



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Efecto de la inhibición de la actividad de
las aromatasas por letrozol en la
inducción del SOPQ**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

MARÍA FERNANDA MEZA MEDINA

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. LETICIA MORALES LEDESMA

Asesoras:

Dra. ROSA LINARES CULEBRO

Dra. ELIZABETH VIEYRA VALDÉZ

Investigación realizada gracias al proyecto:

UNAM-DGAPA-PAPIIT No. IN 216519

México CDMX, 05 de noviembre del 2020.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

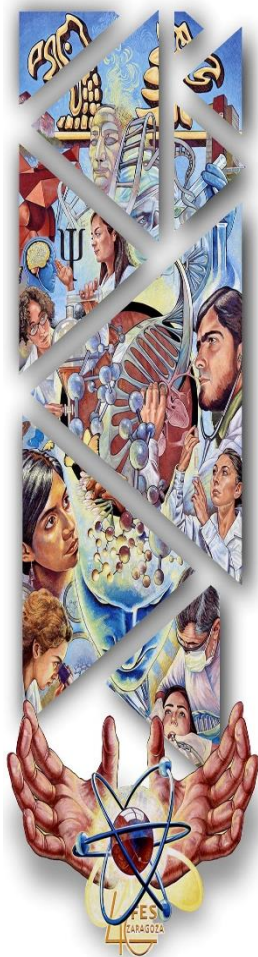
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**



**Efecto de la inhibición de la actividad de
las aromatasas por letrozol en la
inducción del SOPQ**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

María Fernanda Meza Medina

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Leticia Morales Ledesma

Investigación realizada gracias al proyecto:
UNAM-DGAPA-PAPIIT No. IN 216519



FES Zaragoza, CDMX, noviembre del 2020.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

DIRECCIÓN

Oficio de Fecha de Examen



QFB. GRACIELA ROJAS VAZQUEZ
JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna MEZA MEDINA MARÍA FERNANDA con número de cuenta 312289230 de la carrera de BIOLOGÍA se le ha fijado el día 05 del mes de NOVIEMBRE de 2020 a las 13:00 hrs., para presentar examen profesional, que tendrá lugar vía remota, con el siguiente jurado:

- Table with 3 columns: Position (PRESIDENTE, VOCAL, SECRETARIO, SUPLENTE, SUPLENTE), Name (Dra. ROSAS SAUCEDO PATRICIA, Dra. MORALES LEDESMA LETICIA, Mtro. SILVA MENDEZ CARLOS CAMILO, Dra. LINARES CULEBRO ROSA, Dra. VIEYRA VALDEZ ELIZABETH), and Signature line.

Presenta la Tesis: Efecto de la inhibición de la actividad de las aromatasas por letrozol en la inducción del SOPQ.

Opción de Titulación: Tesis

ATENTAMENTE
POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU
Ciudad de México a 06 de octubre de 2020.

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD
DIRECTOR

RECIBÍ:

Vo.Bo.

M. en C. BÁRBARA SUSANA LUNA ROSALES
Jefa de la Carrera

OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES Y DE GRADO

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por darme la oportunidad de ingresar desde la preparatoria y a la FES Zaragoza por permitirme concluir mis estudios.

Agradezco a cada uno de los miembros del jurado:

Dra. Patricia Rosas Saucedo.

Dra. Leticia Morales Ledesma.

M. en C. Carlos Camilo Silva Méndez.

Dra. Rosa Linares Culebro.

Dra. Elizabeth Vieyra Valdez.

Por dedicar su tiempo en la revisión de esta tesis y brindarme los aprendizajes que enriquecieron el presente estudio.

Al apoyo financiero brindado por **UNAM-DGAPA-PAPIIT** convenio **IN 216519**.

A la **Dra. Berenice Venegas Meneses**, por enseñarme la técnica de inmunofluorescencia y por sus comentarios para enriquecer mi trabajo.

Al **Dr. José Pedraza Chaverrí** y al **M. en C. Omar Noel Medina Campos**, gracias por permitirme realizar la captura de imágenes de inmunofluorescencia del presente estudio.

A la **M. en C. María Concepción Puga y Colmenares León** por los aprendizajes que me brindaste y las dudas que me resolviste.

Al personal del Bioterio de la FES ZARAGOZA, **Dra. Adriana, Dr. Román, Dra. Ely**, así como a los laboratoristas **Isa, Carlos, Sra. Lulú y Sr. José**, gracias por sus atenciones y por el cuidar a las ratitas.

A todas las ratitas empleadas en este estudio.

Al **Biol. Roberto Chavira** por su ayuda en la medición de las hormonas.

Deseo dedicar un agradecimiento especial, y póstumo a la **Dra. María Esther Cruz Beltrán**. Para mí fue un honor ser su alumna, llevaré conmigo todos los conocimientos y consejos que me otorgó. Gracias por siempre recibirme con una sonrisa. La recordaremos con mucho amor.

A la **Dra. Lety**:

Mamá Lety, no tengo palabras suficientes para agradecerle el guiarme, el tiempo, la confianza, las enseñanzas y el apoyo que me brindó a lo largo de este tiempo (espero sea por mucho más). Recuerdo cuando tuve la entrevista de la estancia en el laboratorio y cuando me enseñó a teñir los cortes histológicos, desde ese momento supe que quería formar parte de su equipo y la experiencia de poder estar en el laboratorio guiada por usted (y también por mamá Rosa) dejó en mis muchas cosas positivas en mí, recuerdo cada conversación, palabra de aliento, consejo que usted me ha dado y no nos podemos olvidar de los lapizazos que eran justos y necesarios jaja. Gracias por su entrega y compromiso para conmigo y este proyecto, me siento feliz de poder compartir esto con usted, gracias por enseñarme y explicarme las cosas tan bonito, por siempre escuchar mis dudas, por ser tan paciente (sobre todo muy paciente conmigo) y por ver y sacar lo mejor de mí. Gracias por decirme que el ser terca y tenaz en buscar las respuestas para todo era una buena cualidad en mí y en la investigación. Mi cariño, aprecio y admiración por usted y su trabajo son infinitos. Usted es un gran ejemplo a seguir.

A la **Dra. Rosa**:

Mamá Rosa tengo muchos sentimientos encontrados al redactar esto, me siento feliz y orgullosa de formar parte de tus “hijos” académicos. Pese a que en un inicio la regué por inmadurez (cosa que lamento profundamente), siempre me alegró poder trabajar contigo, que fueras mi mentora, ejemplo y madre académica. Gracias por guiarme y enseñarme todo este tiempo, por la paciencia y la enorme, enorme comprensión, por todas esas conversaciones y consejos, así como, por la confianza, el cariño, y lo más importante por decirme las cosas como son. Gracias por siempre exigirme, ya que sólo así pude ver que soy capaz de hacer muchas cosas. Espero que podamos seguir trabajando juntas. Te quiero demasiado mamá.

A la **Dra. Ely**:

Ely, gracias por todo lo que me enseñaste y ayudaste cuando recién llegue al laboratorio. Aún recuerdo cuando nos quedábamos a operar y a sacrificar en las noches. Te agradezco los consejos que me diste a lo largo de este tiempo y también por la paciencia que me tuviste.

A las **Dras. Gabriela Rosas, Deyra Ramírez, Azucena Espinoza, Andrea Chaparro**, así como, al **Dr. Juan Díaz** gracias por enseñarme y guiarme durante todo este tiempo, cada comentario y conversación que tuvimos me motivó e incentivó a dar lo mejor de mí en la elaboración de este proyecto.

A **Adriana Ramírez, Hugo Zarco, Nallely Acuña y Roberto Calderón** sin ustedes en el laboratorio mi estancia hubiera sido completamente diferente. Los adoro chicos, gracias por sus consejos, enseñanzas, ayuda y amistad, los quiero muchísimo.

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio **David, Litzay, Hugo Colín, Karina, Mayahuel, Michelle, Alma, Mildred, Paloma, Ottoniel, Emmanuel, Dianita, Gregorio, Edgar, Miriam, Alejandro, Ángel, Rocío y Miguel**, gracias por todos los momentos de enseñanzas y diversión que compartimos en laboratorio.

A los alumnos del servicio social **Alejandro, Deni, Cinthya y Katia**, mis niños gracias por permitirme enseñarles algunas cosas y gracias por enseñarme algunas otras. Los quiero mucho, comparto con ustedes esto ya que ustedes también fueron parte importante para la finalización de esta tesis.

A **Karla Sandoval**, ¡Mejora, cachito de mi corazón! Han pasado muchos años y me alegra que sigamos juntas. Te asmo un montón, sigamos compartiendo nuestras metas y anhelos, permanezcamos juntas para ver como cada uno de ellos se cumple.

Al **Biol. Kevin Rojas**, te dije que este día llegaría jajaja. Amigo gracias por siempre estar ahí para mí, gracias por todas esas anécdotas interesantes, consejos y momentos de risas, te quiero en demasía.

A **Jacqueline Romero**, amiga sabes lo mucho que te aprecio y admiro, gracias por esta amistad tan bonita. Eres una persona excepcional, gracias por esas pláticas y consejos. Te quiero mucho.

A **Luis Ángel Rojas**, muchas gracias por ayudarme a crecer y madurar, por siempre escucharme y motivarme. Los recuerdos y momentos que compartimos lo atesoro en demasía, gracias por permitirme conocerte a ti, a tu mamá, a Elena, a tu abuelita y a Tony. Como lo dije anteriormente, mi cariño, respeto y agradecimientos hacia ti y tu familia son infinitos. Te quiero.

A mis amigos de la carrera **Laila, Brenda, Linda, Gustavo, Dianita y Guillermo**, gracias por todos los momentos y pláticas que compartimos, sin ustedes la carrera hubiera sido menos interesante, los aprecio mucho.

A mis amigas de la prepa **Mayra, Joy, Karen y Cinn**, aunque no nos veamos mucho, me alegra seguir manteniendo una relación con ustedes, gracias por todos los momentos que compartimos juntas.

DEDICATORIAS

A MIS PAPÁS:

Flor y Enrique, es por ustedes y por todo su esfuerzo y sacrificio he llegado hasta aquí. Agradezco infinitamente su amor, crianza, dedicación, ayuda, ejemplo y sabias palabras. Esto es por ustedes y para ustedes.

Flor, mami estoy infinitamente agradecida con Dios por ser tu hija. Gracias por nunca dejarme, por tu amor incondicional, por todas esas pláticas, por acompañarme en todo momento, por todo tu apoyo a lo largo de mi vida, gracias por ser la mejor mamá que la vida me pudo dar, eres la mayor bendición que poseo. Te amo mucho.

Enrique, papi sé que te sientes muy orgulloso de mí. Papi eres mi pilar, mi motivación y el mejor ejemplo del esfuerzo y esmero que tengo. Gracias por todo tu amor, por confiar en mí, por apoyarme. Eres el mejor papá que Dios me pudo dar. Espero siempre te sientas orgulloso de lo que soy.

A MIS HERMANOS:

Sareli y Samuel sin sus bromas, pláticas, risas, anécdotas, regaños y palabras de aliento no sería la persona que soy. Gracias por estar siempre ayudándome, aconsejándome, escuchándome y cuidándome. Los amo infinitamente hermanos.

Sare, porque eres mi complemento, mejor amiga, consejera, confidente, la persona más leal y cálida que la vida me pudo dar. Agradezco que siempre creas en mí y estés pendiente de todo lo que añoro y me ayudes a cumplirlo, sigamos apoyándonos y creciendo juntas. Love u, sis.

Sam, manito por ser la persona que más me exige y me reta a dar lo mejor de mí en cada cosa que hago, gracias por ser un gran ejemplo, por apoyarme y ayudarme en cada idea que tengo. Sé que siempre puedo acudir a ti y soy muy feliz por ello. Love u, manito.

A mi **Abuelita Ely**, abue gracias por todo lo que me has dado, por todos tus consejos, tus palabras, y por ser tan cálida y amorosa conmigo; gracias por cuidarme desde chiquita, parte de lo que soy te lo debo a ti. Te amo abue. *Amor de mis amores, tú eres mi cielo.*

Así como a hermosa y cálida familia. **Sofía, Sergio, tía Campos, tío Omar, Gustavo, Michelle, Ramón, tía Laura, Omar y Santiago**, muchas gracias por estar conmigo y apoyarme en cada etapa de mi vida. Agradezco sus consejos, cariño y comprensión. **Elvis y Nena** gracias por siempre alegrarme y hacerme feliz.

En memoria de Sergio Medina. Abuelito, ya cumplí. Espero y deseo que estés orgulloso de mí donde sea que estés, te recuerdo con mucho amor, descansa en paz.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	2
Etapas del desarrollo postnatal en la rata	2
Ciclo estral	5
Estructura del ovario	7
Desarrollo Folicular	9
Regulación de las funciones ováricas	13
Ovulación	16
Fase Lútea	17
Atresia folicular	18
Biosíntesis de las hormonas esteroides	21
Inervación ovárica	26
Síndrome de ovario poliquístico	28
Disfunción neuroendocrina	31
Predisposición genética	31
Hiperactividad de las fibras simpáticas	31
Modelos de inducción del SOPQ	32
Andrógenos	32
Estrógenos	33
Letrozol	34
Efectos de la denervación simpática en la rata con el SOPQ	35
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
HIPÓTESIS	37
OBJETIVO GENERAL	38
OBJETIVOS PARTICULARES	38

MATERIALES Y MÉTODOS	40
RESULTADOS	49
Modelo I. Inyección de letrozol en ratas infantiles, hasta el momento de la apertura vaginal	49
Modelo II. Inyección de letrozol en ratas infantiles hasta los 60 días de edad	56
Modelo III. Efecto de la SBNO a los 50 días de edad en ratas inyectadas con Letrozol desde el día 10 de vida hasta los 60 días de edad.	63
DISCUSIÓN	73
MODELOS	82
CONCLUSIONES	86
REFERENCIAS	87

ABREVIATURAS

17β-HSD	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
3β-HSD	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
A	Adrenalina
AC	Adenilato ciclasa
ACAT	Colesterol transferasa
AES	Sociedad de Exceso de Andrógenos
AES/PCOS	Sociedad de Exceso de Andrógenos y Síndrome de Ovario Poliquístico
AMPc	Monofosfato de Adenosina Cíclico Intracelular
ANDEVA	Análisis de varianza multifactorial
AV	Apertura vaginal
bFGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico
CGRP	Péptido Relacionado con el Gen que de la Calcitonina
CRH	Hormona Liberadora de Corticotropina
D1	Diestro 1 ó Metaestro
D2	Diestro 2
DA	Dopamina
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DTH	Dihidrotestosterona
EAV	Edad de apertura vaginal
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
EPE	Edad del primer estro vaginal
ESHRE/ASRM	Sociedad Europea de Reproducción y Embriología Humana y la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva
FSH	Hormona Folículo Estimulante
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GCMS	Ganglio Celiaco Mesentérico Superior
GH	Hormona del Crecimiento

ABREVIATURAS

GnRH	Hormona Liberadora de las Gonadotropinas
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidad
HMG CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
i.p	Intraperitoneal
IGF-1	Factor de Crecimiento Semejante a la Insulina 1
Il-6	Interleucina 6
Kiss	Kisspeptina
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad
LH	Hormona Luteinizante
NA	Noradrenalina
NGF	Factor de Crecimiento Neural
NGF- α	Factor de Necrosis Tumoral α
NGF-p75	Receptor de baja afinidad
NIH	Institutos Nacionales de la Salud
NOS	Nervio Ovárico Superior
NPO	Nervio del Plexo Ovárico
NPY	Neuropéptido Y
OS	Operación Simulada
PEV	Primer estro vaginal
PKA	Proteína Quinasa A
PT	Propionato de Testosterona
SBNO	Sección Bilateral del Nervio Ovárico Superior
SHBG	Proteína Transportadora de las Hormonas Sexuales
SOPQ	Síndrome de Ovario Poliquístico
SP	Sustancia P
StAR	Proteína reguladora aguda esteroideogénica
TA	Testigo Absoluto
TH	Tirosina hidroxilasa
VA	Arginina Vasopresina
VE	Valerato de Estradiol
Vh	Vehículo
VIP	Péptido Intestinal Vasoactivo

RESUMEN

El ovario es un órgano en constante cambio, sus funciones son reguladas por señales hormonales y neurales que actúan en conjunto y modulan el desarrollo folicular, la secreción de las hormonas y la ovulación (Adashi, 1994; Ojeda y Urbanski, 1994; Levine, 2015). Las modificaciones en estas señales pueden estimular el desarrollo de patologías como el síndrome de ovario poliquístico (SOPQ), el cual es una de las principales causas de infertilidad anovulatoria en las mujeres en edad reproductiva (Gorry y col., 2006; Bremer, 2010). Las características que permiten su diagnóstico son el hiperandrogenismo, la anovulación y los quistes ováricos (Azziz y col., 2006).

El origen de la patología no se ha determinado, pero ha sido atribuido a alteraciones en el patrón de secreción hormonal del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, así como al aumento de la actividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario a través del nervio ovárico superior (NOS) (Lara y col., 2000; Teede y col., 2010). Algunos de los modelos usados en el estudio de su etiología, incluyen el uso de los andrógenos, los estrógenos, las antiprogestinas, los inhibidores de la actividad aromatasas, así como, la manipulación genética y la exposición a factores estresantes (Walters y col., 2012; Abbott y col., 2013; Padmanabhan y Veiga-Lopez, 2013).

La administración constante de Letrozol, un inhibidor selectivo de la actividad de las aromatasas induce el hiperandrogenismo, la anovulación, las alteraciones en la concentración de las hormonas esteroides y proteicas, así como, las características morfológicas del ovario presentes en la mujer con la patología (Mannerås y col., 2007; Maliqueo y col., 2013).

Los reportes muestran que las características que se desarrollan en respuesta a la administración de Letrozol pueden depender, entre otros factores, de la dosis y del tiempo de exposición. Para analizar esta posibilidad, en el presente estudio se utilizaron ratas hembra de la cepa CII-ZV a las cuales se les inyectó 0.5 mg/Kg/día de Letrozol disuelto en 0.1 mL de solución salina por vía intraperitoneal. El tratamiento se realizó desde los 10 días de edad, cinco veces a la semana hasta la canalización vaginal (modelo I) o cada 48 h (vida media del fármaco) hasta los 60 días de edad (modelo II).

En el modelo donde logramos inducir las características del síndrome (modelo II), se analizó si el Letrozol es capaz de inducir la patología en respuesta al aumento de la actividad de las fibras simpáticas, para ello se realizó la sección bilateral del NOS a los 50 días de edad y la eutanasia se

RESUMEN

realizó alrededor de los 60 días de vida, al presentar un estro vaginal. Para comprobar la disminución del tono simpático se determinó la expresión de la TH en el ovario.

En todos los grupos se analizó la edad de apertura vaginal, el patrón de ciclo estral, la masa relativa de los órganos, la respuesta ovulatoria, la concentración de las hormonas esteroides, la dinámica del crecimiento folicular y la morfología ovárica.

En las ratas del modelo I, la apertura vaginal se retrasó y el primer estro se presentó aproximadamente seis días después de la última administración del fármaco. La masa ovárica, la capacidad ovulatoria, la concentración de la progesterona y del estradiol no se modificó. Por otra parte, la masa del útero y adrenal disminuyó; sin embargo, la masa corporal y la concentración de la testosterona aumentó. La morfología ovárica exhibió la presencia de prequistes, quistes foliculares y cuerpos lúteos, además, la dinámica del crecimiento folicular mostró una disminución en el número de los folículos totales y sanos con un diámetro menor a 349 μm .

En el modelo II, la edad de apertura vaginal se adelantó, no obstante, el primer estro se retrasó. La masa corporal y ovárica, así como, la concentración de la testosterona aumentó. Por otro lado, la capacidad ovulatoria, la masa adrenal y uterina disminuyeron, al igual que la concentración de la progesterona y el estradiol. En el ovario, disminuyó el número de los folículos totales, resultado de la disminución de los folículos sanos con un diámetro menor a 449 μm , en cuanto a la morfología ovárica, esta reveló la presencia de prequistes, quistes y quistes hemorrágicos, así como, ausencia de cuerpos lúteos.

En el 50% de las hembras sometidas a la SBNO, se restableció la capacidad ovulatoria con una cuota ovulatoria baja, mientras que, en las sometidas a la operación simulada, aproximadamente el 85% restableció la ovulación. La masa corporal y ovárica, así como, la concentración de la progesterona aumentó. En contraste, la masa adrenal y uterina, al igual que la concentración de la testosterona y el estradiol disminuyeron. La histología ovárica mostró la presencia de prequistes, quistes foliculares, quistes hemorrágicos y cuerpos lúteos; morfología semejante se apreció en los animales sometidos a la operación simulada. El número de los folículos totales sanos no se modificó y el número de los folículos atrésicos aumentó. La expresión de la TH ovárica, disminuyó por la denervación bilateral del NOS.

RESUMEN

Los resultados del presente estudio muestran que el desarrollo del síndrome es el resultado de la exposición temprana a una concentración alta de andrógenos; sin embargo, lo que permite su mantenimiento es el estímulo constante a estos. En el modelo II la inervación simpática modula de manera inhibitoria los mecanismos que permiten la ovulación.

INTRODUCCIÓN

El SOPQ es una patología con una variedad de características reproductivas y metabólicas que afecta del 4% al 18% de las mujeres en edad reproductiva, según los criterios de diagnóstico utilizados (Moran y col., 2011; Sirmans y Pate, 2014). Es considerado como un trastorno poligénico y endocrino complejo, heterogéneo y multifactorial. Se caracteriza, por manifestaciones clínicas y bioquímicas de hiperandrogenismo, trastornos menstruales (oligo/anovulación) y ovarios poliquísticos que eventualmente culminan con la infertilidad (Witchel, 2006; Allahbadia y Merchant, 2011; Azziz, 2018).

La problemática del síndrome no sólo radica en la complejidad de su abordaje en la clínica, su origen o en la falta de un consenso que incluya en su totalidad a todas las pacientes con esta patología (Flores, 2012). También se deben considerar las comorbilidades y los riesgos de salud a largo plazo que incluyen alteraciones metabólicas (resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, diabetes mellitus tipo 2, perfiles de riesgo cardiovascular adversos) y psicológicas (ansiedad, insatisfacción corporal, desórdenes alimenticios, depresión y una mala calidad de vida) que las mujeres con la patología experimentan (Teede y col., 2010; Dennett y Simon, 2015).

El origen de la patología se desconoce y es probable que más de un factor desencadene todas las anomalías observadas y relacionadas con el SOPQ (Maliqueo y col., 2013). El hiperandrogenismo se considera el factor clave en el desarrollo y mantenimiento del síndrome (Homburg, 2009). Se ha planteado que la exposición a una concentración alta de los andrógenos en etapas tempranas de la vida puede conducir al desarrollo del síndrome en la edad adulta (Abbott y col., 2008), mientras que, otras evidencias sugieren que el aumento en la actividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario por medio del nervio ovárico superior (NOS) están implicadas en el desarrollo de la patología (Lara y col., 2000).

En el presente estudio se utilizó un modelo de androgenización temprana, mediante la inhibición de la actividad de las aromatasas, por la inyección de Letrozol, sobre la actividad ovárica en dos momentos de la vida del animal, al inicio de la pubertad y en la etapa adulta al presentar un estro vaginal. Además, se analizó si el síndrome se desarrolla en respuesta a la hiperactividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario.

MARCO TEÓRICO

Etapas del desarrollo postnatal en la rata

Los mecanismos involucrados en la maduración sexual pueden diferir entre las especies, sin embargo, la rata presenta cierta similitud con la mujer en el control de la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), en la secreción de las gonadotropinas, en los mecanismos de retroalimentación positiva o negativa ejercidos por los esteroides y en el desarrollo folicular (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

En la rata, el desarrollo de los mecanismos neuroendocrinos relacionados con la reproducción se produce en un lapso de cinco semanas (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990). Ojeda y colaboradores (1980) clasifican estas etapas con base en los parámetros morfológicos y fisiológicos relacionados con el eje hipotálamo-hipófisis-ovarios.

Etapas neonatal

En la rata, esta etapa abarca desde el nacimiento hasta el séptimo día de edad, se caracteriza por el inicio del crecimiento folicular independiente de las gonadotropinas que son imperceptibles por el ovario hasta el quinto día de edad, día en que la hormona folículo estimulante (FSH) comienza a estimular la producción del estradiol a partir de la testosterona. La alta concentración de la α -feto proteína suprime la secreción del estradiol (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990). Al final de esta etapa ya hay actividad esteroideogénica del ovario en respuesta a las gonadotropinas (Peter, 1970; Döhler y Wuttke, 1974; Lamprecht y col., 1976; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

Etapas infantil

Esta etapa comienza desde el octavo día y culmina el día 21 de edad, se caracteriza por la presencia de picos ocasionales de la hormona luteinizante (LH). Alrededor del día 12 de edad ocurre un aumento en la concentración de la FSH necesario para el reclutamiento y crecimiento de los folículos (Kragt y Dahlgren, 1972; Ojeda y Ramírez, 1972) y que a partir del día 15 de edad comienza a disminuir, ya no se presentan picos de la LH (Döhler y Wuttke, 1974; Mackinnon y col., 1976; Wuttke y col., 1980; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990). La disminución en la

concentración de la α -feto proteína permite el aumento en la concentración del estradiol (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

En nuestra cepa de ratas (CII-ZV), entre los 10 y 16 días de edad se observan muchos folículos pequeños, los cuales para el día 18 disminuyen como resultado de la atresia folicular. En cuanto a la concentración de la LH se observa un pico de secreción entre los días 14-16 de edad, mientras que, la concentración de la noradrenalina (NA) en el hipotálamo anterior aumenta al final de esta etapa, al igual que la concentración de la progesterona y el estradiol (Castro y col., 2001).

Etapa Juvenil

Este periodo comienza a partir del día 21 y finaliza alrededor del día 30 de edad, al inicio de esta etapa se observa un decremento de la concentración de la FSH y de la LH. Ésta última gonadotropina empieza a aumentar al final de esta etapa y sigue un patrón de secreción pulsátil y circádico (Meijs-Roelofs y col., 1983; Urbanski y Ojeda, 1985; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

A nivel ovárico, se observa un aumento en la cantidad de receptores a la LH que, aunado con su patrón de secreción, genera una mayor actividad esteroidogénica. Por otra parte, ocurre un aumento gradual de la prolactina y de la hormona del crecimiento (GH) por acción de la GnRH (Smith-White y Ojeda, 1981; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

En nuestra cepa de animales, se observa que el número de los folículos pequeños vuelve a aumentar en los días cercanos al inicio de la etapa juvenil (21 y 24 días), al día 26 de edad la población de los folículos preovulatorios comienza a surgir. La concentración de la LH y de la progesterona es baja, sin embargo, la del estradiol comienza a incrementar conforme el animal se desarrolla, un comportamiento similar se observa en la concentración de la NA en el hipotálamo anterior y medio que presenta un pico de secreción entre los días 26 y 30 (Castro y col., 2001).

Etapa peripuberal

En mamíferos, la pubertad es delimitada por los caracteres sexuales secundarios, influida por múltiples factores entre los cuales se incluye la edad, la masa corporal y la nutrición (Moran y col., 1989).

MARCO TEÓRICO

En ratas hembra, esta etapa inicia cerca del día 30 de edad y finaliza cuando ocurre la apertura vaginal (entre el día 36 y 39 de edad). Se observa la presencia de los ovocitos en el oviducto (Arata-Bellabarba y col., 1981) señal de que el animal comienza su periodo de fertilidad debido a la activación del eje hipotálamo-hipófisis-ovarios (Kakarla y Bradshaw, 2003; Chulani y Gordon, 2014).

La canalización vaginal (único signo externo del inicio de la pubertad en la rata) es estimulada por los estrógenos y generalmente ocurre un día después del primer pico preovulatorio de las gonadotropinas. En el frotis vaginal se muestran células queratinizadas correspondientes al primer estro y es seguido por la presencia de leucocitos durante uno o dos días, señal del primer diestro (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

En el ovario se observa un aumento en la cantidad de receptores a la LH y la FSH que conlleva a una mayor actividad esteroidogénica (Ojeda y Urbanski, 1988). El patrón de secreción de la LH y la prolactina presenta un pico a ciertas horas de la tarde y es independiente del control esteroideo (Kimura y Kawakami, 1981; Urbanski y Ojeda, 1987). El pulso de la LH estimula un aumento en la producción del estradiol en los ovarios, lo cual ejerce una retroalimentación estimulante en la secreción de las gonadotropinas (Urbanski y Ojeda, 1986). Cuando la concentración de los esteroides aumenta, sensibiliza al hipotálamo el cual estimula la secreción preovulatoria de las gonadotropinas, que desencadena la primera ovulación (Urbanski y Ojeda, 1986; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

Ciclo estral

El ciclo estral es un proceso repetitivo y dinámico resultado de las interacciones entre los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-ovarios (Barbacka-Surowiak y col., 2003; Cora y col., 2015). Implica esencialmente la presencia recurrente de diferentes tipos celulares correlacionados con el estado de la mucosa vaginal, el útero y el ovario ligado a la secreción de las hormonas esteroides y a las gonadotropinas (Goldman y col., 2007).

En la rata, el ciclo estral tiene una duración de cuatro a cinco días, en este proceso un conjunto de folículos y ovocitos crecen, maduran y se diferencian para alcanzar la capacidad de ovular o degenerar por atresia (Barbacka-Surowiak y col., 2003). Las etapas del ciclo estral se identifican por la ausencia, la presencia o la proporción de los tres tipos celulares epiteliales básicos (leucocitos, células nucleadas y queratinizadas), así como por la densidad celular y la disposición de las células (Cora y col., 2015) y con base en ello, se pueden identificar cuatro etapas (Figura 1): metaestro (diestro I), diestro (diestro II), proestro y estro (Long y Evans, 1922; Freeman, 1988; Cora y col., 2015).

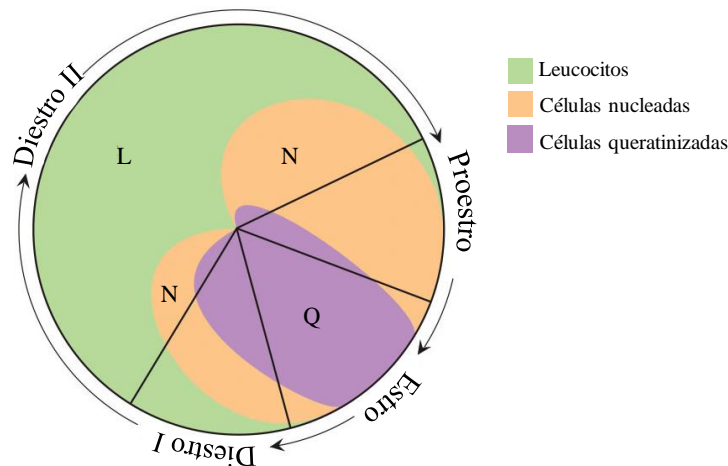


Figura 1. Representación gráfica de los tipos de células y su proporción relativa durante las cuatro etapas del ciclo estral en la rata. El nombre de cada etapa del ciclo estral se muestra en el exterior del círculo que avanza en el sentido de las manecillas del reloj. Los 4 cuadrantes son de tamaños diferentes para representar una estimación aproximada del tiempo que dura en cada etapa. Modificado de Byers y col., 2012.

La figura 2, muestra la citología vaginal de la rata. Cada una de las etapas se ha caracterizado desde el aspecto histológico hasta los cambios neuroendócrinos que presentan.

- Metaestro (Diestro I): es una etapa que dura de 6 a 8 horas (Byers y col., 2012). Se caracteriza por la presencia de células epiteliales queratinizadas anucleadas y leucocitos

(Mendiola y col., 1993; Cora y col., 2015). El cuerpo lúteo, se encarga del aumento en la concentración de la progesterona (Mendiola y col., 1993), ésta ejerce una retroalimentación inhibitoria sobre el patrón de secreción de la GnRH y de las gonadotropinas (Barbacka-Surowiak y col., 2003; Freeman, 2006). La FSH induce la selección de los folículos antrales pequeños que iniciarán su desarrollo y el aumento paulatino del estradiol (Barbacka-Surowiak y col., 2003).

- Diestro II: tiene una duración de 48 a 72 horas (Freeman, 2006). En esta etapa las células predominantes son los leucocitos, las células nucleadas pequeñas y alargadas y en menor proporción, las células epiteliales queratinizadas anucleadas (Cora y col., 2015). La concentración de la FSH y la LH se mantiene basal, en esta etapa los folículos que comienzan su desarrollo secretan el 17- β estradiol. La concentración de la progesterona comienza a disminuir por la degeneración del cuerpo lúteo y, en consecuencia, el útero se hace pequeño, poco contráctil y la mucosa vaginal es muy delgada (Mendiola y col., 1993; Barbacka-Surowiak y col., 2003; Levine, 2015).
- Proestro: dura entre 12 y 14 horas (Freeman, 2006). Se puede observar el predominio de células epiteliales pequeñas redondas y nucleadas (Goldman y col., 2007). Ocurre un aumento en la secreción del estradiol que, a nivel hipotalámico, estimula una mayor secreción de la GnRH lo que resulta en una rápida liberación de la LH por la hipófisis. La FSH aumenta de manera simultánea y estimula la maduración de un nuevo conjunto de folículos ováricos que ovularán en el siguiente ciclo (Barbacka-Surowiak y col., 2003). La concentración de los estrógenos permite que el útero engrose progresivamente, mientras que, la mucosa vaginal atraviesa múltiples divisiones mitóticas (Mendiola y col., 1993).
- Estro: presenta una duración de 24 horas (Freeman, 2006). Se caracteriza por la presencia de células anucleadas y queratinizadas resultado del pico de secreción de los estrógenos producidos durante el proestro. La concentración de la FSH, la LH y el estradiol es basal; sin embargo, la progesterona es alta debido a la formación del cuerpo lúteo, el útero permanece engrosado (Mendiola y col., 1993; Barbacka-Surowiak y col., 2003; Cora, 2015; Levine, 2015).

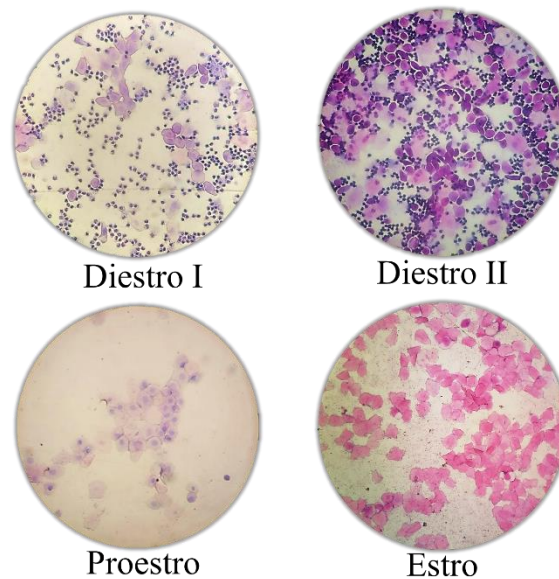


Figura 2. Micrografías de la citología de la mucosa vaginal de ratas de la cepa CII-ZV. La tinción empleada fue Hematoxilina-Eosina (H-E), las micrografías se tomaron a un aumento de 40 x.

Estructura del ovario

Los ovarios son órganos pares (Brüel y col., 2014) de color blanco rosado de forma ovalada, se localizan en la región pélvica y están fijados a la superficie posterior del ligamento ancho del útero a través de un pliegue del peritoneo llamado mesovario, que lleva vasos sanguíneos a cada ovario (Tapia, 2007; Brüel y col., 2014; Ross y Pawlina, 2015). En la mujer tienen una dimensión aproximada de 3.5 cm de alto, 2 cm de ancho y 1 cm de espesor (Tresguerres y col., 2005) mientras que, en la rata adulta miden aproximadamente 4.35 mm de ancho, 5.5 mm de largo y 1.3 mm de espesor (Navarrete, 2014).

