92 ± 0.40 días, mientras que del grupo VE fue de 14.30 ± 0.09 días (figura 8). Los datos de la AV muestran una diferencia significativa entre el grupo VH respecto al grupo tratado con VE ($p < 0.0001$, prueba U Mann-Whitney).

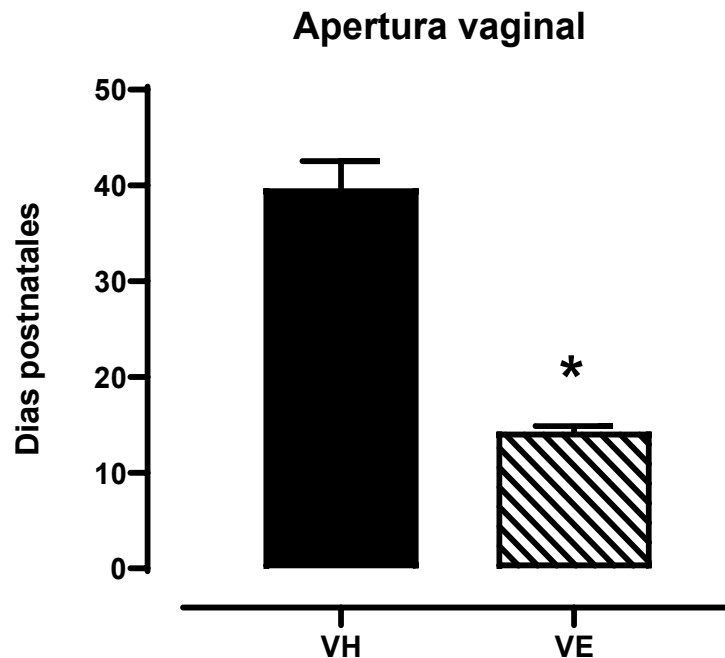


Figura 8. Apertura vaginal. Se muestra el promedio \pm SEM de la AV de los animales tratados con aceite de sésamo (VH) o VE (2 mg/0.1 mL) a los 10 días postnatal. * $p < 0.0001$ respecto al grupo VH con una prueba de U Mann-Whitney.

6.2- Peso corporal al momento del sacrificio.

El peso corporal de los animales fue registrado al momento del sacrificio de cada uno de los grupos experimentales. Los grupos de animales sacrificados al primer ciclo estral posterior a la inyección presentaron variaciones en los pesos corporales registrados. No existe diferencia significativa entre el peso corporal del grupo VH (202.44 \pm 4.47 g) respecto al peso corporal del grupo VH + But (202.5 \pm 4.32 g, $p = 0.999$, Prueba ANOVA de una vía) ni del grupo VE (173.87 \pm 9.68 g, $p = 0.0728$, Prueba ANOVA de una vía). El peso corporal del grupo VE + But (142.66 \pm 7.45 g de peso corporal) disminuyó significativamente respecto al grupo VH (202.44 \pm 4.47 g, $p = 0.00014$, Prueba ANOVA de una vía), al grupo VH + But (202.5 \pm 4.32 g de peso corporal, $p < 0.0001$, Prueba ANOVA de una vía) y el grupo VE (173.87 \pm 9.68 g, $p = 0.0195$, Prueba ANOVA de una vía) (Figura 9).

En los animales sacrificados a los dos ciclos estrales posteriores inyección se encontró que no hubo cambios significativos en el peso corporal del grupo VH (202.44 ± 4.47 g), del grupo VH + But (200.7 ± 6.69 g, $p = 0.997$, Prueba ANOVA de una vía) y del grupo VE (221.25 ± 8.76 g, $p = 0.088$, Prueba ANOVA de una vía). El peso corporal del grupo VE + But (228.4 ± 7.86 g) aumentó significativamente respecto al grupo VH (202.44 ± 4.47 g, $p = 0.005$, Prueba ANOVA de una vía) y al grupo VH + But (200.7 ± 6.69 g, $p = 0.0031$, Prueba ANOVA de una vía) (Figura 9). No hubo diferencias en el peso corporal del grupo VE (221.25 ± 8.76 g) y el grupo VE + But (228.4 ± 7.86 g, $p = 0.635$, Prueba ANOVA de una vía). (Figura 9).

A los cuatro ciclos estrales posteriores a la inyección, no hubo cambios en el peso corporal del grupo VH (212.14 ± 3.18 g) y VE (228.82 ± 9.72 g). Hubo un aumento significativo de peso corporal del grupo VH + But (229.03 ± 4.91 g) respecto al grupo VH (212.14 ± 3.18 g $p < 0.0001$, Prueba ANOVA de una vía). El grupo VE + But (254.66 ± 5.16 g) tuvo un aumento significativo de peso corporal respecto al grupo VH (212.14 ± 3.18 g $p < 0.0001$, Prueba ANOVA de una vía), VH + But (229.03 ± 4.91 g $p = 0.0008$, Prueba ANOVA de una vía) y VE (228.82 ± 9.72 g $p = 0.0003$, Prueba ANOVA de una vía) (figura 9).

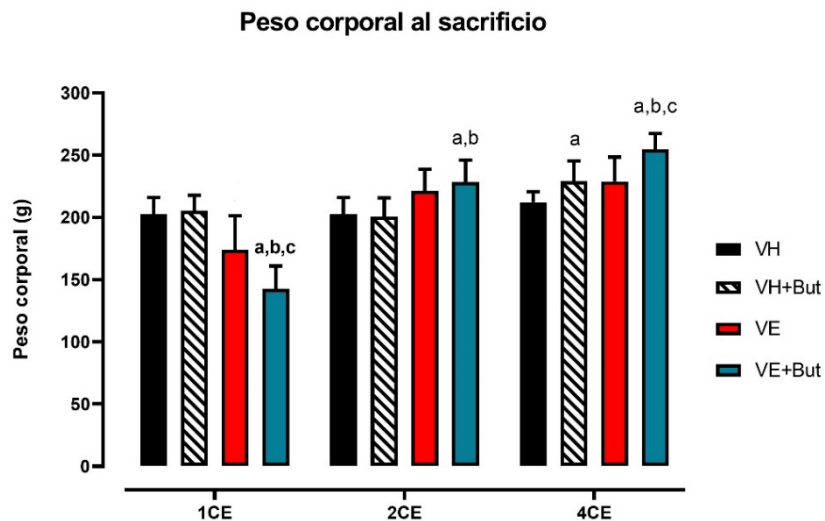


Figura 9. Peso corporal al momento del sacrificio. Se muestra la media \pm SEM del peso corporal de los grupos VH, VH + But, VE y VE + But sacrificados a uno, dos o cuatro ciclos estrales posteriores a la inyección de NaCl o butoxamina [$100 \mu\text{g}/20 \mu\text{L}$] en las bolsas ováricas. ANOVA de una vía y una prueba Tukey pos hoc. a) $p < 0.05$ respecto al grupo VH, b) $p < 0.05$ respecto al grupo Vh + But y c) $p < 0.05$ respecto al grupo VE.

6.3- Tasa de animales ovulantes.

Se registró el número de animales que presentaron ovulación en los diferentes grupos experimentales. Los animales del grupo VH y VH + But presentaron ovulación espontánea (10/12 vs 8/11) al ser sacrificados al primer estro vaginal posterior a la microinyección en las bursas ováricas, sin diferencia significativa entre estos grupos experimentales ($p = 0.64$, Prueba exacta de Fisher). Los animales del grupo VE (1/11) y VE + But (0/9) no presentaron ovulación, y mostraron una diferencia significativa respecto al grupo VH y VH + But ($p < 0.01$ Prueba exacta de Fisher) (Figura 10, panel A).

