



**Facultad de Farmacia  
Escuela de Química y Farmacia**

**EFECTO DEL BLOQUEO DEL TONO ADRENÉRGICO  
POR PROPRANOLOL SOBRE LA CONDICIÓN DE  
OVARIO POLIQUÍSTICO EN RATA**

**CAROLINA PAZ RIVAS RIQUELME**

**Unidad de investigación para optar al Título de Químico Farmacéutico**

**DIRECTORA: Dra. SELVA LETICIA LUNA  
CO-DIRECTOR: Dr. HERNÁN LARA**

**2018**



## DEDICATORIA

*A mis padres Angélica y Mario quienes me inculcaron que los estudios son su mejor legado. A mi hermana, mi apoyo fundamental, quien siempre ha tenido más fe en mí que yo mismo. A mi segunda familia en Quilpué quienes siempre estudiaron atentos a mis necesidades. A mi abuela Blanquita por esperar que llegara a la meta y a mis tres angelitos en el cielo que sé que están siempre a mi lado.*

## AGRADECIMIENTOS

A lo largo de estos ideales cinco años que concluyeron en seis, quiero agradecer a toda mi linda familia por entregarme sus valores, confianza y aliento incondicional; a mis amigos y amigas por su constante apoyo y a mis docentes por entregarme las herramientas para iniciar mi vida profesional.

Aunque es difícil y en ocasiones se vuelve tedioso estudiar, al final del camino me doy cuenta de los logros y estoy llena de satisfacción, y al mirar atrás, caigo en cuenta de lo mucho que he crecido en lo personal y académico.

Gracias por no rendirse conmigo, por alentarme en cada paso y por estar siempre presentes.

Por último, quiero agradecer a la profesora Leticia, por estar siempre convenciéndome de mis capacidades y por su constante incentivo a seguir creciendo como profesional.

## RESUMEN

La función ovárica que comprende desarrollo folicular, secreción de hormonas esteroidales y ovulación, está controlada por señales hormonales endocrinas del eje hipotálamo-hipófisis y por señales simpáticas de tipo adrenérgica. En modelo murino de ovario poliquístico por única dosis de valerato de estradiol (2 mg) mostró que, antecediendo al desarrollo de quistes y anovulación, ocurre un aumento del tono adrenérgico en el ovario. Se propone que el bloqueo farmacológico de ese tono adrenérgico aumentado por valerato de estradiol podría prevenir el desarrollo de la condición de ovario poliquístico. Para ello se trataron ratas hembras adultas, con tres condiciones: una dosis única de 2 mg de valerato de estradiol intra muscular seguida de inyecciones diarias de suero fisiológico por 30 días (grupo VE); valerato de estradiol más inyecciones diarias de 5 mg/kg de propranolol por 30 días (grupo VE+PROP); y administración de vehículo oleoso seguido de 30 días de suero fisiológico (grupo control). Los animales fueron sacrificados en el estro posterior al término del tratamiento. Se realizaron estudios morfométricos en ovario y determinación de hormonas esteroidales secretadas "in vitro".

El tratamiento con VE mostró un aumento en el recuento de folículos preantrales y antrales atrésicos, disminución en el tamaño de preantrales y antrales normales, aumento de folículos anómalos, y disminución significativa de cuerpos lúteos y aciclicidad estral, sin cambios en la secreción ovárica de hormonas esteroidales, respecto del control. VE+PROP presentó una disminución en el recuento y tamaño de folículos preantrales atrésicos, disminución del recuento de los folículos anómalos, pero estos aumentaron de tamaño y no mostró un restablecimiento de la ciclicidad. Estos cambios se acompañan con una menor secreción de progesterona, todo respecto de VE.

Así, se aprecia que el bloqueo del tono adrenérgico contrarresta parcialmente, el efecto de VE en el ovario.

BLOCKADE OF ADRENERGIC TONE BY PROPRANOLOL AND ITS EFFECT ON THE  
POLYCYSTIC OVARY CONDITION INDUCED BY ESTRADIOL VALERATE IN RATS.

**ABSTRACT**

Ovarian function includes follicular development, secretion of steroidal hormones and ovulation and is controlled by endocrine signals from the hypothalamic-pituitary axis and sympathetic adrenergic signals. A murine model of polycystic ovary induced by a single dose of estradiol valerate (2 mg) showed that there is an increase in the adrenergic tone in the ovary preceding the development of cysts and anovulation. It is proposed that the pharmacological blockade of this increased adrenergic tone could be prevented avoiding the development of the polycystic ovary condition. To challenge this hypothesis, female adults rats were treated in three ways: a single dose of estradiol valerate (2 mg, intramuscular, followed by daily injections of physiological solution during 30 days (VE group); estradiol valerate plus daily injections of propranolol (5 mg/kg, intraperitoneal) for 30 days (VE group + PROP); and administration of oil vehicle followed by 30 days of physiological solution (control group). At the end of the treatment, the animals were sacrificed in the subsequent estrus. Morphometric studies of the ovary structures and of steroidal hormones secreted "in vitro" determination were performed. VE treatment produced an increase in atretic preantral and antral follicles number, decrease in the size of healthy preantrals and antrals follicles, increase of anomalous follicles, and significant decrease of the corpora lutea and estral aclicity, without changes in the ovarian secretion of steroidal hormones, when compared to the control. VE + PROP presented, in comparison with VE, a decrease in the number and size of atretic preantral follicles, decrease in the anomalous follicles number with size increased without restoration of the cyclicity. These changes are accompanied by a lower secretion of progesterone. The present work shows that blockade of the adrenergic tone partially overcomes the effect of VE on the ovary.

**GLOSARIO**

Folículo:	unidad funcional del ovario
Atresia:	proceso de muerte programada de folículos ováricos
Ciclo estral:	periodo comprendido entre dos ovulaciones en la hembra
Foliculogénesis:	proceso de maduración de los folículos ováricos
Esteroidogénesis:	conjunto de reacciones metabólicas que hacen posible la síntesis de hormonas esteroidales en un determinado órgano o tejido
Folículos preantrales normales:	folículo que ha salido de su estado de quiescencia, reanudando la proliferación celular, pero que aún no presenta cavidad antral
Folículos preantrales atrésicos:	folículo que ha salido de su estado de quiescencia, reanudando la proliferación celular, pero aún no presenta cavidad antral y tiene características de atresia
Folículos antrales normales:	folículo que ha salido de su estado de quiescencia y ha llegado a fases finales de su crecimiento, presentando cavidad antral
Folículos antrales atrésicos:	folículos que ha salido de su estado de quiescencia, ha llegado a etapas avanzadas de desarrollo, presentando cavidad antral, y tiene características de atresia

Folículo tipo III	estructura folicular grande, con o sin ovocito, exhibe 4 o 5 capas de CG pequeñas y de forma variable, densamente teñidas y empaquetadas, que rodean un enorme antro, con un compartimento de CT aparentemente normal
Prequiste	folículo sin ovocito, con varias capas irregulares de CG degeneradas y una capa prominente de CT
Quiste	folículo sin ovocito, con una gran cavidad antral, un compartimento delgado de CG que contiene pocas células aparentemente sanas y una capa prominente de CT



**ABREVIATURAS**

CG: células de la granulosa

CT: células de la teca

FSH: hormona folículo estimulante

LH: hormona luteinizante

CL: cuerpo lúteo

GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas

NOS: nervio ovárico superior

NA: noradrenalina

OP: ovario poliquístico

SOP: síndrome de ovario poliquístico

VE: valerato de estradiol

PROP: propranolol

i.m.: intramuscular

i.p.: intraperitoneal

EE: error estándar

Ab: anticuerpos

NGF: factor de crecimiento nervioso

## ÍNDICE

RESUMEN .....	i
ABSTRACT .....	ii
GLOSARIO.....	iii
ABREVIATURAS .....	v
INTRODUCCIÓN .....	1
OBJETIVO GENERAL.....	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	6
MATERIALES Y MÉTODOS .....	7
Animales .....	7
Tratamiento .....	7
Obtención de tejidos .....	8
Procesamiento histológico.....	8
Análisis morfométrico.....	10
Determinación de secreción “in vitro” de hormonas esteroidales .....	10
Expresión de resultados y análisis estadístico .....	11
RESULTADOS .....	12
DISCUSIÓN .....	19
CONCLUSIÓN.....	27
BIBLIOGRAFÍA.....	28

## INTRODUCCIÓN

La unidad funcional del ovario son los folículos, en los mamíferos estos residen en el estroma de la corteza ovárica<sup>1</sup>. El ensamblaje folicular en rata ocurre durante el periodo neonatal temprano<sup>2</sup>, tiempo donde ocurre la transformación de células germinales primordiales en ovocitos primarios, los que quedan arrestados en la profase I meiótica<sup>3</sup>, siendo rodeados por un epitelio simple de células aplanadas, también llamadas células de pregranulosa, formando así el folículo primordial<sup>1</sup>. Este proceso ocurre durante los primeros días de vida del animal y representa el número total de gametos disponibles para una hembra a lo largo de su vida reproductiva<sup>9</sup>.