La superficie ovárica se encuentra revestida por un epitelio simple de células cúbicas o cilíndricas denominado epitelio superficial del ovario (Ross y Pawlina, 2015). Debajo de éste se encuentra la túnica albugínea compuesta principalmente por tejido conjuntivo denso poco vascularizado con fibras de colágeno, que confiere al ovario un color blanquecino (Gartner y Hiatt, 2007).

Histológicamente el ovario se encuentra dividido en tres regiones estructurales (Figura 3):

MARCO TEÓRICO

- Corteza: es la región periférica del ovario que rodea a la región medular, en ella se encuentran los folículos ováricos, en diferentes etapas de desarrollo (Gartner y Hiatt, 2007; Ross y Pawlina, 2015). Los folículos se encuentran rodeados por el estroma, que es una red de tejido conjuntivo derivado del mesénquima y está compuesto de fibras reticulares, células fusiformes, fibroblastos y células musculares lisas (Leeson y col., 1989; Gartner y Hiatt, 2007).
- Médula: es la parte central del ovario, procede de células mesonéfricas, está compuesta por tejido conjuntivo laxo, vasos sanguíneos y linfáticos, así como nervios que ingresan desde el mesovario a través del hilio (Brüel y col., 2014).
- Hilio: es la zona de unión entre el mesovario y el ovario. Contiene células nerviosas, microganglios, vasos sanguíneos, linfocitos, tejido conectivo de sostén y células hiliares las cuales secretan andrógenos (Tresguerres y col., 2005).

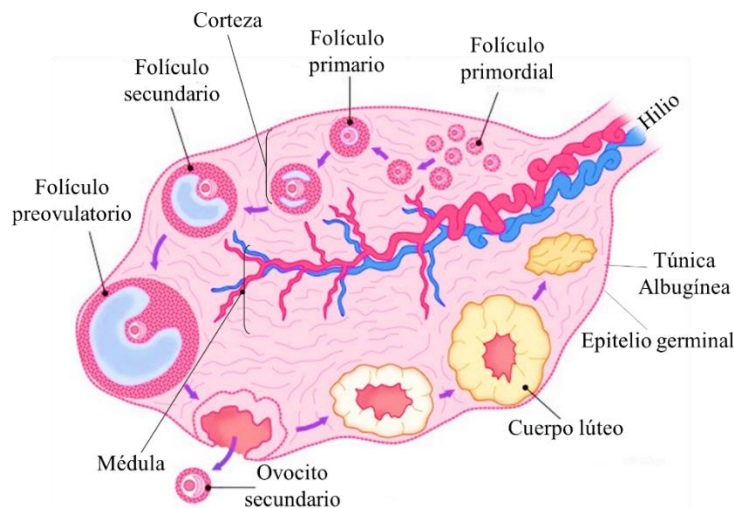


Figura 3. Composición estructural del ovario. Se muestra la secuencia de la maduración folicular, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo. Tomado y modificado de Ross y Pawlina, 2015.

En los mamíferos, la población de folículos primordiales se mantiene como fuente de reserva folicular, hasta el final de la vida reproductiva de la hembra, en cada ciclo reproductivo un conjunto de folículos primordiales comenzará su desarrollo. El crecimiento de los folículos continúa hasta que culminan con la ovulación o bien degeneran por atresia (Hirshfield, 1991).

En la rata, el conjunto de folículos primordiales que serán la fuente de reserva para toda la vida reproductiva se establece después del nacimiento (Santamaría y col., 2019). Se ha observado que

la ruptura de los nidos de ovogonias y el ensamble folicular comienza en las primeras 24 horas después del nacimiento (Malamed y col., 1992; Santamaría y col., 2019). Este proceso se completa en los primeros cuatro a cinco días después del nacimiento (Rajah y col., 1992). Los ovocitos que no fueron rodeados por células de la granulosa inmaduras mueren por apoptosis (Kezele y Skinner, 2003; Pepling, 2006).

En las mujeres, el desarrollo de los folículos comienza con la formación de los folículos primordiales en la etapa prenatal; tras el nacimiento, el proceso se interrumpe y continúa en un período que transcurre desde la pubertad hasta la menopausia (Parborell, 2002). Se estima que, al momento del nacimiento la mujer tiene alrededor de dos millones de ovocitos, sin embargo, la mayoría de ellos degeneran gradualmente a través del proceso de atresia y al llegar a la pubertad posee cerca de 400,000 ovocitos. Durante la vida fértil, la mujer produce alrededor de 400 óvulos maduros (Baker, 1963; Ross y Pawlina, 2015).

El ciclo ovárico se divide en dos etapas, la folicular y la luteal. Durante la fase folicular ocurre el crecimiento y desarrollo de los folículos y concluye con la ovulación. Al finalizar la fase folicular, inicia la fase luteal, que se caracteriza por la formación del cuerpo lúteo encargado de secretar la progesterona (Geneser, 2000).

Desarrollo Folicular

Los folículos son la unidad anatómica y funcional del ovario. Su función es mantener, nutrir, madurar y liberar al ovocito en el momento en que este sea capaz de ser fecundado (Gartner y Hiatt, 2015).

El desarrollo folicular es un proceso complejo donde el folículo interactúa con las gonadotropinas, los esteroides ováricos y con otros factores. Es un proceso continuo, es decir, los folículos comienzan su desarrollo desde el grupo de reserva hasta llegar a folículos preovulatorios (Filipiak y col., 2016).

De acuerdo con su histología, Ross y Pawlina (2015) identifican cuatro tipos de folículos ováricos en función de su estado de desarrollo (Figura 4):

1.- Folículos primordiales: se encuentran en gran número en la corteza ovárica, forman un depósito finito de ovocitos, que permanecen en la fase de reposo hasta que son estimulados para

crecer (Ross y Pawlina, 2015). Este tipo de folículos está compuesto por un ovocito primario de aproximadamente 30 μm con un nucléolo de gran tamaño y un núcleo excéntrico (Figura 4) con cromatina dispersa detenido en la etapa de diploteno de la profase de la meiosis I (Gartner y Hiatt, 2007).

El ovocito se encuentra rodeado por una capa simple de células foliculares planas (Brüel y col., 2014), la superficie externa se encuentra delimitada por una lámina basal. El crecimiento inicial de estos folículos es independiente del estímulo de las gonadotropinas (Ross y Pawlina, 2015).

2.- Folículos primarios: posterior a la activación del folículo primordial, se distinguen cambios en el ovocito primario, las células foliculares y el tejido estromal circundante (Gartner y Hiatt, 2007). El ovocito aumenta de tamaño y mide entre 50-80 μm , las células foliculares aplanadas proliferan y se tornan cúbicas, momento en el cual se denominan células de la granulosa, estos folículos miden de 100-150 μm (Figura 4).

A medida que el ovocito crece comienza a secretar glucoproteínas que forman la zona pelúcida, ésta separa y protege al ovocito de las células de la granulosa (Gartner y Hiatt, 2007; Ross y Pawlina, 2015). En esta etapa, se desarrollan uniones tipo comunicantes entre las células de la granulosa que van a ayudar en el transporte de sustancias nutritivas y pequeñas moléculas contenidas en la sangre, vitales en el desarrollo del ovocito y del folículo. Fuera de la lámina basal, las células del estroma forman una cubierta de células de tejido conjuntivo denominada teca folicular (Ross y Pawlina, 2015).

3.- Folículos secundarios: el ovocito permanece del mismo tamaño, el estímulo de la FSH resulta en el aumento del número de capas de células de la granulosa. Durante esta etapa, se forman cavidades con líquido folicular rico en glucosaminoglucanos, proteoglucanos, proteínas de unión de esteroides, estradiol, activina, inhibina, progesterona y folistatina (Gartner y Hiatt, 2007; Ross y Pawlina, 2015).

La teca folicular se diferencia en dos capas, la teca interna y la teca externa:

- Teca interna: se forma a partir de la diferenciación de las células del estroma a células poliédricas epitelioides con un núcleo redondo. Esta capa posee mucha vascularización debido al ingreso de vasos sanguíneos, por otra parte, se encuentran

los receptores a la LH y en respuesta al estímulo de ésta sintetizan y liberan los andrógenos.

- Teca externa: conformada por una capa de células de tejido conectivo como células del músculo liso y haces de fibras de colágeno (Gartner y Hiatt, 2007; Brüel y col., 2014; Ross y Pawlina, 2015).

Cuando el estrato granuloso alcanza un espesor de 6 a 12 capas de células, las cavidades con líquido folicular comienzan a confluir en una sola cavidad con forma de media luna llamada antro folicular (Figura 4). Las células de la granulosa más cercanas al antro folicular y a la membrana basal se denominan células de la granulosa murales, las cuales presentan mayor actividad esteroidogénica y bajo el estímulo de la FSH sintetizan receptores a la LH. El ovocito, con un tamaño aproximado de 125 μm , adquiere una posición excéntrica y algunas de las células de la granulosa que lo rodean conforman un montículo llamado cúmulo oóforo; estas células proveen de nutrientes al ovocito y secretan 17- β estradiol, involucrado en la maduración del ovocito. Las células que rodean de forma inmediata al ovocito forman la corona radiada cuya función es sintetizar factores solubles que mejoran la progresión meiótica, la fertilidad de los ovocitos y el desarrollo embrionario, éstas permanecerán con el ovocito hasta la ovulación (Vanderhyden y Armstrong, 1989; Lanuza, 1999; Ross y Pawlina, 2015).

4.- Folículos preovulatorios: representan el último estadio del desarrollo folicular y los que presentan mayor actividad esteroidogénica y una respuesta mayor a las gonadotropinas (Uilenbroek y Richards, 1979; Lanuza, 1999). A medida que el folículo se acerca a su tamaño máximo disminuye la actividad mitótica de las células de la granulosa, el estrato granuloso se torna más fino y el antro folicular aumenta de tamaño (Figura 4). El ovocito, mide aproximadamente 120 μm de diámetro y junto con el cúmulo ooforo de 10-20 mm. Ambos son desplazados hacia una posición excéntrica de la cavidad folicular y debido a su gran tamaño sobresale en la superficie del ovario (Sánchez-Criado, 1999; Golfien y Monroe, 2000; Ross y Pawlina, 2015).

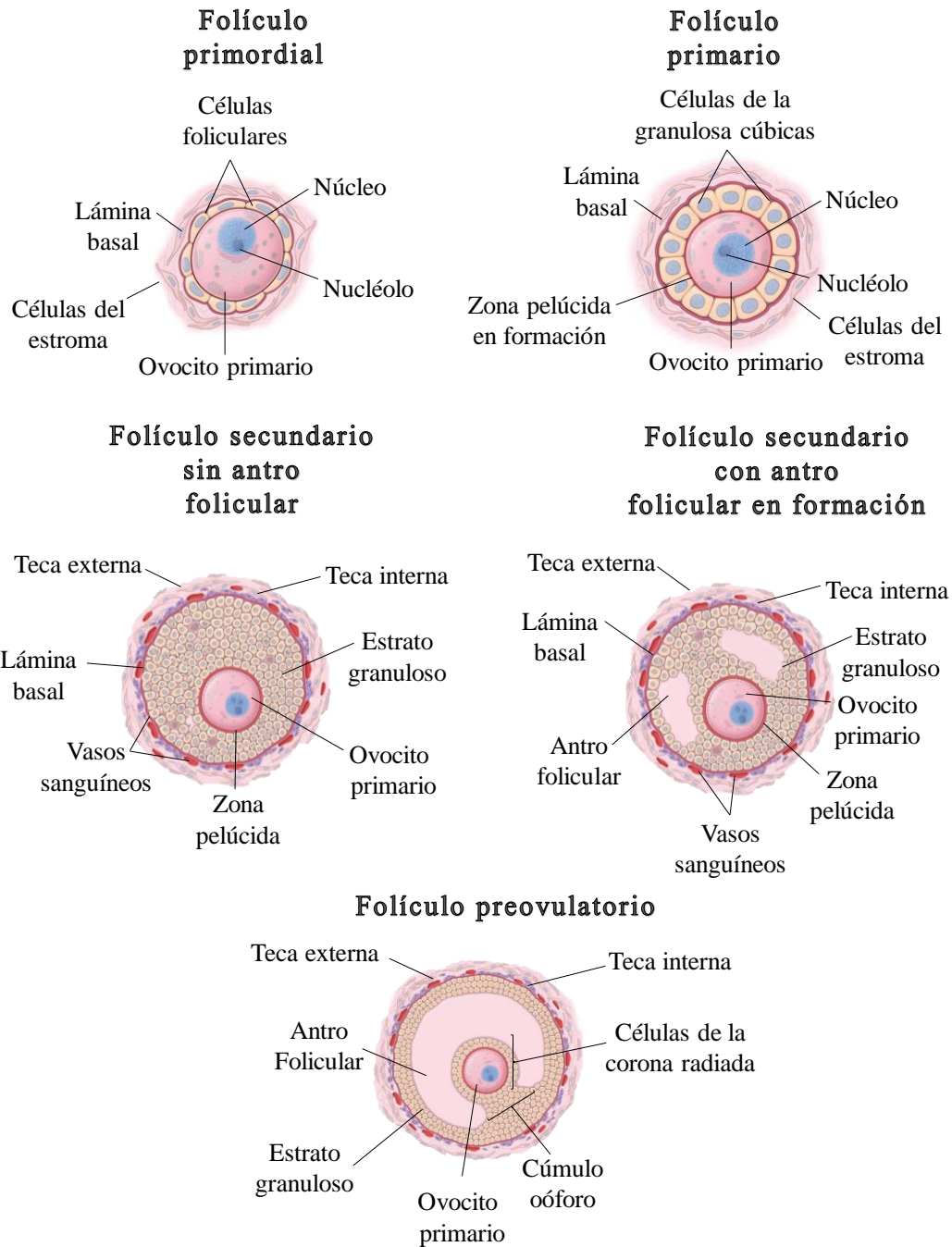


Figura 4. Estadios de maduración durante el desarrollo folicular. Tomado y modificado de Ross y Pawlina, 2015.

Regulación de las funciones ováricas

El desarrollo, la maduración y la dinámica de los folículos ováricos son regulados por señales hormonales y nerviosas transmitidas entre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Tena-Sempere, 2014; Levine, 2015).

El hipotálamo regula la síntesis y liberación de la GnRH, un decapeptido secretado por neuronas parvicelulares, que en el humano se ubican en el núcleo arqueado, núcleo periventricular y el área preóptica hipotalámica anterior (Jennes y col., 1997; Gómez-Prieto y Velázquez-Paniagua, 2002). Mientras que, en la rata adulta es producida por un número relativamente pequeño de neuronas, ubicadas en el complejo de la banda diagonal de Broca, el septum medial, el hipotálamo rostral y el área preóptica hipotalámica anterior (Jennes y col., 1997).

Las neuronas GnRHérgicas exhiben un patrón de secreción pulsátil coordinado y repetitivo (Ben-Shlomo y Melmed, 2011). El generador de los pulsos de la GnRH es regulado por las interacciones con grupos neuronales dentro y fuera del hipotálamo (Martínez de la Escalera y col., 1992; Grachev y Goodman, 2016; Herbison, 2018; Plant, 2019). Estos mecanismos a su vez dependen de la concentración de los estrógenos y de la progesterona (Rosales y col., 2006).

Múltiples factores regulan la secreción de las neuronas de la GnRH entre los que se encuentran (Figura 5): el tono opioide endógeno¹ como la β -endorfina, el ácido gamma-aminobutírico (GABA), la adrenalina (A), la arginina vasopresina (AV), el cortisol, la dopamina (DA), el estradiol, el glutamato, la kisspeptina (Kiss), la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la NA, las neurotensinas, el neuropéptido Y (NPY), el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la progesterona, la serotonina (5HT) y la testosterona (Gómez-Prieto y Velázquez-Paniagua, 2002; Krsmanovic y col., 2009; Ben-Sholomo y Melmed, 2011; Trujillo y col., 2015).

¹ Neurotransmisores que tienen actividad semejante a los analgésicos opiáceos, se encuentran agrupados en tres familias: endorfinas, encefalinas y dinorfinas (Muñoz, 2010).

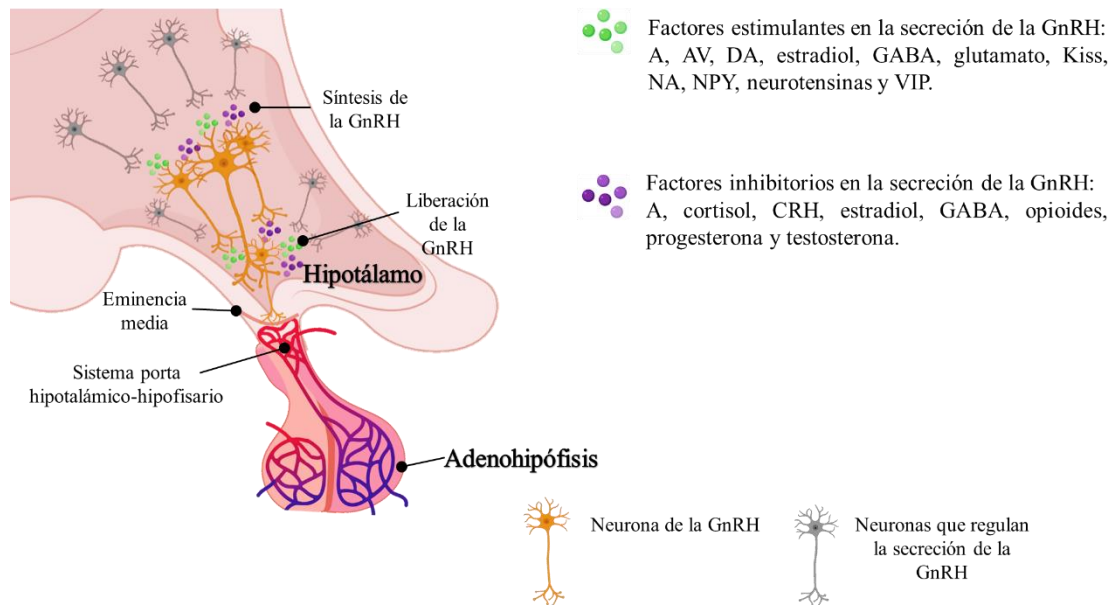


Figura 5. Factores estimulantes e inhibitorios sobre la síntesis y liberación de la GnRH. Tomado y modificado de Ben-Shlomo y Melmed, 2011; Trujillo y col., 2015.

Una vez sintetizada la GnRH es transportada a las terminales axónicas de las neuronas GnRHérgicas localizadas en la eminencia media y es liberada de manera pulsátil al sistema portal hipotálamico-hipofisario. Este sistema se compone de dos lechos capilares y conecta al hipotálamo con la adenohipófisis. En la adenohipófisis la frecuencia del pulso de la GnRH determina la velocidad de la secreción de la LH o la FSH por parte de los gonadotropos² (Ben-Shlomo y Melmed, 2011). En la mujer, cuando se produce una frecuencia de un pulso cada 90 minutos, la GnRH aumenta de forma preferente la secreción de la LH. Mientras que, cuando los pulsos ocurren cada 120 minutos, la GnRH estimula la secreción de la FSH (Wildt y col., 1981; Ulloa-Aguirre y Timossi, 2000; Koeppen y Stanton, 2009).

En el ovario la LH y la FSH se unen a sus receptores localizados en las células de la teca y de la granulosa, respectivamente (Silverman y col., 1987; Jeong y Kaiser, 2006). Por una parte, la LH induce la ovulación, la formación del cuerpo lúteo y la producción de la progesterona y los andrógenos. Mientras que, la FSH estimula el desarrollo folicular, la síntesis de la activina e inhibina y la biosíntesis de los estrógenos a partir de los andrógenos (Padmanabhan y col., 2018).

² Células basófilas especializadas en la secreción de la LH y la FSH, poseen receptores a la GnRH y se encuentran ubicadas en la adenohipófisis (Tresguerres y col., 2005).

MARCO TEÓRICO

El inicio de la fase folicular se caracteriza por concentraciones basales de la FSH y la LH, por el reclutamiento de una nueva cohorte de folículos y por la baja concentración de la progesterona y el estradiol. Esta última, se debe a la falta de madurez de los folículos (Hall, 2014). Conforme las gonadotropinas comienzan a estimular el desarrollo folicular, las células de la granulosa comienzan a aumentar la secreción del estradiol. En las células de la granulosa la FSH estimula la secreción de la activina y en conjunto, estimulan la formación de los receptores a la FSH. Esto permite que los folículos puedan crecer hasta un estadio preovulatorio y aumenten la concentración de los estrógenos, aunque las concentraciones de la FSH disminuyan (Clifton y Steiner, 2009; Hall, 2014).

En esta etapa, el aumento los esteroides ováricos regula de manera inhibitoria la secreción de la GnRH en el hipotálamo (Clifton y Steiner, 2009; Kaiser, 2011). Por otra parte, en las células de la granulosa el aumento de los estrógenos permite la secreción de la inhibina y en consecuencia disminuyen la concentración de la FSH al actuar en la adenohipófisis.

Cuando la concentración del estradiol es lo suficientemente alta, consecuencia de la maduración de los folículos, el estradiol deja de tener un efecto inhibitorio y estimula la secreción de la LH, conocida como “el pico preovulatorio”, lo que desencadena la ovulación (Figura 6) (Clifton y Steiner, 2009).

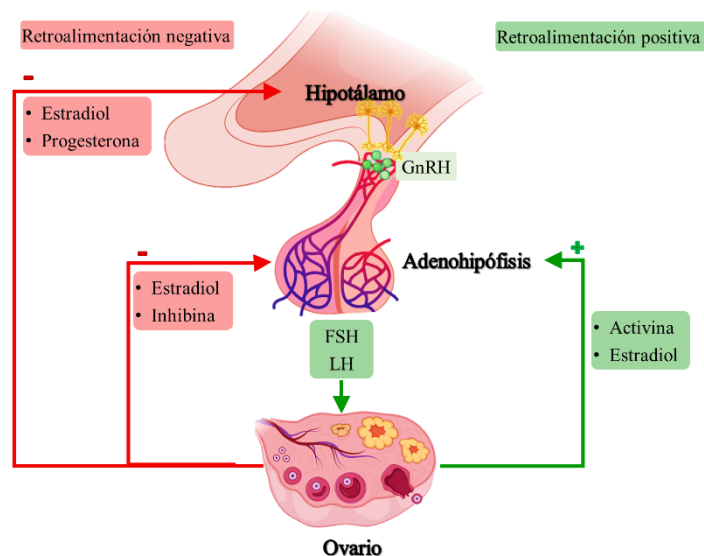


Figura 6. Regulación neuroendocrina del eje reproductivo femenino. La secreción pulsátil de la GnRH estimula la síntesis y la liberación de la LH y la FSH. Ambas gonadotropinas viajan a través del torrente sanguíneo y llegan al ovario donde estimulan el desarrollo folicular y la secreción de las hormonas esteroides y proteicas. Las hormonas secretadas por los ovarios regulan de manera estimulante o inhibitoria la secreción de la GnRH en el hipotálamo y de la LH y la FSH en la adenohipofisis. Tomado y modificado de Hall, 2014.

Ovulación

La ovulación es un proceso inflamatorio (Domínguez y col., 1991) donde el folículo preovulatorio libera al ovocito maduro hacia la superficie del ovario, el ovocito atraviesa la pared folicular y el epitelio superficial del ovario (Trujillo y col., 2015).

La ovulación, se desencadena por efecto del aumento en la concentración de la LH que, en la rata ocurre en el día del proestro. La concentración sérica de la inhibina, la progesterona, la 17 α -hidroxiprogesterona y el estradiol incrementan de manera paulatina. Cuando la concentración del estradiol es lo suficientemente alta y sostenida, estimula un pico de secreción de la LH que, a su vez, estimula la síntesis de la progesterona, responsable del pico de secreción de la FSH (Rao y col., 1978; Channing y col., 1980; Robker y Richards, 1998; Rosales y col., 2006; Reed y Carr, 2018).

El pico preovulatorio de gonadotropinas en el folículo estimula:

- El reinicio y termino de la primera división meiótica del ovocito primario, éste se transforma a ovocito secundario el cual se detiene en la metafase de la meiosis II. El ovocito secundario es expulsado al momento de la ovulación y culminará la segunda división meiótica sólo si es fertilizado (Eppig, 1982).
- El aumento del líquido folicular que, a su vez, genera un aumento en el tamaño del folículo, lo que hace que este protuya de la pared del ovario. En esta zona se produce una isquemia conocida como estigma (Arteaga-Martínez y García-Peláez, 2017).
- La ruptura de las uniones tipo comunicantes entre las células de la granulosa murales, con la finalidad de facilitar la formación del sitio de ruptura en la pared del folículo (Tsafriri y Reich, 1999; Salustri, 2004).
- La síntesis de una matriz extracelular muco-elástica abundante en las células del cúmulo oóforo, que promueve el desprendimiento del complejo de células de la corona radiada y del ovocito de la pared folicular (Lawrence y col., 1980 b; Brower y Schultz 1982; Tsafriri y Reich, 1999; Shirazi y Moalemian, 2007).
- Las células de la teca comienzan a secretar colagenasa, prostaglandinas y activador del plasminógeno (Arteaga-Martínez y García-Peláez, 2017). El activador del plasminógeno, estimula su conversión a una enzima proteolítica activa llamada

plasmina (LeMaire y col., 1975), ésta en conjunto con la colagenasa, provocan la ruptura del estigma (Arteaga-Martínez y García-Peláez, 2017).

- Las prostaglandinas, la colagenasa y la plasmina digieren el colágeno de la pared folicular, lo que facilita la expulsión del complejo corona radiada-ovocito. Posteriormente, las prostaglandinas estimulan la liberación del ovocito mediante la contracción del músculo liso dentro de la corteza del ovario (Espey, 1974; Espey y Lipner, 1974; Peters y McNatty, 1980).

Fase Lútea

El cuerpo lúteo es una glándula endocrina que se forma después de la ovulación, a partir de las células de la granulosa y de la teca restantes del folículo. Esta glándula secreta la progesterona y, en caso de fertilización, proporciona un ambiente óptimo en el útero para una gestación exitosa, inhibe la actividad contráctil del útero y el desarrollo folicular (Bachelot y Binart, 2005; Strauss y Williams, 2009).

En roedores, el cuerpo lúteo ejerce un papel esencial, porque es responsable del mantenimiento de la preñez a través de la secreción de la progesterona, mientras que, en los humanos proporciona la progesterona necesaria hasta que se forma la placenta (Bachelot y Binart, 2005). En la rata cíclica, la vida del cuerpo lúteo se caracteriza por el desarrollo, el mantenimiento y la regresión luteal (luteólisis). En la mañana del estro, secreta una cantidad limitada de la progesterona que se mantiene hasta el diestro II y luego comienza la luteólisis si no ocurrió la fertilización (Bachelot y Binart, 2005). Su mantenimiento y función es regulado por interacciones complejas entre las hormonas estimulantes (luteotróficas) como la prolactina, el estradiol y la LH e inhibitorias (luteolíticas) como la activina y la folistatina (Niswender y col., 2000; Niswender, 2002; Bachelot y Binart, 2005).

Dentro del cuerpo lúteo se establece una red vascular acompañada por el ingreso y proliferación de capilares y fibroblastos del estroma circundante. Esto hace posible que, las moléculas grandes como las lipoproteínas de baja densidad (LDL) sean transportadas vía sanguínea, y así proporcionen el colesterol como sustrato para la producción de la progesterona (Strauss y Williams, 2009).

El pico preovulatorio de la LH promueve la luteinización de las células de la granulosa y de la teca. Asimismo, modifica la vía esteroidogénica de modo que aumenta la expresión del citocromo P450_{scc} y de la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), que son enzimas necesarias para la conversión del colesterol en la progesterona. Por otra parte, disminuye la expresión de la 17 α -hidroxilasa, el citocromo P450 y la aromatasa que convierten la progesterona en los estrógenos, después del proceso de luteinización, la progesterona es secretada por ambos tipos celulares (Bachelot y Binart, 2005).

Las células luteinizadas completan su vida útil mediante un proceso de luteólisis caracterizado por la disminución en la secreción de la progesterona. Este proceso es el resultado de la disminución en la irrigación sanguínea y de la capacidad esteroidogénica de las células lúteales, que conlleva a un cambio estructural de la glándula con la finalidad de que ésta pueda involucionar. Posterior a la involución, en el ovario se forma una pequeña cicatriz llamada el cuerpo albicans, que permanecerá en el ovario varias semanas (Bachelot y Binart, 2005).

Atresia folicular

La apoptosis, o la muerte celular programada, es un proceso de regulación celular esencial para el desarrollo embrionario normal y la homeostasis del tejido adulto (Kapia y Hsueh, 1997). La atresia folicular es un proceso apoptótico normal en el ovario, regulado por las hormonas y controla el número de los folículos en desarrollo (Vidal y Dixon, 2018).

En el ovario se distinguen dos etapas principales de muerte celular: la muerte de las células germinales producida antes del nacimiento y la atresia folicular que se produce desde antes de la pubertad y se acelera antes de la menopausia (Hsueh y col., 1994; Kapia y Hsueh, 1997). Aunque los mecanismos subyacentes al proceso de la atresia folicular ovárica no son claros, es posible que represente una ventaja evolutiva en la cual ocurre una selección folicular, de modo que, solo aquellos folículos que contienen ovocitos sanos puedan ovular (Hsueh y col., 1994).

Se ha planteado que, una disminución en la concentración de la FSH es la responsable del inicio del proceso de la atresia en los folículos. Hsueh y colaboradores (1994) mencionan que la pérdida del estímulo de la FSH durante un período crítico en el desarrollo folicular induce la atresia, mientras que, Speroff (1983) menciona que la pérdida de los receptores a FSH en las células de la granulosa es el detonante de la atresia folicular. A pesar de que el desarrollo de los folículos

primordiales y primarios es independiente de las gonadotropinas, la atresia ocurre en todas las etapas del desarrollo del folículo (Hirshfield, 1991).

Los folículos en desarrollo se encuentran expuestos a factores de supervivencia o de rescate folicular y factores atretogénicos³. Entre los factores de supervivencia se encuentran las gonadotropinas, los estrógenos, la activina y factores de crecimiento como el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo-1 (IGF-1), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento neural (NGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). Los folículos antrales atrésicos expuestos a la FSH pueden alcanzar la etapa de folículo preovulatorio y ovular (Hirshfield y Midgley, 1978; Gougeon, 1993; Chun y col., 1996).

Dentro de los factores atretogénicos se encuentra el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleucina 6 (IL-6), los andrógenos y los radicales libres (Hsueh y col., 1994; Kapia y Hsueh, 1997; Markstrom y col., 2002).

Se ha observado que, en mamíferos hay al menos seis etapas de degeneración durante el desarrollo ovárico. Las primeras tres etapas se encuentran antes de la formación del folículo e involucran la degeneración de las células germinales (Hsueh y col., 1984), mientras que, las otras tres se encuentran en diferentes etapas del desarrollo folicular (Greenwald y Roy, 1994).

Etapas de la atresia durante la formación de los folículos:

1. La falta del factor de crecimiento de mastocitos y el factor de células madre genera la muerte apoptótica de múltiples células germinales durante su migración y proliferación hacia la cresta urogenital (Dolci y col., 1991; Godin y col., 1991).
2. Desgaste de ovogonias: tras la colonización de la cresta urogenital las células germinales primordiales se denominan ovogonias y comienzan a proliferar. La proliferación de las ovogonias se acompaña de una degeneración masiva que ocurre durante la mitosis (Ioannou, 1964; Ohno y Smith, 1964).
3. Degeneración de los ovocitos: ocurre cuando las ovogonias cesan la mitosis e inician el proceso meiótico y el ensamble folicular que dará origen a los folículos primordiales. Al llegar a esta etapa, por un mecanismo desconocido, se detiene el proceso meiótico, momento en el cual los cromosomas se descondensan y reanudan

³ Factores que inducen atresia folicular (Speroni, 2016).

su actividad transcripcional (Hsueh y col., 1984). Uno o tres días posterior al nacimiento, la mayoría de los ovocitos se encuentran rodeados de células inmaduras de la granulosa (50-70%) mientras que, los que permanecen desnudos, degeneran (Ohno y Smith, 1964).

Etapas de la atresia de los folículos en desarrollo (Figura 7):

1. Etapa I: se caracteriza por la presencia de núcleos picnóticos en alrededor del 10% de las células de la granulosa, generalmente en aquellas que se encuentran cerca del antro folicular. Algunas de las células de la granulosa todavía están en mitosis (Hsueh y col., 1984). La membrana basal se encuentra intacta (Byskov, 1974).
2. Etapa II: los folículos muestran muchas células de la granulosa picnóticas (10-30%), pocas de ellas en mitosis y algunas se encuentran dispersas en el antro folicular (descamación). La membrana basal pierde su integridad y los leucocitos se infiltran entre las capas de las células de la granulosa (Bukovský y col., 1984; Hsueh y col., 1984).
3. Etapa III: se caracteriza por una reducción en el número de células de la granulosa, ninguna de ellas prolifera por mitosis, las células de la teca presentan hipertrofia⁴ y la membrana basal se fragmenta (Hsueh y col., 1984).

⁴ Aumento del tamaño de un tejido u órgano por aumento del tamaño de las células que la forman (Speroni, 2016).

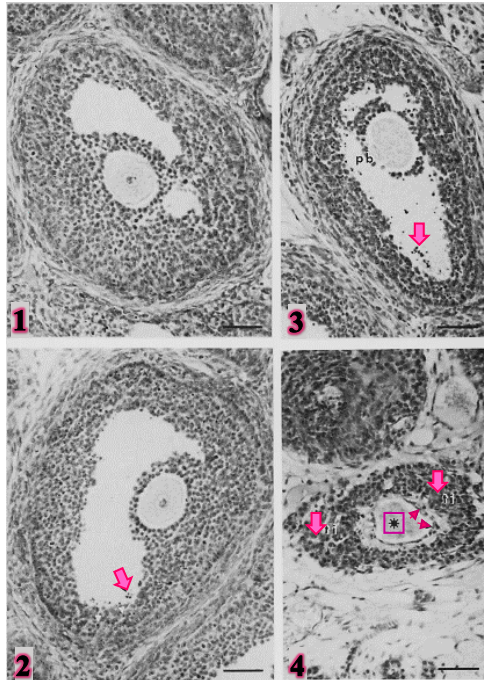


Figura 7. Histología de folículos en diferentes estados de la atresia en el ovario de rata, tinción hematoxilina-eosina. 1: Folículo antral sano; 2: Etapa I de la atresia, las flechas marcan los núcleos picnóticos en las células de la granulosa; 3: Etapa II de la atresia, las flechas indican los restos celulares dentro del líquido folicular; 4: Etapa III de la atresia, el asterisco dentro del cuadrado indica la fragmentación del ovocito, las flechas indican la hipertrofia de las células de la teca y las flechas pequeñas rosas indican las pocas células de la granulosa, el folículo ha colapsado. Barra 50 μ m. Tomado de Braw y Tsafirri, 1980.

Biosíntesis de las hormonas esteroideas

Las hormonas esteroideas se clasifican en esteroideas sexuales (andrógenos, estrógenos y progesterona), glucocorticoides (cortisol, cortisona y corticosterona) y mineralocorticoides (aldosterona) y son sintetizados principalmente en las glándulas suprarrenales, las gónadas, la placenta y el sistema nervioso central (Gómez-Chang y col., 2012). En vertebrados, los esteroideas son esenciales para el control endocrino de la reproducción, influyen en todos los aspectos del establecimiento y el mantenimiento del género, por lo que la ausencia, la disminución, el aumento de ellas o de sus receptores resultan en alteraciones en el desarrollo reproductivo (Conley y Walters, 1999).