Los animales del grupo VH y VH + But presentaron ovulación espontánea (10/12 vs 5/5) al ser sacrificados al segundo estro vaginal posterior a la microinyección en las bursas ováricas, sin diferencia significativa entre estos grupos experimentales ($p > 0.999$, Test exacto de Fisher). Los animales del grupo VE (1/4) no presentaron ovulación y presentaron una diferencia significativa respecto al grupo VH + But (5/5, $p = 0.0476$, Test exacto de Fisher). En los animales del grupo VE + But (3/6) el 60% presentó ovulación, pero no fue significativo respecto a los grupos VH (3/5, $p = 0.537$, Test exacto de Fisher), VH + But (5/5, $p = 0.444$, Test exacto de Fisher) y VE (1/4, $p = 0.523$, Test exacto de Fisher) (Figura 10, panel B).

Los animales del grupo VH y VH + But presentaron ovulación espontánea (7/7 vs 11/11) al ser sacrificados al cuarto estro vaginal posterior a la microinyección de NaCl o butoxamina en las bursas ováricas; los grupos no presentaron diferencia significativa ($p > 0.9999$, Prueba exacta de Fisher). Los animales del grupo VE (0/4) y VE + But (1/6) no presentaron ovulación, y mostraron una diferencia significativa respecto al grupo VH y VH + But ($p = 0.0007$ Prueba exacta de Fisher) (Figura 10, panel C).

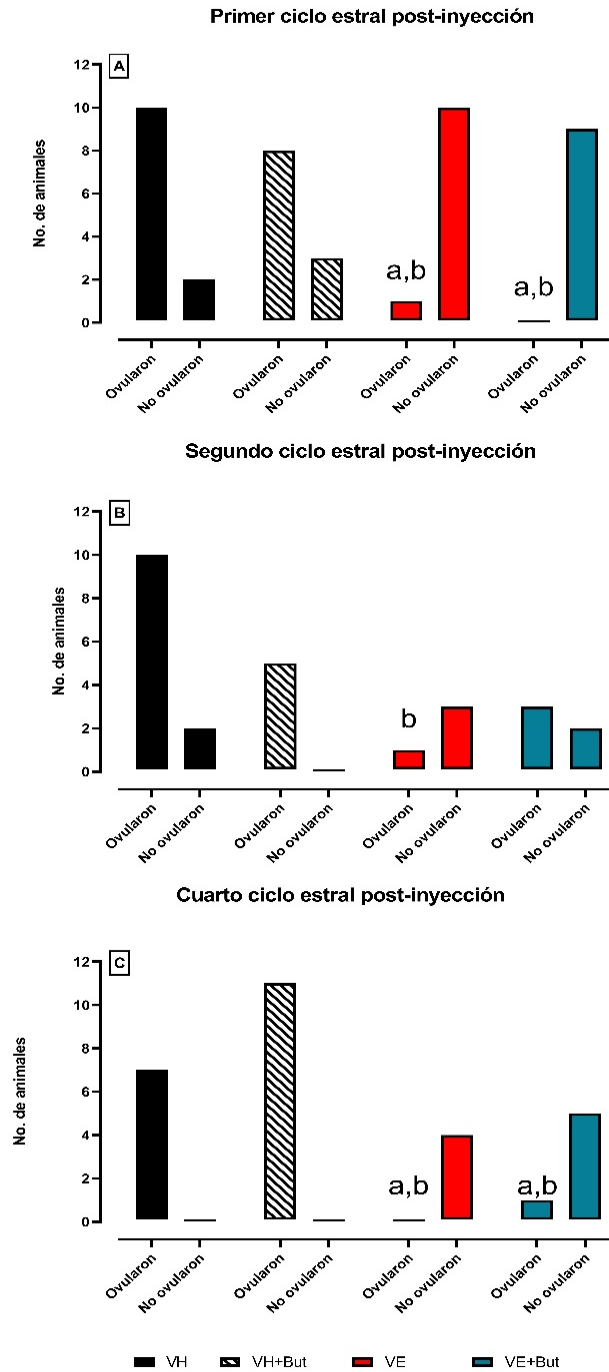


Figura 10. Tasa de animales ovulantes. Se muestra el número de animales ovulantes (TAO) de los grupos VH, VH + But, VE y VE + But sacrificados a uno, dos o cuatro ciclos estrales posteriores a la microinyección de NaCl o butoxamina [100 µg/20 µL] en las bolsas ováricas. Test exacto de Fisher. a) $p = 0.0002$ respecto a VH y b) $p = 0.0007$ respecto al grupo VH + But.

6.4- Número de ovocitos.

Se cuantificó el número de ovocitos de los animales ovulantes en todos los grupos experimentales. El número de ovocitos presentó variaciones en los 3 experimentos. En el grupo de animales VH sacrificados a un ciclo estral posterior a la microinyección de NaCl o butoxamina en las bursas ováricas, no se encontraron diferencias significativas en el número de ovocitos (VH: 7.41 ± 1.09 vs. VH + But: 7.37 ± 1.54 , $p = 0.78$, con un test Kruskal-Wallis seguido de una U Mann-Whitney). En el grupo VE (1.18 ± 1.18) se encontró que el número de ovocitos fue significativamente menor respecto a los grupos VH (7.41 ± 1.09 , $p < 0.001$, con un test Kruskal-Wallis seguido de una U Mann-Whitney) y VH + But (7.37 ± 1.54 , $p < 0.01$ con un test Kruskal-Wallis seguido de una U Mann-Whitney). No se encontraron ovocitos en los animales del grupo VE + But (0.00 ± 0.00) (figura 11, panel A).

Respecto a los animales del grupo VH sacrificados a dos ciclos estrales posteriores a la microinyección de NaCl o butoxamina, se encontró que el grupo VH + But presentó un mayor número de ovocitos respecto al grupo VH (VH: 7.41 ± 1.09 ovocitos vs. VH + But: 12.4 ± 1.20 $p < 0.01$ con un test Kruskal-Wallis seguido de una U Mann-Whitney). El grupo VE (3.25 ± 3.25 ovocitos) mostró una tendencia a tener un menor número de ovocitos al compararlo con el grupo VH (7.41 ± 1.09 ovocitos $p = 0.32$) y VH + But (12.4 ± 1.20 $p = 0.10$, con un test Kruskal-Wallis seguido de una U Mann-Whitney). El número de ovocitos del grupo VE + But (3.2 ± 1.46) fue significativamente menor respecto a los grupos VH (7.41 ± 1.09 , $p < 0.05$ con un test Kruskal-Wallis seguido de una U Mann-Whitney) y VH + But (12.4 ± 1.20 , $p < 0.01$ con un test Kruskal-Wallis seguido de una U Mann-Whitney) (Figura 11, panel B).

Se analizó el número de ovocitos de los grupos experimentales VH o VE sacrificados a los cuatro ciclos estrales posteriores a la microinyección de NaCl o butoxamina a los 60 días de edad. El grupo VH + But (9.09 ± 0.96 ovocitos) tuvo un menor número de ovocitos respecto al grupo VH (12.57 ± 0.48 ovocitos $p < 0.05$ con un test Kruskal-Wallis seguido de una U Mann-Whitney). El grupo VE no presentó ovulación (0.00 ± 0.00) y fue estadísticamente significativo al compararlo con los

grupos VH (12.57 ± 0.48 ovocitos, $p < 0.0001$), y VH + But (9.09 ± 0.96 , $p < 0.0001$, con un test Kruskal-Wallis seguido de una U Mann-Whitney). El único animal ovulante del grupo VE + But tuvo 0.33 ± 0.33 ovocitos. El número de ovocitos fue menor en este grupo al compararlo con la ovulación de los grupos VH (12.57 ± 0.48 , $p < 0.0001$) y VH + But (9.09 ± 0.96 , $p < 0.0001$, con un test Kruskal-Wallis seguido de una U Mann-Whitney) (Figura 11, panel C).