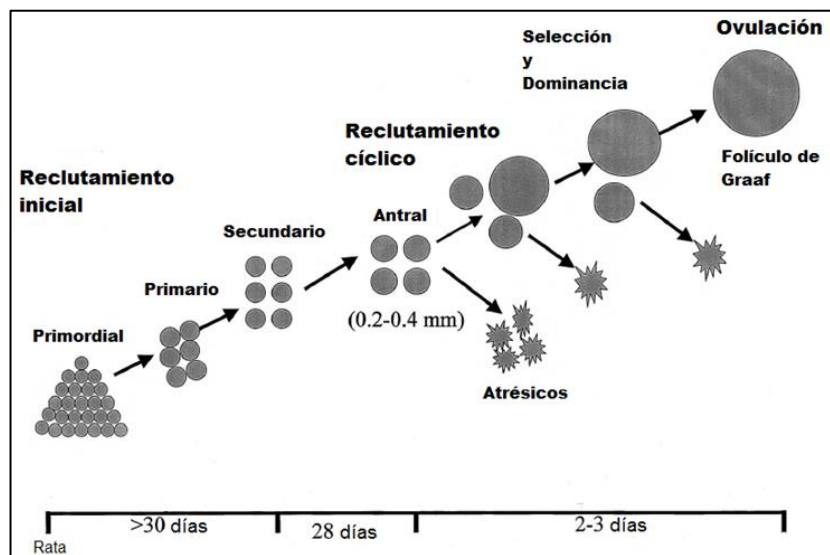
Mucho antes de la pubertad, y por estímulo de factores intraováricos y otros factores desconocidos, algunos folículos primordiales son reclutados para ingresar al conjunto creciente de folículos primarios. Las células de pregranulosa maduran a células de la granulosa (CG), disponiéndose en una capa de células cuboidales circundando al ovocito. Durante esta etapa también ocurre crecimiento de los ovocitos, pero permanecen detenidos en la profase I de la meiosis<sup>4</sup>. Con la pubertad, el reclutamiento inicial se hace periódico, y los folículos reclutados continúan su crecimiento convirtiéndose en folículos secundarios, con dos o más capas de CG rodeando al ovocito, y una capa de células de la teca (CT) formada a partir del estroma, ambas separadas por una lámina basal. El folículo en desarrollo recibe el suministro de sangre a través de capilares que perfunden la teca sin penetrar la lámina basal, nutrientes y otras señales solubles deben difundir a través de la lámina basal para alcanzar la granulosa. En esta etapa las CG expresan receptores para la hormona folículo estimulante (FSH)<sup>5</sup> y a medida que el folículo crece, las CT se estratifican y expresan receptores para la hormona luteinizante (LH)<sup>6</sup>. En adelante, el desarrollo folicular será dependiente de estas gonadotropinas. En paralelo a la proliferación de la capa granulosa, se origina una cavidad antral llena con fluido folicular,

formando así los folículos terciarios o antrales<sup>1</sup>. Como resultado del aumento de FSH circulante durante cada ciclo reproductivo, comienza el reclutamiento cíclico. Los ovocitos en estos folículos ya han completado su crecimiento, han adquirido una zona pelúcida y son competentes para reanudar la meiosis una vez que ocurra el alza preovulatoria de LH. Este proceso de reclutamiento cíclico es dependiente de hormonas y consiste en rescatar a una cohorte de folículos antrales de la atresia, proceso de muerte programada en que la mayoría de los folículos ováricos son eliminados antes de llegar a la ovulación<sup>4</sup>. Morfológicamente, los folículos atrésicos se caracterizan por CG con núcleo picnótico, restos de ovocito que han reiniciado meiosis, infiltrado leucocitario y teca hipertrofiada<sup>7</sup>. En aquellos folículos que experimentaron ovulación, el tejido remanente se transforma en una estructura con funciones esteroideogénicas denominada cuerpo lúteo (CL)<sup>8</sup>.

La rata es un modelo de estudio que se caracteriza por tener ciclos reproductivos de 4 a 5 días, donde el desarrollo folicular completo abarca 5-6 ciclos estrales (25-30 días aproximadamente)<sup>9</sup> y se observan ovulaciones espontáneas al culminar el proestro (Figura 1). Dado que la rata es un animal poliovulatorio, es posible observar numerosos CL que dan cuenta de la ovulación actual y además, a diferencia de lo que ocurre en humanos, los CL no experimentan luteólisis al final de cada ciclo, por esto permanecen tres o más generaciones de CL de ovulaciones anteriores<sup>8</sup>.

El inicio del crecimiento folicular hasta la etapa preantral se considera un proceso independiente de gonadotropinas, ya que las células somáticas de los folículos aún no expresan receptores para FSH ni LH<sup>9</sup>. La posterior maduración folicular, ovulación y resorción de los CL ocurre bajo un control endocrino mediado por el eje hipotálamo-hipófisis<sup>10</sup>, donde, de manera pulsátil, la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), péptido hipotálmico, estimula a la adenohipófisis para la liberación de gonadotropinas<sup>11</sup>. La función predominante de la FSH es estimular la secreción de estradiol y el crecimiento

de folículos ováricos, mientras que la LH induce la ovulación y la formación de CL y estimula la producción de andrógenos y estrógenos ováricos<sup>8</sup>.



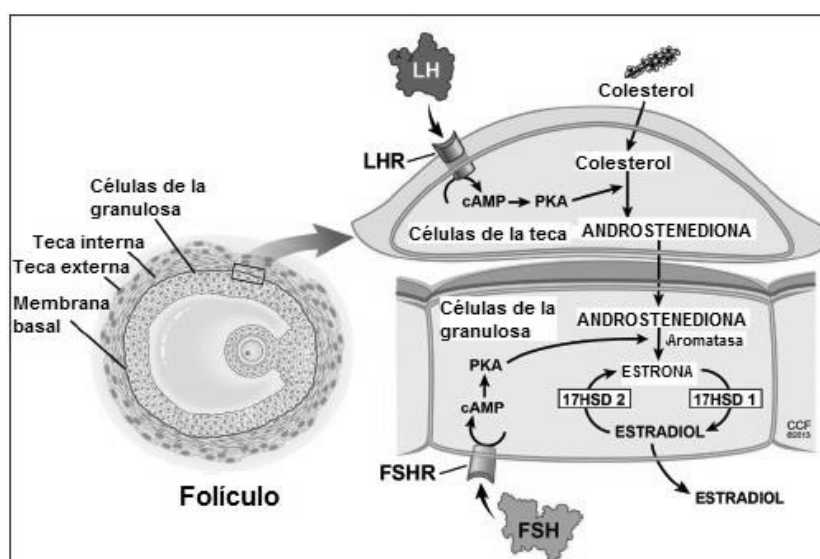
**Figura 1.** Duración del reclutamiento y selección de folículos en ovarios de ratas. Modificado a partir de McGee E y Hsueh A, 2000<sup>4</sup>.

La LH incrementa la esteroidogénesis “de novo” a partir del colesterol en las CT, produciendo andrógenos, principalmente androstenediona, como producto final. Estos difunden a través de la lámina basal y se convierten en estradiol en las CG por la acción del complejo enzimático de la aromatasa, estimulado por la FSH, lo que lleva al crecimiento y maduración del folículo apto para la ovulación<sup>12, 13</sup> (Figura 2).

Existe evidencia que muestra que el ovario no solo funciona por medio del control hormonal, sino que también se encuentra bajo un control nervioso directo<sup>14</sup>.

En la rata la inervación simpática alcanza el ovario por dos vías distintas: 1) por la vía del plexo nervioso ovárico a lo largo de la arteria ovárica, compuesto por fibras noradrenérgicas y 2) por el nervio ovárico superior (NOS) en el ligamento suspensorio, cuyas fibras se distribuyen en el estroma ovárico<sup>15, 16</sup>. El estímulo adrenérgico

representado principalmente por noradrenalina (NA) es mediado por receptores de tipo  $\beta_2$ , localizados en CG y CL, que no son inervadas directamente, y en CT directamente inervadas por nervios simpáticos. Estos receptores fluctúan durante el ciclo estral normal, siendo mayor su expresión en la etapa de diestro y mínima en estro<sup>17</sup>. Dichos receptores están acoplados a la liberación de progesterona en CG y de andrógenos en CT. No influyen en la liberación de estradiol ya que NA carece de efecto sobre la actividad de la aromatasa<sup>16</sup>. Además, el control simpático se asocia con el crecimiento folicular y la regulación de la irrigación del ovario<sup>18</sup>.



**Figura 2.** Teoría de dos células de la producción de estrógeno: la hormona luteinizante estimula la producción de androstenediona a partir del colesterol en las células de la teca. Este andrógeno se transporta a las células de la granulosa, donde se convierte en estrona. La hormona folículo estimulante promueve la conversión de estrona en  $17\beta$ -estradiol en los ovarios. Modificado a partir de Doshi S y Agarwal A, 2013<sup>27</sup>.