Las principales hormonas producidas por los ovarios son el estradiol y la progesterona y, en menor proporción, la estrona, la androstenediona, la testosterona y la 17- α -hidroxiprogesterona.

Todas estas hormonas son sintetizadas a partir del colesterol y, por lo tanto, tienen estructuras similares (Tresguerres, 2010; Miller y Auchus, 2011).

El colesterol es un componente esencial de las membranas celulares de los mamíferos, así como, un precursor importante de los compuestos biológicamente activos. Contiene 27 átomos de carbono, de los cuales 17 están incorporados en cuatro anillos fusionados que conforman el núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno, dos están en grupos metilo angulares unidos en las uniones de los anillos AB y CD, y ocho están en la cadena lateral periférica, un grupo hidroxilo unido al carbono 3 y un doble enlace entre los átomos de carbono 5 y 6 (Figura 8) (Baynes y Dominiczka, 2011).

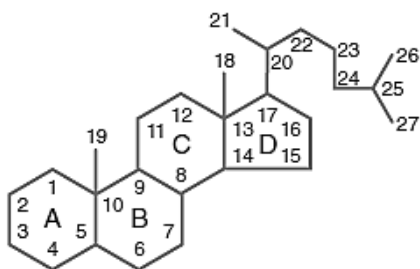


Figura 8. Estructura química de la molécula del colesterol formado por el núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno (A-D), los números del 1-27 describen los átomos de carbono. Tomado de Koeppen y Stanton, 2009.

Las células que sintetizan las hormonas esteroides utilizan tres vías que aseguran el suministro constante de colesterol (Domínguez y col., 2012):

1. Síntesis *de novo* a partir del acetato en el retículo endoplásmico.
2. La movilización de ésteres de colesterol almacenados en gotitas de lípidos a través de colesterol-éster hidrolasa.
3. La absorción de lipoproteínas sanguíneas que transportan colesterol (LDL y de alta densidad (HDL)).

La mayor parte del suministro del colesterol proviene de las LDL derivadas de la dieta. La concentración adecuada de LDL suprime a la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG CoA) reductasa, enzima limitante de la velocidad en la síntesis del colesterol (Bremer y Miller, 2014).

La LH estimula la síntesis de HMG CoA reductasa, de las LDL y de sus receptores. Las LDL se absorben por endocitosis, se almacenan o son convertidas en colesterol libre que posteriormente

será esterificado por acil-CoA, colesterol transferasa (ACAT) y almacenado en gotitas de lípidos que se utilizarán en la síntesis de las hormonas esteroideas (Bremer y Miller, 2014). En el ovario los tejidos que realizan la esteroidogénesis son: 1) las células de la granulosa, 2) las células de la teca, 3) la glándula intersticial y 4) los cuerpos lúteos (Hu y col., 2010).

La esteroidogénesis ovárica se logra mediante la cooperación de las células de la teca y la granulosa, la LH se une a sus receptores en las células de la teca y la FSH se une a sus receptores en las células de la granulosa. Ambos receptores están acoplados a proteínas G, la unión a su ligando provoca la activación de la adenilato ciclasa (AC), la producción de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) intracelular y, a su vez, la activación de la proteína quinasa A (PKA) que fosforila a la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR), encargada del transporte del colesterol a la mitocondria (Marsh, 1976; Sanborn y col., 1980; Golos y col., 1988; Tonetta y Dizerega, 1989; Waterman y Keeney, 1996; Conti, 2002; Hu y col., 2010; Gómez-Chang y col., 2012).

Una vez que la StAR transporta el colesterol a la membrana interna de la mitocondria, es transformado a la pregnenolona a través de la escisión de la cadena lateral (carbono 20-22). El proceso de la escisión de la cadena lateral del colesterol comienza con dos hidroxilaciones, la primera en el C-20 y la segunda en el C-22, las cuales son resultado de la acción de la P450_{scc}, el resultado de estas reacciones es la 20 α , 22 β - dihidroxicolesterol. La ruptura de los enlaces entre estos átomos ocurre por la acción de la 20, 22 desmolasa/liasa que da como resultado una molécula de pregnenolona y una de ácido isocaproico (Figura 9) (Gower, 1988; Tresguerres y col., 2005; Berg y col., 2008).

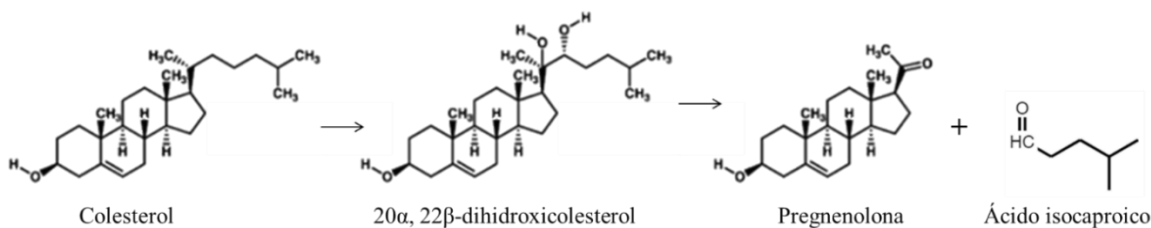


Figura 9. Reacciones necesarias en la formación de pregnenolona a partir de colesterol. Tomado y modificado de Berg y col., 2008.

El paso limitante en la esteroidogénesis es la síntesis de la pregnenolona, posterior a esto, puede ser metabolizada por dos vías que ocurren dentro del retículo endoplásmico liso de las células de la teca interna (Figura 10) (Gower, 1988; Tresguerres y col., 2005; Bremer y Miller, 2014).

- 1) La vía Δ_4 , ocurre en el cuerpo lúteo donde la enzima 3β -HSD hace que la molécula de la pregnenolona sea convertida a la progesterona; mediante la pérdida de un átomo de hidrógeno en el C-3. A través de la Δ_5 -4 isomerasa ocurre un cambio en el doble enlace de la posición C-5 y C-6 a la posición C-4 y C-5, ésta conversión es esencialmente irreversible (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Tresguerres y col., 2005; Andersen y Ezcurra, 2014). Posteriormente, la progesterona puede ser transformada a la 17α -hidroxiprogesterona por una hidroxilación en el C-17, por acción de 17α -hidroxilasa y a través de la $17, 20$ liasa es convertida a la androstenediona, precursor de la testosterona. Esta conversión requiere la acción de la enzima 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD) en el C-17, donde cataliza la reducción del grupo ceto (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Tresguerres y col., 2005; Berg y col., 2008; Andersen y Ezcurra, 2014).
- 2) Vía Δ_5 , se lleva a cabo principalmente en las células de la teca, donde la pregnenolona es transformada a la dehidroepiandrosterona (DHEA). Esta vía comienza con la molécula de la pregnenolona, que a través de la adición de un grupo hidroxilo en la posición C- 17α , por parte del citocromo P450c 17α -hidroxilasa, produce la 17α -hidroxipregnenolona que mediante la enzima P450c 17α -liasa elimina el grupo acetilo del C17-C20 y se forma el precursor de los andrógenos la DHEA. Posteriormente la DHEA es oxidada en el C-3 por la enzima 3β -HSD y la Δ_5 -4 isomerasa cataliza el cambio del doble enlace insaturado de la posición C-5 y C-6 a la posición C-4 y C-5 para sintetizar la androstenediona (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Tresguerres y col., 2005; Wickenheisser y col., 2006; Andersen y Ezcurra, 2014).

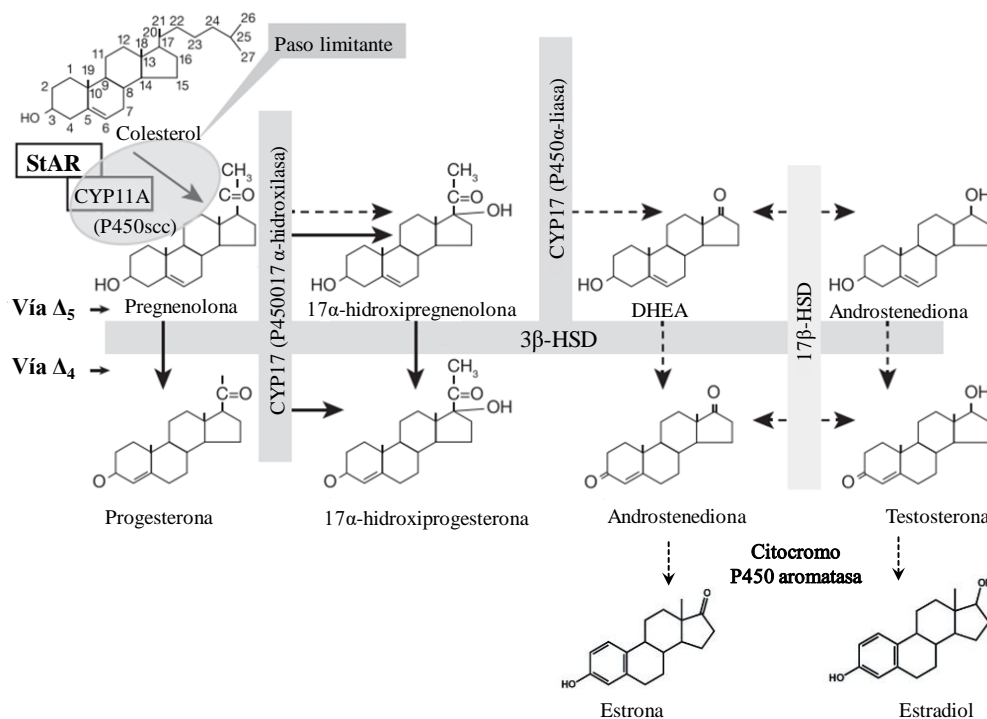


Figura 10. Rutas biosintéticas de las hormonas esteroideas sexuales. Tomado y modificado de Wickenheisser y col., 2006.

Los andrógenos producidos en las células de la teca se difunden a través de la lámina basal y son captados por las células de la granulosa, donde se encuentra el complejo enzimático citocromo P450 aromatasa, que transforma la androstenediona en la estrona y la testosterona en el estradiol (Figura 11) (Santen y col., 2009; Miller y Auchus, 2011).

La P450 aromatasa cataliza tres pasos independientes que convierten los andrógenos en los estrógenos (Di Nardo y Gilardi, 2013; Yoshimoto y Guengerich, 2014). Los dos primeros pasos son reacciones secuenciales, por oxígeno molecular al sustrato del C-19, lo que implica dos hidroxilaciones bien establecidas (Berge y col., 2008; Wood y Cupp, 2018). El tercer paso es la eliminación del grupo metilo del C-19 que es liberado como ácido fórmico, debido a la reacción ocurre la formación del anillo fenólico en el anillo A (Wood y Cupp, 2018).

La secuencia exacta de reacciones asociadas con esta última reacción aún está bajo investigación. El producto final de estas tres reacciones es la estrona o el estradiol conforme al sustrato hormonal utilizado en la reacción (Wood y Cupp, 2018).

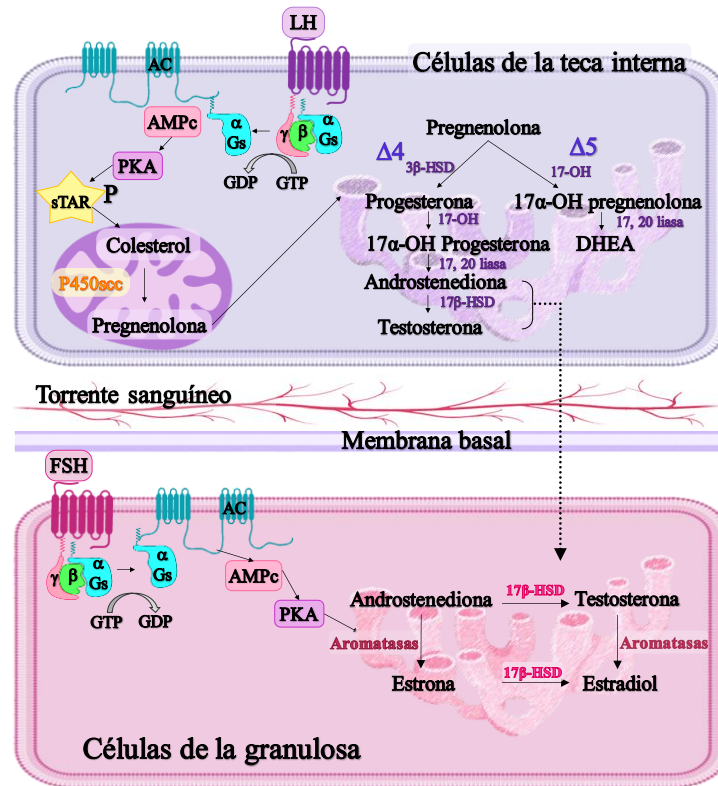


Figura 11. Biosíntesis de las hormonas esteroides en el folículo ovárico. La interacción de la LH con sus receptores en las células de la teca y de la FSH con sus receptores en las células de granulosa, estimula la expresión de las enzimas esteroidogénicas involucradas en la secreción de los andrógenos y los estrógenos respectivamente. LH: hormona luteinizante; FSH: hormona folículo estimulante; GTP: trifosfato de guanósina; GDP: difosfato de guanósina; ATP: trifosfato de adenosina; AMPc: monofosfato de adenosina cíclico; PKA: proteína quinasa A; StAR: proteína reguladora aguda esteroidogénica; 3β-HSD, 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; DHEA: dehidroepiandrosterona; 17β-HSD: 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; P450_{scc}: citocromo P450 de escisión de la cadena lateral de colesterol. Tomado y modificado de Strauss y col., 2014.

Inervación ovárica

Los ovarios de los mamíferos se encuentran inervados por el sistema nervioso simpático y parasimpático (Burden, 1978), ambos regulan procesos como el desarrollo folicular (Bahr y Ben-Jonathan, 1981) y la biosíntesis de hormonas esteroides (Dissen y Ojeda, 1999).

Las fibras nerviosas que ingresan al ovario inervan los diferentes compartimentos ováricos como los vasos sanguíneos, la glándula intersticial y los folículos en crecimiento (Dissen y Ojeda, 1999).

Inervación simpática

En la rata, los nervios simpáticos que inervan al ovario provienen de los segmentos torácico inferior T11 al segmento lumbar superior L4 de la médula espinal, que hacen sinapsis con los ganglios celiaco y mesentérico superior (Dissen y Ojeda, 1999).

Estas fibras llegan al ovario por medio de (Figura 12):

- El nervio del plexo ovárico (NPO), el cual viaja a lo largo de la arteria ovárica y está constituido en su mayoría por fibras de naturaleza sensorial, simpática y en menor proporción por fibras parasimpáticas (Klein y Burden, 1988 a; Gerendai y col., 1998; Uchida y col., 2005; Pastelín y col., 2017). Sus fibras se asocia con la vasculatura ovárica, ingresan al ovario a través del hilio e inervan la corteza y la médula. También inerva la bursa ovárica y el oviducto (Payer, 1978; Baljet y Drukker, 1979; Lawrence y Burden, 1980; Burden, 1985; Pastelín y col., 2017; Del Campo y col., 2019). Las fibras del NPO transportan neurotransmisores como la sustancia P (SP), el péptido relacionado con el gen que codifica para la síntesis de la calcitonina (CGRP) (Klein y Burden, 1988 a; Dees y col., 1995), la NA y el NPY (McDonald y col., 1987).
- El nervio ovárico superior (NOS): Sus somas se originan en el ganglio celiaco mesentérico superior (GCMS) y transcurre por el ligamento suspensorio. Las fibras ingresan al ovario a través del hilio para organizarse alrededor de la glándula intersticial y entre los folículos sin penetrar en la capa de células de la granulosa (Burden, 1978; Baljet y Drukker, 1979; Lawrence y Burden, 1980). El nervio está conformado por paquetes de fibras de naturaleza noradrenérgica y peptidérgica (VIP y NPY) (Lawrence y Burden, 1980). Este tipo de inervación participa en la regulación de la secreción de hormonas esteroides, el desarrollo folicular y la ovulación (Domínguez y Riboni, 1971; Grob, 1974; Gerendai y Halasz, 1978; Lawrence y Burden, 1980; Barria y Lara, 1991; Morales y col., 1993; Morán y col., 2000; Del Campo y col., 2019).

Inervación parasimpática

En la rata, la inervación parasimpática del ovario proviene del nervio vago (Burden y Lawrence, 1977), el cual se origina de las neuronas medulares del núcleo del tracto solitario, del complejo vagal dorsal, del núcleo ambiguo y del área postrema (Burden y col., 1983; Gerendai y col., 1998, 2000). Aproximadamente el 85% de las fibras del nervio vago son de naturaleza sensorial (Burden, 1978), por donde transcurren neurotransmisores como la SP, el CGRP, el VIP, la gastrina, la somatostatina y la acetilcolina (Figura 12) (Klein y Burden, 1988 b).

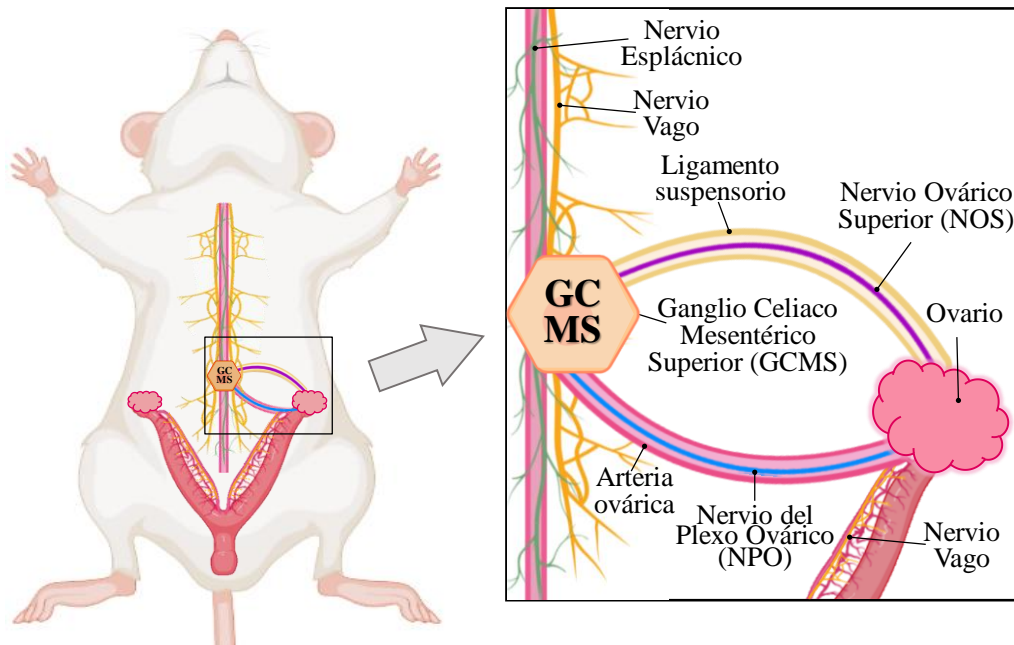


Figura 12. Origen de la inervación ovárica en la rata, a partir del ganglio celiaco mesentérico superior (GCMS). La línea de color amarillo indica la inervación procedente del nervio vago, la morada indica la inervación del nervio ovárico superior (NOS) y la línea azul la del nervio del plexo ovárico (NPO). Tomado y modificado de Kagitani y col., 2008.

Síndrome de ovario poliquístico

El síndrome de ovario poliquístico (SOPQ) es la patología más común en mujeres en edad reproductiva, aumenta el riesgo de infertilidad, patologías endometriales y enfermedades cardiometabólicas debido a que se encuentra regulado por procesos hormonales y metabólicos (Bremer, 2010).

Inicialmente fue descrito por Stein y Leventhal (1935) quienes observaron en siete mujeres la presencia de amenorrea, hirsutismo, obesidad y ovarios poliquísticos (Flores, 2012).

En 1990 los Institutos Nacionales de la Salud (NIH) consideraron como criterios de diagnóstico la presencia simultánea de hiperandrogenismo (clínico o bioquímico) y trastornos en el ciclo menstrual, sin tomar en cuenta la presencia de ovarios poliquísticos. De acuerdo con este criterio se establece que el síndrome afecta del 5 al 10% de las mujeres alrededor del mundo (Zawadzski y Dunaif, 1992; Dunaif y col., 2001; Vizcaíno y col., 2006; Merino y col., 2015; Lizneva y col., 2016).

En el consenso de Rotterdam (2003) la Sociedad Europea de Reproducción y Embriología Humana y la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ESHRE/ASRM) establecen que el diagnóstico del SOPQ requiere la presencia de al menos dos de los siguientes tres criterios: 1) oligo o anovulación, 2) hiperandrogenismo clínico o bioquímico y 3) ovarios poliquísticos. Con base en estos criterios el síndrome afecta del 6 al 21% de mujeres en edad reproductiva (Azziz y col., 2006; Lizneva y col., 2016).

En el 2006, la Sociedad de Exceso de Andrógenos (AES) considera como características de diagnóstico: 1) el hiperandrogenismo clínico o bioquímico, sin tomar en consideración la resistencia a la insulina, la disfunción tiroidea, la hiperprolactinemia o el síndrome de Cushing, 2) oligo/anovulación y 3) la presencia de quistes ováricos. De acuerdo con estos criterios la prevalencia del síndrome es aproximadamente del 10 al 15% (Azziz y col., 2006; March y col., 2009; Lizneva y col., 2016).

En el 2009, la Sociedad de Exceso de Andrógenos y Síndrome de Ovario Poliquístico (AES/PCOS) establece que los criterios de diagnóstico son la presencia de hiperandrogenismo clínico o bioquímico, acompañado de oligo, anovulación o de ovarios poliquísticos con una incidencia aproximada del 9% (Azziz y col., 2009; March y col., 2009).

Moran y colaboradores (2010) muestran que la prevalencia del SOPQ en la población mexicana es del 6 % de acuerdo con el criterio de los NIH. Sin embargo, hasta el momento la incidencia exacta de esta patología no se ha establecido, puesto que, depende de los criterios utilizados en su diagnóstico (Batrinos, 1993).

El síndrome se asocia con desordenes metabólicos como daños cardiovasculares, resistencia a la insulina, obesidad, dislipidemia y alteraciones en la tolerancia a la glucosa, que conllevan al desarrollo de diabetes mellitus tipo II (Dunaif, 2006; Matalliotakis y col., 2006; Goodarzi y col., 2011; Wild, 2012). Otros factores asociados al desarrollo del síndrome son las alteraciones neuroendocrinas, ováricas, predisposición genética e hiperactividad de las fibras simpáticas (Lara y col., 1993; Azziz y col., 2004; Ehrmann, 2005).

Algunas de las hipótesis que tratan de explicar la etiología del síndrome son:

Resistencia a la insulina e hiperinsulinemia: la resistencia a la insulina juega un papel fundamental en el desarrollo del síndrome, así como en las patologías metabólicas asociadas al mismo. Se ha descrito que aproximadamente un 50-70% de mujeres con el síndrome desarrollan resistencia a la insulina, ésta es definida como la disminución en la capacidad de la insulina para estimular el uso intracelular de glucosa (Del Río y col., 2006; Escobar, 2009; Dolz, 2010; Hernández-Rodríguez y Licea, 2015).

El origen de la resistencia a la insulina puede deberse a un defecto en la acción del post-receptor, normalmente la unión de la insulina a su receptor estimula la fosforilación de los residuos tirosina de los sustratos intracelulares para iniciar la transducción de la señal y favorecer la internalización de la glucosa. Se plantea que, en la resistencia a la insulina, posterior a la unión de la insulina a su receptor, ocurre una autofosforilación de los residuos de serina en lugar de los de tirosina, lo que reduce la internalización de la glucosa (Kahn y White, 1988; Dunaif y col., 1995; Saltiel, 1996; Dolz, 2010) y favorece el desarrollo de hiperinsulinemia.

La hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina estimulan el aumento en la secreción de los andrógenos ya que favorecen diversos mecanismos que contribuyen al desarrollo del síndrome, entre los cuales destacan: a) aumento del efecto del IGF-1 sobre los receptores de las células de la teca, lo que estimula el aumento en la síntesis de los andrógenos; b) activación de la enzima citocromo P450c17 α que estimula la síntesis de los andrógenos ováricos; c) reducción de la síntesis hepática de proteínas transportadoras de las hormonas sexuales (SHBG) por parte del hígado, lo que resulta en el aumento de la concentración de la testosterona libre (Álvarez-Blasco y col., 2006; Escobar, 2009; Ibáñez y col., 2011; Shafiee y col., 2013).

Disfunción neuroendocrina: se asocia con el aumento en la frecuencia de los pulsos de la GnRH. En la mujer sana los pulsos ocurren cada 90 minutos; sin embargo, en las mujeres con la patología suceden cada 60 minutos. Bajo estas condiciones se favorece el aumento en la secreción de la LH, más que de la FSH cuya concentración tiende a disminuir o no modificarse (Gross y col., 1987; Ciccone y Kaiser, 2009). El incremento en la concentración de la LH estimula la síntesis de los andrógenos en las células de la teca, mientras que, en las células de la granulosa el decremento de la FSH resulta en la disminución de la aromatización de los andrógenos, así como en la alteración del desarrollo y maduración folicular (Bremer, 2010).

Predisposición genética: la base genética del síndrome no se conoce. Si bien hay un fuerte componente familiar en el desarrollo de la patología; el modo de la herencia es incierto y la susceptibilidad genética difiere entre pacientes de la misma familia (Crespo y col., 2018; Khan y col., 2019). Los genes que regulan la secreción y la acción de la insulina, la esteroidogénesis ovárica y suprarrenal se consideran como los candidatos que determinan la expresión de varios fenotipos en el síndrome (Lakkakula y col., 2013). Debido a la heterogeneidad de esta patología, se considera como un trastorno oligogénico en el que la interacción de una serie de factores genéticos y ambientales modulan el desarrollo del síndrome (Khan y col., 2019). Hasta el momento no se ha descrito que exista una alteración en los genes que sea común en los pacientes con fenotipo del síndrome.

Hiperactividad de las fibras simpáticas: se ha señalado que el desarrollo del síndrome es resultado del aumento en la actividad de las fibras simpáticas que inervan al ovario. En roedores, la inyección intraperitoneal de valerato de estradiol (VE), aumenta la expresión del NGF y de su receptor de baja afinidad el p-75 (Lara y col., 2000). Cuando el receptor p-75 y el NGF se unen en la terminal nerviosa localizada en el ovario, desencadenan en el GCMS, un aumento en la actividad de la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de las catecolaminas, lo que conlleva a un aumento en el contenido y liberación de la NA ovárica, a una mayor secreción de los andrógenos y al desarrollo de quistes (Lara y col., 1993; Bremer, 2010; Morales-Ledesma y col., 2010).

Modelos de inducción del SOPQ

En busca de la etiología del SOPQ se han desarrollado modelos experimentales en animales como roedores, ovejas y primates no humanos en los que se reproducen algunas de las características reproductivas (Maliqueo y col., 2013) o metabólicas (Mannerås y col., 2007) descritas en las mujeres con la patología (Franks, 1995; Flores, 2012; Shi y Vine, 2012).

El empleo de modelos experimentales en roedores proporciona una herramienta versátil para comprender los mecanismos biológicos asociados con el desarrollo del síndrome. Entre las ventajas de utilizar la rata y ratón sobre otras especies incluye la facilidad de manejo y mantenimiento, el alto índice de reproducción, los tiempos de gestación cortos, los ciclos estrales de corta duración, la viabilidad de las manipulaciones genéticas y la asequibilidad (Singh, 2005; Shi y Vine, 2012; Walters y col., 2012).

Las similitudes conservadas evolutivamente entre los roedores y los humanos sobre la regulación del desarrollo folicular, la ovulación y la secreción de las hormonas esteroides por el eje hipotalámico-hipofisario, permiten establecer analogías entre estas dos especies (Walters y col., 2012).

Hasta la fecha, los modelos de inducción del síndrome en la rata incluyen la inyección de fármacos hormonales como los esteroides en diferentes etapas de desarrollo, fármacos no hormonales como los inhibidores de la actividad aromatasa, así como la exposición al estrés por frío (Singh, 2005; Shi y Vine, 2012). El uso de estos modelos permite el desarrollo del hiperandrogenismo, la alta concentración de la LH, la anovulación, la presencia de quistes foliculares y la resistencia a la insulina (Walters y col., 2012).

Andrógenos

En la rata se puede inducir el síndrome a través de la administración de DHEA (Roy y col., 1962), propionato de testosterona (PT) (Beloosesky y col., 2004; Morales-Ledesma y col., 2017) o 5α dihidrotestosterona (DHT) (Mannerås y col., 2007; Walters y col., 2012).

DHEA: es un andrógeno de corta actividad, empleado en animales desde 1960 en la inducción del SOPQ (Çinar y Gün, 2016). El tratamiento en ratas durante 20 a 40 días resultó, en la anovulación, la formación de quistes foliculares y pérdida del patrón del ciclo estral. La

concentración sérica de la LH, los andrógenos, los estrógenos y la progesterona aumentaron (Lee y col., 1991; Abramovich y col., 2012). Mientras que, la concentración de las gonadotropinas puede no modificarse (Henmi y col., 2001) o disminuir (Ward y col., 1978).

PT: es un andrógeno derivado sintéticamente de la testosterona. Su administración puede ser prenatal o posnatal. En el tratamiento prenatal, las hembras gestantes recibieron una dosis de PT del día 16 al 19 de gestación, lo que resultó en la alteración del ciclo estral. El análisis de la morfología ovárica mostró un aumento en el número de quistes, folículos preantrales y antrales mientras que, los folículos preovulatorios y los cuerpos lúteos disminuyeron (Tehrani y col., 2014; Qu y col., 2015).

El tratamiento con PT en los primeros 5 días de vida bloquea la ovulación al primer estro vaginal (PEV) (Morales-Ledesma y col., 2017) o en la edad adulta (Huffman y Hendricks, 1981; Morales-Ledesma y col., 2017). La morfología ovárica mostró quistes foliculares y folículos atrésicos (McDonald y Doughty, 1972). En ambas edades, la concentración sérica de la LH y el estradiol aumentaron; sin embargo, la progesterona y la FSH disminuyeron (Morales-Ledesma y col., 2017).

La DHT es un andrógeno no aromatizable sintetizado a partir de la testosterona por la enzima 5α -reductasa. En ratas prepuber, la administración diaria de 83 μ g de DHT a través de pellets de liberación continua por 90 días, resulta en la disrupción del patrón del ciclo estral, ovarios poliquísticos y anovulación. La concentración de la testosterona y el estradiol no se modificaron; sin embargo, la de progesterona disminuyó (Mannerås y col., 2007). El tratamiento prenatal con 3 mg de DHT durante los días 16-19 de gestación, aumenta la concentración sérica de la LH, la testosterona, el estradiol y la progesterona; sin modificar la concentración de la FSH. El análisis de la morfología ovárica reveló un aumento en el número de los folículos preantrales y antrales, mientras que, el número de los folículos preovulatorios y los cuerpos lúteos disminuyeron (Wu y col., 2010).

Estrógenos

El estrógeno más utilizado en la inducción del SOPQ es el VE, un estrógeno de larga actividad (Williams y Stancel, 1996). Una inyección de VE a los 10 o 14 días de edad muestra un adelanto en la canalización vaginal y alteraciones en el patrón del ciclo estral; además, genera el aumento de la atresia folicular, la anovulación y los ovarios poliquísticos en la edad adulta. Eventos que se

acompañan por el aumento de la concentración de la NA ovárica (Rosa-e-Silva y col., 2003; Cruz y col., 2012).

Letrozol

El Letrozol, es un inhibidor de la actividad de la aromatasas de tercera generación, no esteroideo y altamente específico (Figura 13). Desde el 2000 se ha empleado en el tratamiento de mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama. Recientemente ha sido usado como fármaco en el tratamiento de infertilidad en mujeres con el SOPQ o con resistencia al citrato de clomifeno (He y Jiang, 2011; Misso y col., 2012; Liu y col., 2017).

Posterior a la primera administración de Letrozol, la supresión máxima de los estrógenos se logra entre las 48 a 72 hrs. El fármaco se absorbe en el tracto gastrointestinal con una biodisponibilidad del 99.9%, posee una vida media en el organismo de 48 h y su vía de eliminación es a través del hígado (Pfister y col., 2001; Lee y Ledger, 2011). En el ovario, actúa en las células de la granulosa, aquí se une competitivamente al grupo hemo de la subunidad del citocromo P450 aromatasas e inhibe la conversión de los andrógenos a los estrógenos (Bhatnagar, 2007). Su administración no tiene un efecto significativo sobre la síntesis de los mineralocorticoides o los glucocorticoides suprarrenales (Pfister y col., 2001; Lee y Ledger, 2011).

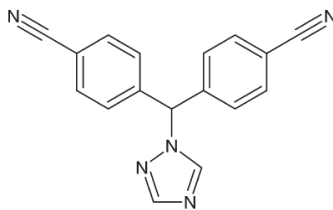


Figura 13. Estructura química del letrozol. Tomado de Lee y Ledger, 2011.

La administración constante de Letrozol reproduce varias características del SOPQ (Kauffman y col., 2015). Este modelo se basa en el aumento de los andrógenos endógenos, resultado del bloqueo de la aromatización (Kafali y col., 2004; Reddy y col., 2016).

En los modelos de inducción del SOPQ con Letrozol, las dosis empleadas varían desde 0.1 a 3 mg diarios por lapsos de 7 hasta 91 días. La vía de administración puede ser oral, intraperitoneal o

subcutánea por pellets de liberación prolongada. La mayoría de los estudios utilizan a la rata adulta y muy pocos de ellos usan la rata prepuber.

El tratamiento con Letrozol genera la pérdida del patrón del ciclo estral y la anovulación (Mannerås y col., 2007; Maliqueo y col., 2013). La masa del ovario aumenta y su morfología muestra múltiples quistes foliculares y hemorrágicos, folículos atrésicos y escasos o nulos cuerpos lúteos (Pandey y col., 2016). Evidencias previas muestran que, el tratamiento con el Letrozol aumenta la concentración sérica de la testosterona y de la LH, además, la concentración del estradiol y de la progesterona disminuye (Baravalle y col., 2006; Zurvarra y col., 2009). Por otra parte, algunos estudios muestran que la administración de este fármaco puede alterar la concentración de la FSH. Los cambios en esta hormona son controversiales, pues hay autores que señalan que aumenta (Baravalle y col., 2006; Zurvarra y col., 2009), otros que disminuye (Maliqueo y col., 2013; Kauffman y col., 2015) y otros que no se modifica (Caldwell y col., 2014; Saiyed y col., 2016). Del mismo modo, algunos autores han mostrado que la concentración del estradiol no se modifica (Skarra y col., 2017; Ryan y col., 2018; Khaled y col., 2019).

Efectos de la denervación simpática en la rata con el SOPQ

Se ha postulado que el SOPQ es el resultado del aumento en la actividad de las fibras simpáticas que recibe el ovario (Barria y col., 1993; Lara y col., 1993; Rosa-e-Silva y col., 2003). Esta idea se ve apoyada por el hecho de que, en los animales tratados con el VE, la eliminación del principal aporte noradrenérgico, por la sección bilateral del NOS, restablece la capacidad ovulatoria de los animales (Morales-Ledesma y col., 2010).