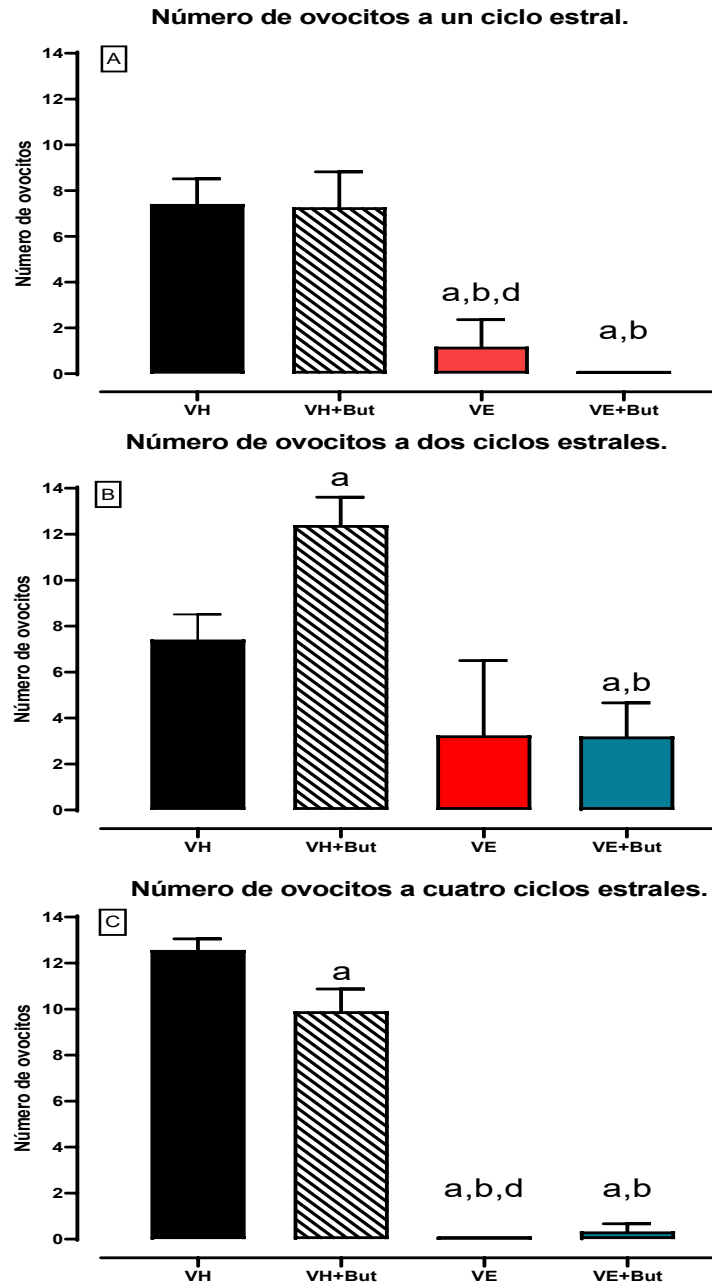


Figura 11. Número de ovocitos. Se muestra el promedio \pm SEM del número de ovocitos de los grupos VH, VH + But, VE y VE + But sacrificados a uno, dos o cuatro ciclos estrales posteriores a la inyección de NaCl o butoxamina [100 μ g/20 μ L] en las bursas ováricas. Prueba de Kruskal-Wallis y una prueba U Mann-Whitney pos hoc. a) $p < 0.0001$ respecto al grupo VH, b) $p < 0.0001$ respecto al grupo VH + But y (c) $p < 0.0001$ respecto al grupo VE.

6.5- Peso ovárico.

Se registró el peso de los ovarios de los diferentes grupos experimentales (Tabla 1). Al analizar el peso de los ovarios de los animales VH o VE sometidos a la microinyección de NaCl o butoxamina en las bolsas ováricas y sacrificados a un ciclo estral, dos ciclos estrales y cuatro ciclos estrales posteriores a la microinyección, se encontró que no hubo diferencias significativas entre el peso del ovario izquierdo (OI) con respecto al peso del ovario derecho (OD) de todos los grupos experimentales. Al analizar el peso de los OI y OD de los animales sacrificados a un ciclo estral, no se encontró diferencia significativa entre los los grupos VH + But (OI: 17.59 ± 1.1 g, $p = 0.62$, OD: 15.57 ± 0.7 g, $p = 0.63$ Prueba ANOVA de una vía) o VE (OI: 11.70 ± 1.2 g $p = 0.10$, OD: 11.06 ± 0.9 g, $p = 0.08$ Prueba ANOVA de una vía) respecto al grupo VH (OI: 15.59 ± 1.2 g, OD: 14.10 ± 0.6 g). El peso del OI y OD del grupo VE (OI: 11.70 ± 1.2 g, $p < 0.01$, OD: 11.06 ± 0.9 g, $p < 0.01$) y VE + But (OI: 5.18 ± 1.3 g, $p < 0.0001$, OD: 5.38 ± 1.4 g, $p < 0.0001$ Prueba ANOVA de una vía), fue menor respecto al grupo VH + But (OI: 17.59 ± 1.1 g, OD: 15.57 ± 0.7 g). El peso del OI y OD del grupo VE + But (OI: 5.18 ± 1.3 g $p < 0.01$, OD: 5.38 ± 1.4 g, $p < 0.001$ ANOVA de una vía) fue menor respecto al grupo VE (OI: 11.70 ± 1.2 g, OD: 11.06 ± 0.9 g).

Al analizar los pesos ováricos de los animales sacrificados a los dos ciclos estrales posteriores a la microinyección de NaCl o butoxamina se encontró que no hubo diferencia significativa entre el peso de los OI y OD del grupo VH + But (OI: 14.15 ± 1.7 g $p = 0.35$, OD: 15.61 ± 1.9 g, $p = 0.89$, Prueba ANOVA de una vía) respecto al grupo VH (OI: 15.59 ± 1.2 g, OD: 14.10 ± 0.6 g). El peso de los OI y OD del grupo VE (OI: 7.47 ± 0.9 g $p < 0.0001$, OD: 6.00 ± 0.9 g $p < 0.0001$ Prueba de ANOVA de una vía) y VE + But (OI: 10.31 ± 0.6 g $p < 0.0011$, OD: 8.78 ± 1.4 g $p < 0.01$ Prueba de ANOVA de una vía) disminuyó significativamente respecto al grupo VH (OI: 15.59 ± 1.2 g, OD: 14.10 ± 0.6 g). El peso del OI y OD del grupo VE (OI: 7.47 ± 0.9 g $p < 0.001$, OD: 6.00 ± 0.9 g $p < 0.001$) fue menor respecto al grupo VH + But (OI: 14.15 ± 1.7 g, OD: 15.61 ± 1.9 g). El peso del OI del grupo VE + But (10.31 ± 0.6 g $p = 0.09$) no tuvo diferencias significativas con respecto al grupo VH + But (OI: 14.15 ± 1.7 g), sin embargo, el peso del OD (8.78 ± 1.4 g, $p < 0.001$) disminuyó

significativamente en este grupo experimental respecto al grupo VH + But (OD: 15.61 ± 1.9 g). El peso del OI del grupo VE + But (10.31 ± 0.6 g p = 0.07) no tuvo diferencias significativas con respecto al grupo VE (OI: 7.47 ± 0.9 g), sin embargo, el peso del OD (8.78 ± 1.4 g, p < 0.05) disminuyó significativamente en este grupo experimental respecto al grupo VE (OD: 6.00 ± 0.9 g) (Tabla 1).

Al analizar los pesos ováricos de los animales sacrificados a los cuatro ciclos estrales posteriores a la microinyección de NaCl o butoxamina se encontró que no hubo diferencia significativa entre el peso de los OI y OD del grupo VH + But (OI: 16.93 ± 1.3 g, p = 0.63, OD: 18.33 ± 0.8 g, p = 0.12, Prueba ANOVA de una vía) o VE + But (OI: 16.44 ± 1.8 g, p > 0.99, OD: 15.80 ± 2.3, p = 0.35, Prueba ANOVA de una vía) respecto al grupo VH (OI: 14.97 ± 0.7 g, OD: 15.44 ± 0.6 g). El peso del OI y OD del grupo VE (5.66 ± 1.5 g, OD: 7.83 ± 1.3 g) fue menor respecto a los grupos VH (OI: 14.97 ± 0.7 g, p < 0.0001, OD: 15.44 ± 0.6 g, p < 0.0001, Prueba ANOVA de una vía), VH + But (OI: 16.93 ± 1.3 g, p < 0.0001, OD: 18.33 ± 0.8 g, p < 0.0001, Prueba ANOVA de una vía) y VE + But (OI: 16.44 ± 1.8 g, p < 0.0001, OD: 15.80 ± 2.3, p < 0.0001, Prueba ANOVA de una vía) (Tabla 1).