Se ha demostrado la importancia del componente nervioso para la función ovárica usando el modelo murino adulto en varias condiciones experimentales. Cuando se altera la señal nerviosa que llega al ovario se ven comprometidos los procesos de foliculogénesis y esteroidogénesis ovárica. Al aumentar el tono adrenérgico en rata se desarrolla la condición de ovario poliquístico (OP) e hiperandrogenismo<sup>19, 20</sup>, sugiriendo que, además

del factor hormonal, el componente nervioso podría estar involucrado en la etiología del síndrome de ovario poliquístico (SOP), la causa más prevalente de infertilidad en mujeres en edad fértil<sup>21</sup>. Uno de los modelos experimentales más utilizados para estudiar la condición tipo OP, es la administración de una única dosis de 2 mg de valerato de estradiol (VE) vía intra peritoneal (i.p.), un estrógeno de vida media larga, a ratas hembras en edad reproductiva, tras lo cual se describe que los ovarios desarrollan numerosas estructuras quísticas y anovulación, ocho semanas después de la administración de la hormona<sup>22</sup>.

Corroborando la importancia del componente adrenérgico sobre la función ovárica, existe evidencias que aquellos manejos experimentales que disminuyen el tono adrenérgico en esta glándula, como denervación quirúrgica del NOS, conduce a la recuperación de la ciclicidad y de la capacidad ovulatoria en ratas con OP inducido por VE<sup>24</sup>. Por otra parte, se ha reportado que un tono adrenérgico aumentado tras la administración del agonista  $\beta$  adrenérgico isoproterenol, conduce al desarrollo de quistes foliculares y la hipersecreción de andrógenos, lo cual se previene con la administración "in vivo" del antagonista propranolol (PROP)<sup>25</sup>. Tomando en consideración esta aproximación farmacológica, en el presente proyecto de unidad de investigación se postula que es posible bloquear la hiperestimulación simpática endógena desencadenada por un estímulo hormonal (VE), bloqueando los receptores  $\beta$  adrenérgicos, y así prevenir los rasgos morfológicos y bioquímicos de la condición de OP inducido por VE, logrando preservar la capacidad ovulatoria y la ciclicidad estral.

**OBJETIVO GENERAL**

Analizar el efecto del bloqueo farmacológico  $\beta$  adrenérgico sobre la función ovárica en ratas adultas, tras la administración "in vivo" de propranolol en la fase temprana del proceso de generación de ovario poliquístico inducido por valerato de estradiol.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1- Estudiar el desarrollo folicular en el ovario mediante clasificación de estructuras normales (folículos preantrales, antrales, atrésicos) y anormales (quistes) en el ovario de ratas adultas tratadas con VE y VE+PROP.
- 2- Evaluar el efecto del tratamiento farmacológico con VE y VE+PROP en la formación de CL.
- 3- Estudiar los cambios en la capacidad esteroideogénica midiendo la secreción "in vitro" de progesterona, testosterona y estradiol.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Se utilizaron ratas Sprague-Dowley hembras adultas jóvenes, vírgenes, de edad similar y entre 180-200 g de peso, procedentes del bioterio de la Universidad de Valparaíso. Se mantuvieron en condiciones ambientales controladas: temperatura (23-25°C), humedad alrededor del 70%, ciclos de luz-oscuridad de 12 horas (luz 07:00 AM – 19:00 PM), agua potable y alimento “ad libitum”. Los animales fueron marcados y enumerados en sus colas, con color rojo los controles, color azul los tratados con VE y con color negro los tratados con VE+PROP.

### Tratamiento

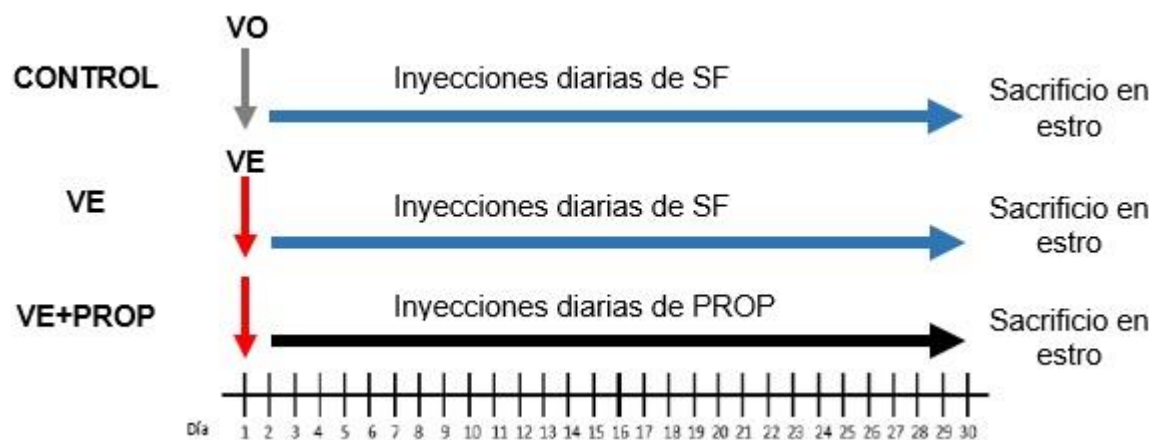
Los animales se dividieron de forma aleatoria en tres grupos:

- Grupo control (n=3): recibió una inyección intramuscular (i.m.) de vehículo oleoso y las inyecciones diarias de suero fisiológico vía intraperitoneal (i.p.), durante todo el tiempo que duró el experimento (30 días).
- Grupo tratado con VE (n=5): recibió una inyección de VE (Sigma), en vehículo oleoso, en una dosis única de 2 mg/200 g de peso, vía i.m. y las inyecciones diarias de suero fisiológico, vía i.p. durante todo el tiempo que duró el experimento.
- Grupo tratado con VE+PROP (n=5): recibió una inyección de VE (Sigma), en una dosis única de 2 mg/200 g de peso, vía i.m., en vehículo oleoso, más una inyección diaria de DL-PROP (Sigma), 5 mg/kg de peso, vía i.p., durante todo el tiempo que duró el experimento.

Diariamente se realizaron lavados vaginales para observar al microscopio las características de las células exfoliadas y establecer el día del ciclo en que se encuentra cada individuo (estro, metaestro, diestro, proestro), con esta información se llevó un

registro de la ciclicidad estral y se sacrificó a los animales en el estro siguiente al término del tratamiento.

Una representación esquemática de los tratamientos se presenta en la figura 3.



**Figura 3.** Protocolo de tratamiento: CONTROL: todas las ratas recibieron una única inyección de vehículo oleoso i.m. (gris). VE: todas las ratas recibieron una única dosis de 2 mg/200 g de peso i.m. (roja). Posteriormente, ambos grupos recibieron una inyección diaria de suero fisiológico i.p. por 30 días (azul). El grupo VE+PROP recibieron una única dosis de 2 mg/200 g de peso i.m. de VE (roja) seguido por una inyección diaria de PROP 5mg/kg i.p. por 30 días. Los grupos fueron sacrificados en estro. VO: vehículo oleoso, SF: suero fisiológico.

### Obtención de tejidos

Todos los animales se sacrificaron en el estro posterior a la última dosis de tratamiento, por decapitación. Se obtuvieron ambos ovarios. Cada ovario izquierdo se destinó a estudio de secreción “in vitro” de hormonas y luego a técnica histológica. El ovario derecho se conservó a -80°C para estudios posteriores.

### Procesamiento histológico

El ovario izquierdo de cada animal, luego de la incubación “in vitro”, se disecó y fijó en solución de Bouin por 48 horas, luego se lavó y deshidrató en soluciones de concentraciones crecientes de etanol, para inmediatamente ser aclarado en butanol. Esto se realizó en el equipo procesador de tejidos Leica TP1020. Posteriormente se realizó la inclusión del tejido en Paraplast Plus (Sigma Aldrich, USA) en el centro modular de

inclusión de tejidos Leica EG1150c, en donde se moldearon y enfriaron los bloques de Paraplast Plus que contienen las muestras.

Tras la obtención del bloque de Paraplast Plus con el tejido incluido, en el micrótopo rotatorio automático Leica RM2155 se realizaron cortes histológicos de 6  $\mu\text{m}$  de espesor, en cintas de 8-12 cortes. Los cortes fueron estirados en un baño termorregulador con agua destilada a  $40\pm 2^\circ\text{C}$  y se montaron de forma seriada en portaobjetos previamente tratados con albúmina de Meyer. Las muestras fueron rotuladas con el nombre del experimento, identificación de la rata y el número de portaobjeto. Las preparaciones, posterior a la rotulación, se secaron en estufa a  $40^\circ\text{C}$  por al menos 12 horas.

Al finalizar el secado las preparaciones pasaron por 5 baterías de reactivos: desparafinado, hidratación, tinción, deshidratación y aclaramiento. El desparafinado se realizó con tres pasajes por xilol, la hidratación con soluciones decrecientes en concentración de etanol hasta llegar a agua destilada y la tinción usada fue tricrómico de Arteta. El proceso de tinción se realizó acorde al protocolo, de manera secuencial, con hematoxilina de Harris, 0,5% eritrosina B (C.I 45430), 0,5% de naranja G (C.I 16230) y 1% de azul de metileno (C.I 42780). La deshidratación se realizó con etanol al  $95^\circ$  y  $100^\circ$  y el aclaramiento, con tres pasajes por xilol. Para finalizar, las preparaciones fueron montadas con Entellan (Merck). La observación se realizó en microscopio óptico binocular de campo claro Olympus CX31.

El procesamiento histológico se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología de la Reproducción y Desarrollo del Instituto de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso.