Cuando se induce el SOPQ por la inyección al nacimiento con 100 µg de PT, la sección bilateral del NOS no restablece la ovulación al primer estro vaginal ni en la etapa adulta (Morales-Ledesma y col., 2017). Un efecto similar se observa en la rata adulta que fue tratada con 1 mg de testosterona libre en el primer o quinto día de nacimiento (Anesetti y Chávez-Genaro, 2015). Estas evidencias nos permiten sugerir que el desarrollo y mantenimiento del SOPQ originado a partir de diferentes modelos no siempre es el resultado de la hiperactividad simpática.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la clínica un gran porcentaje de mujeres con problemas de infertilidad presentan el SOPQ, cuya característica principal es el hiperandrogenismo, acompañado de la anovulación y/o desarrollo de quistes foliculares.

Hasta el momento la etiología del SOPQ es desconocida, sin embargo, se ha sugerido que su origen puede estar relacionado con la exposición temprana a una alta concentración de los andrógenos o al aumento de la actividad de las fibras simpáticas que inervan al ovario a través del NOS. En el modelo de la rata tratada con VE, se ha observado que la activación de las neuronas simpáticas periféricas que inervan al ovario contribuye al aumento en el contenido y liberación de la NA ovárica que, a su vez, favorece el aumento en la secreción de los andrógenos. Se ha mostrado que la eliminación de la información simpática, por la sección bilateral del NOS o por la simpatectomía química, restablece las funciones ováricas.

Otro modelo que reproduce las características del SOPQ es la administración de Letrozol, un inhibidor selectivo de la actividad de las aromatasas, sin embargo, se desconocen los efectos que el fármaco puede tener si este se administra desde la edad infantil. Hasta donde tenemos conocimiento, no hay reportes que indiquen si el desarrollo de la patología en este modelo también es el resultado de la hiperactividad simpática. En el presente estudio se analizó el efecto de inyectar Letrozol desde los 10 días de edad hasta la apertura vaginal o hasta los 60 días de edad al presentar un estro vaginal, sobre la morfología del ovario y la concentración de las hormonas esteroides, con la finalidad de explicar las alteraciones en la función reproductiva. También se analizó si la ovulación se puede restablecer al disminuir la actividad simpática que transcurre por el NOS.

HIPÓTESIS

En la mujer la hiperactividad de las fibras simpáticas está asociada con el desarrollo del SOPQ. En la rata, la exposición constante al Letrozol es capaz de inducir el hiperandrogenismo, la morfología quística y la anovulación, entonces, en este modelo el restablecimiento de la función ovárica va a depender del tiempo de exposición al fármaco y de la integridad de la inervación simpática.

OBJETIVO GENERAL

Analizar si en la rata tratada con Letrozol desde la etapa infantil hasta la pubertad o hasta la edad adulta se producen las características que definen al síndrome de ovario poliquístico y si su desarrollo es mediado por la información simpática que inerva al ovario.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de la inyección de Letrozol cinco veces a la semana desde el día 10 de vida hasta el momento de la apertura vaginal, sobre el inicio de la pubertad, el ciclo estral, la concentración de las hormonas esteroides, la respuesta ovulatoria, la dinámica del crecimiento folicular y la morfología ovárica.
2. Analizar el efecto de la inyección de Letrozol cada 48 h desde el día 10 de vida hasta los 60 días, sobre la edad de apertura vaginal, el patrón del ciclo estral, la concentración de las hormonas esteroides, la respuesta ovulatoria, la morfología ovárica y la dinámica del desarrollo folicular.
3. Evaluar en la rata inyectada con letrozol desde el día 10 de vida hasta los 60 días de edad el efecto de la sección bilateral del nervio ovárico superior a los 50 días de edad, sobre el ciclo estral, la concentración de las hormonas esteroides, la respuesta ovulatoria, la morfología ovárica y la expresión de la TH en el ovario.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de la investigación se utilizaron ratas hembra, de diez días de edad pertenecientes a la cepa CII-ZV. Los animales fueron mantenidos con iluminación controlada de 14 h de luz y 10 h de oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h), temperatura de 22 ± 2 °C, con libre acceso a la madre hasta el destete y posteriormente al agua y alimento. En todos los casos se siguió lo establecido por la Ley Mexicana de Protección Animal para el uso de animales de experimentación (NOM-062-ZOO-1999), especificaciones técnicas para la protección, el cuidado y el uso de animales de laboratorio.

Los animales fueron colocados en grupos de seis a siete crías por camada (cinco o seis hembras y un macho) y el destete se realizó a los 24 días de edad. Los frotis vaginales para el análisis citológico del ciclo estral y los tratamientos farmacológicos se realizaron entre las 09:00 y 10:00 horas.

En la figura 14, se muestra el diagrama de los grupos experimentales utilizados en los tres modelos de este estudio.

MODELO I

Grupo Testigo Absoluto (TA): Ratas hembra intactas fueron sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

Tratamiento con el vehículo (Vh) o Letrozol: Ratas hembra inyectadas por vía intraperitoneal con 0.1 mL de solución salina que fungió como el Vh o con 0.5 mg de Letrozol (Femara, Novartis Pharma AG, Stein, Suiza) disuelto en 1.0 mL del Vh por cada Kg de masa corporal. Las inyecciones se realizaron cinco veces a la semana, desde los 10 días de edad hasta el día de la apertura vaginal.

Los animales fueron sacrificados cuando presentaron el primer estro vaginal (Figura 14 A).

MODELO II

Grupo TA: Ratas hembra intactas fueron sacrificadas a los 60 días de edad en el día del estro.

MATERIALES Y MÉTODO

Tratamiento con Vh o Letrozol: Animales de 10 días de edad fueron inyectados con el Vh o Letrozol cada 48 h, hasta los 60 días de edad y al presentar un estro vaginal fueron sacrificados (Figura 14 B).

MODELO III

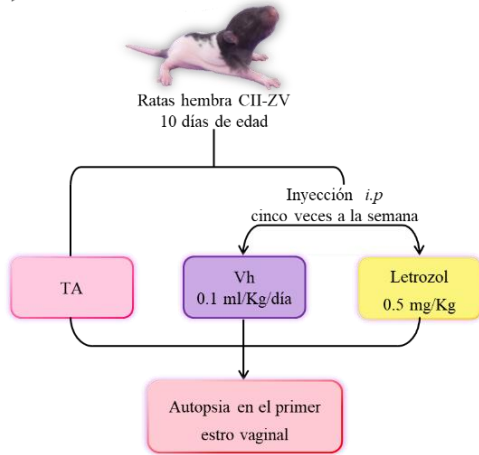
Los animales TA o inyectados desde los 10 días de edad con el Vh o Letrozol cada 48 h, al llegar a los 50 días edad fueron sometidos a alguna de las siguientes manipulaciones quirúrgicas (Figura 14 C):

- **Operación Simulada (OS):** en este procedimiento los animales fueron anestesiados con éter, posteriormente se les realizó bilateralmente una incisión dorso lateral de aproximadamente 2 cm en piel, músculo y peritoneo. Asimismo, se suturó la herida sin tocar ningún órgano, se aplicó alcohol yodado y se esperó a que los animales se recuperaran antes de ser regresados al bioterio. Los animales fueron sacrificados aproximadamente a los 65 días de edad en el día del estro.
- **Sección Bilateral del NOS (SBNO):** los animales fueron anestesiados con éter y sometidos a una incisión dorso lateral de forma bilateral en piel, músculo y peritoneo de aproximadamente 2 cm, a través de la cual se exteriorizó el ovario unido al útero. Se identificó el ligamento suspensorio por el cual transcurre el NOS y se procedió a realizar la sección del NOS. El ovario se regresó a la cavidad peritoneal y se suturó la herida, se aplicó alcohol yodado y se esperó a que los animales se recuperaran antes de ser regresados al bioterio. Los animales fueron sacrificados aproximadamente a los 65 días de edad en el día del estro.

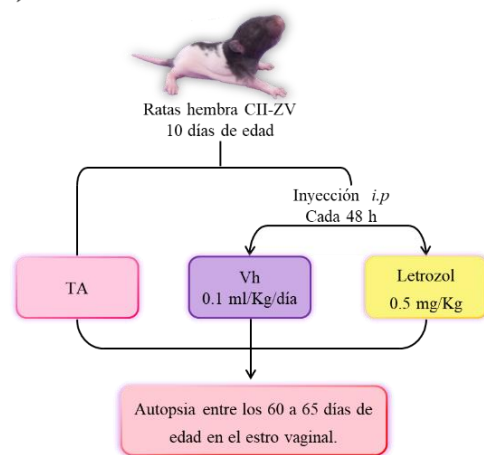
Todos los grupos se revisaron diariamente hasta que se presentó la canalización de la vagina, momento en el cual se comenzó la toma de frotis vaginales. Los frotis fueron teñidos con hematoxilina-eosina y analizados en el microscopio óptico OPTIPHOT-2 (Nikon Instruments Inc., USA), algunos animales fueron sacrificados al presentar el primer estro vaginal (Modelo I) y en otros (Modelo II y III) se continuó por un lapso de ocho días, el cual se reanudó ocho días antes de que culminara el tratamiento, con el fin de contar con un registro del patrón del ciclo estral de los animales.

MATERIALES Y MÉTODO

A) Modelo I



B) Modelo II



C) Modelo III

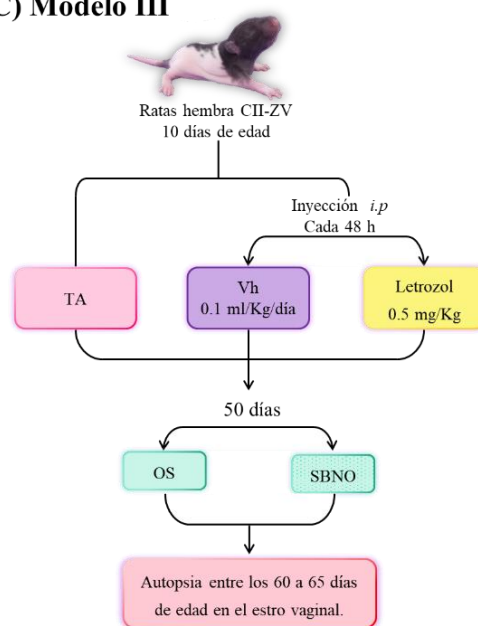


Figura 14. Diagrama de flujo que muestra los grupos experimentales empleados en: A) Modelo I, B) Modelo II y C) Modelo III. Donde: TA: Testigo absoluto; Vh: Vehículo; SBNO: Sección Bilateral del Nervio Ovárico Superior y OS: Operación simulada.

Procedimiento de Autopsia

Previo al momento del sacrificio se registró la masa corporal, los animales fueron sacrificados por decapitación y se colectó la sangre del tronco, que se dejó coagular a temperatura ambiente aproximadamente por 15 min. Posteriormente, la sangre se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 15 min. El suero fue dividido en alícuotas y las muestras se congelaron a -20 °C hasta el momento de la cuantificación de las hormonas esteroides, mediante la técnica de Quimioluminiscencia.

En el momento de la autopsia, se disecó y pesó el útero, las adrenales y los ovarios. Los oviductos fueron separados de los ovarios y, a través del microscopio estereoscópico SMZ800N (Nikon Instruments Inc., USA), se contaron los ovocitos contenidos en cada oviducto.

Valoración de la dinámica del crecimiento folicular

Los ovarios de los animales empleados en cada modelo experimental fueron fijados en Bouin durante 24 horas y posteriormente se colocaron en alcohol al 70% hasta el momento de realizar la deshidratación y la inclusión en paraplast (Surgipath Paraplast, Leica Biosystem, USA). Se realizaron cortes histológicos seriados de 10 µm en el microtomo rotatorio manual 202A (ECOSHEL, USA), los cuales fueron teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina.

El diámetro folicular se midió en aquellos folículos cuyo ovocito presentó núcleo y nucleolo bien definido. Las mediciones se realizaron en un microscopio óptico OPTIPHOT-2 (Nikon Instruments Inc., USA) con la ayuda de un ocular micrométrico. El diámetro mayor (D_1) y el perpendicular a éste (D_2), correspondieron a la distancia tomada de un extremo a otro de la membrana basal (Figura 15). El diámetro promedio (D_p) se calculó con la relación: $D_p = (D_1 + D_2)/2$ (Rosas, 2006).

MATERIALES Y MÉTODO

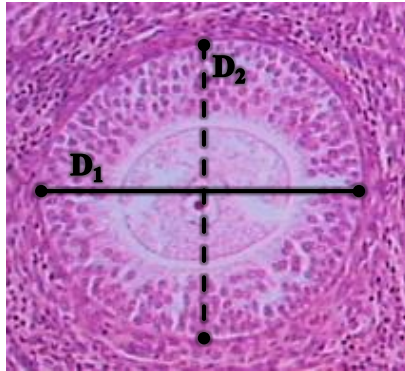


Figura 15. Representación esquemática de la medición del diámetro folicular. D_1 : Diámetro mayor 1; D_2 : Diámetro perpendicular.

La dinámica del crecimiento folicular se evaluó a través de la proporción de los folículos sanos, atrésicos y quistes foliculares. Los folículos con un diámetro menor o igual a $349\ \mu\text{m}$ se consideraron como folículos pequeños, los que presentaron un diámetro entre las 350 a $449\ \mu\text{m}$ como folículos medianos y finalmente aquellos con un diámetro mayor o igual a $450\ \mu\text{m}$ como folículos preovulatorios. Se consideraron como folículos atrésicos aquellos que presentaron al menos una de las siguientes características: picnosis nuclear, descamación de las células de la granulosa en la cavidad antral e hiperplasia en la capa de las células de la teca (Greenwald y Roy, 1994).

Fueron definidos como quistes foliculares (Figura 16 A) aquellos que presentaron una cavidad antral amplia, disminución de las capas de la granulosa, hiperplasia tecal y ausencia del ovocito (Brawer y col., 1986; Lara y col., 2000). Los quistes hemorrágicos (Figura 16 B) fueron aquellos quistes en cuyas cavidades se observó la presencia de restos de sangre (Yoffe y col., 1991). Se consideraron como prequistes foliculares aquellas estructuras que se encontraban en un estadio transitorio entre un folículo preovulatorio y un quiste folicular. De acuerdo con Lara y colaboradores (2000), estas estructuras de transición son denominadas folículos tipo III, caracterizadas por la presencia o la ausencia del ovocito, así como cuatro o cinco capas de células de la granulosa, con teca aparentemente normal y presencia de invaginaciones y evaginaciones en la pared folicular (Figura 16 C).

MATERIALES Y MÉTODO

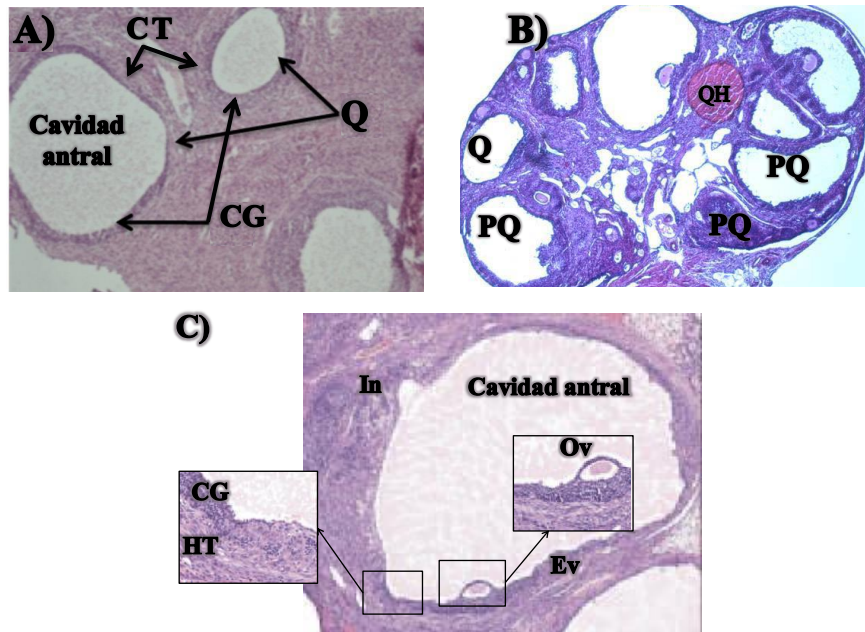


Figura 16. Aspectos morfológicos de: A) un quiste folicular (Tomado de Pandey y col., 2016); B) un quiste hemorrágico (Tomado de Ryan y col., 2018) y C) prequiste folicular (Tomado de Mannerås y col., 2007). Q: Quiste folicular; QH: Quiste hemorrágico; PQ: Prequiste folicular; CG: Células de la granulosa; CT: Células de la teca; Ov: Ovocito; HT: Hiperplasia tecal; In: Invaginaciones; Ev: Evaginaciones.

Cuantificación de las hormonas esteroideas

La medición de la concentración de la progesterona, la testosterona y el estradiol se realizó mediante la técnica de Quimioluminiscencia. Para ello se tomaron alícuotas con un volumen aproximado de 500 μL por muestra de suero y se colocaron dentro de un microtubo y se ingresaron al equipo IMMULITE 1000 (Siemens Healthcare Diagnostics, USA). Una vez dentro, el equipo tomó 25 μL de muestra y la depositó en la fase sólida que contenía el anticuerpo policlonal para la progesterona, la testosterona o el estradiol.

Posteriormente se añadió la hormona conjugada con fosfatasa alcalina y se dejó incubar con agitación intermitente durante una hora a 37 °C para la cuantificación de la testosterona y el estradiol y 30 min para cuantificación de la progesterona. Después de la incubación, el conjugado enzimático no unido fue eliminado por centrifugación. Se agregó el sustrato quimioluminiscente y se incubó durante 10 minutos.

La concentración sérica de progesterona se expresó en ng/mL, mientras que, testosterona y estradiol en pg/mL. Los valores de los coeficientes de variación intraensayo e interensayo

MATERIALES Y MÉTODO

fueron 6.7 y 7.9% para progesterona, 9.5% y 11.7 % para testosterona y 7.1 y 8.3 para estradiol, respectivamente.

Perfusión

Con la finalidad de observar si la expresión de la TH se modifica por efecto de la denervación simpática, se analizó la expresión de la enzima en los ovarios de ratas inyectadas con Letrozol y sometidas a la SBNO. Los animales fueron sobrealterados con pentobarbital sódico (40 mg/Kg de peso corporal) y se les realizó una perfusión intracardiaca con una bomba peristáltica (Pump Med Flow 4.0- 85.0 mL/min, Thomas Scientific, USA), a través de la cual se pasaron 150 mL de solución salina que fungió como solución limpiadora, seguida de 150 mL de paraformaldehído al 4% como solución fijadora, a una velocidad de 8 mL/min. Al finalizar la perfusión, se extrajeron las glándulas adrenales que fungieron como control positivo y los ovarios. Los órganos fueron mantenidos en paraformaldehído al 4% por 24 h. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con buffer de fosfatos (PBS) a un pH de 7.4. Para su criopreservación se colocaron por 24 h en solución de sacarosa al 10%, al día siguiente se colocaron en sacarosa al 20%. Finalmente, se colocaron en una solución de sacarosa al 30% esta última solución, fue cambiada semanalmente hasta el momento de realizar los cortes histológicos.

Análisis de la expresión y cuantificación de la TH

Los ovarios de los animales sacrificados por perfusión intracardiaca, fueron cortados a 7 µm de grosor mediante el criostato Leica CM1520 (Leica Biosystems, DE) a -20 °C. Los cortes seleccionados fueron aquellos que incluían la parte central del ovario, estos se montaron en portaobjetos de vidrio recubiertos con silano, con base en la metodología descrita por Venegas y colaboradores (2015).

Las laminillas fueron lavadas tres veces con PBS-IX (PBS con 0.5% de Triton X-100). Las secciones fueron incubadas por 15 min en tritón-PBS al 0.5%. Posteriormente se incubaron en albúmina de suero bovino al 2% libre de IgG (BSA sigma) durante 2 h para reducir la tinción de fondo y se incubaron durante 72 h a 4 °C con un anticuerpo policlonal de conejo anti-TH (1:200) (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA).

MATERIALES Y MÉTODO

Después de la incubación con el anticuerpo primario, las laminillas fueron lavadas dos veces con tritón- PBS por 10 min y una vez con PBS-IX. Las laminillas se incubaron con un anticuerpo secundario (anti-conejo acoplado a fluoresceína FITC) (Jackson Immuno Research Laboratories Inc., USA) durante una hora. Al finalizar, los tejidos se lavaron tres veces con PBS por 10 min cada uno.

Los cortes fueron teñidos con DAPI-Vecta-shield (Vector Labs., USA.) para contra teñir los núcleos de las células.

La adquisición y procesamiento de las imágenes se realizó en el lector de placas acoplado a microscopía, fluorescencia, luminiscencia y espectroscopia Cytation 5 y el software Gen5 versión 3.05 para Windows (BioTek, Instruments, Inc.USA). El análisis de las imágenes se realizó en el sistema Nis-Elements BR 3.0 (Nikon, USA), se emplearon cuatro cortes seriados de cada grupo. La inmunohistofluorescencia se calculó como el número total de píxeles por el área total evaluada mediante el análisis de segmentación de color, que produce la cuantificación de los objetos de un color específico (verde).

Análisis Estadístico

A todos los datos obtenidos se les aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk. En los casos donde la distribución fue normal se aplicaron pruebas paramétricas. Establecido lo anterior, los resultados de la masa corporal, la masa relativa de los ovarios, del útero y de las adrenales (mg del órgano/100 g de la masa corporal del animal), así como, la concentración sérica de las hormonas esteroideas se analizaron por la prueba de Análisis de Varianza Multifactorial (ANDEVA) de un factor, seguida por la prueba de comparación múltiple o pos-hoc Tukey-Kramer. Asimismo, los resultados del modelo III se analizaron mediante una prueba de ANDEVA de dos vías, tomando al grupo asignado (TA, Vh o Letrozol) como el primer factor y al tratamiento quirúrgico (OS o SBNO) como el segundo, seguido por la prueba de comparación múltiple Tukey-Kramer.

El número de los ovocitos liberados por ambos ovarios fue analizado por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la prueba de comparación de Dunn. El porcentaje de animales ovulantes, el porcentaje de los folículos sanos y el porcentaje de tiempo en cada etapa del ciclo estral se analizó por la prueba de X^2 . Los datos de fluorescencia se analizaron mediante

MATERIALES Y MÉTODO

la prueba “*t*” de *Student*. Por otra parte, los datos de la edad de la apertura vaginal, del primer estro vaginal y de la dinámica del crecimiento folicular se muestran con la mediana y el rango intercuartil y se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Se consideraron como estadísticamente significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor a 0.05. El programa estadístico empleado fue Prism 8 versión 8.0.2 (GraphPad Software Inc., USA) para Windows.

RESULTADOS

Modelo I. Inyección de letrozol en ratas infantiles, hasta el momento de la apertura vaginal

Inicio de la Pubertad

La mediana de los días de la apertura vaginal y del primer estro vaginal de las hembras inyectadas con el Vh o Letrozol fue mayor respecto al grupo TA. Como se puede observar en el Cuadro 1, el tratamiento con Letrozol resultó en el retraso del primer estro vaginal de aproximadamente nueve días respecto al grupo TA y seis días respecto al grupo Vh.

Cuadro 1. Mediana y el rango intercuartil (mostrado entre los paréntesis) de la edad de apertura vaginal (EAV) y del primer estro vaginal (PEV) de animales testigo absoluto (TA) o inyectados desde los 10 días de edad con el vehículo (Vh) o Letrozol cinco veces a la semana hasta el día de la apertura vaginal y sacrificados en el primer estro vaginal.

Grupo	EAV (Días)	PEV (Días)
TA	36 (35, 36.5)	37 (37, 38)
Vh	39 (38, 40) *	40 (39, 44.5) *
Letrozol	40 (39, 43) *	46 (43.7, 48) * ●

* P<0.05: vs. TA; ● P<0.05 vs. Vh (Prueba U de Mann-Whitney).

Ciclo estral

En las hembras intactas, así como en las inyectadas con el Vh o Letrozol presentaron diestro al momento de la apertura vaginal. Las hembras inyectadas con Letrozol permanecieron más de seis días en esta etapa (Figura 17) mientras que, las TA o las inyectadas con el Vh mostraron un ciclo estral regular.

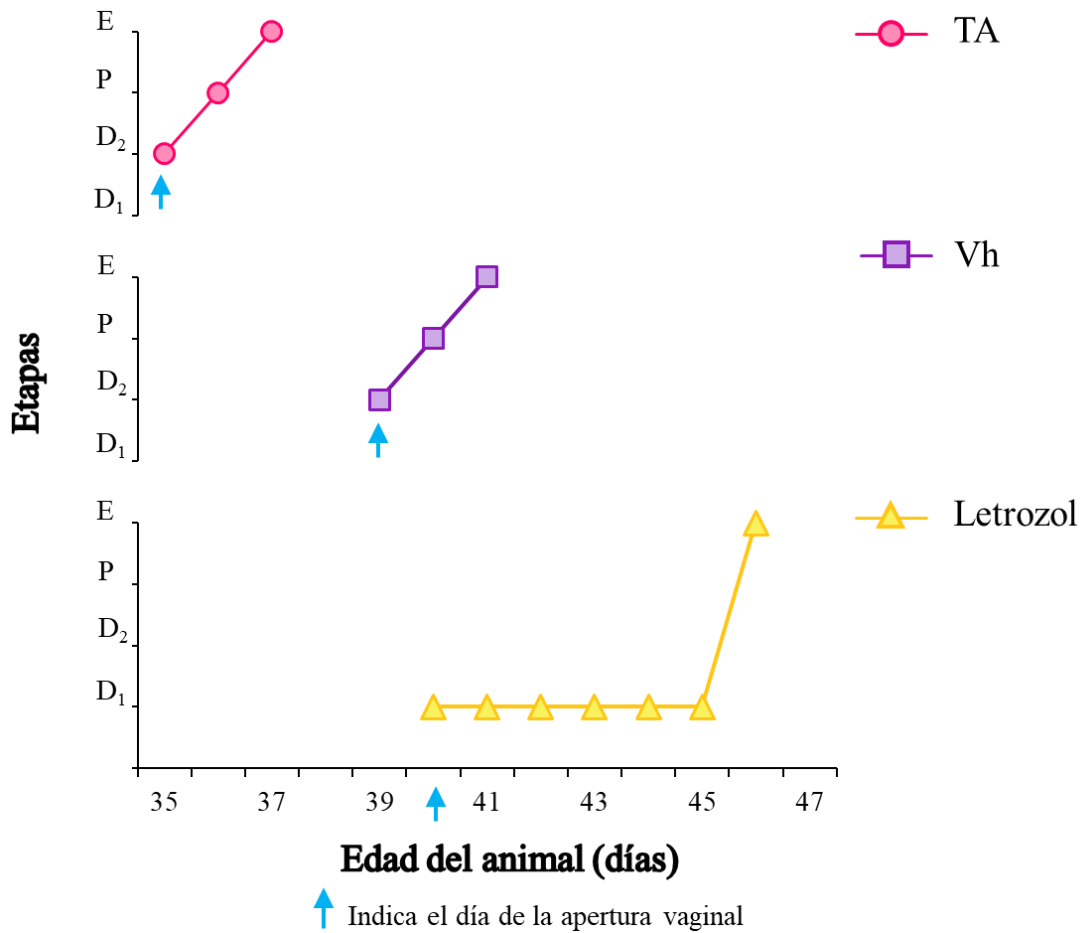


Figura 17. Patrón representativo del ciclo estral de animales testigo absoluto (TA) o inyectados desde los 10 días de edad con el vehículo (Vh) o Letrozol cinco veces a la semana hasta el día de la apertura vaginal y sacrificados en el primer estro vaginal. D₁: Diestro 1; D₂: Diestro 2; P: Proestro y E: Estro. La flecha de color azul indica el día de la apertura vaginal.

RESULTADOS

Masa corporal y masa relativa de la masa ovárica, masa adrenal y del útero

En comparación con el grupo TA, los animales inyectados con Letrozol mostraron mayor peso corporal; así como la disminución en la masa adrenal y del útero, si bien en los animales inyectados con el Vh se observó una tendencia similar, esta no fue estadísticamente significativa (Cuadro 2).

Cuadro 2. Media \pm e.e.m de la masa corporal (g) y de la masa relativa (mg/100 g PC) de la masa ovárica, la masa adrenal y del útero de animales testigo absoluto (TA) o inyectados desde los 10 días de edad con el vehículo (Vh) o Letrozol cinco veces a la semana hasta el día de la apertura vaginal y sacrificados en el primer estro vaginal.

Grupo	Masa corporal	Masa ovárica	Masa adrenal	Útero
TA	117.3 \pm 3.2	26.4 \pm 1.4	27.5 \pm 2.0	163.8 \pm 8.3
Vh	127.2 \pm 2.3	30.2 \pm 2.2	22.7 \pm 2.5	137.8 \pm 13.0
Letrozol	139.8 \pm 3.5 * ●	32.6 \pm 2.4	20.0 \pm 1.7 *	120.5 \pm 11.9 *

* P<0.05: vs. TA; ● P<0.05 vs. Vh (ANDEVA, seguida por la prueba comparación múltiple Tukey-Kramer).

Respuesta ovulatoria

En ratas hembra el tratamiento con Letrozol desde los 10 días de edad hasta la apertura vaginal no modificó el porcentaje de animales ovulantes ni el número de los ovocitos liberados por ambos ovarios, en comparación con animales TA o inyectados con el Vh (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de animales ovulantes y la media \pm e.e.m del número de los ovocitos liberados por el ovario izquierdo y derecho de ratas testigo absoluto (TA) o inyectadas desde los 10 días de edad con el vehículo (Vh) o Letrozol cinco veces a la semana hasta el día de la apertura vaginal y sacrificados en el primer estro vaginal.

Grupo	n	Porcentaje de animales ovulantes	No. Ovocitos liberados		No. Ovocitos totales
			Ovario izquierdo	Ovario derecho	
TA	11	100	4.7 \pm 0.7	4.6 \pm 0.6	8.9 \pm 0.8
Vh	12	91.6	3.3 \pm 0.4	3.4 \pm 0.6	6.4 \pm 0.8
Letrozol	10	100	4.6 \pm 1.0	3.0 \pm 0.5	6.6 \pm 1.0

Concentración de las hormonas esteroides

La inyección de Letrozol no modificó la concentración de la progesterona (Figura 18 A); sin embargo, se observó el aumento en la concentración de la testosterona respecto al grupo TA o inyectado con el Vh (Figura 18 B). En contraste, la inyección de Letrozol resultó en el aumento de la concentración del estradiol respecto a los animales TA (Figura 18 C).

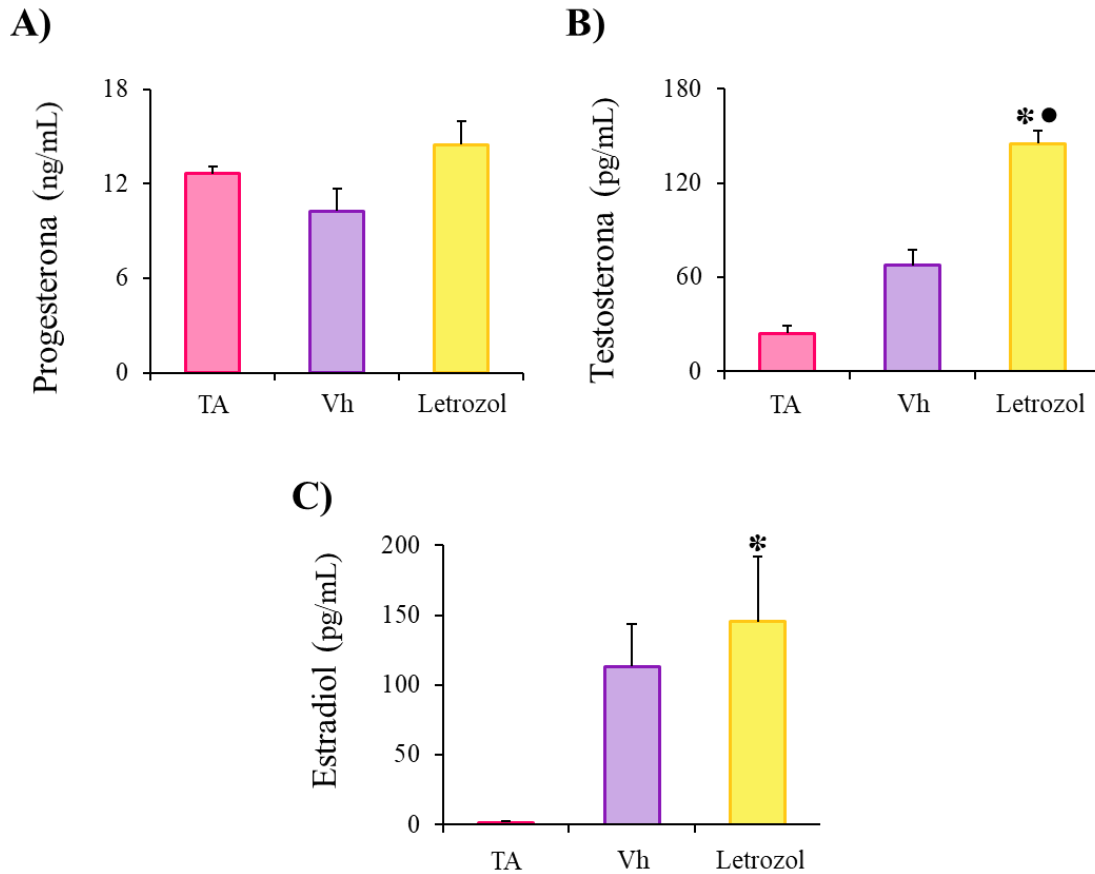


Figura 18. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de: A) progesterona, B) testosterona y C) estradiol, de animales testigo absoluto (TA) o inyectados desde los 10 días de edad con el vehículo (Vh) o Letrozol, cinco veces a la semana hasta el día de la apertura vaginal y sacrificados en el primer estro vaginal. * $P < 0.05$ vs. TA; • $P < 0.05$ vs. Vh (ANDEVA, seguida de la prueba de comparación múltiple Tukey-Kramer).

Histología ovárica y dinámica del crecimiento folicular

La histología ovárica de los animales inyectados con el Vh (Figura 19 B) no se modificó respecto a la observada en las hembras TA (Figura 19 A), en ambos, se observan folículos en todas las etapas del desarrollo, así como la presencia de cuerpos lúteos. Estas mismas estructuras también fueron visibles en los ovarios de las hembras inyectadas con el Letrozol; sin embargo, en estos se observó la formación de prequistes y quistes foliculares (Figura 19 C).