Tabla 1. Promedio del peso ovárico en miligramos en los diferentes tratamientos.

EXPERIMENTO	1 CICLO ESTRAL		2 CICLOS ESTRALES		4 CICLOS ESTRALES	
	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Ovario izquierdo	Ovario derecho.
VH	15.59 ± 1.2	14.10 ± 0.6	15.59 ± 1.2	14.10 ± 0.6	16.93 ± 1.3	18.33 ± 0.8
VH+ But	17.59 ± 1.1	15.57 ± 0.7	14.15 ± 1.7	15.61 ± 1.9	14.97 ± 0.7	15.44 ± 0.6
VE	11.70 ± 1.2 ^	11.06 ± 0.9^	7.47 ± 0.9*^	6.00 ± 0.9*^	5.66 ± 1.5*^	7.83 ± 1.3*^
VE+ But	5.18 ± 1.3*^~	5.38 ± 1.4*^~	10.31 ± 0.6*	8.78 ± 1.4*^~	16.44 ± 1.8~	15.80 ± 2.3~

Media ± SEM del peso de los ovarios de los animales inyectados con butoxamina [100 µg/ 20 µL] en ambas bursas ováricas a los 60 días posteriores a la administración del VE. Los animales fueron sacrificados al siguiente estro vaginal observado, a los dos ciclos estrales posteriores a la inyección o a los cuatro ciclos estrales posteriores a la inyección. ANOVA de una vía y una prueba Tukey pos hoc. *p < 0.0001, ^p < 0.0001 y ~p = 0.0007.

6.6- Morfología ovárica.

Se analizó la morfología de los ovarios de los animales tratados con VH o VE en la etapa infantil e inyectados en las bolsas ováricas con NaCl o butoxamina a los 60 días postnatal. Con respecto a los animales del grupo VH y sacrificados a los dos ciclos estrales posteriores de la inyección de NaCl (VH) o butoxamina (VH + But) presentaron una morfología ovárica similar. Se encontraron estructuras comunes de un ovario sano como presencia de folículos ováricos en diferentes estadios de desarrollo (figura 12, panel a); además, se encontró la presencia de cuerpos lúteos signo característico de un animal que ovuló (figura 12, panel b y c). El grupo tratado con VE mostró la presencia de prequistes y quistes ováricos (figura 12, panel e), y una nula presencia de folículos ováricos en desarrollo (figura 12, panel e y f); por otro lado, no hubo presencia de cuerpos lúteos. El grupo VE + But, presentó folículos ováricos en desarrollo (figura 12, panel g) y si hubo presencia de cuerpos lúteos indicativo de ovulación (figura 12, panel h).

Los animales sacrificados a cuatro ciclos estrales posteriores a la microinyección de NaCl (VH) o butoxamina (VH + But), presentaron las estructuras comunes del ovario, como folículos ováricos en desarrollo (figura 13, panel a y c) y cuerpos lúteos (figura 13, panel b y d). Los ovarios de los animales del grupo VE presentaron, prequistes y quistes ováricos (figura 13, panel e y f) y no hubo presencia de cuerpos lúteos. Por último, los animales del grupo VE + But, presentaron quistes y prequistes ováricos (figura 13, panel g y h).

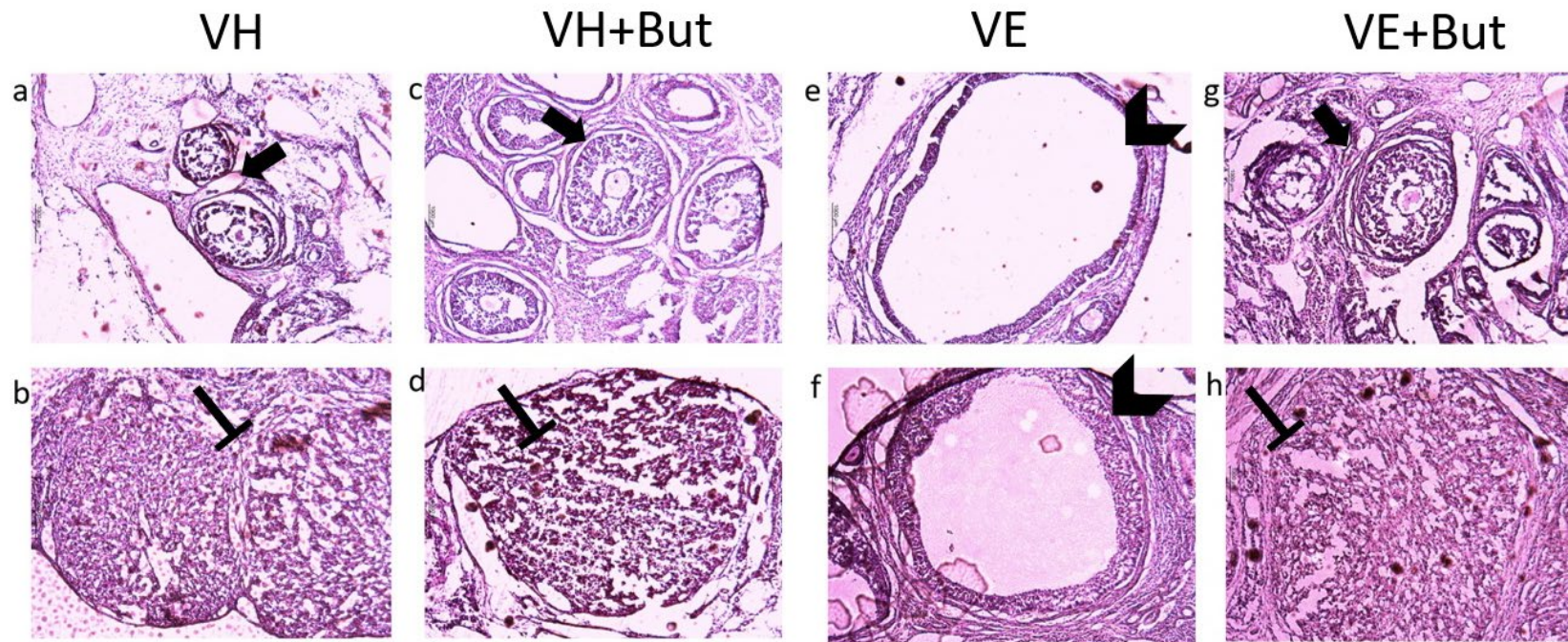


Figura 12. Estructuras ováricas de ratas sacrificadas en estro vaginal a dos ciclos estrales posteriores a la microinyección de NaCl o butoxamina [100 µg/20 µL] observados con un objetivo 5x. El panel de microfotografías se muestran estructuras ováricas clave. En a, c y g, se muestra la presencia de folículos secundarios sin antro (flecha)., En b, d y h, se muestra la presencia de cuerpos lúteos (flecha sin punta). En e y f se muestra la presencia de quistes ováricos característicos del SOP (punta de flecha).