### **Análisis morfométrico**

El conteo y clasificación de folículos en diferentes etapas del desarrollo se realizó de acuerdo a los siguientes criterios morfológicos reportados previamente<sup>22, 28</sup>:

- Preantrales normales: folículo que ha salido de su estado de quiescencia, reanudando la proliferación celular, pero que aún no presenta cavidad antral.
- Preantrales atrésicos: folículo que ha salido de su estado de quiescencia, reanudando la proliferación celular, pero aún no presenta cavidad antral y tiene características de atresia.
- Antrales normales: folículo que ha salido de su estado de quiescencia y ha llegado a fases finales de su crecimiento, presentando cavidad antral.
- Antrales atrésicos: folículos que ha salido de su estado de quiescencia, ha llegado a etapas avanzadas de desarrollo, presentando cavidad antral, y tiene características de atresia.

También se contabilizaron estructuras anómalas como quistes. En paralelo se midió el diámetro folicular usando una reglilla ocular micrométrica previamente calibrada. El diámetro del folículo se estableció midiendo el eje mayor de la figura delimitada por la lámina basal.

### **Determinación de secreción “in vitro” de hormonas esteroidales**

Con la medición de las secreciones hormonales directas del ovario en incubaciones “in vitro” se pretende tener una mejor evidencia de la capacidad productora y secretora de la glándula. Para ello, al momento del sacrificio de los animales se extrajeron los ovarios, el izquierdo se dividió en mitades, las que se incubaron durante 3 horas a 37°C, bajo atmósfera de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> en 2 mL de solución tampón Krebs-Ringer bicarbonato (pH 7,4). Mediante inmunoensayos específicos se midió la concentración de progesterona (kit Elisa

ALPCO® para progesterona), testosterona (Kit Elisa DRG® para testosterona) y estradiol (kit Elisa ALPCO® para Estradiol) liberado al medio de cultivo.

### **Expresión de resultados y análisis estadístico**

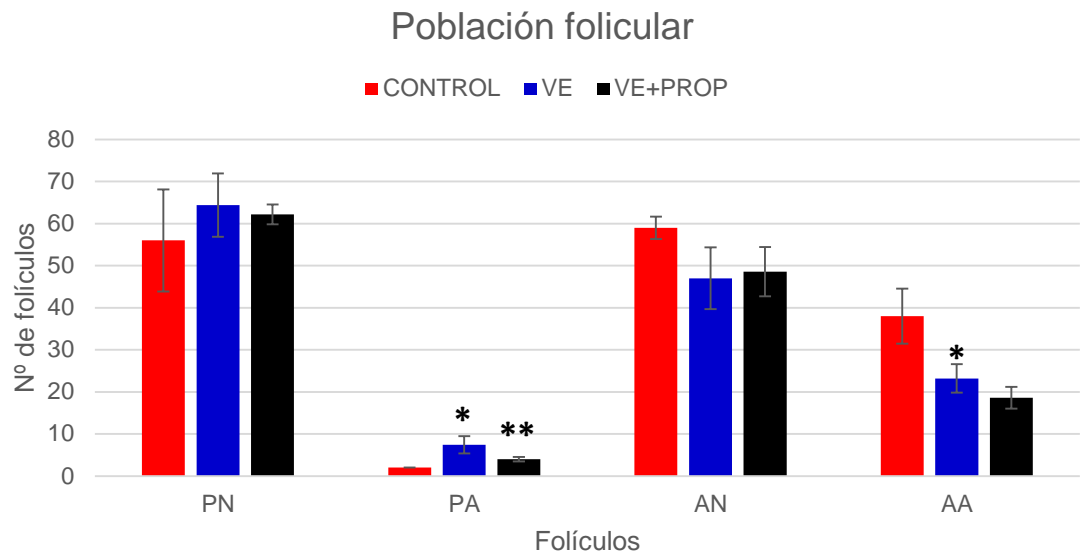
Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  error estándar (EE). Para determinar si las diferencias entre los grupos experimentales (controles, VE y VE+PROP) eran estadísticamente significativas, se utilizó la prueba de F para evaluar la varianza y la prueba t de Student, asumiendo distribución normal de los datos. Se consideraron diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ . Los gráficos y el procesamiento de datos se realizaron en Microsoft Office 2016.

## RESULTADOS

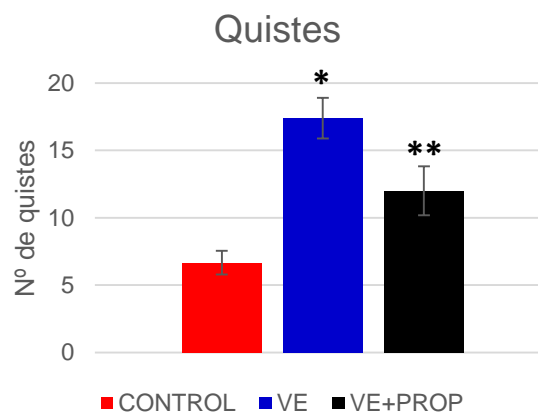
Para evaluar el efecto del tratamiento, con PROP 5 mg/kg/día en OP inducido por VE por un período de 30 días, sobre la foliculogénesis, se realizó un análisis morfométrico basado en el recuento diferencial de folículos en diferentes estadios de desarrollo y en el diámetro folicular de cada una de estas estructuras. La figura 4 muestra que el tratamiento con VE, con respecto al control, administrado 30 días antes, no altera la población de folículos preantrales y antrales normales, sin embargo, produce un aumento de preantrales atrésicos, disminución de antrales atrésicos y aumento de la presencia de folículos con anomalías morfológicas, los que se denominaron quistes. Sobre esa condición de OP inducido por VE, PROP provoca cambios significativos en folículos preantrales atrésicos, siendo capaz de prevenir parcialmente el efecto generado por VE en aproximadamente un 57%, sin producir cambios en folículos preantrales normales, antrales normales y antrales atrésicos. También se encontró que VE aumenta el número de estructuras anómalas con respecto al control, y que PROP disminuye de manera significativa el número de quistes tras la inducción de la condición de OP (30%).

En la figura 5 se observa el efecto de los tratamientos sobre el tamaño folicular. Se aprecia una disminución significativa en el diámetro promedio de folículos preantrales (4% más pequeños) y antrales normales (14% más pequeños) por VE con respecto al control, mientras que VE+PROP disminuye en un 16% el tamaño de los folículos preantrales atrésicos con respecto al grupo VE. Ninguno de los dos tratamientos afectó el tamaño de los folículos antrales atrésicos. Por otro lado, el tamaño de los quistes aumentó significativamente en el grupo tratado con VE+PROP (11%) con respecto al grupo VE, que no presentaba diferencias respecto del control.