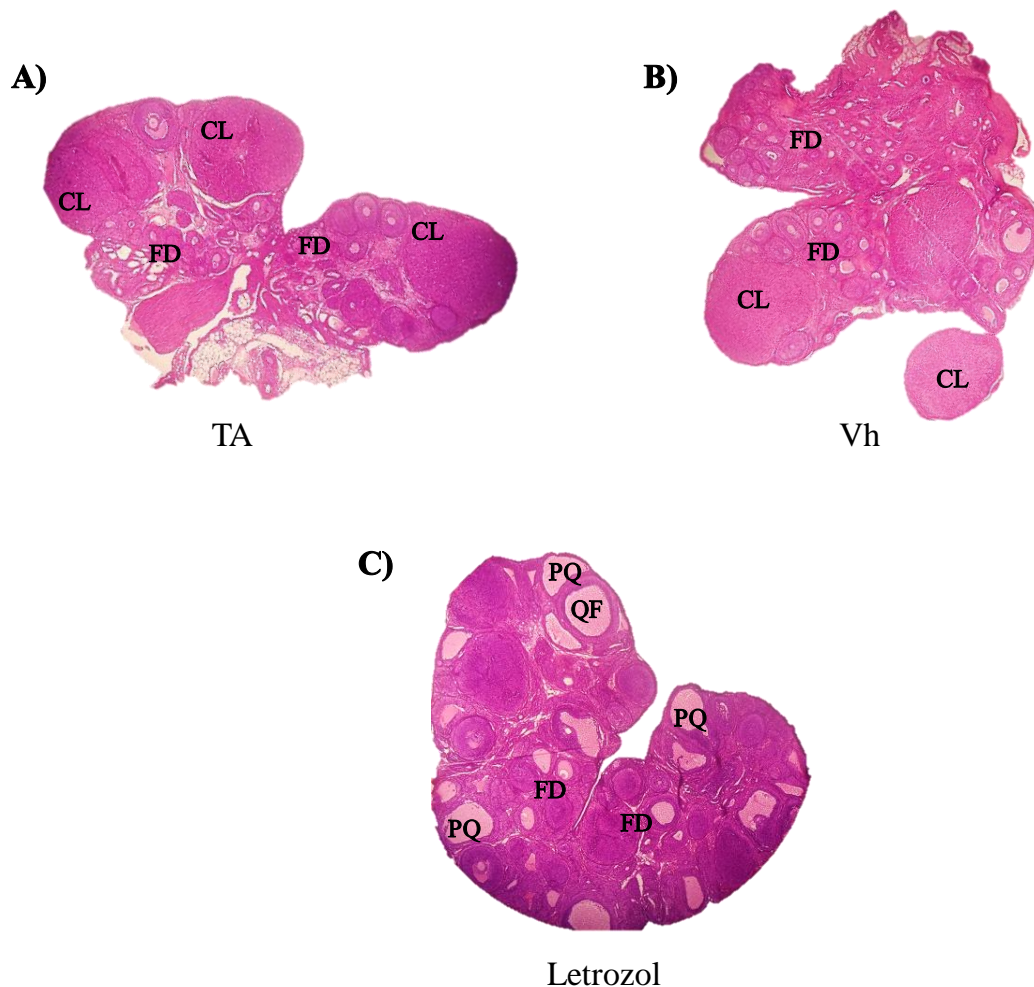


Figura 19. Micrografía a 4x que muestra de manera representativa la histología ovárica de animales A) Testigo absoluto (TA) o inyectados desde los 10 días de edad con B) el vehículo (Vh) o C) Letrozol, cinco veces a la semana hasta el día de la apertura vaginal y sacrificados en el primer estro vaginal. FD: Folículos en Desarrollo; CL: Cuerpo Lúteo; PQ: Prequiste y QF: Quiste Folicular. Tinción hematoxilina-eosina.

RESULTADOS

En las hembras inyectadas con el Letrozol desde los 10 días de edad hasta la pubertad, no se observaron modificaciones en la mediana del número de los folículos totales, sanos o atrésicos, respecto a las hembras inyectadas con el Vh. Como se observó en la histología ovárica, sólo los animales inyectados con el Letrozol mostraron prequistes y quistes foliculares (Cuadro 4).

Cuadro 4. Mediana y el rango intercuartil (el cual se muestra entre paréntesis) del número de folículos totales, sanos, atrésicos, prequistes y quistes de animales inyectados desde los 10 días de edad con el vehículo (Vh) o Letrozol cinco veces a la semana hasta el día de la apertura vaginal y sacrificados en el primer estro vaginal.

Grupo	Número de folículos				
	Totales	Sanos	Atrésicos	Prequistes	Quistes
Vh	108 (104, 132)	80 (78, 104)	28 (26, 28)	-	-
Letrozol	92 (62, 101)	48 (30, 64)	24 (22, 26)	10 (8, 13)	3 (2, 5)

La inyección de Letrozol desde los 10 días de edad hasta la apertura vaginal resultó en la disminución del porcentaje de los folículos sanos pequeños con un diámetro menor a 349 μm respecto al grupo Vh. A pesar de esta disminución el porcentaje de los folículos medianos o preovulatorios no se modificó respecto a los animales inyectados con el Vh (Figura 20).

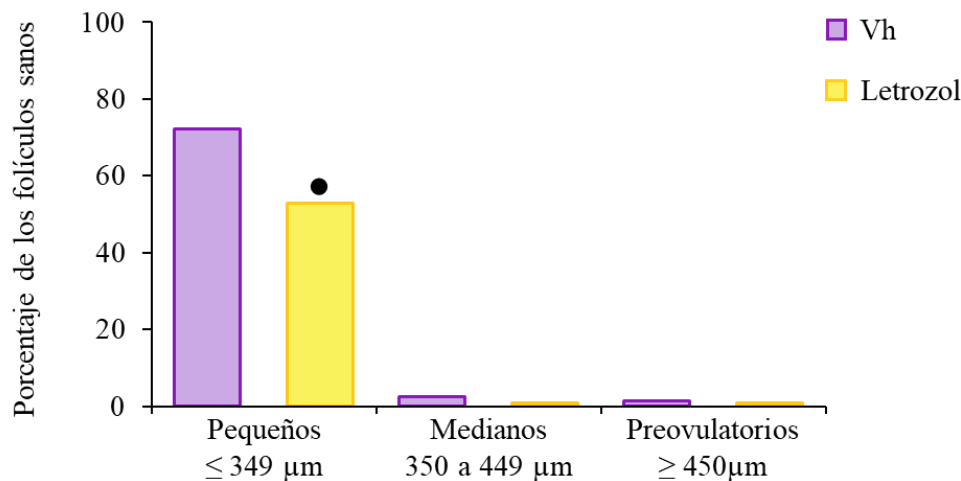


Figura 20. Porcentaje de folículos sanos pequeños con un diámetro menor o igual a 349 μm , medianos con diámetro de 350 a 449 μm y preovulatorios con diámetro mayor a 450 μm . Los animales fueron inyectados desde los 10 días de edad con el vehículo (Vh) o Letrozol cinco veces a la semana hasta la apertura vaginal y sacrificados en el primer estro vaginal. El 100 % correspondió al total de los folículos considerados en cada tratamiento. • $P < 0.05$ vs. Vh (Prueba X^2).

Modelo II. Inyección de letrozol en ratas infantiles hasta los 60 días de edad

Inicio de la Pubertad

En las hembras inyectadas con Letrozol la mediana de los días de la apertura vaginal fue menor respecto al grupo TA o inyectado con el Vh, es decir, este grupo presentó un adelanto de la apertura vaginal. Por el contrario, el tratamiento con Letrozol resultó en el retraso del primer estro vaginal respecto al grupo TA y al grupo tratado con el Vh (Cuadro 5).

Cuadro 5. Mediana y el rango intercuartil (mostrado entre los paréntesis) de la edad de apertura vaginal (EAV) y del primer estro vaginal (PEV) de animales testigo absoluto (TA) o inyectados cada 48 horas desde los 10 días de vida con el vehículo (Vh) o Letrozol hasta los 60 días de edad. La eutanasia de los animales se realizó en el estro vaginal inmediato al término del tratamiento.

Grupo	EAV (Días)	PEV (Días)
TA	35 (34, 35)	36 (35, 37)
Vh	35 (34, 38)	37 (35, 43)
Letrozol	31 (30, 32) *●	66 (65, 68) *●

* P<0.05: vs. TA; ● P<0.05 vs. Vh (Prueba U de Mann-Whitney).

Patrón del ciclo estral

En la Figura 21, se muestra el patrón del ciclo estral de los dos periodos de toma de frotis vaginal. En las hembras intactas o inyectadas con el Vh se observaron todas las etapas del ciclo estral en patrones cíclicos. El porcentaje de tiempo que ambos grupos pasaron en la etapa del diestro (TA: 42% vs. Vh: 44.4 %), proestro (TA: 27% vs. Vh: 28.2%) y estro (TA: 31% vs. Vh: 27.4 %) fue similar (Figura 22).

Los animales inyectados con el Letrozol fueron acíclicos, sus frotis vaginales se caracterizaron por la presencia de leucocitos, tipo celular dominante de la etapa del diestro. Esta condición no se modificó aproximadamente cinco días después de que el fármaco se dejara de administrar (Figura 21). Cabe resaltar que estos animales permanecieron más del 90 % del tiempo en esta etapa (Figura 22).

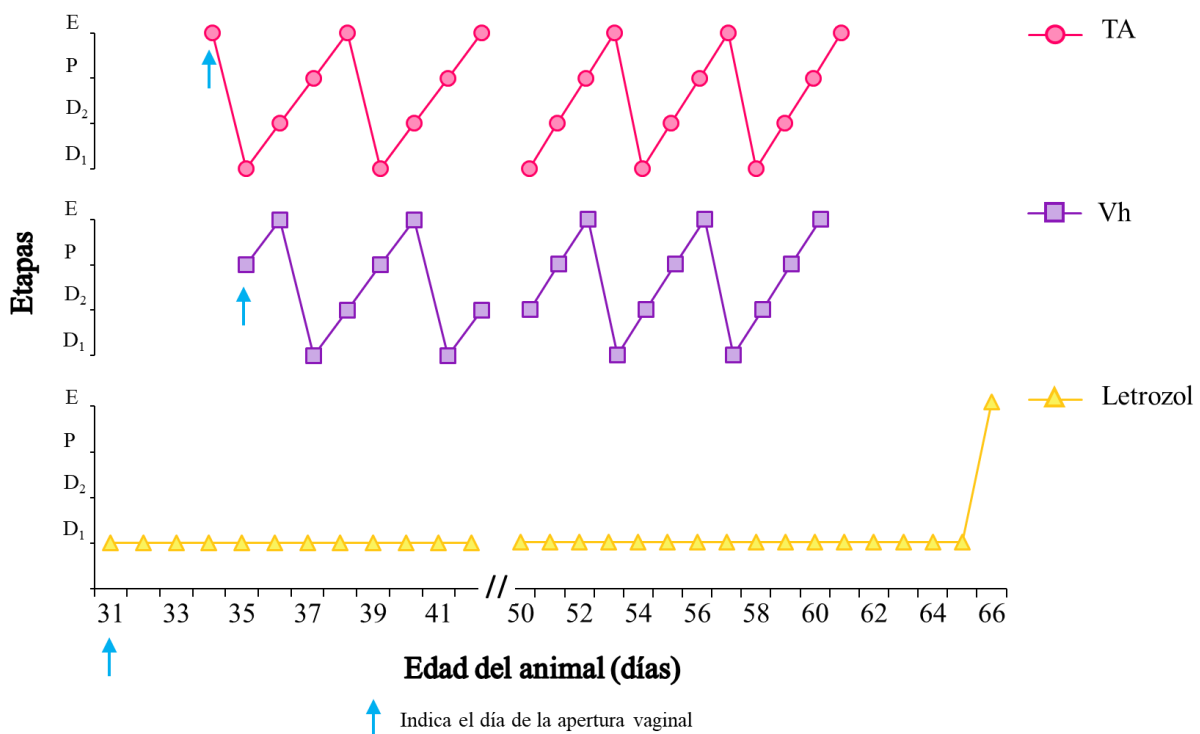


Figura 21. Patrón representativo del ciclo estral de animales testigo absoluto (TA) o inyectados cada 48 horas con el vehículo (Vh) o Letrozol desde los 10 días de vida hasta los 60 días de edad. La eutanasia de los animales se realizó en el estro vaginal inmediato al término del tratamiento. D₁: Diestro; D₂: Diestro 2; P: Proestro y E: Estro. La flecha en color azul significa el día de la apertura vaginal.

RESULTADOS

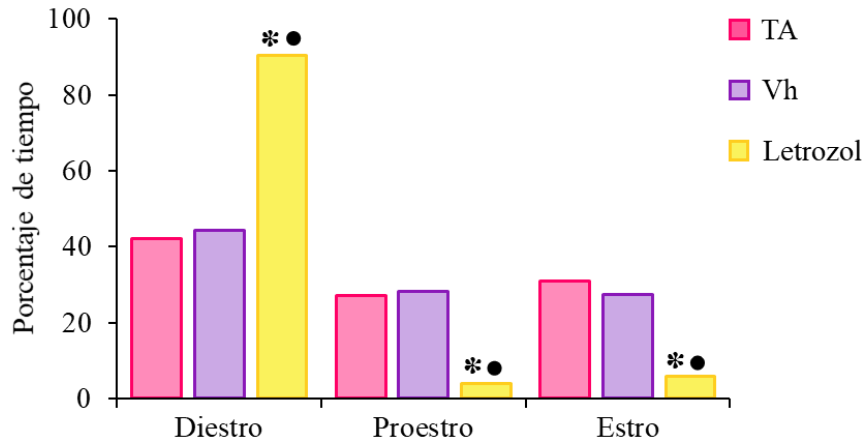


Figura 22. Porcentaje del tiempo en cada etapa del ciclo estral de animales testigo absoluto (TA) o inyectados cada 48 horas con el vehículo (Vh) o Letrozol desde los 10 días de vida hasta los 60 días de edad. La eutanasia de los animales se realizó en el estro vaginal inmediato al término del tratamiento. * $P < 0.05$ vs. TA; • $P < 0.05$ vs. Vh (Prueba X^2).

Masa corporal y masa relativa de la masa ovárica, masa adrenal y del útero

La inyección del Vh resultó en la disminución de la masa adrenal, respecto al grupo TA. En cambio, el tratamiento con el Letrozol provocó el aumento de la masa corporal y ovárica, además, disminuyó la masa adrenal y del útero, respecto a los animales TA o inyectados con el Vh (Cuadro 6).

Cuadro 6. Media \pm e.e.m de la masa corporal (g) y de la masa relativa (mg/100 g MC) de la masa adrenal, masa ovárica y del útero de animales testigo absoluto (TA) o inyectados cada 48 horas desde los 10 días de vida con vehículo (Vh) o Letrozol hasta los 60 días de edad. La eutanasia de los animales se realizó en el estro vaginal inmediato al término del tratamiento.

Grupo	n	Masa corporal	Masa ovárica	Masa adrenal	Útero
TA	10	185.0 \pm 4.6	28.5 \pm 1.1	27.5 \pm 0.8	146.6 \pm 6.2
Vh	11	195.2 \pm 4.3	24.3 \pm 1.0	22.3 \pm 1.3 *	144.6 \pm 10.0
Letrozol	15	218.3 \pm 4.0 *•	41.5 \pm 1.7 *•	20.6 \pm 0.9 *•	110.5 \pm 6.8 *•

* $P < 0.05$ vs. TA; • $P < 0.05$ vs. Vh (ANDEVA, seguida de la prueba de comparación múltiple Tukey-Kramer).

Respuesta ovulatoria

Las hembras tratadas con el Vh no presentaron modificaciones en el porcentaje de animales ovulantes ni en el número de ovocitos liberados, por el ovario izquierdo o derecho con respecto al grupo TA (Figura 23, A). Por otro lado, sólo dos de 15 animales inyectados con el Letrozol ovularon (Figura 23, B), con una cuota ovulatoria baja, de un ovocito por el ovario izquierdo y 2 y 3 por el derecho (Figura 23, B).

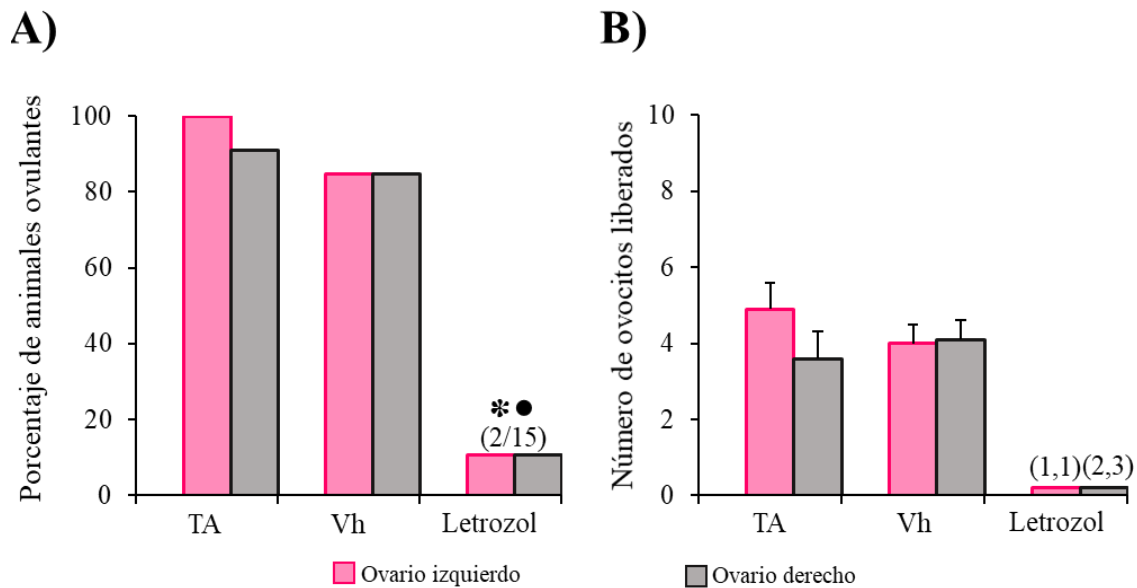


Figura 23. A) Porcentaje de animales ovulantes y B) media \pm e.e.m del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo y derecho de animales testigo absoluto (TA) o inyectados cada 48 horas desde los 10 días de vida con el vehículo (Vh) o Letrozol hasta los 60 días de edad. La eutanasia de los animales se realizó en el estro vaginal inmediato al termino del tratamiento. Entre paréntesis se muestra el número de animales que ovularon y el total de ovocitos liberados. * $P < 0.05$ vs. TA; ● $P < 0.05$ vs. Vh (su respectivo ovario; Prueba de X^2).

Concentración de las hormonas esteroideas

En las hembras inyectadas con el Vh la concentración de la progesterona no fue estadísticamente diferente respecto al grupo TA; sin embargo, disminuyó en las tratadas con el Letrozol (Figura 24, A). La concentración de la testosterona aumentó por la inyección de Letrozol (Figura 24, B), no obstante, la concentración del estradiol fue menor en las ratas inyectadas con el Vh o el Letrozol respecto al grupo intacto (Figura 24, C).

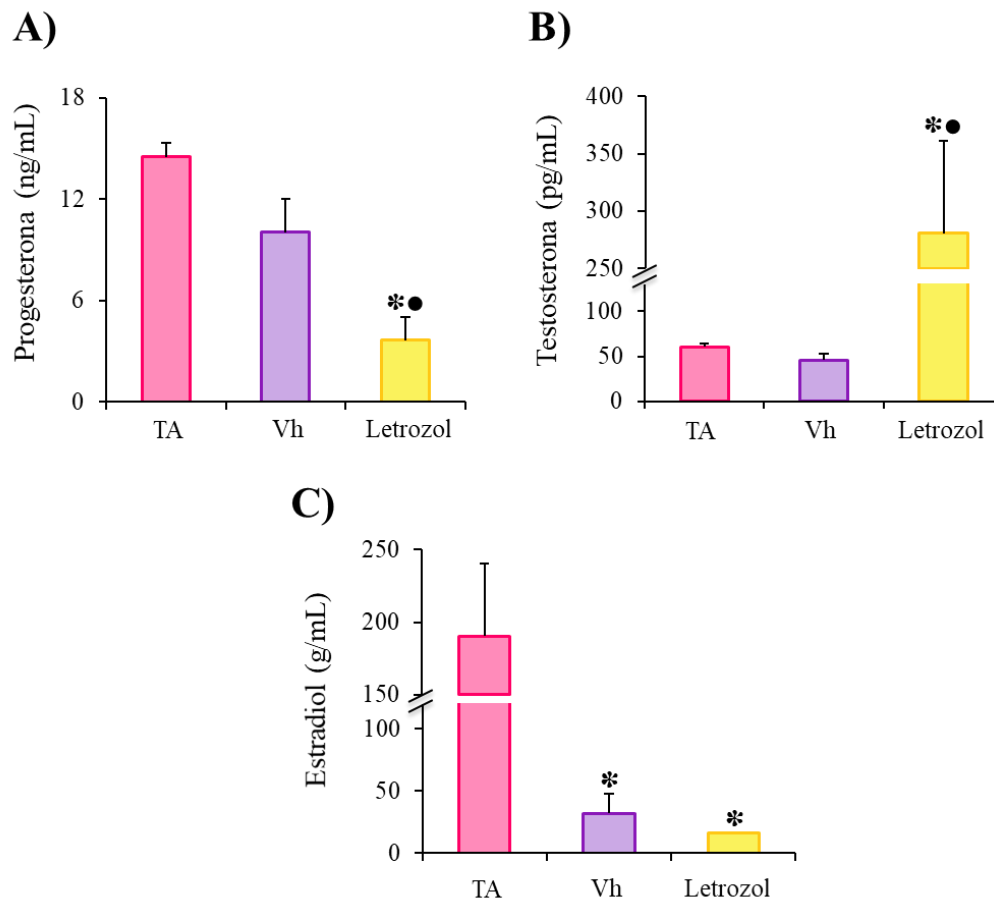


Figura 24. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de: A) progesterona, B) testosterona y C) estradiol, de animales testigo absoluto (TA) o inyectados cada 48 horas con el vehículo (Vh) o Letrozol desde los 10 días de vida hasta los 60 días de edad. La eutanasia de los animales se realizó en el estro vaginal inmediato al término del tratamiento. * $P < 0.05$ vs. TA; ● $P < 0.05$ vs. Vh (ANDEVA, seguida de la prueba de comparación múltiple Tukey-Kramer).

Histología ovárica y dinámica del crecimiento folicular

La histología ovárica de las hembras TA (Figura 25, A) exhibe numerosos folículos en desarrollo y presencia de cuerpos lúteos, indicativo de ovulación, un patrón semejante se observó en la morfología ovárica de hembras inyectadas con el Vh (Figura 25, B). Por otra parte, en el corte representativo de los animales inyectados con el Letrozol (Figura 25, C), se observa la ausencia de cuerpos lúteos y escaso desarrollo folicular. En estas hembras se observó la formación de prequistes, quistes foliculares y quistes hemorrágicos.

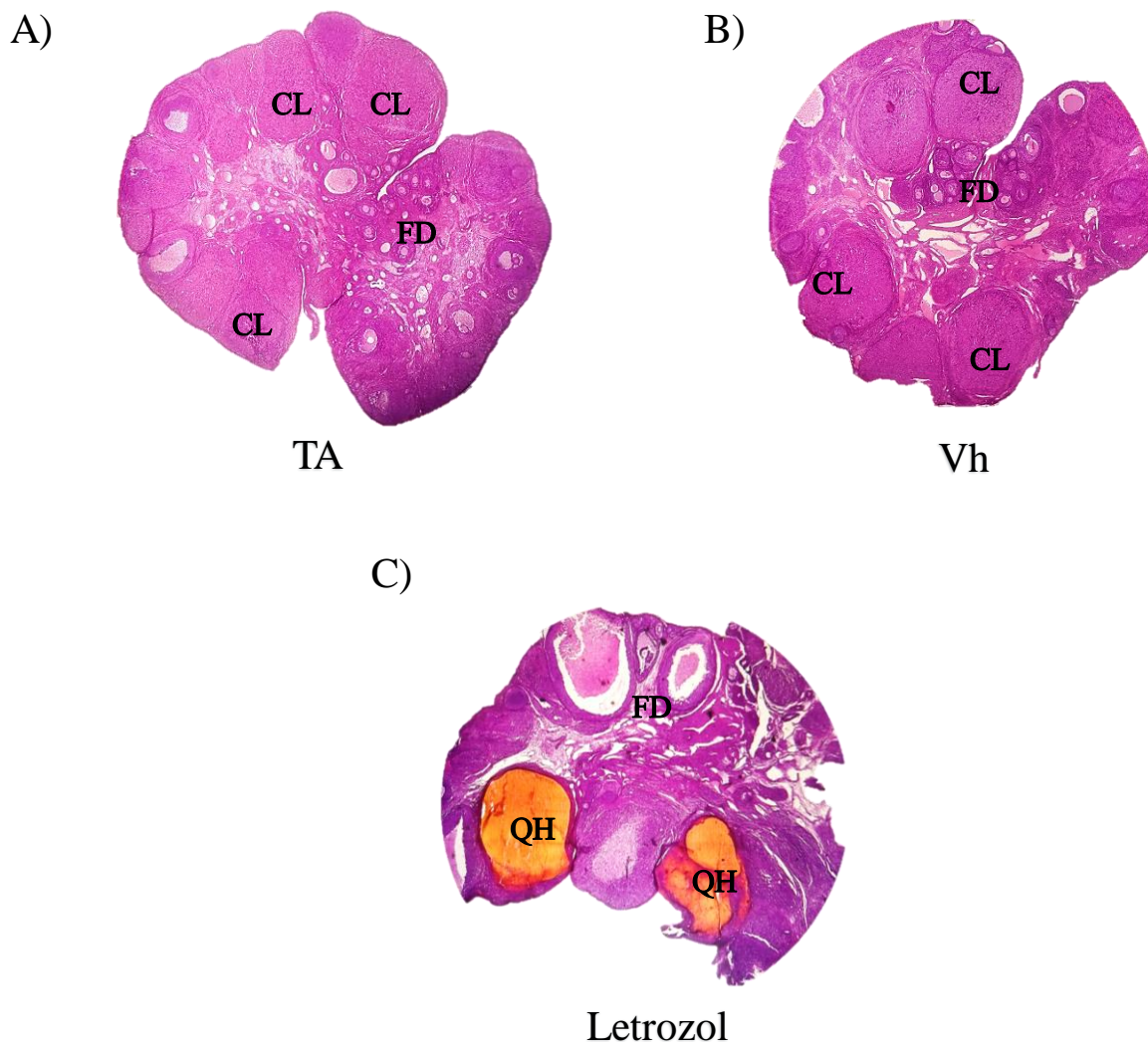


Figura 25. A) Micrografía a 4x de la histología ovárica de animales A) testigo absoluto (TA) o inyectados cada 48 horas con B) el vehículo (Vh) o C) Letrozol desde los 10 días de vida hasta los 60 días de edad. La eutanasia de los animales se realizó en el estro vaginal inmediato al término del tratamiento. FD: Folículos en desarrollo; CL: Cuerpo Lúteo y QH: Quiste hemorrágico. Tinción con la técnica de hematoxilina-eosina.

RESULTADOS

El estudio de la dinámica del crecimiento folicular mostro que, la inyección del Letrozol no modificó la mediana del número de los folículos totales, sanos y atrésicos respecto al grupo tratado con el Vh (Cuadro 7). Si bien no se modificó la población de los folículos, la inyección con Letrozol favoreció el desarrollo de estructuras prequísticas y quísticas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Mediana y el rango intercuartil (el cual se muestra entre paréntesis) del número de folículos totales, sanos, atrésicos, prequistes y quistes de animales inyectados cada 48 horas con el vehículo (Vh) o Letrozol desde los 10 días de edad hasta los 60 días de edad. La eutanasia de los animales se realizó en el estro vaginal inmediato al termino del tratamiento.

Grupo	Número de folículos					
	Totales	Sanos	Atrésicos	Prequistes	Quistes	Quistes hemorrágicos
Vh	175 (170, 222)	130 (121, 165)	49 (45, 57)	-	-	-
Letrozol	140 (123, 156)	81 (66, 95)	40 (39, 45)	12 (8,13)	8 (4, 8)	5 (3, 5)

En comparación con el grupo inyectado con el Vh, las hembras tratadas con Letrozol mostraron una disminución en el porcentaje de los folículos sanos con un diámetro promedio menor de 349 μm (Figura 26). No obstante, el porcentaje de los folículos sanos medianos o preovulatorios no se modificó entre ambos grupos (Figura 26).

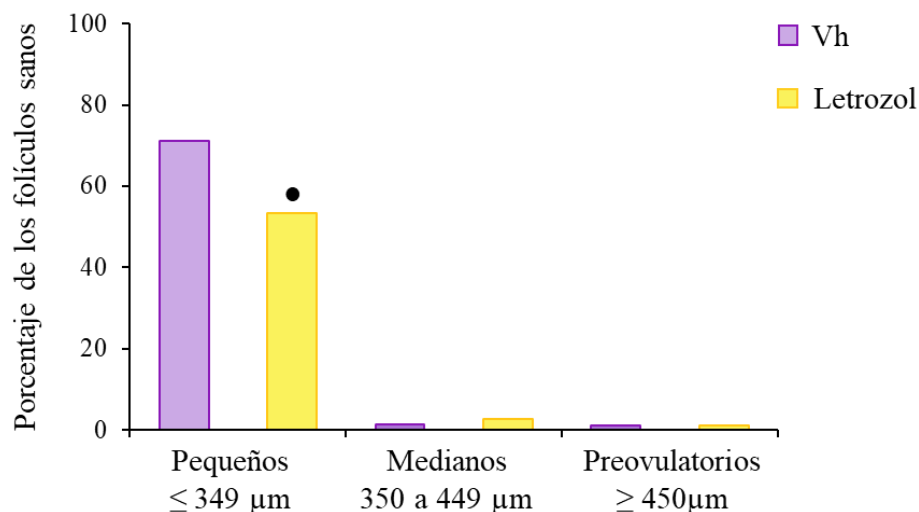


Figura 26. Porcentaje de los folículos sanos pequeños con un diámetro menor o igual a 349 μm , medianos con diámetro de 350 a 449 μm y preovulatorios con diámetro mayor a 450 μm , de animales inyectados cada 48 h con el vehículo (Vh) o Letrozol desde los 10 días de edad hasta los 60 días de edad. La eutanasia de los animales fue en el estro vaginal inmediato al termino del tratamiento. El 100 % correspondió al total de los folículos considerados en cada tratamiento. ● $P < 0.05$ vs. Vh (Prueba X^2).

Modelo III. Efecto de la SBNO a los 50 días de edad en ratas inyectadas con Letrozol desde el día 10 de vida hasta los 60 días de edad.

Masa corporal y masa relativa de los ovarios, las adrenales y el útero

La operación simulada realizada en los animales inyectados con el Vh no modificó la masa corporal, la adrenal, la ovárica o la del útero. Sin embargo, en las hembras inyectadas con el Letrozol, la OS resultó en el aumento de la masa corporal y ovárica; efecto contrario se observó en la masa adrenal y del útero respecto al grupo Vh sometido a la misma cirugía (Cuadro 8).

En las hembras inyectadas con el Vh, la SBNO resultó en el aumento de la masa adrenal, en cambio, la masa corporal, la ovárica o la del útero no se modificó. En contraste, en las hembras inyectadas con el Letrozol, la denervación bilateral resultó en el aumento de la masa corporal y la ovárica, además, en estas se observó la disminución de la masa adrenal y del útero respecto al grupo Vh sometido a la SBNO (Cuadro 8).

Cuadro 8. Media \pm e.e.m de la masa corporal (g) y de la masa relativa (mg/100 g masa corporal) de la masa ovárica, adrenal y la del útero de animales testigo absoluto (TA) o inyectados cada 48 h con el vehículo (Vh) o Letrozol desde los 10 días de vida hasta los 60 días de edad. Los animales fueron sometidos a la operación simulada (OS) o a la sección bilateral del nervio ovárico superior (SBNO) a los 50 días de edad. La eutanasia de los animales se realizó en el estro inmediato al término del tratamiento.

Grupo	Masa corporal	Masa ovárica	Masa adrenal	Útero
TA OS	195.0 \pm 12.3	25.3 \pm 2.0	26.7 \pm 1.8	148.1 \pm 9.7
Vh OS	198.6 \pm 3.8	29.50 \pm 1.4	29.2 \pm 1.7	150.75 \pm 9.2
Letrozol OS	237.1 \pm 4.3 ★	39.2 \pm 3.4 ★	21.5 \pm 1.2 ★	101.7 \pm 8.7 ★
TA SBNO	198.3 \pm 2.7	31.7 \pm 1.2	24.4 \pm 0.8	141.0 \pm 8.6
Vh SBNO	198.7 \pm 2.9	30.5 \pm 2.3	30.0 \pm 1.4 ◆	141.0 \pm 8.6
Letrozol SBNO	248.5 \pm 5.1 ●	50.5 \pm 4.2 ●▲	21.8 \pm 1.2 ●	100.0 \pm 2.6 ●

◆ P<0.05 vs. TA SBNO; ★ P<0.05 vs. Vh OS; ● P<0.05 vs. Vh SBNO; ▲ P<0.05 vs. Letrozol OS (ANDEVA de dos factores, seguida por la prueba de comparación múltiple Tukey-Kramer).

Respuesta ovulatoria

En los animales TA o inyectados con el Vh, la OS o la sección bilateral del NOS no modificó el porcentaje de animales ovulantes, ni el número de ovocitos liberados. Por otro lado, se observó que aproximadamente el 85% de las hembras inyectadas con el Letrozol y sometidas a la OS ovularon. El 50% de las hembras inyectadas con el Letrozol respondieron a la denervación bilateral, con una cuota ovulatoria baja respecto al grupo inyectado con el Vh y sometido a la SBNO (Figura 27).

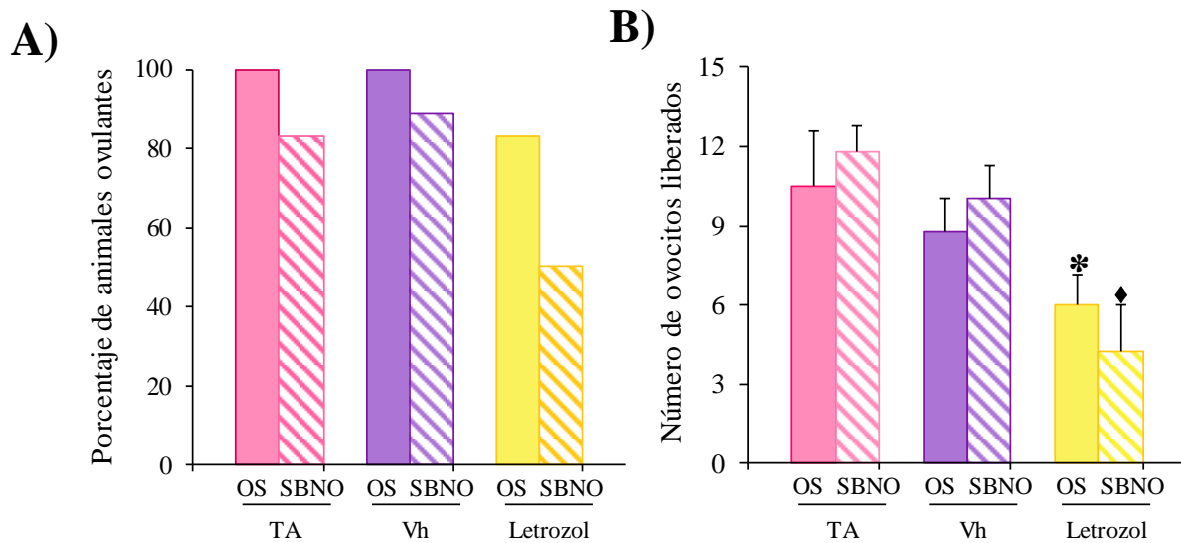


Figura 27. A) Porcentaje de animales ovulantes y B) la media \pm e.e.m del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo y ovario derecho de animales testigo absoluto (TA) o inyectados cada 48 h con el vehículo (Vh) o Letrozol desde los 10 días de vida hasta los 60 días de edad. Los animales fueron sometidos a la operación simulada (OS) o a la sección bilateral del nervio ovárico superior (SBNO) a los 50 días de edad. La eutanasia de los animales se realizó en el estro inmediato al término del tratamiento. * $P < 0.05$ vs. TA OS; ♦ $P < 0.05$ vs. TA SBNO (ANDEVA de dos vías, seguida de la prueba Tukey-Kramer).