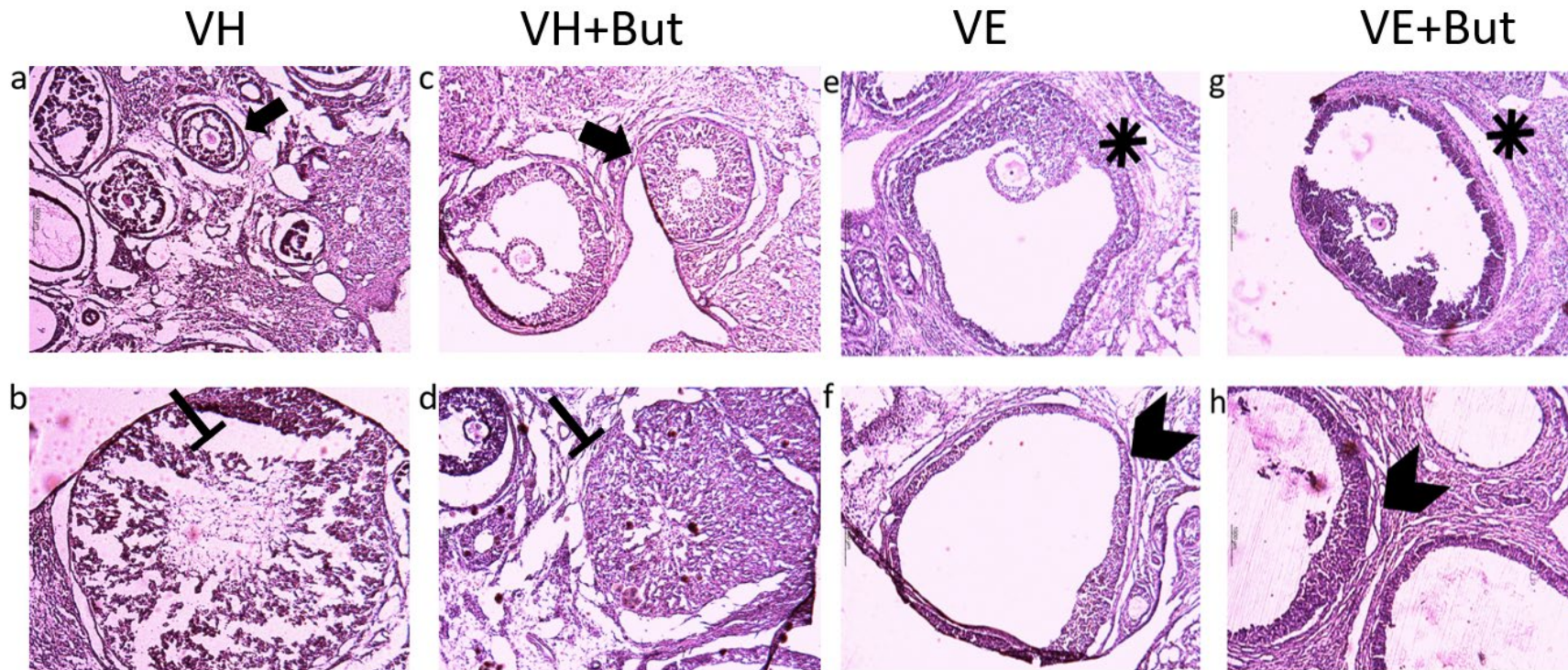


Figura 13. Estructuras ováricas de ratas sacrificadas en estro vaginal a cuatro ciclos estrales posteriores a la microinyección de NaCl o butoxamina [100 µg/20 µL] observados con un objetivo 5x. El panel de microfotografías se muestran estructuras ováricas clave. En a y c, se muestra la presencia de folículos secundarios sin antro (flecha)., En b y d, se muestra la presencia de cuerpos lúteos (flecha sin punta). En e y f, se muestra la presencia de prequistes (asterisco). En g y h, se muestra la presencia de quistes ováricos característicos del SOP (punta de flecha).

7- Discusión.

El presente estudio permitió identificar que, en la etapa adulta, el bloqueo de los receptores β_2 -adrenérgicos ováricos con un antagonista selectivo como la butoxamina, indujo la recuperación del funcionamiento ovárico y la morfología ovárica al segundo ciclo estral posterior a la microinyección de la butoxamina en las bursas ováricas, en un modelo de rata con SOP inducido con VE en la etapa infantil. La respuesta ovárica ante el bloqueo de los receptores β_2 -adrenérgicos ováricos depende del tiempo en que estos receptores permanezcan bloqueados.

En este estudio se utilizó el modelo de rata con SOP inducido con VE en la etapa infantil. De acuerdo con Brawer y cols., 1978 y 1986, las ratas hembra presentan aciclicidad, anovulación, células cornificadas vaginales permanentes y ovarios poliquísticos ocho semanas posteriores a la inyección de una sola dosis de 2 mg de VE. En este estudio se observó que al administrar una sola dosis de 2 mg VE en la etapa infantil, se adelanta la AV en los animales y se producen quistes ováricos que como consecuencia provoca aciclicidad, anovulación, un menor peso ovárico, tal y como lo han reportado en la literatura (Morales-Ledesma y cols., 2010 y 2020; Linares y cols., 2013, 2021, Venegas y cols., 2019; Espinoza y cols., 2018).

La AV es un signo indicativo del inicio de la pubertad, ya que ocurre próxima al momento de la primera ovulación (Márquez, 2002). Según Arrata y colaboradores en 1981, las ratas hembra sanas deben abrir vagina entre los días 36 y 39 posnatal hecho que se observó en las ratas inyectadas con aceite de sésamo y que indica que el VH utilizado en este experimento no afecta el inicio de la pubertad. La administración de VE en la etapa infantil adelanta la edad de la AV en las ratas hembra, debido a que la ruptura de la membrana vaginal es sensible a los niveles aumentados de estradiol (Rosa *et. al.*, 2003). Este estudio muestra que, a partir de la AV, los animales con VE presentan irregularidad en los ciclos estrales, ya que presentan células cornificadas persistentes (estros permanentes), indicativo de un animal acíclico, lo cual concuerda con lo descrito por Brawer y cols. en 1976 y por Linares y colaboradores en 2013, en donde la mayoría de los animales mostraron estros persistentes. El bloqueo de los receptores β_2 -adrenérgicos ováricos con una

sola dosis de butoxamina promueve la recuperación de la función ovárica, observable en el grupo sacrificado a dos ciclos estrales, en el cual, tres animales mostraron un ciclo estral de cuatro días regular, resultando en ovulación.

Una de las características del modelo de inducción de SOP con VE, es el peso corporal de los animales. Se ha observado que cuando se administra el VE en la etapa infantil, el peso corporal de los animales es menor respecto a los animales sanos, observable en este experimento en los animales sacrificados a un ciclo estral, en contraste a esto, los animales sacrificados a dos ciclos estrales y cuatro ciclos estrales del grupo VE aumentaron el peso corporal respecto al grupo VH o VH+But, comparable con trabajos en los cuales se ha utilizado el mismo modelo de inducción de SOP con VE, en los cuales el peso de los animales tratados con el mismo, disminuía respecto a los grupos VH (Manni, 2005). En contraste a esto, los grupos VE sacrificados a cuatro ciclos estrales mostraron un aumento en el peso corporal respecto al grupo VH, pero esto puede contribuirse a otras condiciones de las ratas, dado que según lo descrito por Maliqueo y colaboradores en 2014, el VE no favorece el incremento en el peso corporal durante el proceso de inducción del SOP.

Se han realizado muchos trabajos que relacionan el sistema nervioso simpático y el SOP, algunos de ellos han encontrado que, en los animales tratados con VE y posterior algún método para mejorar la actividad ovárica, como el ejercicio o la administración de un fármaco (Manni, 2005; Furat, *et. al.*, 2018), en los cuales el peso corporal de los animales tratados disminuye, algo comparable con lo obtenido en este trabajo, dado que, una vez que se administra la butoxamina, el peso corporal de los animales empieza a aumentar a lo largo de los diferentes ciclos.