A

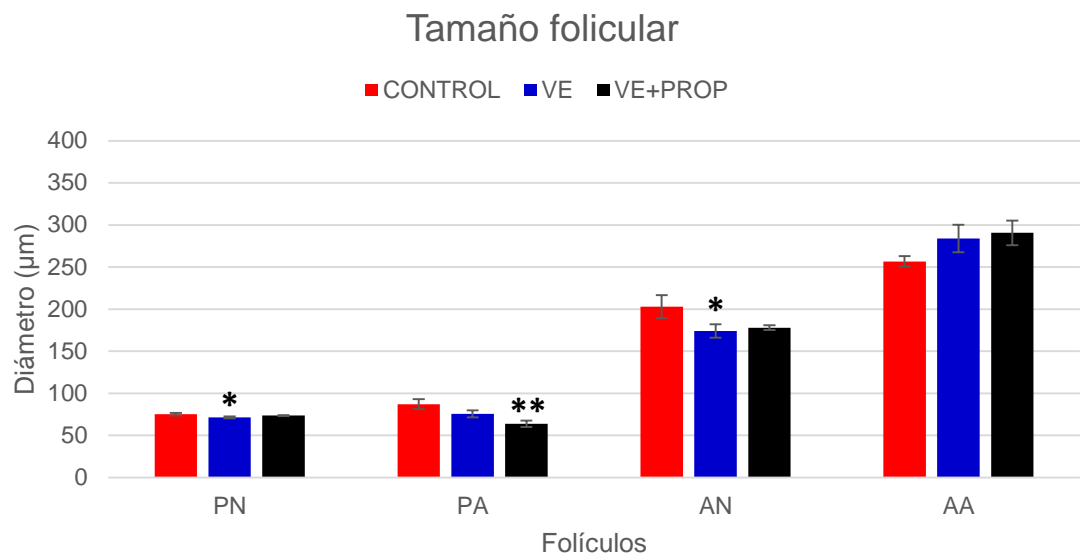


B

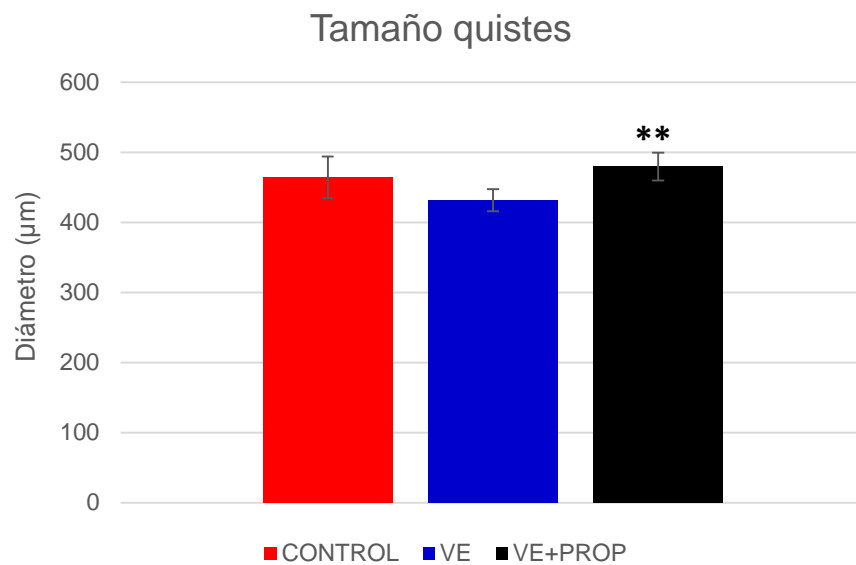


**Figura 4.** Efecto del bloqueo  $\beta$  adrenérgico “in vivo” mediado por PROP en OP de ratas adultas inducido por VE durante 30 días, sobre el recuento folicular. **A.** En la abscisa se muestran los distintos tipos de folículos; PN, PA, AN y AA; y en la ordenada el número promedio de folículos contabilizados. **B.** Recuento promedio de folículos quísticos. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  EE. Los asteriscos sobre la barra de error indican significancia estadística (\* vs control, \*\* vs VE). VE: valerato de estradiol, PROP: propranolol, PN: folículo preantral normal, PA: preantral atrésico, AN: antral normal, AA: antral atrésico

A



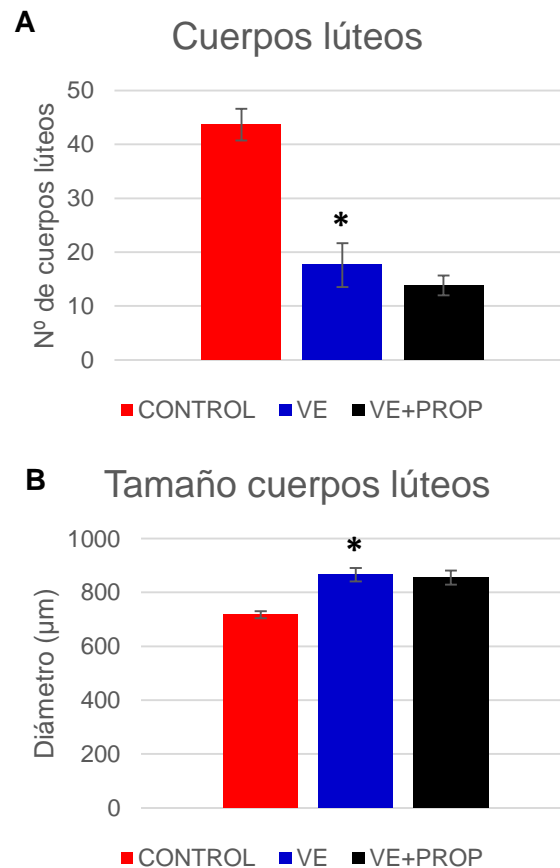
B



**Figura 5.** Efecto del bloqueo  $\beta$  adrenérgico “in vivo” mediado por PROP en OP de ratas adultas inducido por VE durante 30 días, sobre el tamaño promedio de la población folicular. **A.** En la abscisa se muestran los distintos tipos de folículos; PN, PA, AN y AA; y en la ordenada el diámetro promedio folicular en  $\mu\text{m}$ . **B.** Tamaño promedio de folículos quísticos en  $\mu\text{m}$ . Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  EE. Los asteriscos sobre la barra de error indican significancia estadística (\* vs control, \*\* vs VE). VE: valerato de estradiol, PROP: propranolol, PN: folículo preantral normal, PA: preantral atrésico, AN: antral normal, AA: antral atrésico

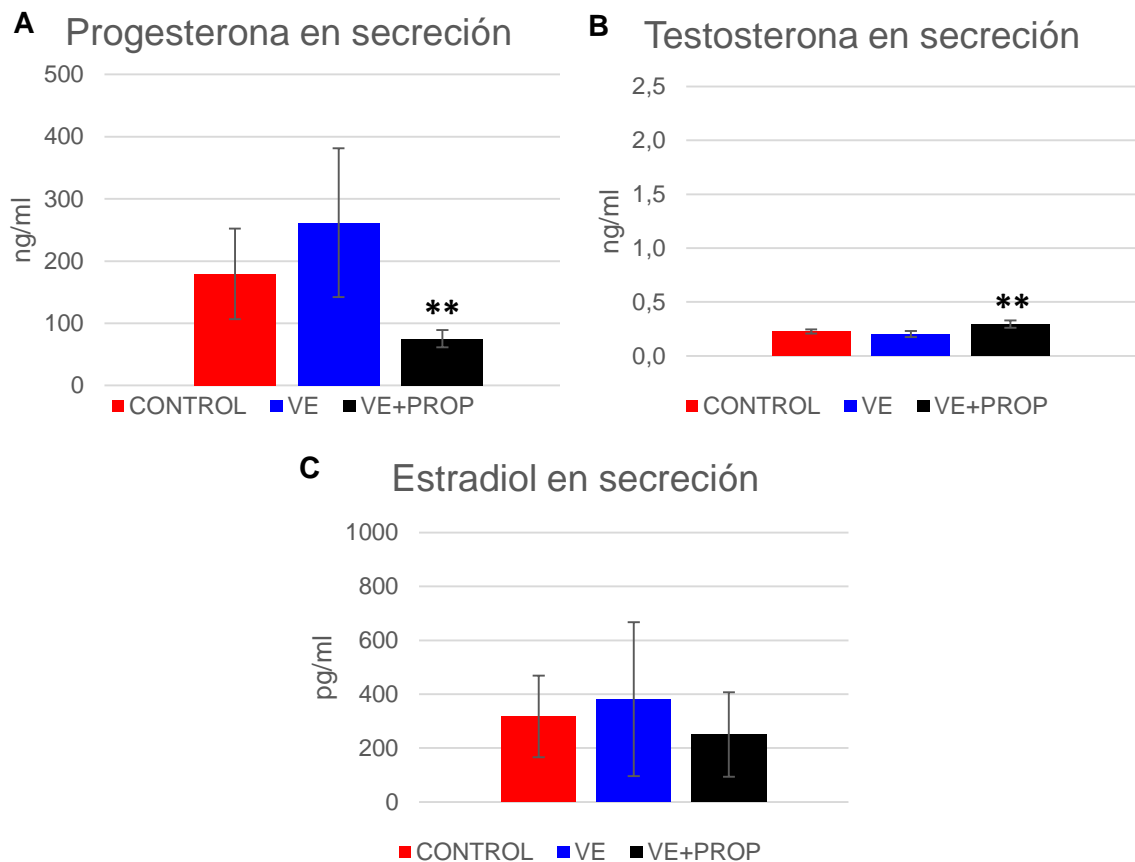


En relación a los CL, en la figura 6 se evidencian cambios significativos en el grupo VE con respecto al grupo control. Un 60% menos de CL pero éstos son de mayor tamaño (20% más grandes). Por el tratamiento con VE+PROP no se observó una recuperación significativa de estos parámetros.