Concentración de hormonas esteroides

En las hembras inyectadas con el Letrozol se observó que la SBNO aumentó la concentración de la progesterona, disminuyó la concentración de la testosterona y no modificó la concentración del estradiol, respecto al grupo inyectado con el Vh y sometido a la misma cirugía (Figura 28). En las hembras inyectadas con el Letrozol, la OS no modificó la concentración de la progesterona y la testosterona, sin embargo, disminuyó la del estradiol (Figura 28).

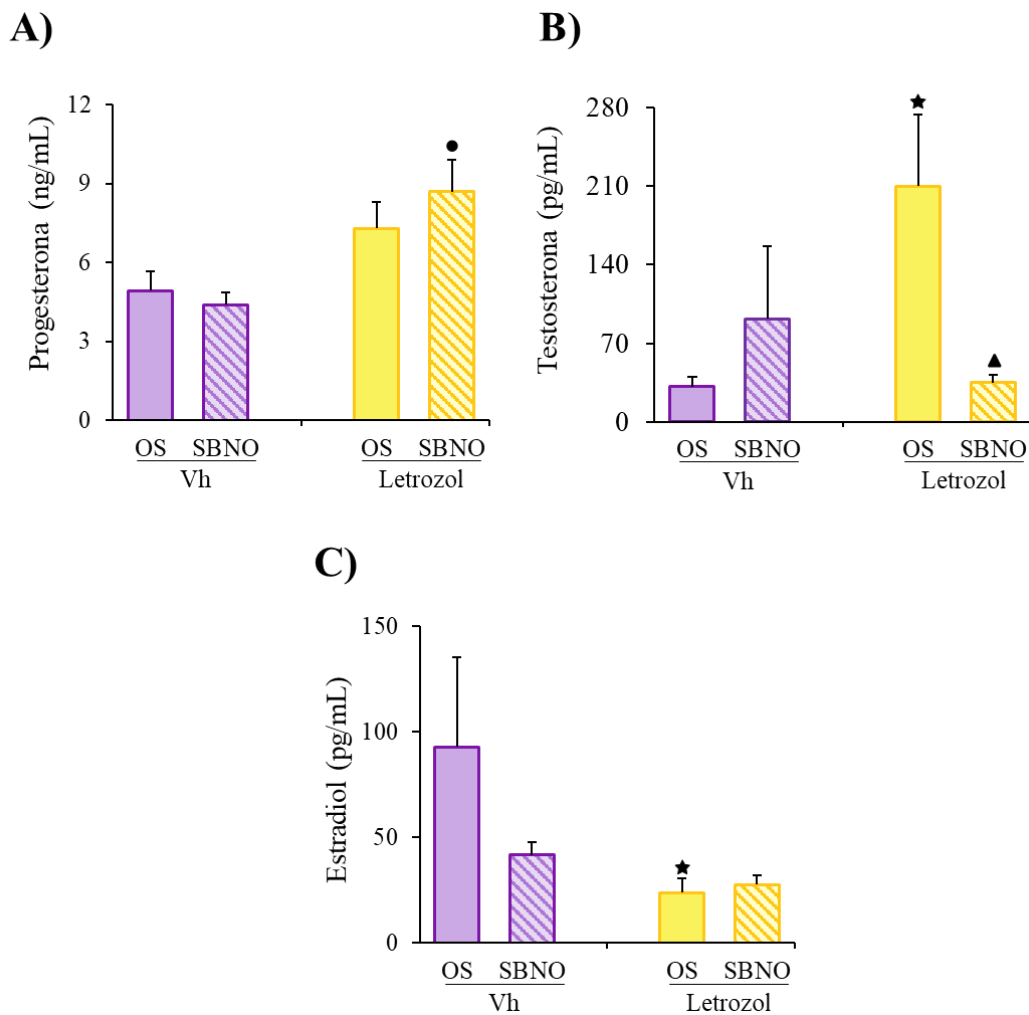


Figura 28. Media \pm e.e.m de la concentración sérica de: A) progesterona, B) testosterona y C) estradiol de animales inyectados cada 48 h con el vehículo (Vh) o Letrozol desde los 10 días de vida hasta los 60 días de edad. Los animales fueron sometidos a la operación simulada (OS) o a la sección bilateral del nervio ovárico superior (SBNO) a los 50 días de edad. La eutanasia de los animales se realizó en el estro inmediato al término del tratamiento. ★ $P < 0.05$ vs. Vh OS, ● $P < 0.05$ vs. Vh SBNO, ▲ $P < 0.05$ vs. Letrozol OS (ANDEVA de dos factores, seguida por la prueba de comparación múltiple Tukey-Kramer).

Morfología ovárica

En las hembras TA o inyectadas con el Vh, la OS o la sección bilateral del NOS no modificó la morfología ovárica, en estos animales se observan folículos en varias etapas de desarrollo y cuerpos lúteos (Figura 29, A). La histología ovárica de las hembras inyectadas con el Letrozol y sometidas a la OS también mostraron folículos en desarrollo y cuerpos lúteos, así como múltiples prequistes foliculares y quistes hemorrágicos (Figura 29, A). Si bien en el grupo inyectado con Letrozol y sometido a la denervación bilateral del NOS, la morfología ovárica no difirió en cuanto a la presencia de estructuras quísticas, cuerpos lúteos y folículos en desarrollo (Figura 29, A) es conveniente remarcar, que se observó la presencia de folículos preovulatorios luteinizados con ovocito atrapado (Figura 29, B).

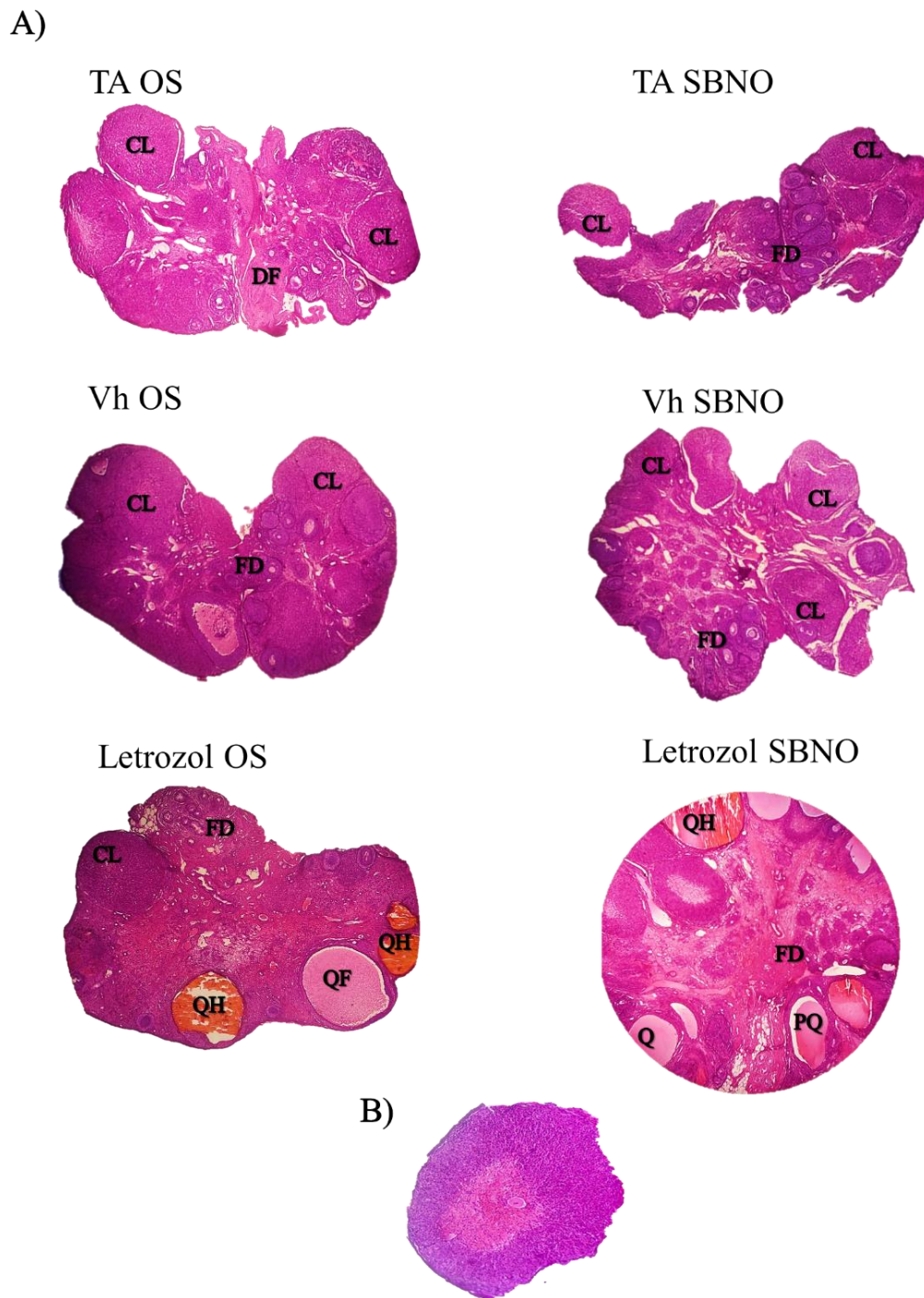


Figura 29. Micrografía a 4x que muestra de manera representativa la histología ovárica de animales testigo absoluto (TA) o inyectados cada 48 h con el vehículo (Vh) o Letrozol desde los 10 días de vida hasta los 60 días de edad. Los animales fueron sometidos a la operación simulada (OS) o a la sección bilateral del nervio ovárico superior (SBNO) a los 50 días de edad. La eutanasia de los animales se realizó en el estro inmediato al término del tratamiento; B) Micrografía a 10x que muestra un folículo preovulatorio luteinizado con ovocito atrapado. FD: Folículos en Desarrollo; CL: Cuerpo Lúteo; PQ: Prequiste; Q: Quiste Folicular y QH: Quiste Hemorrágico. Tinción con la técnica de hematoxilina-eosina.

RESULTADOS

El estudio de la dinámica del crecimiento folicular reveló que la SBNOS en las hembras inyectadas con Letrozol no modificó la mediana del número de los folículos totales, sanos y atrésicos respecto al grupo inyectado con Letrozol y con la OS. De igual manera, se observó que la mediana del número de los prequistes, quistes foliculares y quistes hemorrágicos de los grupos inyectados con Letrozol y sometidos a la OS o a la SBNO no difirió entre ambos grupos (Cuadro 9).

Cuadro 9. Mediana y el rango intercuartil (el cual se muestra entre paréntesis) del número de los folículos totales, sanos, atrésicos, prequistes, quistes foliculares y quistes hemorrágicos de animales inyectados cada 48 h con Letrozol desde los 10 días de vida hasta los 60 días de edad. Los animales fueron sometidos a la operación simulada (OS) o a la sección bilateral del nervio ovárico superior (SBNO) a los 50 días de edad. La eutanasia de los animales se realizó en el estro inmediato al término del tratamiento.

Grupo	Número de folículos					
	Totales	Sanos	Atrésicos	Prequistes	Quistes	Quistes hemorrágicos
Letrozol OS	138 (131, 148)	89 (87, 108)	28 (25, 29)	10 (7, 14)	4 (3, 6)	2 (2, 3)
Letrozol SBNO	151 (129, 171)	94 (72, 100)	41 (35, 59)	8 (7,13)	4 (2, 5)	4 (3, 4)

En lo que respecta al porcentaje de los folículos sanos pequeños, medianos o preovulatorios de los animales inyectados con Letrozol y sometidos a la SBNO no fue diferente respecto al grupo inyectado con el fármaco y sometido a la OS (Figura 30).

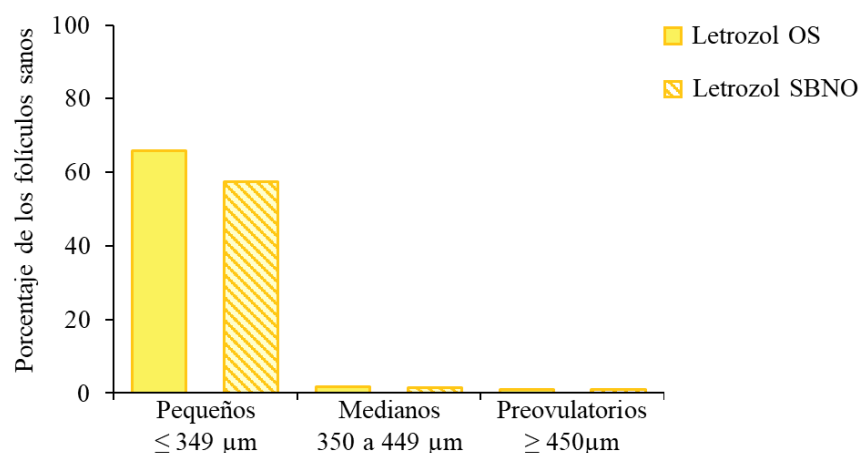


Figura 30. Porcentaje de los folículos sanos pequeños con un diámetro menor o igual a 349 μm, medianos con diámetro de 350 a 449 μm y preovulatorios con diámetro mayor a 450 μm, de animales inyectados cada 48 h con Letrozol desde los 10 días de vida hasta los 60 días de edad. Los animales fueron sometidos a la operación simulada (OS) o a la sección bilateral del nervio ovárico superior (SBNO) a los 50 días de edad. La eutanasia de los animales se realizó en el estro inmediato al término del tratamiento.

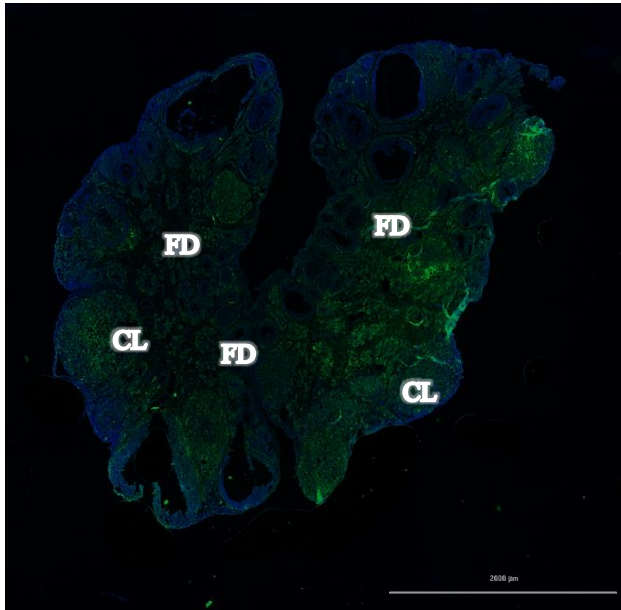
Expresión de la enzima TH en el ovario

En la figura 31, se observa el barrido panorámico (4x) de la inmunofluorescencia de los grupos inyectados con el Vh o Letrozol (Figura 31, A y B), así como sus respectivos acercamientos a 10 x (Figura 31, a y b).

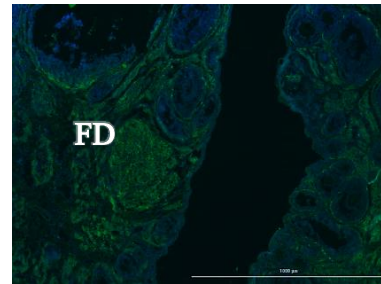
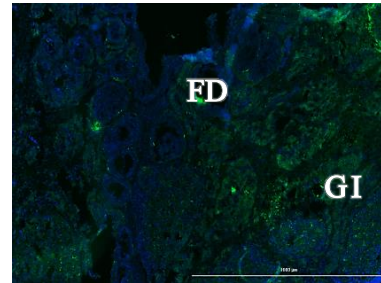
La inmunofluorescencia de los ovarios de los animales inyectados con el Vh mostró la expresión de la TH en las células de la teca de los folículos en desarrollo, en los cuerpos lúteos, en la glándula intersticial y escasamente en las células de la granulosa (Figura 31, a). Del mismo modo, en los ovarios de los animales inyectados con el Letrozol además de la expresión de la enzima TH en las estructuras ya mencionadas, la TH también se observó la capa de las células de la teca de los prequistes, quistes foliculares y quistes hemorrágicos (Figura 31, B). El análisis de la expresión de la TH no mostró diferencias estadísticas entre los animales inyectados con Vh o Let (Figura 33).

En cuanto a las secciones de los ovarios de animales inyectados con el Vh o Letrozol y sometidos a la sección bilateral del NOS (Figura 32, A y B) se observó una menor expresión de la TH; sin embargo, la marca aún fue perceptible en la capa de las células de la teca de los folículos en desarrollo, en los cuerpos lúteos y en la glándula intersticial (Figura 32, a). Adicionalmente, en los animales inyectados con el Letrozol la inmunoreactividad a la TH también fue visible en las estructuras prequisticas y quísticas (Figura 32, B). La disminución de la expresión de esta enzima se confirmó mediante en el análisis de la marca dado por el porcentaje de pixeles. Las diferencias significativas se encontraron entre los grupos con el mismo tratamiento (Vh o Letrozol) pero sometidos a la SBNO (Figura 33).

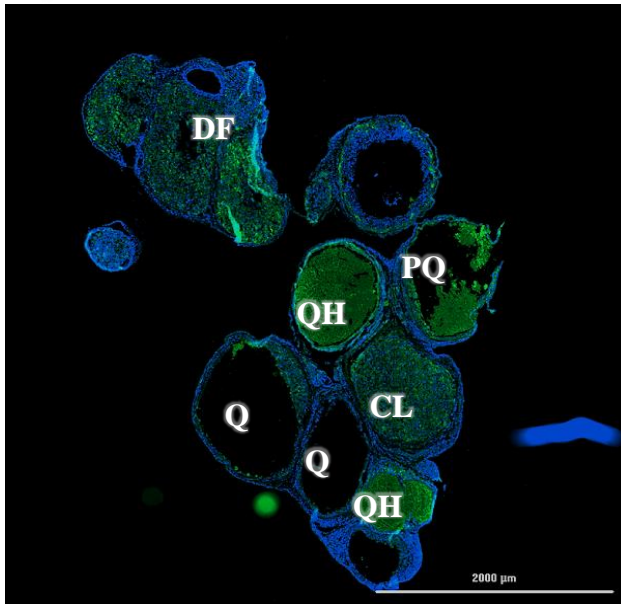
A) Vh



a)



B) Letrozol



b)

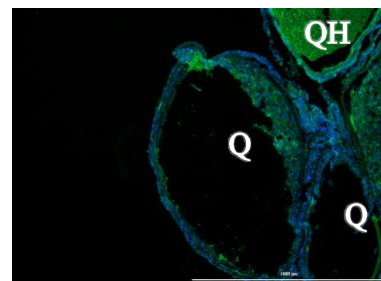
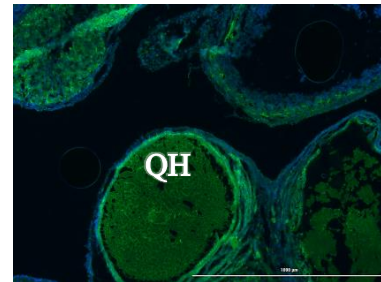
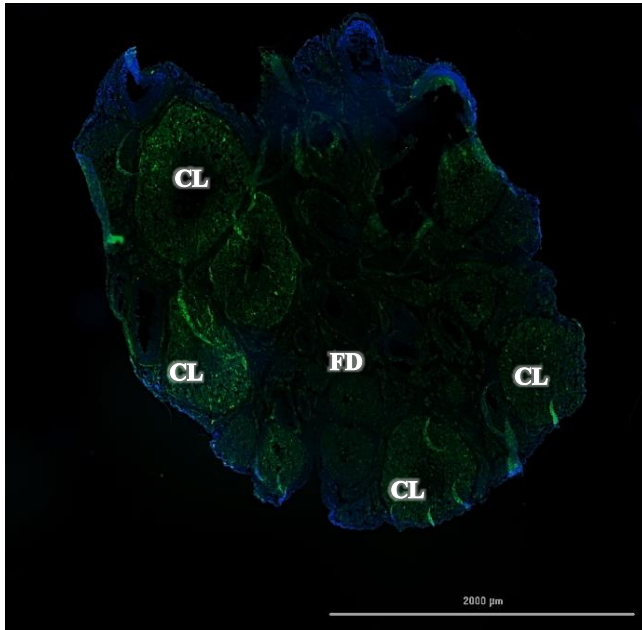
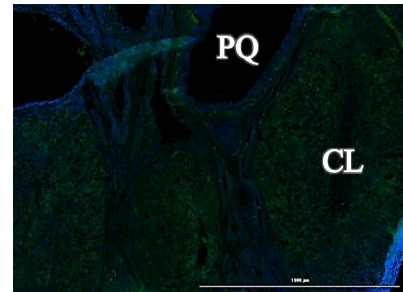
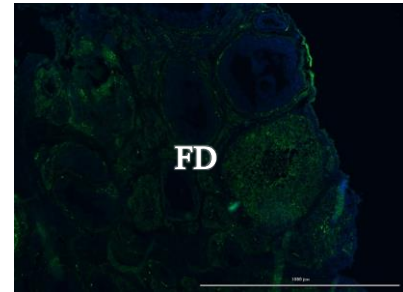


Figura 31. Distribución de la expresión de la tirosina hidroxilasa (TH) en secciones de ovario de animales inyectados cada 48 horas con el vehículo (Vh) (A, a) o Letrozol (B, b) desde los 10 días de vida hasta los 60 días de edad. Los animales fueron sacrificados al estro vaginal inmediato al término del tratamiento. Las secciones de los ovarios fueron teñidas con anticuerpo anti-TH (color verde) y los núcleos teñidos con DAPI (color azul). CL: Cuerpo lúteo, FD: Folículos en desarrollo, PQ: Prequiste, Q: Quiste y QH: Quiste hemorrágico.

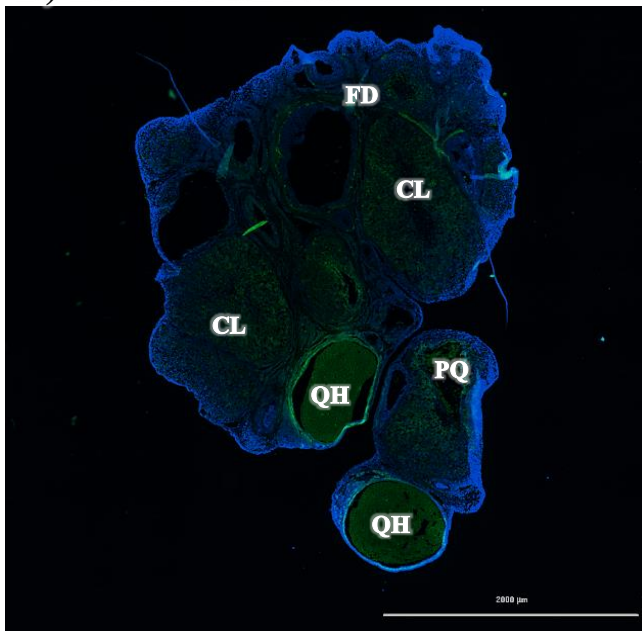
A) Vh SBNO



a)



B) Letrozol SBNO



b)

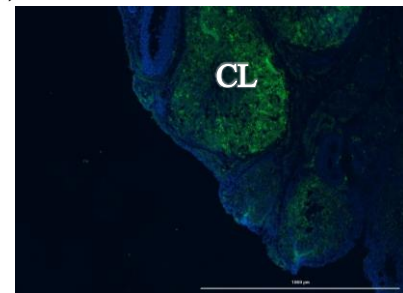


Figura 32. Distribución de la expresión de la tirosina hidroxilasa (TH) en secciones de ovario de animales inyectados cada 48 horas desde los 10 días de vida con el vehículo (Vh) (A, a) o Letrozol (B, b) hasta los 60 días de edad. Los animales fueron sometidos a la sección bilateral del nervio ovárico superior (SBNO) a los 50 días de edad. La eutanasia de los animales se realizó en el estro vaginal inmediato al término del tratamiento. Las secciones de los ovarios fueron teñidas con anticuerpo anti-TH (color verde) y los núcleos teñidos con DAPI (color azul). CL: Cuerpo lúteo, FD: Folículos en desarrollo, PQ: Prequiste, Q: Quiste y QH: Quiste hemorrágico.

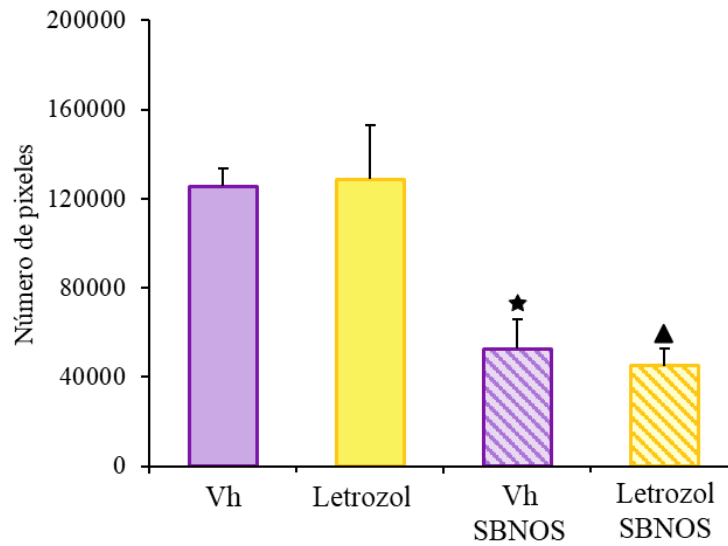


Figura 33. Media \pm e.e.m del número de pixeles de la reactividad de la tiroxina hidroxilasa (TH) de ovarios de ratas inyectadas cada 48 horas desde los 10 días de vida con vehículo (Vh) o Letrozol hasta los 60 días de edad. Adicionalmente se usaron animales con el mismo patrón de administración los cuales se sometieron a la sección bilateral del nervio ovárico superior (SBNO) a los 50 días de edad. La eutanasia de los animales se realizó en el estro vaginal inmediato al término del tratamiento. El análisis de imágenes se realizó en el sistema Nis-Elements BR 3.0. ★ $P < 0.05$ vs. Vh; ▲ $P < 0.05$ vs. Letrozol (Prueba “t” de Student).

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que el Letrozol bloquea la ovulación cuando se mantiene el fármaco en circulación durante su vida media, efecto que es revertido cuando se elimina la información simpática que llega al ovario a través del NOS.

El inicio de la pubertad en roedores es regulado por múltiples procesos, entre los cuales destaca la maduración anatómica y fisiológica del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Ojeda y Urbanski, 1994; Foster y Ebling, 1999). Algunas evidencias indican que el inicio de la pubertad, evaluado por la canalización vaginal, depende de los estrógenos (Ojeda y Urbanski, 1994) mientras que, otras indican que depende de los andrógenos (Ramírez y Sawyer, 1965; Zarrow y col., 1969). En el presente estudio, utilizamos dos modelos de administración de Letrozol. En el primero, el fármaco se administró cinco días por semana lo que resultó en el retraso del inicio de la pubertad y cuando fue inyectado cada 48 h hubo un adelanto. La discrepancia entre los dos modelos puede indicar que, si bien hay inhibición de las aromatasas, en aquellos animales donde se permite que transcurra la vida media del fármaco, 48 h parte de los andrógenos podrían ser aromatizados a estrógenos, antes de que se dé la siguiente administración, por lo que los pocos estrógenos circulantes permitieron el adelanto de la apertura vaginal (Morán y col., 2000; Morán y col., 2003). Dado que al momento no contamos con evidencias sobre los efectos del Letrozol en el proceso de la canalización vaginal, requerimos de más estudios que permitan dilucidar si este proceso depende sólo de las concentraciones de los estrógenos o los andrógenos.

Los dos modelos de administración con Letrozol resultaron en la alteración del patrón de ciclo estral, lo que refleja modificaciones en la secreción de las hormonas esteroides y proteicas (Sun y col., 2013; Rajan y col., 2017). La citología vaginal en ambos modelos exhibió diestros persistentes y el estro se observó alrededor de seis días después de haber finalizado el tratamiento. Adicionalmente, se observó que estas hembras no presentaron proestros, similar a lo reportado anteriormente en este modelo (Caldwell y col., 2014). Es posible que las bajas concentraciones del estradiol sean las responsables de la presencia de los diestros vaginales constantes. Patel y Shah (2018) muestran que el tratamiento con 1

mg/Kg/día de Letrozol por más de diez días, resulta en la presencia de diestros persistentes, condición que no se modifica mientras se mantiene la exposición al fármaco.

En el presente estudio se observó que el tratamiento con Letrozol resultó en la disminución de la concentración de los estrógenos en los modelos donde el fármaco se administró cada 48 h hasta los 60 días de edad, lo cual puede ser atribuido al efecto inhibitorio sobre la aromatización de los andrógenos (Lee y Ledger, 2011). En las hembras tratadas con Letrozol y sometidas a la OS, la disminución en la concentración del estradiol pueda deberse a la activación de vías neurales, sin embargo, requerimos de más estudios para dilucidar este evento.

Ortega y colaboradores (2013) mencionan que la administración de Letrozol puede ejercer un efecto dual sobre el peso de los órganos, donde aumenta en aquellos sensibles a los andrógenos y disminuye en los sensibles a los estrógenos. Este último evento ocurrió en la masa del útero, donde se observó que independientemente del modelo empleado en el presente estudio, la inyección de Letrozol resultó en la disminución de la masa uterina, similar a lo mostrado previamente por Jadhav y colaboradores (2013). Esta respuesta puede ser el resultado de la disminución en la concentración del estradiol, aunque no se descarta que también ocurra una disminución en el número de los receptores α a estrógenos, asociados con la proliferación celular, el engrosamiento endometrial (Winuthayanon y col., 2010) y el mantenimiento de la contracción del miometrio (Toda y col., 2001).

Fisher y colaboradores (1998) mostraron que, en el ratón knockout para aromatasa (ArKO), disminuye la concentración de estradiol y aumenta la de andrógenos, lo que se acompaña de úteros de menor tamaño y de menor proliferación uterina. Esta respuesta también se observa cuando se elimina los estrógenos mediante la ovariectomía y se restablece el peso del útero cuando se realiza el remplazo hormonal con estrógenos (Oestergaard y col., 2006).

Actualmente el SOPQ representa entre el 70 y el 80% de los casos de infertilidad anovulatoria (Melo y col., 2015). El mecanismo de anovulación se desconoce, sin embargo, existe evidencia de que el desarrollo folicular se detiene en la etapa de folículos antrales, lo cual se ha asociado con una secreción hormonal irregular (Willis y col., 1998; Franks y col., 2000). Adicionalmente, se ha planteado que los folículos adquieren la capacidad de responder

a la LH aun cuando no han alcanzado el tamaño de un folículo dominante (Willis y col., 1998; Gorry y col., 2006). Esta respuesta estimula una mayor secreción de los andrógenos responsables de inducir la atresia folicular (Billig y col., 1993). Esta última, se ha considerado como el origen de los quistes ováricos y se sugiere que su formación ocurre a partir de los folículos antrales que experimentan atresia (Ben-Ze'ev y Amsterdam, 1987; Anderson y Lee, 1997).

El hecho de que los animales del modelo I hayan sido capaces de ovular, lo atribuimos a que el estro vaginal se presentó aproximadamente seis días después de la última inyección del fármaco. Es posible que la aromatización de los andrógenos se restableciera, lo que pudo permitir que algunos de los folículos preovulatorios atrésicos fueran rescatados y ovularan. No descartamos que, durante la administración del fármaco, la baja concentración de los estrógenos pudiera estimular en la hipófisis el aumento de la secreción de la FSH (Figura 34), tal y como ha sido mostrado en estudios previos (Baravalle y col., 2006; Zurvarra y col., 2009). Este aumento de la FSH pudo haber rescatado a los folículos preovulatorios atrésicos.

En contraste, en el modelo II observamos que sólo dos de 15 animales ovularon con una cuota ovulatoria baja. Resultados similares fueron reportados por los grupos de Ullah (2017) y Patel y Shah (2018), quienes muestran que el tratamiento con Letrozol durante 21 días disminuye la formación de cuerpos lúteos. Por otra parte, estudios previos han mostrado que la administración de Letrozol resulta en el aumento de la concentración de la FSH y modificaciones en la histología ovárica (Baravalle y col., 2006; Zurvarra y col., 2009). Estos resultados nos permiten sugerir que la administración de Letrozol pudo haber modificado la afinidad o cantidad de receptores a FSH (Figura 35).

Considerando que las funciones reproductivas son reguladas por vías neurales y endocrinas, se ha planteado que las alteraciones presentes en el SOPQ pueden ser el resultado de modificaciones en la actividad simpática que llega al ovario (Barria y col., 1993; Morales-Ledesma y col., 2010; Linares y col., 2017). En los ovarios de mujeres con el síndrome, se han observado variaciones en la inervación simpática. Semenova (1969) describió un aumento de las fibras catecolaminérgicas en los ovarios de pacientes con esta patología. A través de procedimientos quirúrgicos como la punción selectiva de los ovarios por electrocoagulación o por estimulación con láser, vía laparoscópica, entre el 40% y 60% de

las pacientes respectivamente restablecen las funciones ováricas (Abad y col., 2001; Silva, 2010).

El modelo del animal con el SOPQ, inducido por la inyección del VE, muestra un bloqueo de la ovulación, respuesta que ha sido atribuida a una mayor actividad del sistema simpático proveniente del NOS (Lara y col., 1993). De manera que la eliminación de este aporte simpático por la sección bilateral del NOS resulta en el restablecimiento de la ovulación (Barria y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003). En el presente estudio, en animales tratados con Letrozol hasta los 60 días de edad y sometidos a la sección bilateral del NOS, diez días antes de terminar el tratamiento, se observó que el 50% de los animales logran ovular similar a lo reportado en el modelo de inducción del síndrome con VE y sometido al mismo tipo de denervación (Morales-Ledesma y col., 2010), sin embargo, en el presente estudio se observó una cuota ovulatoria baja (Figura 35). Resultados que permiten señalar que, si bien el VE y el Letrozol son inductores del SOPQ, la participación del NOS en la respuesta ovulatoria depende del origen del síndrome.

El hecho de que las hembras inyectadas con Letrozol y sometidas a la operación simulada fueran capaces de ovular plantea la idea de un mecanismo diferente que permite la liberación de ovocitos en este modelo, lo cual probablemente se deba a la activación de vías neurales resultado de la perforación del peritoneo (Flores y col., 2006) las cuales llegan al ovario a través del NOS. Se requieren de más estudios para dilucidar que vía neural desencadena la ovulación espontánea en estos animales.

En el animal inyectado con el VE, el NOS es una de las vías neurales que participa en el desarrollo del síndrome, donde la hiperactividad simpática se relaciona con un aumento de la síntesis de NGF y de su receptor de baja afinidad, p-75 (Dissen y col., 2000; Stener-Victorin y col., 2003). Dissen y colaboradores (2000) mencionan que el aumento en la producción de NGF ovárico es suficiente para iniciar alteraciones estructurales y funcionales asociadas con el desarrollo de quistes foliculares y la anovulación. Hasta el momento no contamos con literatura que muestre que el Letrozol es capaz de aumentar la hiperactividad del sistema simpático que llega al ovario, ni se conoce el mecanismo que conlleva a la formación de los quistes foliculares. El hecho de que no observáramos el aumento de la expresión de la TH ovárica podría deberse a que evaluamos la expresión de esta enzima

cuando el fármaco ya había sido metabolizado. No descartamos que durante la administración de Letrozol aumente la expresión de la TH ovárica. Por lo que una de nuestras perspectivas para estudios posteriores será evaluar esta enzima cuando el fármaco siga en circulación.