La TAO es utilizada como un parámetro para indicar el número de animales que ovula de manera regular; en este estudio observamos que los animales tratados con el VH no afectaron su ovulación espontánea. Por otra parte, los animales con inducción del SOP con VE presentaron anovulación al estro vaginal observado, lo que sugiere que el modelo de SOP inducido por VE fue inducido de forma correcta, estos resultados concuerdan con lo descrito por Winnykamien y cols. En 2017,

donde se menciona que el modelo de SOP esta caracterizado por una anovulación crónica y con lo descrito por Linares y cols. en 2013, Venegas, 2019, Morales-Ledesma, 2010 y 2020, Espinoza y cols. 2018, donde se menciona que los animales con inducción de SOP por VE no presentan ovulación. Ya en nuestro grupo de investigación se ha demostrado que en el modelo de inducción de SOP con VE una estrategia para recuperar las funciones ováricas como la ovulación es la denervación de las fibras noradrenérgicas periféricas con monofosfato de guanetidina (GTD), lo que sugiere que la hiperactividad del SNP se ve disminuido reestableciendo las funciones ováricas como la ovulación (Espinoza y cols, 2018). En este trabajo se propuso que un efecto similar se podía ver reflejado al bloquear los receptores β_2 -adrenérgicos ováricos. En este sentido se observó que el bloqueo selectivo de los receptores β_2 -adrenérgicos ováricos no afecta la ovulación espontánea en los animales sacrificados al estro vaginal observado, a los dos y cuatro ciclos posteriores al bloqueo. Cuando se realiza el bloqueo de los receptores β_2 -adrenérgicos en los ovarios en los animales con inducción de SOP con VE, se observa una recuperación de la ovulación espontánea en los animales sacrificados a los dos ciclos posteriores al bloqueo. Este dato da por primera vez evidencia que el bloqueo agudo de los receptores β_2 -adrenérgicos ováricos recupera la ovulación espontánea en los animales con inducción de SOP. En estudios previos de nuestro grupo de investigación, se había demostrado que el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos con propranolol, recupera la ovulación en los animales al siguiente ciclo posterior a su administración (Venegas y cols., 2019). Se puede observar que no se observó una recuperación de la ovulación en los animales con bloqueo de los receptores β_2 -adrenérgicos ováricos que fueron sacrificados a un ciclo estral o cuatro ciclos estrales, una posible explicación se deba al factor tiempo y duración del efecto del fármaco, dado que se pudieron necesitar dosis mas altas para observar estos cambios en animales sacrificados a un ciclo estral o una dosis prolongada para observar los cambios en los animales sacrificados a cuatro ciclos.

Por otro lado, se pudo observar una disminución del peso ovárico en el modelo animal de rata con SOP inducido con VE lo cual ya ha sido demostrado en varios trabajos donde presumiblemente se deba a una disminución en los niveles

circulantes de gonadotropinas después de la administración de VE (Brawer, *et. al.*, 1986). Uno de estos trabajos fue realizado por Lara y colaboradores en 1993, en el cual, utilizaron un modelo animal similar, con una única dosis de VE intramuscular, en la que obtuvieron que el peso ovárico de los animales administrados con VE disminuyó en un 50% comprándolo con el peso del grupo VH. En nuestro estudio, se observa que en los tres experimentos analizados: uno, dos y cuatro ciclos estrales, el peso ovárico en los animales tratados con VE fue menor. Asimismo en otros modelos de inducción de SOP como el uso dihidroxitestosterona (DHT) se ha observado una disminución del peso ovárico (Mannerås y cols., 2009), dado que este modelo animal desarrolla obesidad y falla ovulatoria, utilizaron electroacupuntura, para recuperar la actividad normal del sistema nervioso simpático. Ahora bien, se han realizado varios experimentos donde se analiza el sistema nervioso simpático en modelos con SOP, entre los cuales se ha propuesto a la acupuntura como una estrategia para modular la actividad simpática nerviosa ejerciendo efectos positivos sobre las funciones ováricas, puesto que esta técnica pudiera tener efectos de largo plazo en parámetros endocrinos y la ovulación (Mannerås y cols., 2009), sin efectos negativos en donde se realiza la acupuntura. También se ha propuesto al ejercicio como una estrategia para modular la hiperactividad del SNS ya que éste modula la expresión de NGF y su receptor p75NTR en los ovarios de ratas tratadas con VE (Manni, 2005).

En este estudio se sugiere que el bloqueo selectivo de los receptores β 2-adrenérgicos con butoxamina disminuye la hiperactividad del sistema nervioso simpático, y recupere las funciones ováricas en el modelo de inducción de SOP con VE, lo cual se demuestra al analizar la morfología ovárica de los animales sacrificados a los dos y cuatro ciclos posteriores a la administración del antagonista adrenérgico. La morfología ovárica está caracterizada por presentar cuerpos lúteos, folículos en desarrollo y folículos atrésicos, en un modelo de rata con SOP inducido por VE, se observan ovarios pequeños, poco folículos secundarios, quiste con la cavidad central grande, una capa de la teca engrosada y una capa de células de la granulosa atenuada (Brawer, *et. al.*, 1986), observable en los ovarios de las ratas VE de este experimento (figura 12 y 13), se observan folículos en desarrollo y

cuerpos lúteos en los grupos VH, en los grupos VE se observan quistes ováricos, cabe resaltar que en el grupo con inducción de SOP con VE y con bloqueo de los receptores β_2 -adrenérgicos con butoxamina que fueron sacrificados a los dos ciclos posteriores a su administración, se observó la presencia de folículos en desarrollo y cuerpos lúteos lo que afirma que el animal ovuló, por lo anterior, se sugiere que hay una recuperación en la morfología ovárica y por lo tanto de las funciones ováricas. Esto no se observó en los animales sacrificados a los cuatro ciclos posteriores al bloqueo de los receptores β_2 -adrenérgicos, pues solo se encontró la presencia de quistes y prequistes, por lo que se propone que la butoxamina tiene un tiempo de acción determinado y necesita de una segunda dosis o dosis continuas para poder observar estos cambios a largo plazo.

En conclusión, se puede mencionar que se observaron cambios en el número de ovocitos, en el tamaño ovárico y en la morfología ovárica después de la administración de butoxamina, lo que sugiere que el bloqueo de los receptores β_2 adrenérgicos ováricos restablece estas funciones, observable dos ciclos posteriores a la administración, lo cual da indicios de que posiblemente se necesitaron más dosis o una dosis mayor para poder observar estos cambios a largo plazo en la regulación nerviosa simpática del ovario, abriendo campo a nuevas investigaciones utilizando la butoxamina como bloqueador de los receptores β -adrenérgicos.

8- Conclusiones.

- En el modelo de rata con SOP inducido con VE en la etapa infantil:
 - El bloqueo selectivo de los receptores β_2 -adrenérgicos ováricos no presentó cambios observables en las funciones ováricas de los animales sacrificados a un ciclo estral posterior a la administración del antagonista.
 - El bloqueo selectivo de los receptores β_2 -adrenérgicos ováricos con butoxamina reestablece la ovulación espontánea y la morfología

ovárica dos ciclos estrales posteriores a la administración del antagonista.

- El bloqueo selectivo de los receptores β_2 -adrenérgicos ováricos mostró cambios en la morfología ovárica pero no restableció la ovulación de los animales sacrificados cuatro ciclos estrales posteriores a la administración de la butoxamina.

9- Perspectivas.

Los cambios observados en la función y la morfología ovárica fueron observables dos ciclos estrales posteriores a la administración de la butoxamina, lo que sugiere que se pudo necesitar una dosis mayor o una dosis prolongada, se podría necesitar la implementación de una bomba de infusión continua que permita la administración de butoxamina de manera constante en el ovario, para evaluar la respuesta de los ovarios a largo plazo, de igual forma se podría realizar una curva de dosis-respuesta, para determinar la dosis efectiva necesaria para restablecer las funciones ováricas a largo plazo.

10-Literatura citada.

Aguado, L. (2002). Role of the Central and Peripheral Nervous System in the Ovarian Function. *Microscopy Research and Technique*, 59. Pp 462-473.