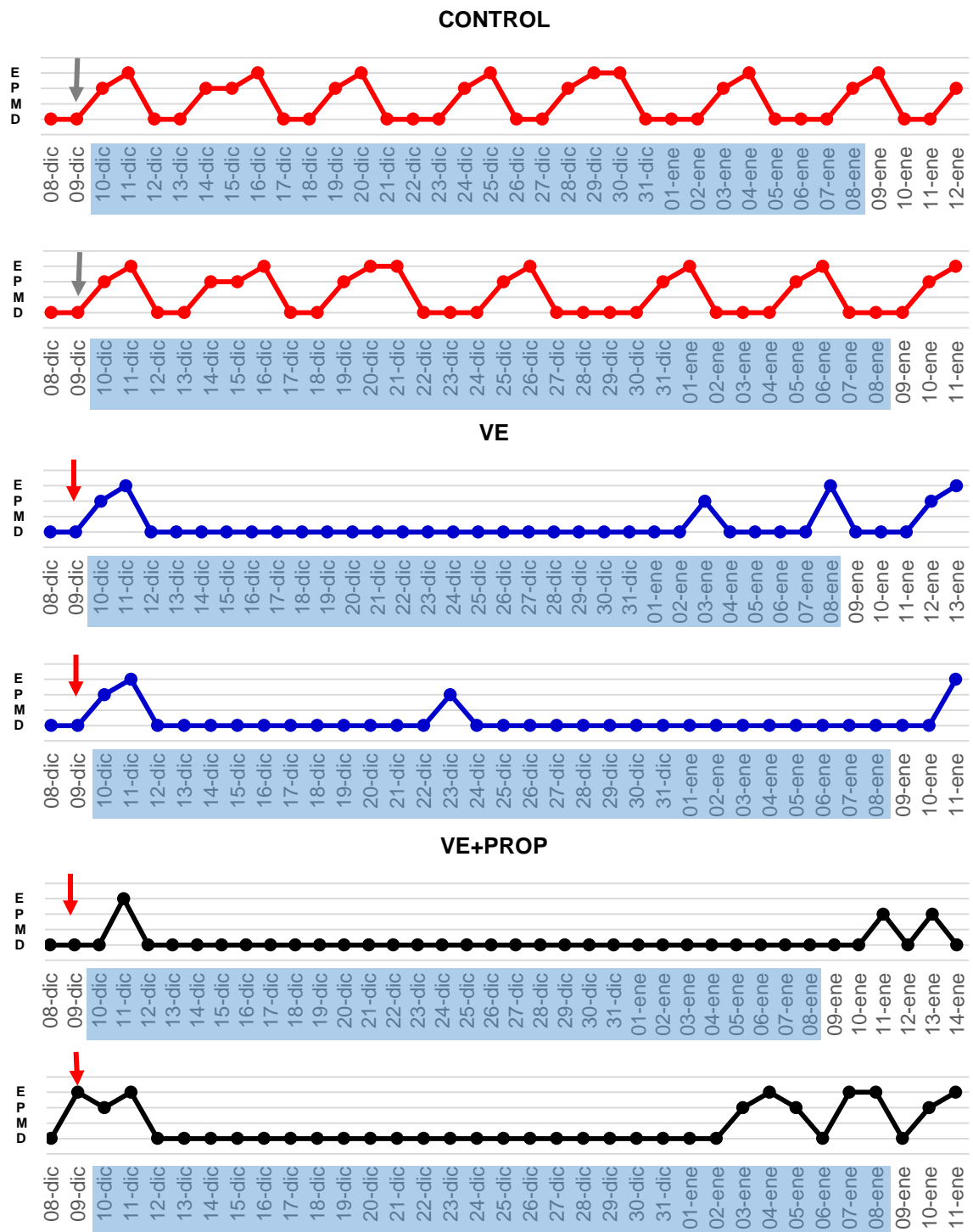
**Figura 6.** Efecto del bloqueo  $\beta$  adrenérgico "in vivo" mediado por PROP en OP de ratas adultas inducido por VE durante 30 días. **A.** Recuento promedio de cuerpos lúteos. **B.** Tamaño promedio de cuerpos lúteos. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  EE. Los asteriscos sobre la barra de error indican significancia estadística. VE: valerato de estradiol, PROP: propranolol.

Para evaluar los cambios en la capacidad esteroidogénica de los ovarios se midieron las secreciones de hormonas esteroidales del ovario en incubaciones "in vitro". La figura 7 muestra que 30 días posteriores a la administración de VE, este no afectó la secreción de progesterona, testosterona y estradiol, con respecto al control. Sin embargo, se observó una disminución significativa de progesterona (72% menos) y un aumento significativo de testosterona (50% más) en el grupo tratado con VE+PROP con respecto al grupo VE, sin cambios significativos en la secreción de estradiol.



**Figura 7.** Efecto de PROP 5 mg/kg/día durante 30 días sobre la secreción "in vitro" de hormonas esteroidales en OP inducido por VE en ratas adultas. **A**, **B** y **C** corresponden a la secreción de progesterona, testosterona y estradiol, respectivamente, por 3 horas, en condiciones controladas. El resultado se expresa como promedio  $\pm$  EE. Los asteriscos sobre la barra de error indican significancia estadística ( $p < 0,05$ ) (\*\* vs grupo tratado con VE).

La citología vaginal es un reflejo de la función ovárica ya que la maduración de este epitelio es controlada por las fluctuaciones de hormonas esteroidales secretadas por esta glándula. Para evaluar el efecto de la inducción de OP con VE y la posible reversión de esta condición tras la administración de PROP, sobre la ciclicidad estral, se analizó la citología vaginal. En la figura 8 se observa la sucesión de las etapas en dos individuos representativos de cada grupo de tratamiento, donde la transición de proestro a estro da cuenta de la ocurrencia de la ovulación. Se muestra que en la condición control, hay una ciclicidad conservada que denota ciclos que duran 4 a 5 días, VE provoca una condición anovulatoria y con citología vaginal ambigua persistente, y el tratamiento con el fármaco  $\beta$  bloqueante, tras la inducción de OP con VE, sugiere indicios de restauración de la ciclicidad en 2 de los 5 animales del grupo.



**Figura 8.** Ciclicidad estral según citología vaginal exfoliativa La abscisa representa la fecha y el sombreado celeste el periodo de tratamiento (control y VE con suero fisiológico y VE+PROP con PROP). Controles se presentan con líneas rojas, VE con líneas azules y VE+PROP con líneas negras. La flecha roja indica la inyección única de VE, la flecha gris indica la inyección única de vehículo oleoso. En el eje de las ordenadas se ubican las etapas del ciclo, E: estro, P: proestro, M: metaestro, D: diestro.

## DISCUSIÓN

Existe evidencia considerable que indica que el control del desarrollo folicular, secreción de hormonas esteroidales y ovulación, son procesos de la función ovárica regulados por señales hormonales que establecen una relación entre el hipotálamo, la adenohipófisis y los ovarios<sup>29</sup>. Además de esta regulación hormonal claramente definida, se ha reunido evidencia que pone de manifiesto una importante participación neural en el control del ovario. El componente simpático, de naturaleza principalmente adrenérgica, contribuye a esta regulación, actuando en conjunto con la señal hormonal para facilitar tanto el desarrollo folicular<sup>3</sup>, como la esteroidogénesis<sup>17</sup> ovárica, actuando por medio de receptores de tipo  $\beta_2$  adrenérgicos<sup>17</sup>.

Con el fin de conocer más sobre la participación del componente nervioso en la función ovárica, específicamente en el desarrollo folicular, se utilizó un modelo experimental en el que ha sido reportado aumento del tono adrenérgico precediendo a la condición de OP<sup>19</sup>,<sup>20</sup>.

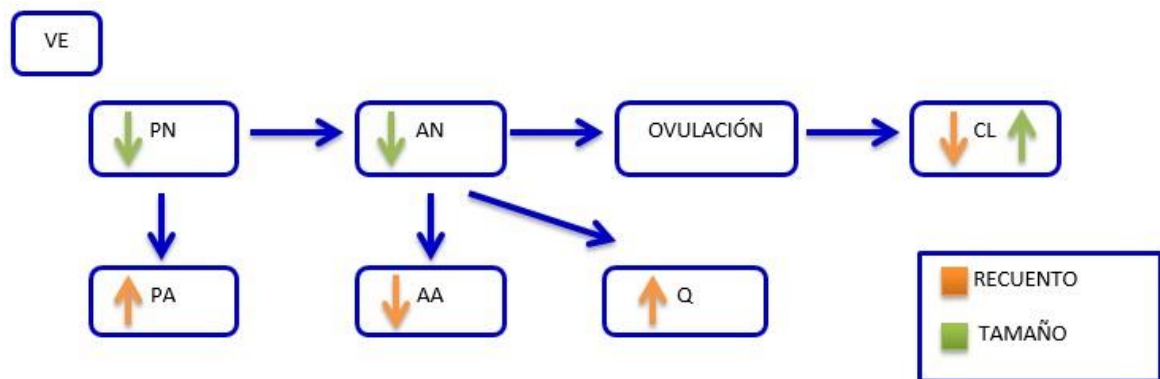
En un modelo murino, basado en una alteración endocrina producida por la administración un estrógeno de vida media larga (2 mg de VE en dosis única), Brawer y cols. Reportaron el desarrollo de numerosos folículos quísticos y anovulación<sup>22</sup> al cabo de 60 días. Lara y cols. evidenciaron un aumento del tono adrenérgico en el ovario previo al desarrollo de OP (30 días posterior a VE)<sup>20</sup>. A partir este contexto surge la hipótesis que, si se bloquea tal hiperestimulación simpática con un fármaco  $\beta$  bloqueante, se podría prevenir el desarrollo de la condición poliquística.

Este trabajo de unidad de investigación intenta explicar qué sucede en la función ovárica cuando con la señal nerviosa adrenérgica se bloquea por 30 días tras la inducción de OP con VE.

De acuerdo al estudio morfométrico realizado, el presente trabajo evidenció cambios ocasionados por VE sobre el desarrollo folicular, con respecto a la condición control, que se manifestaron como disminución en el tamaño de folículos preantrales y antrales normales. Dado que el tamaño folicular depende principalmente de la proliferación de CG<sup>3</sup>, el VE podría estar comprometiendo el crecimiento de estas estructuras que se sabe dependen de la estimulación de FSH y LH<sup>5, 6</sup> (Figura 9).

Por otra parte, el aumento detectado en el número de folículos preantrales atrésicos por efecto de VE, sugiere que el entorno neuroendocrino generado no tendría un rol antiapoptótico en folículos antrales, atribuibles a las gonadotrofinas<sup>29</sup>, sino más bien sobre la atresia de los preantrales. Así, la disminución de los folículos antrales atrésicos observada y el aumento de los quistes ocasionado por VE indica la falta de un soporte proapoptótico que conduzca a la atresia, desviando el desarrollo normal hacia la formación de estructuras anómalas como quistes (Figura 9).