En los cortes de tejido ovárico de ratas inyectadas con Letrozol la expresión de la TH ovárica se observó en su mayoría en la capa de células de la teca de los folículos en desarrollo, en la glándula intersticial y en estructuras prequísticas y quísticas, similar a lo observado en el modelo del animal inyectado con VE (Manni y col., 2005; Venegas y col., 2019). Por otra parte, expresión de la TH también se observó en los cuerpos lúteos lo cual no había sido reportado anteriormente. Evidencia previa muestra que hay crecimiento progresivo de los nervios adrenérgicos durante la fase lútea, lo cual probablemente esté asociado con la formación de vasos sanguíneos en los cuerpos lúteos en desarrollo (Bahr y col., 1974; Burden, 1978). Además, se ha observado que existe una correlación entre las concentraciones de la NA y de su precursor, la DA, en el cuerpo lúteo en formación. Battista y colaboradores (1989) mostraron que la cantidad de DA en el cuerpo lúteo es hasta 4 veces mayor que la de la NA, esto sugiere que hay *síntesis de novo* de la NA en el tejido ovárico (Kotwica y col., 1996).

En la clínica se ha observado que aproximadamente el 60 % de las pacientes con el SOPQ presentan un volumen y masa ovárica mayor (Hague y col., 1990), además de alteraciones en la dinámica del crecimiento folicular (Willis y col., 1998; Franks y col., 2000). En el modelo II de nuestro estudio observamos que los animales mostraron un aumento de la masa ovárica, estos resultados son similares a los reportados anteriormente por los grupos de Mannerås y colaboradores (2007), Jahan y colaboradores (2016) y Saiyed y colaboradores (2016). Ellos muestran que ante el tratamiento con Letrozol aumenta el tamaño del ovario, lo cual está dado por la hiperplasia de las células tecales e intersticiales y la presencia de quistes ováricos. De igual manera, en aquellos animales donde se eliminó el aporte simpático se exacerbó el aumento de la masa ovárica. Esto puede ser el resultado de un proceso de crecimiento compensatorio. Ortega y colaboradores (2013) atribuyen el aumento de la masa ovárica a un posible efecto mitogénico del Letrozol sobre las células teco-intersticiales. Adicionalmente, se ha observado que el tratamiento con este aumenta la concentración del IGF-1 (Cigler y col., 2010). Esto ha llevado a especular que el efecto proliferativo puede estar mediado por la regulación positiva de los factores de crecimiento pertenecientes a la

familia de IGF las cuales actuarían sobre el compartimento teco intersticial. Al parecer el efecto mitogénico del Letrozol depende de la edad en la que se inicie la administración, ya que cuando se hace en ratas prepúberes este efecto no se observa y no aumenta la masa ovárica (Kafali y col., 2004; Jahan y col., 2016).

En el presente estudio se observó que, independientemente del modelo de administración de Letrozol, la morfología del ovario es muy semejante a la descrita en las mujeres con el SOPQ (Li y col., 2017; Kakadia y col., 2019). Pandey y colaboradores (2016) mostraron que, la administración oral de 3mg/Kg/día de Letrozol durante 7 días resulta en el desarrollo de prequistes y ovulación normal. Por otro lado, si el tratamiento se realiza por 15 o 21 días se bloquea la ovulación e incrementa el número de los quistes foliculares.

En las mujeres con la patología no se observan folículos preovulatorios. Por el contrario, se observa un mayor reclutamiento folicular, es decir, aumenta el número de los folículos preantrales y antrales pequeños, los cuales presentan hipertrofia tecal (Taketani, 1990; Erickson, 1991; Webber y col., 2003; Sir y col., 2013). En nuestros tres modelos observamos la ausencia de folículos preovulatorios, similar a lo reportado anteriormente (Jahan y col., 2016; Ullah y col., 2017). Adicionalmente, en el modelo I y II observamos la disminución de los folículos sanos pequeños. Lo cual posiblemente se deba al aumento de la atresia folicular, resultado de la alta concentración de los andrógenos derivado de la administración del Letrozol. En estudios previos se ha mostrado que el tratamiento con Letrozol resulta en el aumento de la atresia folicular y un menor desarrollo folicular (Noorafshan y col., 2013; Li y col., 2017).

Las hembras inyectadas con Letrozol y sometidas a la SBNO presentaron folículos preovulatorios luteinizados con ovocito atrapado, estructuras que no fueron visibles en los animales sometidos a la operación simulada. Estos resultados nos permiten sugerir que, en los animales privados del aporte simpático, se inhibe la actividad de las enzimas y de los factores responsables de la ruptura de la pared del folículo. En consecuencia, los ovocitos no pudieron ser liberados y se inició el proceso de luteinización. Al realizar la denervación simpática además de eliminar el aporte noradrenérgico, disminuimos el aporte VIPérgico el cual se ha reportado que participa en los procesos involucrados en la ovulación (Schmidt y col., 1990). Por lo cual, no descartamos la idea de que la disminución de este péptido se

relacione con la disminución de la ovulación en estos animales. Hasta el momento no contamos con literatura que mencione los efectos del Letrozol sobre estos eventos, por lo cual requerimos de más estudios para esclarecer los sucesos que inhiben la liberación de los ovocitos en este modelo. La falta de inervación simpática no modificó el número de estructuras prequísticas y quísticas, lo cual posiblemente se deba al poco tiempo que se dejó al animal sin la inervación hasta el momento de la evaluación.

En el presente estudio se observó que las hembras inyectadas con Letrozol mostraron una mayor incidencia del número de prequistes, los cuales se presentaron desde folículos de tamaño mediano. Por el contrario, observamos escasos quistes foliculares. Es posible que la presencia de estas estructuras explique la falta de ovulación y de la elevada producción de los andrógenos (Jonard y col., 2003; Sir y col., 2013). Además, en el modelo II y III observamos la formación de quistes hemorrágicos similar a lo reportado anteriormente para este modelo (Ullah y col., 2017; Kauffman y col., 2015). La presencia de los quistes hemorrágicos posiblemente se deba a la disminución de los estrógenos o a la baja actividad su receptor. Esta posibilidad la atribuimos al hecho de que el modelo del ratón knockout para el receptor a estrógenos (ERKO), también se observa la formación de estas estructuras que se acompañan de ovarios hiperémicos (Lubahn y col., 1993).

Estudios previos realizados por Baravalle y colaboradores (2006) y Zurvarra y colaboradores (2009) muestran que, en las ratas tratadas con Letrozol aumenta la concentración sérica de la testosterona, la LH y la FSH y disminuye la del estradiol y la progesterona. En tanto que otros autores muestran que la concentración de FSH disminuye (Maliqueo y col., 2013; Kauffman y col., 2015) y la de estradiol no se modifica (Kauffman y col., 2015; Skarra y col., 2017; Ryan y col., 2018).

El hecho de que la concentración de la progesterona no se modificara en el modelo I lo atribuimos al hecho de que los animales ovularon y se formaron cuerpos lúteos, principales glándulas secretoras de esta hormona (Bachelot y Binart, 2005). Por el contrario, en el modelo II la disminución en la concentración de esta hormona lo atribuimos al escaso número de los cuerpos lúteos. Estas evidencias apoyan la idea del efecto del Letrozol sobre la actividad esteroidogénica del ovario. En la literatura se menciona que en la mujer el fármaco no modifica la síntesis de hormonas de origen adrenal (Lee y Ledger, 2011), en contraste

observamos que independientemente del modelo empleado en este estudio, la inyección de letrozol resultó en la disminución del peso de la masa adrenal, similar a lo observado anteriormente por Ortega y colaboradores (2013), quienes sugieren que este evento puede estar mediado por un efecto inhibitorio por parte de la testosterona en esta glándula.

En los animales inyectados con el Letrozol, el NOS modula de manera inhibitoria la secreción de la progesterona. Esta idea surge del hecho de que en animales con sección bilateral del NOS la concentración de la progesterona fue alta, similar a la del animal tratado con el Vh y sometido a la misma cirugía, pese a que el número de los ovocitos liberados fue menor.

Se ha reportado que el hiperandrogenismo es responsable del desarrollo y mantenimiento del SOPQ. Según el criterio de Rotterdam la alta concentración de andrógenos es la característica más constante presente en aproximadamente el 60% de los casos (Livadas y col., 2014).

El modelo I y II del presente estudio muestran que la concentración sérica de la testosterona es significativamente mayor. Lo que no difiere con lo reportado en la literatura (Kafali y col., 2004; Kauffman y col., 2015; Kakadia y col., 2019). Con relación al modelo III, observamos que la información que viaja a través del NOS parece modular de manera estimulante la secreción de la testosterona. Esto se puede corroborar con los animales sometidos a la OS, puesto que, en ellos la concentración de la testosterona se mantiene similar a la del animal únicamente inyectado con el Letrozol (modelo II).

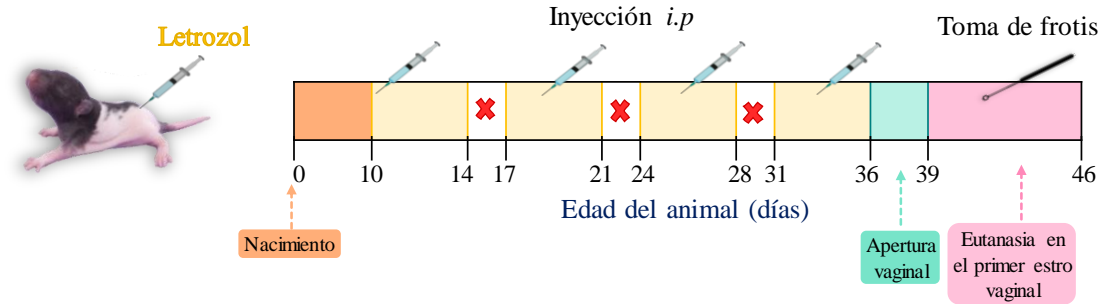
En el modelo del animal tratado con Letrozol el aumento y la acumulación de los andrógenos puede ser resultado de varias modificaciones en las enzimas encargadas de la biosíntesis de los andrógenos (Kafali y col., 2004; Mannerås y col., 2007). Evidencias previas muestran que la administración de Letrozol resulta en el aumento de la 3β -HSD (Zurvarra y col., 2009) y del citocromo P450c17, que posee la actividad de las enzimas 17α -hidroxilasa y de la $17,20$ -liasa (Qin y Rosenfield, 1998; Ortega y col., 2013; Kauffman y col., 2015). Aunque el ovario representa la principal fuente de producción de los andrógenos, otros tejidos periféricos tienen la capacidad de sintetizarlos puesto que, presentan las enzimas esteroideogénicas necesarias y, por lo tanto, pueden contribuir al aumento de la producción de los andrógenos (Ortega y col., 2013).

Además de las alteraciones reproductivas, se ha observado que las mujeres con el SOPQ pueden desarrollar anomalías metabólicas (Kauffman y col., 2015), las que ocurren con mayor frecuencia en aquellas con el hiperandrogenismo y la anovulación (Barber y col., 2007; Moghetti y col., 2013; Patel y Shah, 2018). La prevalencia de la resistencia a la insulina en estas pacientes varía de 50 a 70%, independientemente de su índice de masa corporal (Dunaif y col., 1989; Dunaif, 1997; Carmina y Lobo, 2004).

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que los tres modelos que empleamos resultan en el aumento de la masa corporal. Es posible que esta respuesta se deba a un mayor depósito de grasa abdominal, inguinal y parametrial, así como, al aumento del tamaño de los adipocitos como ha sido reportado anteriormente en el modelo del animal con letrozol (Maliqueo y col., 2013; Kauffman y col., 2015; Arroyo y col., 2019). Cabe resaltar que estos depósitos poseen la capacidad enzimática para la producción de los andrógenos y, por lo tanto, no se puede descartar su contribución en la producción de estos en respuesta al tratamiento con Letrozol.

A partir de los resultados obtenidos, sugerimos que en la rata de 10 días de edad la inducción del SOPQ, por la inyección de Letrozol, sí depende del tiempo de administración. Además, la inervación simpática modula de manera inhibitoria los mecanismos que facilitan la liberación del ovocito.

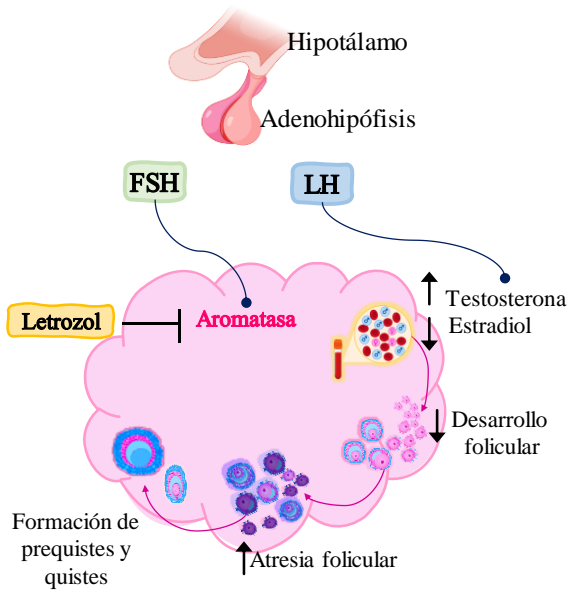
Modelo I



Resultados



Durante el tratamiento con Letrozol



Después del tratamiento con Letrozol

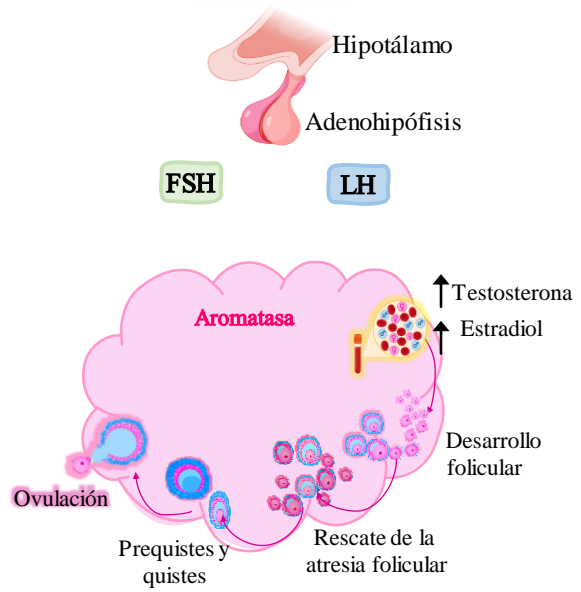
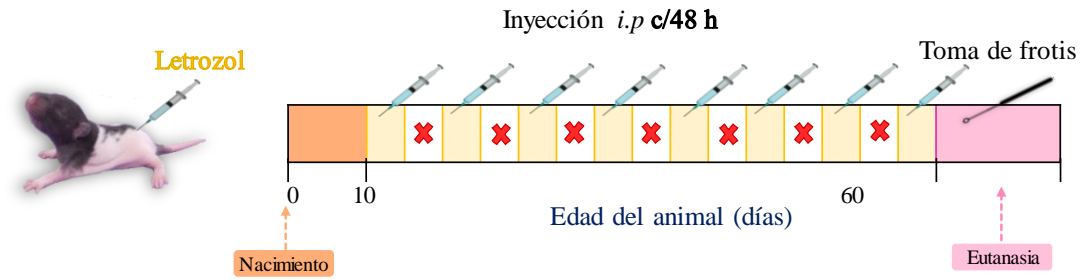


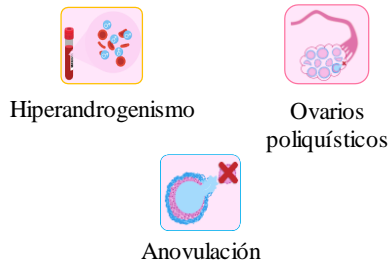
Figura 34. En este modelo se resumen los efectos del **Letrozol** en hembras de 10 días de edad inyectadas cinco veces a la semana hasta la apertura vaginal y sacrificadas en el estro inmediato al término del tratamiento. El tratamiento con Letrozol resulta en el aumento de los andrógenos, a causa de que estos no son biotransformados a los estrógenos. Es posible que estos andrógenos sean los responsables de la disminución de los folículos sanos pequeños y también de la presencia de los prequistes y quistes foliculares. Una vez suspendido el tratamiento la aromatización se reanuda, es decir, que los andrógenos son transformados a los estrógenos. Estos últimos en conjunto con la FSH posiblemente permiten el recate de los folículos atrésicos preovulatorios, lo que pudo permitir la ovulación.

Modelo II y III



Resultados

Sacrificadas en el estro inmediato al termino del tratamiento con Letrozol



Sometidas a la SBNO (50 días de edad), sacrificadas en el estro inmediato al termino del tratamiento con Letrozol

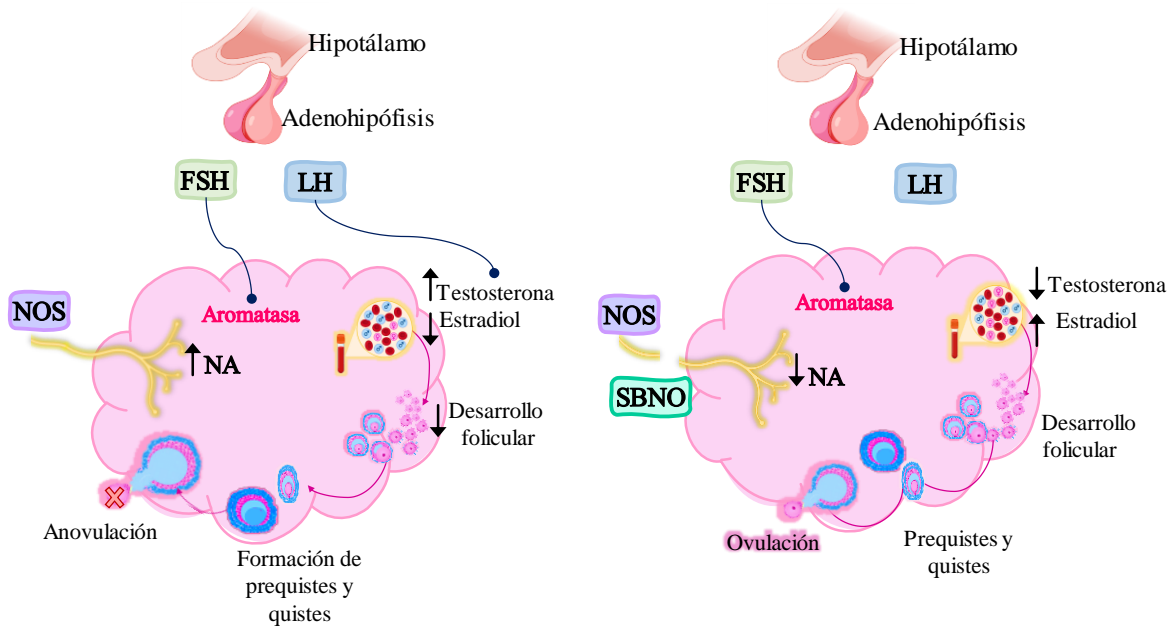
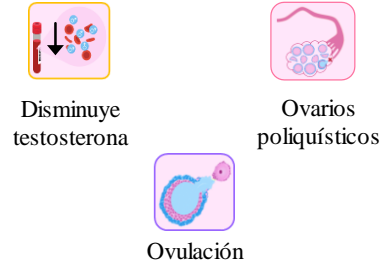


Figura 35. En este modelo se resumen los efectos de la inyección de **Letrozol** tomando en consideración su vida media (48 h). Ratas hembra fueron inyectadas desde los 10 días de edad hasta los 60 días de vida y sacrificadas en el estro inmediato. El tratamiento con Letrozol bajo este patrón de administración resultó en el aumento de los andrógenos, los cuales no se aromatizaron pese a que el fármaco ya había sido metabolizado por el organismo. Posiblemente la alta concentración de los andrógenos fue la responsable de la disminución en el número de los folículos sanos pequeños, la anovulación y la presencia de los prequistes y quistes foliculares. Presumiblemente estos eventos pueden estar relacionados con: a) un incremento en la concentración de la NA ovárica, la cual inhibe la formación de receptores a la FSH; b) la disminución en el número o afinidad de los receptores a la FSH. Al realizar la denervación bilateral del NOS disminuye la concentración de la NA ovárica lo que podría estimular la formación de receptores a la FSH y facilitar la ovulación. No descartamos que la ovulación se dé en respuesta a una menor concentración de los andrógenos.

CONCLUSIONES

- En la rata infantil la inyección con Letrozol desde los 10 días de edad hasta la apertura vaginal induce el hiperandrogenismo, los quistes foliculares sin bloqueo de la ovulación.
- El Letrozol es un buen inductor de hiperandrogenismo.
- La sección bilateral del NOS en hembras inyectadas con Letrozol restablece la ovulación en el 50% de los animales. La inervación simpática modula parcialmente los mecanismos que permiten la ovulación.
- En el animal tratado con Letrozol, el NOS modula de manera estimulante el hiperandrogenismo y de manera inhibitoria la secreción de la progesterona.
- El mejor modelo para reproducir las características que definen al síndrome de ovario poliquístico, es aquel donde el Letrozol se inyecta desde los 10 días de vida hasta los 60 días de edad, considerando la vida media del fármaco.

REFERENCIAS

- Abad A., Gilabert EJ., Payá V., Diago V., Coloma F., Costa S., Gilabert J.** (2001). Drilling ovárico laparoscópico mediante láser CO₂ versus electrocoagulación en el síndrome del ovario poliquístico resistente a Clomifeno. *Fertilidad*, 18(1):31-36.
- Abbott DH., Barnett DK., Levine JE., Padmanabhan V., Dumesic DA., Jacoris S., Tarantal AF.** (2008). Endocrine antecedents of polycystic ovary syndrome in fetal and infant prenatally androgenized female rhesus monkeys. *Biology of Reproduction*, 79(1): 154-163.
- Abbott DH., Nicol LE., Levine JE., Xu N., Goodarzi MO., Dumesic DA.** (2013). Nonhuman primate models of polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 373(1-2): 21-28.
- Abramovich D., Irusta G., Bas D., Cataldi NI., Parborell F., Tesone M.** (2012). Angiopietins/TIE2 system and VEGF are involved in ovarian function in a DHEA rat model of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*, 153(7): 3446-3456.
- Adashi EY.** (1994). Endocrinology of the ovary. *Human Reproduction*, 9(5): 815-827.
- Allahbadia GN., Merchant R.** (2011). Polycystic ovary syndrome and impact on health. *Middle East Fertility Society Journal*, 16(1): 19-37.
- Álvarez-Blasco F., Botella-Carretero JL., San Millán JL., Escobar-Morreale HF.** (2006). Prevalence and characteristics of the polycystic ovary syndrome in overweight and obese women. *Archives of Internal Medicine*, 166(19): 2081-2086.
- Andersen CY., Ezcurra D.** (2014). Human steroidogenesis: implications for controlled ovarian stimulation with exogenous gonadotropins. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1): 1-11.
- Anderson E., Lee GY.** (1997). The polycystic ovarian (PCO) condition: apoptosis and epithelialization of the ovarian antral follicles are aspects of cystogenesis in the dehydroepiandrosterone (DHEA)-treated rat model. *Tissue and Cell*, 29(2): 171-189.
- Anesetti G., Chávez-Genaro R.** (2015). Neonatal testosterone exposure induces early development of follicular cysts followed by sympathetic ovarian hyperinnervation. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(11): 1753-1761.
- Arata-Bellabarba G., Walter B., Rojas JF.** (1981). El inicio de la pubertad en la rata hembra. *Acta Científica Venezolana*, 32:457-462.

- Arroyo P., Ho BS., Sau L., Kelley ST., Thackray VG.** (2019). Letrozole treatment of pubertal female mice results in activational effects on reproduction, metabolism and the gut microbiome. *PloS One*, 14(9): 1-17.
- Arteaga-Martínez SM., García-Peláez MI.** (2017). Gametogénesis. Formación del espermatozoide y del ovocito. En SMA. Martínez, MIG. Peláez (Eds.), *Embriología humana y biología del desarrollo* (2.^a ed., pp. 33-56). Ciudad de México, México: Editorial Médica Panamericana.
- Azziz R.** (2018). Polycystic ovary syndrome. *Obstetrics and Gynecology*, 132(2): 321-336.
- Azziz R., Carmina E., Dewailly D., Diamanti-Kandarakis E., Escobar-Morreale HF., Futterweit W., Janssen OE., Legro RS., Norman RJ., Taylor AE., Witchel SF.** (2006). Positions statement: Criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an androgen excess society guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(11): 4237-4245.
- Azziz R., Carmina E., Dewailly D., Diamanti-Kandarakis E., Escobar-Morreale HF., Futterweit W., Witchel SF.** (2009). The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertility and sterility*, 91(2): 456-488.
- Azziz R., Woods KS., Reyna R., Key TJ., Knochenhauer ES., Yildiz BO.** (2004). The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(6): 2745-2749.
- Bachelot A., Binart N.** (2005). Corpus luteum development: lessons from genetic models in mice. *Current Topics in Developmental Biology*, 68:49-84.
- Bahr J., Kao L., Nalbandov AV.** (1974). The role of catecholamines and nerves in ovulation. *Biology of Reproduction*, 10(2): 273-290.
- Bahr JM., Ben-Jonathan N.** (1981). Preovulatory depletion of ovarian catecholamines in the rat. *Endocrinology*, 108:1815-1820.
- Baker TG.** (1963). A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. Proceedings of the Royal Society of London. Series B. *Biological Sciences*, 158(972): 417-433.

- Balen A.** (2004). The pathophysiology of polycystic ovary syndrome: trying to understand PCOS and its endocrinology. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 18(5): 685-706.
- Baljet B., Drukker J.** (1979). The extrinsic innervation of the abdominal organs in the female rat. *Acta Anat Basel*, 104(3): 243-267.
- Baravalle C., Salvetti NR., Mira GA., Pezzone N., Ortega HH.** (2006). Microscopic characterization of follicular structures in letrozole-induced polycystic ovarian syndrome in the rat. *Archives of Medical Research*, 37(7): 830-839.
- Barbacka-Surowiak G., Surowiak J., Stokłosowa, S.** (2003). The involvement of suprachiasmatic nuclei in the regulation of estrous cycles in rodents. *Reproductive Biology*, 3(2): 99-129.
- Barber TM., Wass JA., McCarthy MI., Franks, S.** (2007). Metabolic characteristics of women with polycystic ovaries and oligo-amenorrhoea but normal androgen levels: implications for the management of polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology*, 66(4): 513-517.
- Barria A., Lara HE.** (1991). Polycystic Ovary. Changes in Ovarian Steroids Secretion. Role of Sympathetic Innervation. *Archives of Biology and Medical Experimental*, 24: R-154.
- Barria A., Leyton V., Ojeda SR., Lara HE.** (1993). Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology*, 133(6): 2696-2703.
- Batrinós ML.** (1993). Diagnostic dilemmas in polycystic ovarian syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 687(1): 230-234.
- Battista PJ., Rexroad Jr, CE., Poff JP., Condon WA.** (1989). Support for a physiological role of endogenous catecholamines in the stimulation of bovine luteal progesterone production. *Biology of Reproduction*, 41(5): 807-812.
- Baynes JW., Dominiczak MH.** (2011). *Bioquímica médica 3 ed. + Student Consult* (3.^a ed., pp. 213-224). Barcelona, España: Elsevier.
- Becú-Villalobos D., Lacau-Mengido IM.** (1990). Control hormonal del desarrollo puberal en la rata hembra. *Acta Physiologica, Pharmacologica et Therapeutica Latinoamericana*, 40(1): 1-17.

- Beloosesky R., Gold R., Almog B., Sasson R., Dantes A., Land-Bracha A., Hirsh J L., Itskovitz-Eldor J., Lessing JB., Homburg R., Amsterdam A.** (2004). Induction of polycystic ovary by testosterone in immature female rats: modulation of apoptosis and attenuation of glucose/insulin ratio. *International Journal of Molecular Medicine*, 14(2): 207-215.
- Ben-Shlomo A., Melmed S.** (2011). Hypothalamic regulation of anterior pituitary function. En Shlomo M. (Ed.), *The Pituitary* (3^a ed., pp. 21-45). Boston, USA: Academic Press.
- Ben-Ze'ev AVRI., Amsterdam A.** (1987). In vitro regulation of granulosa cell differentiation. Involvement of cytoskeletal protein expression. *Journal of Biological Chemistry*, 262(11): 5366-5376.
- Berg JM., Stryer L., Tymoczko J., Macarulla JM.** (2008). *Bioquímica* (6^a ed., pp. 750-755). Madrid, España: Reverte.
- Bhatnagar AS.** (2007). The discovery and mechanism of action of letrozole. *Breast Cancer Research and Treatment*, 105(1): 7-17.
- Billig H., Furuta IO., Hsueh AJ.** (1993). Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*, 133(5): 2204-2212.
- Braw RH., Tsafiriri A.** (1980). Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *Reproduction*, 59(2): 267-272.
- Brawer JR., 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.
- Bremer AA.** (2010). Polycystic ovary syndrome in the pediatric population. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 8(5): 375-394.
- Bremer AA., Miller WL.** (2014). Regulation of steroidogenesis. En A. Ulloa-Aguirre, PM. Conn (Eds.), *Cellular endocrinology in health and disease* (1.^a ed., pp. 311-323). New York, USA: Academic Press.
- Brower PT., Schultz RM.** (1982). Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: existence and possible role during oocyte growth. *Developmental Biology*, 90(1):144-153.
- Brüel A., Christensen EI., Tranum-Jensen J., Qvortrup K., Geneser F.** (2014). *Geneser Histología*. (4.^a ed., pp. 589-593). México: Editorial Médica Panamericana.

- Bukovský A., Presl J., Holub M.** (1984). The ovarian follicle as a model for the cell-mediated control of tissue growth. *Cell and Tissue Research*, 236(3): 717-724.
- Burden, H. W.** (1978). Ovarian innervation. En T. E. Jones (Ed.), *The Vertebrate Ovary: Comparative Biology and Evolution*. (pp. 615-638). New York, EU: Plenum Press.
- Burden HW.** (1985). The adrenergic innervation of mammalian ovaries. En RI. Weiner, N Ben-Jonathan, JM. Bahr (Eds.), *Catecholamines as Hormone Regulators* (pp. 261-278). New York, USA: Raven Press.
- Burden HW., Lawrence Jr IE.** (1977). The effect of denervation on compensatory ovarian hypertrophy. *Neuroendocrinology*, 23(6): 368-378.
- Burden HW., Leonard M., Smith CP., Lawrence Jr IE.** (1983). The sensory innervation of the ovary: a horseradish peroxidase study in the rat. *The Anatomical Record*, 207(4): 623-627.
- Byers SL., Wiles MV., Dunn SL., Taft RA.** (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PloS One*, 7(4):1-5.
- Byskov AGS.** (1974). Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary. *Reproduction*, 37(2): 277-285.
- Caldwell ASL., Middleton LJ., Jiménez M., Desai R., McMahon AC., Allan CM., Handelsman DJ., Walters KA.** (2014). Characterization of reproductive, metabolic, and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models. *Endocrinology*, 155(8): 3146-3159.
- Carmina E., Lobo RA.** (2004). Use of fasting blood to assess the prevalence of insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 82(3): 661-665.
- Castro ME., Ayala ME., Monroy J., Chavira R., Damian-Matsumura P., Domínguez R.** (2001). Changes in monoaminergic activity in the anterior, medium and posterior hypothalamus, gonadotropins levels and ovarian hormones during puberty of the female rat. *Brain Research Bulletin*, 54(4): 345-352.
- Channing CP., Schaerf FW., Anderson LD., Tsafiriri A.** (1980). Ovarian follicular and luteal physiology. *International Review of Physiology*, 22: 117-201.
- Chulani VL., Gordon LP.** (2014). Adolescent growth and development. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 41(3): 465-487.

- Chun SY., Eisenhauer KM., Minami S., Billig H., Perlas E., Hsueh AJ.** (1996). Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*, 137(4): 1447-1456.
- Ciccione NA., Kaiser UB.** (2009). The biology of gonadotroph regulation. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 16(4): 321.
- Cigler T., Tu D., Yaffe MJ., Findlay B., Verma S., Johnston D., Richardson H., Hu H., Qi S., Goss PE.** (2010). A randomized, placebo-controlled trial (NCIC CTG MAP1) examining the effects of letrozole on mammographic breast density and other end organs in postmenopausal women. *Breast Cancer Research and Treatment*, 120(2): 427-435.
- Çinar M., Gün ÖE.** (2016). Experimental models of polycystic ovary syndrome. *Medeniyet Medical Journal*, 31(1): 53-57.
- Clifton DK., Steiner RA.** (2009). Neuroendocrinology of Reproduction. En RL. Barbieri, JF. Strauss (Eds.), *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology* (6.^a ed., pp. 3-33). Maarssen, Países Bajos: Elsevier.
- Conley AJ., Walters KW.** (1999). Aromatization. En E. Knobil, JD. Neill (Eds.), *Encyclopedia of reproduction* (Vol. 1, pp. 280-291). San Diego, USA: Academic Press.
- Conti M.** (2002). Specificity of the cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate signal in granulosa cell function. *Biology of Reproduction*, 67(6): 1653-1661.
- Cora CM., Kooestra L., Travlos G.** (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic Pathology*, 43(6): 776-793.
- Crespo RP., Bachega TA., Mendonça BB., Gomes LG.** (2018). An update of genetic basis of PCOS pathogenesis. *Archives of Endocrinology and Metabolism*, 62(3): 352-361.
- Cruz G., Barra R., González D., Sotomayor-Zárate R., Lara HE.** (2012). Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats. *Fertility and Sterility*, 98(5): 1283-1290.

- Dees WL., Hiney JK., Schultea TD., Mayerhofer, Danilchik M., Dissen GA., Ojeda SR.** (1995). The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptors. *Endocrinology*, 136(12): 760-5768.
- Del Campo M., Piquer B., Witherington J., Sridhar A., Lara HE.** (2019). Effect of superior ovarian nerve and plexus nerve sympathetic denervation on ovarian-derived infertility provoked by estradiol exposure to rats. *Frontiers in Physiology*, 10: 1-10.
- Del Río VJM., Ramírez JP., Cortés ME., Martí G., Godoy A., Vigil P.** (2006). Análisis de resistencia insulínica, tolerancia a la glucosa y testosterona en mujeres jóvenes con síndrome de ovario poliquístico agrupadas por índice de masa corporal. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 71(5): 299-306.
- Dennett CC., Simon J.** (2015). The role of polycystic ovary syndrome in reproductive and metabolic health: Overview and approaches for treatment. *Diabetes Spectrum*, 28(2): 116-120.
- Di Nardo G., Gilardi G.** (2013). Human aromatase: perspectives in biochemistry and biotechnology. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 60(1): 92-01.
- Dissen AG., Ojeda SR.** (1999). Innervation in ovarian. En E. Knobil, JD. Neill (Eds.), *Encyclopedia of reproduction* (Vol. 1, pp. 583-589). San Diego, USA: Academic Press.
- Dissen GA., Lara HE., Leyton V., Paredes A., Hill DF., Costa ME., Martínez- Serrano A., Ojeda SR.** (2000). Intraovarian excess of nerve growth factor increases androgen secretion and disrupts estrous cyclicity in the rat. *Endocrinology*, 141(3): 1073-1082.
- Döhler KD., Wuttke W.** (1974). Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. *Endocrinology*, 94(4): 1003-1008.
- Dolci S., Williams DE., Ernst MK., Resnick JL., Brannan CI., Lock LF., Lyman SD., Boswell S., Donovan PJ.** (1991). Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature*, 352(6338): 809-811.
- Dolz MA.** (2010). Síndrome de ovario poliquístico. Fisiopatología y Diagnostico. En F. Bonilla-Musoles, MA. Dolz, JM. Moreno, FB. Raga (Eds.), *Reproducción Asistida* (pp. 99-105). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.