Apablaza, S. (2000). Síndrome de ovario poliquístico. *Sociedad Chilena de Obstetricia y Ginecología Infantil y de la Adolescencia*, 7. Pp 50-56.

Arata, G., Bishop, W. y Rojas, F. (1981). El inicio de la pubertad en la rata hembra. Artículo de revisión. *Acta Cient. Venezolana*, 32. Pp 457-462.

- Arrayya, V., Jara, P. Y Lara, H. (2004). Cerebro, estrés, y ovario poliquístico. Participación de la inervación simpática en el desarrollo de ovario poliquístico. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*, 51 (8). Pp 473-477.
- Barria, A., Leyton, V., Ojeda, S. y Lara, H. (1993). Ovarian Steroidal Response to Gonadotropins and β -Adrenergic Stimulation Is Enhanced in Polycystic Ovary Syndrome: Role of Sympathetic Innervation. *Endocrinology*, 133(6). Pp 2696-2703.
- Becerro, M. (2008). Las hormonas esteroideas sexuales, el envejecimiento y el ejercicio. *Revista Andaluza de Medicina del Deporte*. 1(1). Pp 22-36.
- Brawer, J. R., Munoz, M., & Farookhi, R. (1986). Development of the Polycystic Ovarian Condition (PCO) in the Estradiol Valerate-Treated Rat. *Biology of Reproduction*, 35(3), 647–655.
- Brawer, J. R., Naftolin, F., Martin, J., & Sonnenschein, C. (1978). Effects of a Single Injection of Estradiol Valerate on the Hypothalamic Arcuate Nucleus and on Reproductive Function in the Female Rat*. *Endocrinology*, 103(2), 501–512. <https://doi.org/10.1210/endo-103-2-501>
- Carretero, M. (2004). Valerato de estradiol + dienogest Terapia hormonal sustitutiva de uso continuo. *OFFARM* 23 (4). Barcelona, España. PP 154-156
- Cruz, G., Fernandois, D. & Paredes, A. (2016). Ovarian function and reproductive senescence in the rat: Role of ovarian sympathetic innervation. *Reproduction Advane Publication*. Pp 2-32
- Cruz-Castán, R., Curiel-Ramírez, S. y C. Meiners. (2014). Modificación de los tiempos de tinción de cortes histológicos con hematoxilina-eosina para maximizar la observación de gametos femeninos de *Euthynnus alletteratus* Rafinesque, 1810. (Pisces: Scombridae) del suroeste del Golfo de México. *Métodos en Ecología y Sistemática*; 9(2): 7.
- Dikmen, A., Mete, A., Ozgur, A., Yilmaz, O., Ercan, G., Yilmaz, H. (2012). Evaluation of glycemic and oxidative/antioxidative status in the estradiol valerate-induced

PCOS model of rats. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 160. PP 55–59.

Dissen, G., Lara, H., Leyton, V., Paredes, A., Hill, D., Costa, M., Martínez-Serrano, A. y Ojeda, S. (2000). Intraovarian Excess of Nerve Growth Factor Increases Androgen Secretion and Disrupts Estrous Cyclicity in the Rat. *Endocrinology*, 141(3). Pp 1073-1082.

Erickson, G. y Chang, R. (2007). *Basic Biology: Ovarian Anatomy and Physiology* en Lobo, R. (Ed.) *TREATMENT OF THE POSTMENOPAUSAL WOMAN* (3° ed., pp 49-66). Elsevier Academic Press. United States of America.

Espey, L. y Richards, J. (2006). Ovulation. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Third Edition edited by Jimmy D. Neill. Elsevier. Pp 425-474.

Espinoza, J. A., Alvarado, W., Venegas, B., Domínguez, R., & Morales-Ledesma, L. (2018). Pharmacological sympathetic denervation prevents the development of polycystic ovarian syndrome in rats injected with estradiol valerate. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0400-8>

Fernandois, D. (2011). Bloqueo farmacológico de los receptores β_2 -adrenérgicos en ratas en el periodo de subfertilidad. Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas. Universidad de Chile. Chile.

Fernandois, D., Lara, H. y Paredes, A. (2012). Blocking of β -Adrenergic Receptors During the Subfertile Period Inhibits Spontaneous Ovarian Cyst Formation in Rats. *Horm Metab Res* ; 44: 682–687

Filipiak, Y., Viquería, M. y Bielli, A. (2016). Desarrollo y dinámica de los folículos ováricos desde la etapa fetal hasta la prepuberal en bovinos. *Veterinaria (Montevideo)* 52 (202). Uruguay.

- Flores, C., Blanco, T., Arbués, R., Domitrovic, H. & Gonzalez, J. (2012). Atresia follicular en ovaries de *Prochilodus lineatus*. *International Journal of Morphology*. 30(4):1301-1308.
- Fortune, J. (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, 50. Pp 225-232.
- Furat Rençber, S., Kurnaz Ozbek, S., Eraldemir, C., Sezer, Z., Kum, T., Ceylan, S., & Guzel, E. (2018). Effect of resveratrol and metformin on ovarian reserve and ultrastructure in PCOS: an experimental study. *Journal of Ovarian Research*, 11(1).
- Fux, C., Fiol, M. y Szafryk, P. (2013). SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO: REVISIÓN DE SU FISIOPATOGENIA. *Revista Facultad de Ciencias Médicas*, 70(1). Pp 27-30.
- Gartner P, Hiatt L. (2007) "Texto Atlas de Histología". 3ª edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana, Pp. 439-449.
- Gerendai, I. y Halász, B. (2000). Central nervous system structures connected with the endocrine glands. Findings obtained with the viral transneuronal tracing technique. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 108. Pp 389-395
- Gerendai, I., Banczerowski, P. y Halász. (2005). Funtional Significance of the Innervation of the Gonads. *Endocrine*, 28(3). Pp 308-318.
- Gigli, I., Russo, A. y Agüero, A. (2006). Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *InVet* (8). Pp. 183-203.
- Gómez-Chang, E., Larrea, F. y Martínez-Montes, F. (2012). Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15(1). Pp 24-36
- Greiner, M., Paredes. A., Rey-Ares, V., Saller, S., Mayerhofer, A. y Lara, E. (2008). Catecholamine Uptake, Storage, and Regulated Release by Ovarian Granulosa Cells. *Endocrinology*, 149(10). Pp 4988-4996.

- Guáqueta, H. (2009). Ciclo estral: Fisiología básica y estrategias para mejorar la detección de celos. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia* (56) III. Pp. 163-183.
- Hernández, S. (2008). ESTIMULACIÓN ADRENÉRGICA EN RATAS DURANTE EL PERÍODO NEONATAL: EFECTOS SOBRE LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA OVÁRICA DURANTE EL DESARROLLO Y LA ETAPA ADULTA (tesis de pregrado). Universidad de Chile, Chile.
- Kagitani, F., Uchida, S. y Hotta, H. (2011). The role of alpha adrenoreceptors in the vascular and estradiol secretory responses to stimulation of the superior ovarian nerve. *J Physiol Sci* 61. Pp. 247-251.
- Ladrón de Guevara, A., Vantman, N., Echiburú, B., Miranda, D. y Sir-Petermann, T. (2013). ¿Qué hay de nuevo en el síndrome de ovario poliquístico?. *Rev. chil. endocrinol. diabetes* 6 (2). Pp. 69-75.
- Lansdown, A. y Ress, D. (2012). The sympathetic nervous system in polycystic ovary syndrome: a novel therapeutic target? *Clinical Endocrinology*, 77. Pp 791-801
- Lara, H., Dissen, G., Leyton, V., Paredes, V., Fuenzalida, H., Fiedler, J. y Ojeda, S. (2000). An Increased Intraovarian Synthesis of Nerve Growth Factor and Its Low Affinity Receptor Is a Principal Component of Steroid-Induced Polycystic Ovary in the Rat. *Endocrinology*, 141(3). Pp 1059-1072.
- Lara, H., Ferruz, J., Luza, S., Bustamante, D., Borges, Y. y Ojeda, S. (1993). Activation of Ovarian Sympathetic Nerves in Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology*, 133(6). Pp 2690-2695.
- Leung, P. y Adashi, E. (2004). *The ovary* (2° ed). Elsevier Academic Press. United States of America.
- Linares, R., Acuña, X. N., Rosas, G., Vieyra, E., Ramírez, D. A., Chaparro, A., Espinoza, J. A., Domínguez, R., & Morales-Ledesma, L. (2021). Participation