Respecto de lo descrito por Brawer y cols. quienes, 60 días posteriores a la administración de 2 mg de VE en ratas adultas, reportaron que el estímulo hormonal inducía la cornificación vaginal persistente y OP anovulatorios<sup>22</sup>. En el presente trabajo se logró apreciar que 30 días después de VE ya se había establecido una citología vaginal ambigua con ausencia de ciclicidad estral, ya que dejó de registrarse la transición de proestro a estro, lo que se interpretó como condición anovulatoria. Este hallazgo coincidió con la presencia de numerosas estructuras anómalas con características de prequistes o quistes. En consecuencia, se puede inferir que el tratamiento con VE utilizado en este estudio fue eficaz.



**Figura 9.** Dinámica de desarrollo folicular y resultados obtenidos en el grupo VE con respecto al control. Las flechas en color naranja indican cambios en el recuento y las flechas en color verde indican cambios en el tamaño. VE: valerato de estradiol, PN: preantrales normales, PA: preantrales atrésicos, AN: antrales normales, AA: antrales atrésicos, Q: quistes, CL: cuerpos lúteos.

Ya que el objetivo del presente trabajo fue disminuir el tono adrenérgico inducido por VE, según lo reportó Lara y cols.<sup>20</sup>, se tomó en consideración las posibles manipulaciones experimentales que pueden disminuir el tono adrenérgico. Estas son: la resección quirúrgica del NOS, que transporta la mayoría de las fibras noradrenérgicas que inervan el ovario, tras el procedimiento se redujeron los niveles de NA elevados por el tratamiento con VE<sup>24</sup>; el uso de guanetidina, un agente bloqueante adrenérgico que al ser administrado de manera crónica destruye las neuronas simpáticas periféricas de modo específico, por un mecanismo no del todo claro, pero que parece involucrar procesos mediados por el sistema inmune, produciendo alteraciones como retraso en el desarrollo folicular, reducción de la capacidad de respuesta secretora de esteroides a gonadotrofinas y alteración del ciclo estral<sup>31</sup>; la administración de anticuerpos (Ab) para el factor de crecimiento nervioso (NGF), factor trófico clave para el desarrollo de la inervación simpática ovárica, que inducen alteraciones en el desarrollo folicular, reducen la capacidad ovárica de secretar hormonas esteroidales en respuesta a gonadotrofinas debido a una disfunción ovárica general<sup>30</sup>. Igualmente, se puede reducir este tono

adrenérgico utilizando fármacos antagonistas del receptor  $\beta$  adrenérgico<sup>31, 25, 32</sup>. En este estudio se utilizó PROP "in vivo", fármaco antagonista  $\beta$  adrenérgico, competitivo y no selectivo, de vida media corta (4 horas), usado principalmente en el tratamiento antihipertensivo<sup>33</sup>. Se prefirió este último tratamiento ya que nuestro grupo de trabajo tiene establecida la dosis, frecuencia y vía de administración del fármaco. Se ha demostrado que 5 mg/kg, una vez al día, por vía i.p. produce una mejora parcial de la función ovárica en condiciones de tono adrenérgico aumentado, como cuando se administra el agonista  $\beta$  adrenérgico isoproterenol<sup>25</sup> o en el periodo de subfertilidad durante el envejecimiento reproductivo<sup>32</sup>.

Después del bloqueo del tono adrenérgico con PROP no se observaron cambios que indiquen una restauración del ciclo estral al final del período, sugiriendo ausencia de ovulaciones, aunque no en todos los animales, lo que sugiere que el bloqueo de los receptores  $\beta$  adrenérgicos por 30 días después de la estimulación hormonal con VE no estaría ejerciendo un efecto de recuperación de la función ovulatoria (Figura 10).

En VE+PROP se advirtió una disminución en el recuento y tamaño de folículos preantrales atrésicos respecto de VE, lo que sugiere que el bloqueo de la estimulación simpática previene la muerte de folículos tempranos inducida por VE. De ser correcta esta interpretación, significaría que el tono adrenérgico participa en el desarrollo folicular promoviendo la atresia temprana (Figura 10).

Por otra parte, dado que no se hallaron cambios en el recuento y tamaño de folículos preantrales y antrales normales respecto de lo modificado por VE, se puede pensar que el bloqueo adrenérgico no permitió una reactivación significativa del desarrollo folicular.

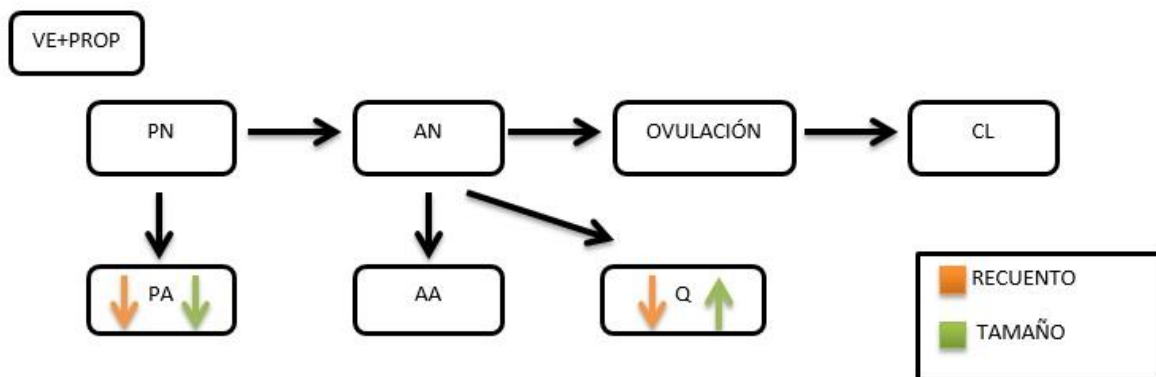
En concordancia, en el ovario se encontró menor presencia de estructuras anómalas. Si bien en este estudio no se hizo una subclasificación, las estructuras quísticas parecen tener la siguiente secuencia: folículos tipo III→prequistes→quistes. A saber, los folículos



tipo III son estructuras grandes, con o sin ovocito, que exhiben 4 o 5 capas de CG pequeñas y de forma variable, densamente teñidas y empaquetadas, que rodean un enorme antro, con un compartimento de CT aparentemente normal<sup>23</sup>. En comparación con prequistes, que son folículos en los que el antro está rodeado por varias capas irregulares de CG degeneradas y finalmente los quistes que se definen como folículos sin ovocito, con una gran cavidad antral, un compartimento delgado de CG que contiene pocas células aparentemente sanas y una capa prominente de CT<sup>23</sup>. En VE+PROP se detectaron menos estructuras con características de quistes o prequistes que en el grupo VE. Estos cambios indicarían una mejora parcial en el desarrollo folicular y esto, sumado al hallazgo del predominio de estructuras de mayor tamaño que podrían corresponder a folículos tipo III, se interpreta como un retraso en el proceso de génesis de quistes. Para corroborarlo se requiere el recuento diferencial (Figura 10).

El ovario, además de los folículos en distintos estadios de desarrollo, normalmente presenta estructuras derivadas de los folículos ovulados, estos son los CL. La rata, al ser un animal poliovulatorio, exhibe numerosos CL que dan cuenta de la ovulación actual y estos coexisten con otros que permanecen de ovulaciones anteriores, ya que cada CL sobrevive por varios ciclos<sup>8</sup>. De acuerdo con la cantidad de CL, la administración de VE redujo la ovulación, tal como lo han reportado otros autores<sup>23</sup>, en correspondencia con lo observado en la aciclicidad estral estimada por la citología vaginal (Figura 9). El tratamiento con el fármaco  $\beta$  bloqueante no restauró la capacidad ovulatoria, pues en el grupo VE+PROP se encontró cantidad similar de CL a la hallada en VE, lo que se corresponde con la ocurrencia de una o menos transiciones de proestro a estro en el ciclo vaginal (Figura 10). Resta estudiar lo que ocurre si el bloqueo se mantuviese por otros 30 días más, ya que, considerando que el ciclo estral en ratas tiene una duración entre 4-5 días<sup>9</sup>, y que el desarrollo folicular desde el reclutamiento inicial hasta la ovulación dura

entre 25-30 días<sup>9</sup>, a los 60 días se estaría acompañando el desarrollo completo de dos cohortes foliculares, lo que permitiría dilucidar el efecto del bloqueo adrenérgico una vez establecido el aumento del tono simpático<sup>20</sup>.



**Figura 10.** Dinámica de desarrollo folicular y resultados obtenidos en el grupo VE+PROP con respecto a VE. Las flechas en color naranja indican cambios en el recuento y las flechas en color verde indican cambios en el tamaño. VE: valerato de estradiol, PN: preantrales normales, PA: preantrales atrésicos, AN: antrales normales, AA: antrales atrésicos, Q: quistes, CL: cuerpos lúteos.