- of the Cholinergic System in the Development of Polycystic Ovary Syndrome. *Molecules*, 26(18), 5506. <https://doi.org/10.3390/molecules26185506>
- Linares, R., Hernández, D., Morán, C., Chavira, R., Cárdenas, M., Domínguez, R., & Morales-Ledesma, L. (2013). Unilateral or bilateral vagotomy induces ovulation in both ovaries of rats with polycystic ovarian syndrome. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11(1).
- Maliqueo, M., Benrick, A. y Stener-Victorin, E. (2014). Rodent Models of Polycystic Ovary Syndrome: Phenotypic Presentation, Pathophysiology, and the Effects of Different Interventions. *Semin Reprod Med* 32. PP 183–193.
- Mannerås, L., Cajander, S., Lönn, M., & Stener-Victorin, E. (2009). Acupuncture and exercise restore adipose tissue expression of sympathetic markers and improve ovarian morphology in rats with dihydrotestosterone-induced PCOS. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 296(4). Pp 1124-1131.
- Manni, L., Holmäng, A., Lundeberg, T., Aloe, L. y Stener-Victorin, E. (2005). Ovarian expression of alpha (1)- and beta (2)-adrenoceptors and p75 neurotrophin receptors in rats with steroid-induced polycystic ovaries. *Autonomic Neuroscience: Basic and clinical*, 118. Pp 79-87.
- Márquez, M. (2002). CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE LA RATA MAGUEYERA (NEOTOMA ALBIGULA) EN CAUTIVERIO. *Acta Zool. Mex* (86), 139–144.
- McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S. y Bennett, S. A. (2012). Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *Journal of Visualized Experiments*, 67.
- Merz, C., Saller, S., Kunz, L., Xu, J., Yeoman, R., Ting, A., Lawson, M., Stouffer, R., Hennebold, J., Pau, F., Dissen, A., Ojeda, S., Zelinski, M. y Mayerhofer, A. (2015). Expression of the beta-2 adrenergic receptor (ADRB-2) in human and monkey ovarian follicles: a marker of growing follicles?. *Journal of Ovarian Research*; 8(8).

- Mira, A. (2005). Síndrome de ovario poliquístico-Teorías de su fisiopatología. *Revista Bioquímica y Patología Clínica incorporada al latindex*, 69 (2). Pp 11-33.
- Morales, L., Chavez, R., Ayala, M. y Dominguez, R. (1998). Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in prepubertal rats on the ovulatory response to gonadotrophin administration. *The Journal of endocrinology*;158(2):213-9.
- Morales-Ledesma, L., Linares, R., Rosas, G., Morán, C., Chavira, R., Cárdenas, M., & Domínguez, R. (2010). Unilateral sectioning of the superior ovarian nerve of rats with polycystic ovarian syndrome restores ovulation in the innervated ovary. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1), 99.
- Morales-Ledesma, L., Trujillo Hernández, A., Ramírez, M. I., Rosas, G., & Linares, R. (2020). Administration of a VIP-antagonist in vivo modifies ovarian hormone secretion in a rat model with polycystic ovary syndrome. *Life Sciences*, 265, 118792. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118792>
- Morán, C., Hernández, M., Cravlotto, M., Porlas, H., Malacara, J., Bermúdez, J. (2006). Síndrome de ovario poliquístico Posición de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología. *Revista de Endocrinología y Nutrición* Vol. 14 (1). PP 7-12.
- 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, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio Institucional – Universidad Nacional Autónoma de México
- Oliver, E., Mayor, F., y D'Ocon, P. (2019). Beta-blockers: Historical Perspective and Mechanisms of Action. *Rev Esp Cardiol*, 72(10). Pp 835-862.
- Pacheco, J. (2010). Falla ovárica precoz. *An Fac med*, 71 (3). Pp 191-200.

- Paixão, L., Ramos, R., Lavarda, A., Morsh, D. y Spritzer, P. (2017). Animal models of hyperandrogenism and ovarian morphology changes as features of polycystic ovary syndrome: a systematic review. *BioMed Central*. Brasil.
- Palacios, E. (2016). Hormonas sexuales y mecanismo de acción. *Mecanismos fisiológicos y moleculares de la anticoncepción*. Real academia nacional de farmacia. Madrid, España. Pp. 73-96
- Prieto-Gómez, B. y Velázquez-Paniagua, M. (2002)- Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. *Rev Fac Med UNAM*, 45(6).
- Rippe, C. (2009). El ciclo estral. *Dairy Cattle Reproduction Conference*. Pp.111-116.
- Rosa-E-Silva, A., Guimaraes, M. A., Padmanabhan, V., & Lara, H. E. (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. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0146>
- Teppa, A. y Teran, J (2000). Conceptos básicos sobre la regulación psicoimmunoneuroendocrina y vascular del ciclo menstrual. Artículo de revisión. Venezuela.
- Torres, R. (2017) PREVALENCIA Y PATOLOGIA DE LA SINEQUIA BURSAOVÁRICA EN CANINOS CRIOLLOS DE LA CIUDAD DE PUNO [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional del Altiplano-Puno]. Repositorio Institucional- Universidad Nacional del Altiplano-Puno.
- Tóth, I, Wiesel, O., Boldogkői, Z., Bálint, K., Tapaszi, Z. y Gerendai, I. (2007). Predominance of Supraspinal Innervation of the Left Ovary. *Microscopy Research and Technique*, 70. Pp 710-718.
- Tresguerres, J. y Castillo, C. (2005). Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico. En J. Tresguerres (Ed.). *Fisiología Humana (1007-1023)*. McGraw-Hill Interamericana.

- Uchida, S. (2015). Sympathetic regulation of estradiol secretion from the ovary. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 187. Pp. 27–35.
- Uchida, S. y Kagitani, F. (2016). Sympathetic regulation of ovarian functions under chronic estradiol treatment in rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. Apablaza, S. (2000). Síndrome de ovario poliquístico. *Sociedad Chilena de Obstetricia y Ginecología Infantil y de la Adolescencia*, 7. Pp 50-56.
- Valenzuela, L. (2010). Inhibición de la citotoxicidad producida por el valerato de estradiol sobre neuronas β -endorfinérgicas a través de un inhibidor de aromatasas y su relación con el consumo de etanol en la rata [Tesis de doctorado- Universidad de Guadalajara]. Repositorio CUCBA- Universidad de Guadalajara.
- Velasco, M., Romero, B., Betancourt, M., Suarez, N., & Contreras, F. (2002). Uso de los Antagonistas Beta-Adrenérgicos en la Hipertensión Arterial. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 21(2), 139-147.
- Venegas, B., de León Gordillo, L. Y., Rosas, G., Espinoza, J. A., Morán, C., Domínguez, R., & Morales-Ledesma, L. (2019). In rats with estradiol valerate-induced polycystic ovary syndrome, the acute blockade of ovarian β -adrenoreceptors improve ovulation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17(1).
- Ventura-Arizmendi, E. y Hernández-Valencia, M. (2019). La esteroidogénesis en el síndrome de ovarios poliquísticos. *Gaceta Médica de México* (155). Pp. 184-190
- Walters, K., Allan, C., Handelsman, D. (2012). Rodent Models for Human Polycystic Ovary Syndrome. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 86 (5).
- Winnykamien, I., Dalibón, A. y Knoblovits, P. (2017). Síndrome de ovario poliquístico. *Revista Hospital Italiano de Buenos Aires*, 37 (1). Pp 10-20.