Otra función fundamental del ovario es la producción de hormonas esteroidales, principalmente progesterona, androstenediona, testosterona y estradiol<sup>29</sup>, cuya síntesis se encuentra bajo el control de gonadotrofinas<sup>23</sup> y NA<sup>20</sup>. Tanto FSH como LH estimulan las CG para producir de progesterona, solo LH mejora la secreción de andrógenos en CT, mientras que la síntesis de estradiol depende tanto de LH, la cual estimula la producción de andrógenos que atraviesan la membrana basal, como de FSH que activa directamente la aromatasa para catalizar la conversión de andrógenos a estrógenos<sup>29</sup>. Además, la inervación simpática que llega directamente a CT, mejora la síntesis de andrógenos a través de la interacción de NA con receptores  $\beta_2$  adrenérgicos, ubicados en estas células<sup>17</sup>. A pesar que las CG no son inervadas directamente, tienen receptores  $\beta_2$  por medio de los cuales NA induce la secreción de progesterona, más no la de estrógenos,

puesto que carece de efecto sobre la actividad de la aromatasa<sup>17</sup>. Cabe destacar que el efecto adrenérgico en CG depende de la presencia de FSH<sup>16</sup>, que además, el número de receptores  $\beta_2$  adrenérgicos fluctúa a lo largo del ciclo estral, siendo menos durante el estro y aumentando en diestro<sup>17</sup> y, que la densidad de estos receptores es regulada de manera negativa por NA en CT<sup>20</sup>.

Para determinar la actividad secretora del ovario se midieron las hormonas esteroidales liberadas al medio, durante 3 horas de incubación "in vitro". El grupo VE no presenta cambios en la secreción de las hormonas con respecto al control, de lo que se infiere que en esta etapa incipiente del establecimiento de la condición de OP, el tono adrenérgico aumentado no ha alterado aún la capacidad de secreción de esteroides ováricos a los 30 días después de la administración de VE.

El bloqueo farmacológico del tono adrenérgico tras la administración de VE, produjo un aumento en la secreción de testosterona con respecto a VE, lo que se considera un resultado paradójico ya que al antagonizar los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos, que se espera estén disminuidos en el ovario residual por el aumento de NA, descrito por Lara y cols. tras el tratamiento con VE por 30 días<sup>20</sup>, hubiese sido esperable una disminución en la secreción de andrógenos. El aumento de esta hormona esteroideal podría, eventualmente, atribuirse a una menor aromatización de andrógenos en CG. Aunque se sabe que la actividad de la aromatasa, enzima que cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos, no es afectada por NA<sup>17</sup>, no está claro lo que ocurre con la actividad de esta enzima frente al bloqueo de los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos del ovario. Considerando que no hubo cambios significativos en la secreción de estradiol, se puede inferir que el aumento de testosterona se debería a una menor conversión de ésta a estrógenos.

En el mismo grupo VE+PROP, se observó una disminución en la secreción de progesterona lo que da cuenta que, al antagonizar los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos, a pesar

que se espera el contenido de estos disminuidos<sup>20</sup>, de igual manera se generaría una respuesta inhibitoria, lo que conduciría a la menor secreción de progesterona. Se ha reportado una respuesta paradójicamente mejorada de los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos en OP frente a la administración “in vitro” de agonistas como isoproterenol<sup>24</sup>, observándose que la activación de los receptores remanentes resulta en un acoplamiento mejor de la transducción de señal generando como respuesta una mayor secreción de progesterona. Así, el resultado en la disminución de progesterona obtenido en este estudio, podría ser explicado por un bloqueo más efectivo por el antagonista debido al bajo número de receptores, lo que abalaría la disminución de la progesterona observada.

En suma, los resultados de este estudio corroboran la importancia de la regulación adrenérgica en la foliculogénesis y esteroidogénesis ovárica. El bloqueo del tono adrenérgico es capaz de revertir de manera parcial los cambios atribuibles a la activación de las neuronas simpáticas periféricas que inervan el ovario resultado de la administración de una única dosis de VE<sup>20</sup>. Para consolidar estos estudios que apoyan la importancia de la regulación neuroendocrina del ovario, se deberán analizar las variaciones en la función ovárica tras el bloqueo adrenérgico en un periodo de 60 días para asociar las observaciones en el desarrollo de más de una cohorte folicular completa al análisis aquí expuesto.

## CONCLUSIÓN

Tomando en consideración que el bloqueo  $\beta$  adrenérgico realizado en ratas hembras adultas mediante la administración de 5 mg/kg/día de PROP por 30 días tras una única inyección de 2 mg/kg de VE, produjo una reactivación parcial de desarrollo folicular ovárico, disminuyendo la muerte de folículos tempranos y generando un retraso en la génesis de estructuras foliculares anómalas, e indicios del restablecimiento de la actividad ovulatoria aún en menor secreción de progesterona, se puede concluir que el bloqueo farmacológico del tono adrenérgico contrarresta, al menos parcialmente, el alza de la actividad simpática en el ovario.

De esta manera, el bloqueo  $\beta$  adrenérgico podría ser la estrategia farmacológica para disminuir las consecuencias desfavorables que acompañan al SOP en mujeres.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. White, B. y Porterfield, S. (2013). The female reproductive system. *Endocrine and Reproductive Physiology*, 215–238.
2. Rajah, R. Glaser, E. y Hirshfield, A. (1992). The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Developmental dynamics*, 194:177-192.
3. Hirshfield, A. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, 124: 43–101.
4. McGee, E. y Hsueh, A. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine reviews*, 21(2): 200–214.
5. Romero, C. Paredes, A. Dissen, G. y Ojeda, S. (2002). Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*, 143(4):1485–1494.
6. Gougeon, A. (2003). Dynamics of human follicular growth: morphologic, dynamic, and functional aspects. *The ovary: second edition*.
7. Hsueh, A. Billig, H. y Tsafiriri, A. (1994). Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews*, 15(6): 707–724.
8. Levine, J. (2014). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. *Knobil and Neill's physiology of reproduction: two-volume set (fourth edition, vol. 2)*.
9. Kezele, P. y Skinner, M. (2003). Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology*, 144(8): 3329–3337.
10. Hillier, S. (2001). Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 179(1–2): 39–46.
11. Berga, S. y Naftolin, F. (2012). Neuroendocrine control of ovulation. *Gynecological*

- Endocrinology, 28 Suppl 1: 9-13.
12. Lovekamp-Swan, T. Jetten, A. y Davis, B. (2003). Dual activation of PPAR alpha and PPAR gamma by mono-(2-ethylhexyl) phthalate in rat ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 201(1-2): 133–141.
  13. Whitehead, S. y Rice, S. (2006). Endocrine-disrupting chemicals as modulators of sex steroid synthesis. *Best practice and research: clinical endocrinology and metabolism*, 20(1): 45–61.
  14. Burden, H. (1972). Adrenergic innervation in ovaries of the rat and guinea pig. *American journal of anatomy*, 133(4): 455–461.
  15. Lawrence, I. y Burden, H. (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The anatomical record*, 196(1): 51–59.
  16. Aguado, L. (2002). Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microscopy research and technique*, 59(6): 462–473.
  17. Aguado, L. Petrovic, S. y Ojeda, S. (1982). Ovarian  $\beta$ -adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology*, 110(4): 1124–1132.
  18. Ahmedt, C. Dees, W. y Ojeda, S. (1986). The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP)-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology*, 118(4): 1682–1689.
  19. Lara, H. Dorfman, M. Venegas, M. Luza, S. Luna, S. Mayerhofer, A. Guimaraes M. Rosa E. y Ramírez, V. (2002). Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: studies on norepinephrine release. *Microscopy research and technique*, 59(6): 495–502.
  20. 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): 2690–

- 2695.
21. Nestler, J. (1998). Polycystic ovary syndrome: A disorder for the generalist. *Fertility and sterility*, 70(5): 811–812.
  22. Brawer, J. Naftolin, F. Martin, J. y 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.
  23. Brawer, J. Michael, M. y Riaz, F. (1986). Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biology of reproduction*, 35(3): 647-655.
  24. Barria, A. Leyton, V. Ojeda, S. y Lara, H. (1993). Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology*, 133(6): 2696–2703.
  25. Luna, S. Neuman, S. Aguilera, J. Brown, D. y Lara, H. (2012). In vivo  $\beta$ -adrenergic blockade by propranolol prevents isoproterenol-induced polycystic ovary in adult rats. *Hormone and metabolic research*, 44(9): 676–681.
  26. Marcondes, F. Bianchi, F. y Tanno, A. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian journal of biology*, 62(4a): 609–614.
  27. Agarwal, A. y Doshi, S. (2013). The role of oxidative stress in menopause. *Journal of mid-life health*, 4(3): 140-143.
  28. Lara, H. Dissen, G. Leyton, V. Paredes, A. 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): 1059–1072.
  29. Kovacs, W. y Ojeda, S. (2012). *Textbook of endocrine physiology*. Oxford university press. 6° Edición. Capítulo 8. pp. 200, 213



30. Lara, H. McDonald, J. y Ojeda, S. (1990). Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology*, 126(1): 364-375.
31. Lara, H. McDonald, J. Ahmed, C. y Ojeda, S. (1990). Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. *Endocrinology*, 127(5): 2199-2209.
32. Fernandois, D. Lara, H. y Paredes, A. (2012). Blocking of  $\beta$ -adrenergic receptors during the subfertile period inhibits spontaneous ovarian cyst formation in rats. *Hormone and metabolic research*, 44(9): 682-687.
33. Flórez, J. (2008). *Farmacología humana*. Elsevier Masson. 5<sup>o</sup> Edición. Capítulo II. pp. 295-354.