- Domínguez R., Chávez R., Cruz ME.** (1991). La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. *Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción. Programa Universitario de Investigación en Salud.* Coordinación de la Investigación Científica UNAM. pp.163-188.
- Domínguez R., Flores A., Cruz-Morales SE.** (2012). Hormonal and Neural Mechanisms Regulating Hormone Steroids Secretion. En H. Abduljabbar (Ed.), *Steroids-Basic Science* (pp. 3-34). Editorial IntechOpen.
- Domínguez R., Riboni L.** (1971). Failure of ovulation in autografted ovary of hemispayed rat. *Neuroendocrinology*, 7(3): 164-170.
- Dunaif A.** (1997). Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanisms and implication for pathogenesis. *Endocrine Review*, 18(1): 774-800.
- Dunaif A.** (2006). Insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 86: S13-S14.
- Dunaif A., Segal K. R., Futterweit W., Dobrjansky, A.** (1989). Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes*, 38(9): 1165-1174.
- Dunaif A., Wu X., Lee A., Diamanti-Kandarakis E.** (2001). Defects in insulin receptor signaling in vivo in the polycystic ovary syndrome (PCOS). *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 281(2): E392-E399.
- Dunaif A., Xia J., Book CB., Schenker E., Tang, Z.** (1995). Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 96(2): 801-810.
- Ehrmann DA.** (2005). Polycystic ovary syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 352(12): 1223-1236.
- Eppig JJ.** (1982). The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. *Developmental Biology*, 89(1): 268-272.
- Erickson GF.** (1991). Folliculogenesis in Polycystic Ovary Syndrome. En A. Dunaif, JR. Givens, FP. Haseltine, GR. Merriam (Eds.), *Polycystic Ovary Syndrome* (pp. 111-128). Boston: Blackwell Scientific.

- Escobar GCE.** (2009). Síndrome de ovario poliquístico (SOP). *Memorias Curso de Actualización en Ginecología y Obstetricia*, 223-235.
- Espey LL.** (1974). Ovarian proteolytic enzymes and ovulation. *Biology of Reproduction*, 10 (2): 216-235.
- Espey LL., Lipner H.** (1974). Ovulation, En E. Knobil, JD. Neill (Eds.), *The Physiology of Reproduction* (pp. 725-756). New York, USA: Raven Press.
- Filipiak Y., Viqueira M., Bielli, A.** (2016). Desarrollo y dinámica de los folículos ováricos desde la etapa fetal hasta la prepuberal en bovinos. *Veterinaria (Montevideo)*, 52(202): 14-22.
- Fisher CR., Graves KH., Parlow AF., Simpson ER.** (1998). Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12): 6965-6970.
- Flores A., Rodríguez JO., Palafox MT., Meléndez G., Barco AI., Chavira R., Domínguez R.** (2006). The acute asymmetric effects of hemiovariectomy on testosterone secretion vary along the estrous cycle. The participation of the cholinergic system. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4(1): 11.
- Flores MR.** (2012). Síndrome de ovario poliquístico: el enfoque del internista. *Medicina Interna de México*, 28(1): 47-56.
- Foster DL., Ebling FJP.** (1999). Puberty, in Nonprimate Mammals. En E. Knobil, JD. Neill (Eds.), *Encyclopedia of reproduction* (Vol. 4, pp. 42-152). San Diego, USA: Academic Press.
- Franks S.** (1995). Polycystic ovary syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 1995(333): 853-861.
- Franks S., Mason H., Willis D.** (2000). Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 163(1-2): 49-52.
- Freeman ME.** (1988). The ovarian cycle of the rat. En E. Knobil, J. Neill, LL. Ewing, GS. Greenwald, CL. Markert, DW. Pfaff (Eds.), *The Physiology of Reproduction* (1.^a ed., pp. 1893-1928). New York, USA: Raven Press.
- Freeman ME.** (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En E. Knobil, JD. Neill (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (3.^a ed., pp. 327-330). New York, USA: Raven Press.

- Gartner LP, Hiatt JL.** (2015). Atlas en color y texto de Histología. (6.^a ed., pp. 405-433). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Gartner LP., Hiatt JL.** (2007). Histología. Texto y Atlas. (3.^a ed., pp. 463-470). Distrito Federal, México: Médica Panamericana.
- Geneser F.** (2000). Histología sobre las bases Biomoleculares (3.^a ed., pp. 613-638). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médico Panamericana.
- Gerendai I., Halasz B.** (1978). Neural participation in ovarian control. *Trends in Neurosciences*, 1(4): 87-88.
- Gerendai I., Tóth IE., Boldogkői Z., Medveczky I., Halász B.** (1998). Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique. *Neuroendocrinology*, 68(4): 244–256.
- Gerendai I., Tóth IE., Boldogkői Z., Medveczky I., Halász B.** (2000). CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 80(1-2): 40-45.
- Godin I., Deed R., Cooke J., Zsebo K., Dexter M., Wylie CC.** (1991). Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture. *Nature*, 352(6338): 807-809.
- Goldman JM., Murr AS., Cooper RL.** (2007). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Developmental and Reproductive Toxicology*, 80(2): 84-97.
- Golfien A., Monroe SE.** (2000). Ovarios. En FS. Greenspan, GJ. Strewler (Eds.), *Endocrinología Básica y Clínica* (4.^a ed., pp. 497-554). Ed. El Manual Moderno.
- Golos TG., Silavin SL., Soto EA., Takagi K.** (1988). Involvement of cyclic AMP in the functions of granulosa and luteal cells: regulation of steroidogenesis. *Progress in Clinical and Biological Research*, 267: 177-200.
- Gómez-Chang E., Larrea F., Martínez-Montes F.** (2012). Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15(1): 24-36.
- Gómez-Prieto B., Velázquez-Paniagua M.** (2002). Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 45(6): 252-257.

- Goodarzi MO., Dumesic DA., Chazenbalk G., Azziz R.** (2011). Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(4): 219-231.
- Gore-Langton RE., Armstrong DT.** (1994). Follicular steroidogenesis and its control. En E. Knobil, JD. Neill (Eds.), *The Physiology of Reproduction* (2.^a ed., Vol. 2, pp. 571-580). New York, USA: Raven Press.
- Gorry A., White DM., Franks S.** (2006). Infertility in polycystic ovary syndrome. *Endocrine*, 30(1): 27-33.
- Gougeon A.** (2003). Dynamics of human follicular growth: A morphological perspective. En PCK. Leung, EY. Adashi, PCK. Leung (Eds.), *The Ovary* (2.^a ed., pp. 21-39). New York, USA: Elsevier.
- Gower DB.** (1988). The biosynthesis of steroid hormones: an up-date. En A. Cooke, RJB. King, HJ. van der Molen (Eds). *New Comprehensive Biochemistry* (Vol. 18, pp. 3-28). New York, USA: Elsevier Science Publishing.
- Grachev P., Goodman RL.** (2016). The GnRH pulse generator. *AIMS Medical Science*, 3(4): 359-385.
- Greenwald GS., Roy SK.** (1994). Follicular development and it's Control. En E. Knobil, JD. Neill (Eds.), *The Physiology of Reproduction* (2.^a ed., Vol. 2, pp. 629-724). New York, USA: Raven Press.
- Grob HS.** (1974). Follicle growth in denervated ovaries of hypophysectomized mice. *Federation Proceedings*, 33(3): 213-213.
- Gross KM., Matsumoto AM., Bremner WJ.** (1987). Differential control of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion by luteinizing hormone-releasing hormone pulse frequency in man. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 64(4): 675-680.
- Hague WM., Adams J., Rodda C., Brook CG., De Bruyn R., Grant DB., Jacobs HS.** (1990). The prevalence of polycystic ovaries in patients with congenital adrenal hyperplasia and their close relatives. *Clinical Endocrinology*, 33(4): 501-510.
- Hall JE.** (2014). Neuroendocrine Control of the Menstrual Cycle. En JF. Strauss, RL. Barbieri (Eds.), *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology* (7.^a ed., pp. 141-156). New York, USA: Elsevier.

- He D., Jiang F.** (2011). Meta-analysis of letrozole versus clomiphene citrate in polycystic ovary syndrome. *Reproductive Biomedicine Online*, 23(1): 91-96.
- Henmi H., Nagasawa K., Hayashi T., Chida M., Akutagawa N., Iwasaki M., Kudo R.** (2001). Lysyl oxidase and MMP-2 expression in dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovary in rats. *Biology of Reproduction*, 64(1): 157-162.
- Herbison AE.** (2018). The gonadotropin-releasing hormone pulse generator. *Endocrinology*, 159(11): 3723-3736.
- Hernández-Rodríguez J., Licea PME.** (2015). Relación entre la insulinoresistencia y el síndrome de ovario poliquístico y sus comorbilidades metabólicas. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 31(4): 383-394.
- Hirshfield AN.** (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, 124:43-101.
- Hirshfield AN., Rees Midgley Jr. A.** (1978). The role of FSH in the selection of large ovarian follicles in the rat. *Biology of Reproduction*, 19(3): 606-611.
- Homburg R.** (2009). Androgen circle of polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*, 24(7): 1548-1555.
- Hsueh AJW., Adashi EY., Jones PBC., Wels THJ.** (1984). Hormonal Regulation of the Differentiation of Cultured Ovarian Granulosa Cells. *Endocrinology Reviews*, 5(1): 76-127.
- Hsueh AJW., Billig H., Tsafiriri A.** (1994) Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process. *Endocrinology Reviews*, 15(16): 707-724.
- Hu J., Zhang Z., Shen WJ, Azhar S.** (2010). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition and Metabolism*, 7(47):1-25.
- Huffman L., Hendricks SE.** (1981). Prenatally injected testosterone propionate and sexual behavior of female rats. *Physiology and Behavior*, 26(5): 773-778.
- Ibáñez L., López-Bermejo A., Díaz M., Marcos MV.** (2011). Endocrinology and gynecology of girls and women with low birth weight. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 30(4): 243-249.
- Ioannou JM.** (1964). Oogenesis in the guinea pig. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 12(4): 673-691.

- Jadhav M., Menon S., Shailajan S.** (2013). Anti-androgenic effect of *Symplocos racemosa* Roxb. against letrozole induced polycystic ovary using rat model. *Journal of Coastal Life Medicine*, 1(4): 309-314.
- Jahan S., Munir F., Razak S., Mehboob A., Ain QU., Ullah H., Afsar T., Shaheen G., Almajwal, A.** (2016). Ameliorative effects of rutin against metabolic, biochemical and hormonal disturbances in polycystic ovary syndrome in rats. *Journal of Ovarian Research*, 9(1):1-9.
- Jennes L., Eyigor O., Janovick JA., Conn PM.** (1997). Brain gonadotrophin releasing hormone receptors: localization and regulation. *Recent Progress in Hormone Research*, 52: 475-491.
- Jeong KH., Kaiser UB.** (2006). Gonadotropin-releasing hormone regulation of gonadotropin biosynthesis and secretion. En E. Knobil, JD. Neill (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (3.^a ed., pp. 1635-1701). New York, USA: Raven Press.
- Jonard S., Robert Y., Cortet-Rudelli C., Pigny P., Decanter C., y Dewailly D.** (2003). Ultrasound examination of polycystic ovaries: is it worth counting the follicles? *Human Reproduction*, 18(3): 598-603.
- Kafali H., Iriadam M., Ozardali I., Demir N.** (2004) Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease. *Archives of Medical Research*, 35(2):103–108.
- Kagitani F., Uchida S., Hotta H.** (2008). Effects of electrical stimulation of the superior ovarian nerve and the ovarian plexus nerve on the ovarian estradiol secretion rate in rats. *The Journal of Physiological Sciences*, 58(2): 133-138.
- Kahn CR., White M.** (1988). The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. *The Journal of Clinical Investigation*, 82(4): 1151-1156.
- Kaiser BU.** (2011). Gonadotropin Hormones. En M.Shlomo (Ed.), *The Pituitary* (3^a ed., pp. 21-45) Boston, USA: Academic Press.
- Kakadia N., Patel P., Deshpande S., Shah, G.** (2019). Effect of *Vitex negundo* L. seeds in letrozole induced polycystic ovarian syndrome. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 9(4): 336-345.

- Kakarla N., Bradshaw KD.** (2003). Disorders of pubertal development: precocious puberty. *Seminars in Reproductive Medicine*, 21(4): 339-352.
- Kapia A., Hsueh AJW.** (1997). Regulation of Ovarian Follicle Atresia. *Annual Review Physiology*, 59(1): 349-363.
- Kauffman AS., Thackray VG., Ryan GE., Tolson KP., Glidewell-Kenney CA., Semaan SJ., Iwata N., Breem KM., Duleba AJ., Stener-Victorin E., Shimasaki S., Webster NJ., Mellon P. L.** (2015). A novel letrozole model recapitulates both the reproductive and metabolic phenotypes of polycystic ovary syndrome in female mice. *Biology of Reproduction*, 93(3): 69-1.
- Kezele P., Skinner MK.** (2003). Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology*, 144(8): 3329-3337.
- Khaled N., El-Bahy AA., Radwan R., Handoussa H., AbdelMaksoud S.** (2019). Ocimum kilimandscharicum L. restores ovarian functions in letrozole-induced Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) in rats: Comparison with metformin. *Life Sciences*, 232: 116640.
- Khan MJ., Ullah A., Basit S.** (2019). Genetic basis of polycystic ovary syndrome (PCOS): current perspectives. *The Application of Clinical Genetics*, 12: 249-260.
- Kimura F., Kawakami M.** (1981). Two daily surges of prolactin secretion preserved after ovariectomy in the immature rat. *Endocrinology Japon*, 28(5): 647-652.
- Klein CM., Burden HW.** (1988) a). Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neuroscience Letters*, 85(2): 217-222.
- Klein CM., Burden HW.** (1988) b). Substance P-and vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-immunoreactive nerve fibers in relation to ovarian postganglionic perikarya in para-and prevertebral ganglia: evidence from combined retrograde tracing and immunocytochemistry. *Cell and Tissue Research*, 252(2): 403-410.
- Koeppen BM., Stanton BA.** (2009). *Berne y Levy, Fisiología*. México: Elsevier Health Sciences. pp 659.
- Kotwica J., Skarzynski D., Bogacki M., Miszkiew G.** (1996). Influence of dopamine as noradrenaline precursor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro. *British Journal of Pharmacology*, 118(7): 1669-1974.

- Kragt CL., Dahlgren J.** (1972). Development of neural regulation of follicle stimulating hormone (FSH) secretion. *Neuroendocrinology*, 9(1): 30-40.
- Krsmanovic LZ., Hu L., Leung PK., Feng H., Catt KJ.** (2009). The hypothalamic GnRH pulse generator: multiple regulatory mechanisms. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 20(8): 402-408.
- Lakkakula BVKS., Thangavelu M., Godla UR.** (2013). Genetic variants associated with insulin signaling and glucose homeostasis in the pathogenesis of insulin resistance in polycystic ovary syndrome: a systematic review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(7): 883-895.
- Lamprecht SA., Kohen F., Ausher J., Zor U., Lindner HR.** (1976). Hormonal stimulation of oestradiol-17 β release from the rat ovary during early postnatal development. *Journal of Endocrinology*, 68(2):343-344.
- Lanuza G.** (1999). *Regulación del desarrollo folicular por factores péptidicos intraováricos*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Lara HE., Dissen GA., Leyton V., Paredes A., Fuenzalida H., Fiedler JL., Ojeda SR.** (2000). An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology*, 141(3): 1059-1072.
- Lara HE., Ferruz JL., Luza S., Bustamante DA., Borges Y., Ojeda SR.** (1993). Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*, 133(6): 2690-2695.
- Lawrence Jr. IE., Burden HW.** (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The Anatomical Record*, 196(1): 51-59.
- Lawrence TS., Dekel N., Beers WH.** (1980). Binding of human chorionic gonadotropin by rat cumuli oophori and granulosa cells: a comparative study. *Endocrinology*, 106(4): 1114-1118.
- Lee MT., Anderson E., Lee GY.** (1991). Changes in ovarian morphology and serum hormones in the rat after treatment with dehydroepiandrosterone. *The Anatomical Record*, 231(2): 185-192.

- Lee VCY., Ledger W.** (2011). Aromatase inhibitors for ovulation induction and ovarian stimulation. *Clinical Endocrinology*, 74(5): 537-546.
- Leeson TS., Leeson RC., Paparo AA.** (1989). *Texto/Atlas de histología*. México: Nueva Editorial Interamericana.
- LeMaire WJ., Leidner R., Marsh JM.** (1975). Pre and post ovulatory changes in the concentration of prostaglandins in rat graafian follicles. *Prostaglandins*, 9(2):221-229.
- Levine JE.** (2014). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En AJ. Zeleznik TM. Plant (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (4.^a ed., Vol. 1, pp. 1199-1257). Boston, USA: Elsevier.
- Li C., Chen L., Zhao Y., Chen S., Fu L., Jiang Y., Zhang J., Rao, J.** (2017). Altered expression of miRNAs in the uterus from a letrozole-induced rat PCOS model. *Gene*, 598: 20-26.
- Linares R., Rosas G., Vieyra E., Ramírez DA., Guerrero YA., Morán C., Morales-Ledesma L.** (2017). In rats with the polycystic ovary syndrome, the monoaminergic activity in the celiac superior mesenteric ganglion depends on the vagal innervation. *Australasian Medical Journal (Online)*, 10(4): 304.
- Liu C., Feng G., Huang W., Wang Q., Yang S., Tan J., y Liu, D.** (2017). Comparison of clomiphene citrate and letrozole for ovulation induction in women with polycystic ovary syndrome: a prospective randomized trial. *Gynecological Endocrinology*, 33(11): 872-876.
- Livadas S., Pappas C., Karachalios A., Marinakis E., Tolia N., Drakou M., Kaldrymides P., Panidis D., Diamanti-Kandarakis E.** (2014). Prevalence and impact of hyperandrogenemia in 1,218 women with polycystic ovary syndrome. *Endocrine*, 47(2): 631-638.
- Lizneva D., Suturina L., Walker W., Brakta S., Gavrilova-Jordan L., Azziz, R.** (2016). Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 106(1): 6-15.
- Long JA., Evans HM.** (1922). The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Memories of University of California*, 6: 1-148.

- Lubahn DB., Moyer JS., Golding TS., Couse JF., Korach KS., Smithies O.** (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(23): 11162-11166.
- Mackinnon PCB., Mattock JM., Ter-Harr MB.** (1976). Serum gonadotrophin levels during development in male, female and androgenized female rats and the effect of general disturbance on high luteinizing hormone levels. *Journal of Endocrinology*, 70(3): 361-371.
- Malamed S., Gibney JA., Ojeda SR.** (1992). Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat. *Cell and Tissue Research*, 270(1): 87-93.
- Maliqueo M., Sun M., Johansson J., Benrick A., Labrie F., Svensson H., Lönn M., Duleba AJ., Stener-Victorin E.** (2013). Continuous administration of a P450 aromatase inhibitor induces polycystic ovary syndrome with a metabolic and endocrine phenotype in female rats at adult age. *Endocrinology*, 154(1): 434-445.
- Mannerås L., Cajander S., Holmäng A., Seleskovic Z., Lystig T., Lönn M., Stener-Victorin E.** (2007). A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*, 148(8): 3781-3791.
- Manni L., Holmäng A., Lundeberg T., Aloe L., 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*, 118(1-2): 79-87.
- March WA., Moore VM., Willson KJ., Phillips DI., Norman RJ., Davies M J.** (2009). The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Human Reproduction*, 25(2): 544-551.
- Markstrom E., Svensson E., Shao R., Svanberg B., Billig H.** (2002). Survival factors regulating ovarian apoptosis--dependence on follicle differentiation. *Reproduction*, 123(1): 23-30.
- Marsh JM.** (1976). The role of cyclic AMP in gonadal steroidogenesis. *Biology of Reproduction*, 14(1): 30-53.
- Martínez de la Escalera G., Choi AL., Weiner RI.** (1992). Generation and synchronization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulses: intrinsic properties of the GT1-1

- GnRH neuronal cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(5): 1852-1855.
- Matalliotakis I., Kourtis A., Koukoura O., Panidis, D.** (2006). Polycystic ovary syndrome: etiology and pathogenesis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 274(4): 187-197.
- McDonald JK., Dess WL., Ahmed CE., Noe BD., Ojeda SR.** (1987) Biochemical and Immunocytochemical Characterization of Neuropeptide Y in the Immature Rat Ovary. *Endocrinology*, 120(5): 1703-1710.
- McDonald PG., Doughty C.** (1972). Comparison of the effect of neonatal administration of testosterone and dihydrotestosterone in the female rat. *Reproduction*, 30(1): 55-62.
- Meijs-Roelofs HMA., Kramer P., Sander HJ.** (1983). Changes in serum concentration of luteinizing hormone in the female rat approaching puberty. *Journal of Endocrinology*, 98(2): 241-249.
- Melo AS., Ferriani RA., Navarro PA.** (2015). Treatment of infertility in women with polycystic ovary syndrome: approach to clinical practice. *Clinics*, 70(11): 765-769.
- Mendiola P., Penalva A., Pérez-Llamas F.** (1993). Ciclo Estral de la Rata. En J. Costa, JA. Madrid, S. Zamora (Eds.), *Manual de clases prácticas de fisiología animal* (pp. 147-150). Murcia, España: EDITUM.
- Merino PM., Schulin-Zeuthen PC., Cannoni BG., Conejero RC.** (2015). Síndrome de ovario poliquístico: diagnóstico en la adolescencia. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(1): 88-93.
- Miller WL., Auchus RJ.** (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*, 32(1): 81-151.
- Misso ML., Wong JL., Teede HJ., Hart R., Rombauts L., Melder AM., Norman RJ., Costello, MF.** (2012). Aromatase inhibitors for PCOS: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 18(3): 301-312.
- Moggetti P., Tosi F., Bonin C., Di Sarra D., Fiers T., Kaufman JM., Giagulli VA., Signori C., Zambotti F., Dall'Alda M., Spiazzi G., Zanolin ME., Bonora E., Spiazzi G.** (2013). Divergences in insulin resistance between the different phenotypes of the polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(4): E628-E637.

- Morales L., Chávez R., Domínguez R.** (1993). Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve. *Medical Science Research*, 21(1): 15-17.
- 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., Ramos JAD., Hernández AT.** (2017). Polycystic ovary syndrome induced by exposure to testosterone propionate and effects of sympathectomy on the persistence of the syndrome. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 15(1): 2-10.
- Morán C., Morales L., Quiróz U., Domínguez R.** (2000). Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in infantile rats on follicular growth. *Journal of endocrinology*, 166(1): 205-211.
- Morán C., Morales L., Razo R. S., Apolonio J., Quiróz U., Chavira R., Domínguez R.** (2003). Effects of sensorial denervation induced by capsaicin injection at birth or on day three of life, on puberty, induced ovulation and pregnancy. *Life Sciences*, 73(16): 2113-2125.
- Moran C., Quirke JF., Roche JF.** (1989). Puberty in Heifers: a Review. *Animal Reproduction Science*, 18(1-3): 167- 182.
- Moran C., Tena G., Moran S., Ruiz P., Reyna R., Duque X.** (2010). Prevalence of polycystic ovary syndrome and related disorders in Mexican women. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 69(4): 274-280.
- Moran LJ., Hutchison SK., Norman RJ., Teede HJ.** (2011). Lifestyle changes in women with polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (7).
- Muñoz EJF.** (2010). Péptidos Opioides Endógenos, Dolor y Adicción. *Synapsis*, 3(1): 33-39.
- Navarrete MMA.** (2014). *Modificaciones de las funciones ováricas en el animal con síndrome de ovario poliquístico, inducido por la administración de valerato de estradiol o la exposición al estrés por frío*. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México.

- Niswender GD.** (2002). Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction*, 123(3):333-339.
- Niswender GD., Juengel JL., Silva PJ., Rollyson MK., McIntush EW.** (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*, 80(1): 1-29.
- Noorafshan A., Ahmadi M., Mesbah SF., Karbalay-Doust S.** (2013). Stereological study of the effects of letrozole and estradiol valerate treatment on the ovary of rats. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 40(3): 115-121.
- Oestergaard S., Sondergaard BC., Hoegh-Andersen P., Henriksen K., Qvist P., Christiansen C., Karsdal MA.** (2006). Effects of ovariectomy and estrogen therapy on type II collagen degradation and structural integrity of articular cartilage in rats: implications of the time of initiation. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 54(8): 2441-2451.
- Ohno S., Smith JB.** (1964). Role of fetal follicular cells in meiosis of mammalian oocytes. *Cytogenetic and Genome Research*, 3(5): 324-333.
- Ojeda SR, Urbanski HF.** (1994). Puberty in the Rat. En E. Knobil, JD. Neill (Eds.), *The Physiology of Reproduction* (2.^a ed., Vol. 2, pp. 363-409). New York, USA: Raven Press.
- Ojeda SR., Andrews WW., Advis JP., White SS.** (1980). Recent advances in the endocrinology of puberty. *Endocrine Reviews*, 1(3): 228-257.
- Ojeda SR., Ramírez VD.** (1972). Plasma level of LH and FSH in maturing rats: response to hemigonadectomy. *Endocrinology*, 90(2): 66-472.
- Ojeda SR, Urbanski HF.** (1988). Puberty in the Rat. En E. Knobil, J. Neill, LL. Ewing, GS. Greenwald, CL. Markert, DW. Pfaff (Eds.), *The Physiology of Reproduction* (1.^a ed., pp. 1699-1737). New York, USA: Raven Press.
- Ortega I., Sokalska A., Villanueva JA., Cress AB., Wong DH., Stener-Victorin E., Stanley SD., Duleba AJ.** (2013). Letrozole increases ovarian growth and Cyp17a1 gene expression in the rat ovary. *Fertility and Sterility*, 99(3): 889-896.
- Padmanabhan V., Puttabyatappa M., Cardoso RC.** (2018). Hypothalamus–Pituitary–Ovary Axis. En Skinner MK (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction*. (2.^a ed., Vol. 2, pp. 121-129). New York, USA: Elsevier.

- Padmanabhan V., Veiga-Lopez A.** (2013). Animal models of the polycystic ovary syndrome phenotype. *Steroids*, 78(8): 734-740.
- Pandey V., Singh A., Singh A., Krishna A., Pandey U., Tripathi YB.** (2016). Role of oxidative stress and low-grade inflammation in letrozole-induced polycystic ovary syndrome in the rat. *Reproductive Biology*, 16(1): 70-77.
- Parborell MFA.** (2002). *Regulación del crecimiento y diferenciación del folículo ovárico por un agonista de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Pastelín CF., Rosas NH., Morales-Ledesma L., Linares R., Domínguez R., Morán C.** (2017). Anatomical organization and neural pathways of the ovarian plexus nerve in rats. *Journal of Ovarian Research*, 10(1): 1-14.
- Patel R., Shah G.** (2018). High-fat diet exposure from pre-pubertal age induces polycystic ovary syndrome (PCOS) in rats. *Reproduction*, 155(2): 139-149.
- Payer AF.** (1978). Ultrastructural study of the nerve plexus accompanying the ovarian artery and vein in the rat. *The Anatomical Record*, 190(1): 47-63.
- Pepling ME.** (2006). From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis*, 44(12): 622-632.
- Peter H.** (1970). Some aspects of early follicular development. En: AR. Midgley, WA. Sadler (Eds). *Ovarian Follicular Development and Function* (pp. 1-3). Nueva York, USA: Raven Press.
- Peters H., McNatty KP.** (1980). Ovulation. En: H. Peters, KP. McNatty (Eds.), *The ovary* (pp. 75-79). London, United Kingdom: Granada Publishing.
- Pfister CU., Martoni A., Zamagni C., Lelli G., De Braud F., Souppart C., Hornberger U.** (2001). Effect of age and single versus multiple dose pharmacokinetics of letrozole (Femara®) in breast cancer patients. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 22(5): 191-197.
- Plant TM.** (2019). The neurobiological mechanism underlying hypothalamic GnRH pulse generation: the role of kisspeptin neurons in the arcuate nucleus. *F1000Research*, 8: 1-17.
- Qin KN., Rosenfield RL.** (1998). Role of cytochrome P450c17 in polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 145(1-2): 111-121.

- Qu F., Liang Y., Zhou J., Ma RJ., Zhou J., Wang FF., Fang JQ.** (2015). Transcutaneous electrical acupoint stimulation alleviates the hyperandrogenism of polycystic ovarian syndrome rats by regulating the expression of P450arom and CTGF in the ovaries. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(5): 7754.
- Rajah R., Glaser EM., Hirshfield AN.** (1992). The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Developmental Dynamics*, 194(3): 177-192.
- Rajan RK., Kumar SS., Balaji B.** (2017). Soy isoflavones exert beneficial effects on letrozole-induced rat polycystic ovary syndrome (PCOS) model through anti-androgenic mechanism. *Pharmaceutical Biology*, 55(1): 242-251.
- Ramírez VD., Sawyer CH.** (1965). Advancement of puberty in the female rat by estrogen. *Endocrinology*, 76(6): 1158-1168.
- Rao MC., Midgley AR., Richards JS.** (1978). Hormonal regulation of ovarian cell proliferation. *Cell*, 14(1): 71-78.
- Reddy PS., Begum N., Mutha S., Bakshi V.** (2016). Beneficial effect of Curcumin in Letrozole induced polycystic ovary syndrome. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(2): 116-122.
- Reed BG., Carr BR.** (2018). The normal menstrual cycle and the control of ovulation. En: KR. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce (Eds.), *Endotext*. South Dartmouth.
- Robker RL., Richards JS.** (1998). Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1. *Molecular Endocrinology*, 12(7): 924-940.
- Rosa-e-Silva A., Guimaraes MA., Padmanabhan V., Lara HE.** (2003). Prepubertal administration of estradiol valerate disrupts cyclicity and leads to cystic ovarian morphology during adult life in the rat: role of sympathetic innervation. *Endocrinology*, 144(10): 4289-4297.
- Rosales JC., Prado A., Cerviño N.** (2006). Endocrinología de la reproducción. En G. Pagés, J. Aller (Eds.). *Infertilidad: fisiología, diagnóstico y tratamiento* (pp. 114-118.). Actualidades Médico-Odontológicas Latinoamericana.
- Rosas GG.** (2006). *Efecto de la inducción del síndrome del ovario poliquístico en la rata infantil, sobre la dinámica del crecimiento folicular y la secreción de hormonas*

- esteroides*. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México.
- Pawlina W., Ross MH.** (2015). *Histología: Texto y atlas* (7.^a ed., pp. 898-906). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Roy S., Mahesh VB., Greenblatt RB.** (1962). Effect of Dehydroepiandrosterone and Δ 4-Androstenedione on the Reproductive Organs of Female Rats: Production of Cystic Changes in the Ovary. *Nature*, 196(4849): 42-43.
- Ryan GE., Malik S., Mellon PL.** (2018). Antiandrogen treatment ameliorates reproductive and metabolic phenotypes in the letrozole-induced mouse model of PCOS. *Endocrinology*, 159(4): 1734-1747.
- Saiyed A., Jahan N., Makbul SAA., Ansari M., Bano H., Habib SH.** (2016). Effect of combination of *Withania somnifera* Dunal and *Tribulus terrestris* Linn on letrozole induced polycystic ovarian syndrome in rats. *Integrative Medicine Research*, 5(4): 293-300.
- Saltiel AR.** (1996). Diverse signaling pathways in the cellular actions of insulin. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 270(3): E375-E385.
- Salustri A.** (2004). Paracrine actions of oocytes in the mouse pre-ovulatory follicle. *International Journal of Developmental Biology*, 44(6): 591-597.
- Sanborn BM., Heindel JJ., Robison GA.** (1980). The role of cyclic nucleotides in reproductive processes. *Annual Review of Physiology*, 42(1): 37-57.
- Sánchez-Criado JE.** (1999). Fisiología del Ovario. En JA. Tresguerres (Ed.) *Fisiología Humana* (2.^a ed., pp. 1020-1032) Madrid, España: Mc Graw-Hill Interamericana.
- Santamaría CG., Abud JE., Porporato MM., Meyer N., Zenclussen AC., Kass L., Rodríguez, HA.** (2019). The UV filter benzophenone 3, alters early follicular assembly in rat whole ovary cultures. *Toxicology Letters*, 303: 48-54.
- Santen RJ., Brodie H., Simpson ER., Siiteri PK., Brodie A.** (2009). History of aromatase: saga of an important biological mediator and therapeutic target. *Endocrine Reviews*, 30(4): 343-375.
- Santen RJ., Song RX., Zhang Z., Kumar R., Jeng MH., Masamura S., Berstein L.** (2003). Adaptive hypersensitivity to estrogen: mechanism for superiority of

- aromatase inhibitors over selective estrogen receptor modulators for breast cancer treatment and prevention. *Endocrine-Related Cancer*, 10(2): 111-130.
- Schmidt G., Jörgensen J., Kannisto P., Liedberg F., Ottesen B., Owman C.** (1990). Vasoactive intestinal polypeptide in the PMSG-primed immature rat ovary and its effect on ovulation in the isolated rat ovary perfused in vitro. *Reproduction*, 90(2): 465-472.
- Semenova II.** (1969). Adrenergic innervation of ovaries in Stein-Leventhal syndrome. *Vestnik Akademii Meditsinskikh Nauk SSSR*, 24(9): 58-62.
- Shafiee MN., Chapman C., Barrett D., Abu J., Atiomo W.** (2013). Reviewing the molecular mechanisms which increase endometrial cancer (EC) risk in women with polycystic ovarian syndrome (PCOS): time for paradigm shift? *Gynecologic Oncology*, 131(2): 489-492.
- Shi D., Vine DF.** (2012). Animal models of polycystic ovary syndrome: a focused review of rodent models in relationship to clinical phenotypes and cardiometabolic risk. *Fertility and Sterility*, 98(1): 185-193.
- Shirazi A., Moalemian Z.** (2007). Ovine cumulus cells estradiol-17 β production in the presence or absence of oocyte. *Animal Reproduction Science*, 101(1-2): 125-133.
- Silva VR.** (2010). Síndrome de ovario poliquístico e infertilidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 21(3): 387-396.
- Silverman AJ., Jhamandas J., Renaud LP.** (1987). Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence. *Journal of Neuroscience*, 7(8): 2312-2319.
- Singh KB.** (2005). Persistent estrus rat models of polycystic ovary disease: an update. *Fertility and Sterility*, 84: 1228-1234.
- Sir TP., Preisler RJ., Magendzo NA.** (2013). Síndrome de ovario poliquístico. diagnóstico y manejo. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(5): 818-826.
- Sirmans SM., Pate KA.** (2014). Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. *Clinical Epidemiology*, 6:1-13.
- Skarra DV., Hernández-Carretero A., Rivera AJ., Anvar AR., Thackray VG.** (2017). Hyperandrogenemia induced by letrozole treatment of pubertal female mice results

- in hyperinsulinemia prior to weight gain and insulin resistance. *Endocrinology*, 158(9): 2988-3003.
- Smith-White S., Ojeda SR.** (1981). Changes in Ovarian Luteinizing (LH) and Follicle Stimulating Hormone (FSH) Receptor Content and in Gonadotropin-Induced Ornithinedecarboxylase Activite During Prepubertal and Pubertal Development of the Rat. *Endocrinology*, 109:152-161.
- Speroff L.** (1983). Ovario. En P. Felig, JD. Baxter, AE. Broadus, LA. Frohman (Eds.), *Endocrinología y Metabolismo* (pp. 711-725). México: Editorial McGraw-Hill.
- Speroni AF.** (2016). Diccionario de anatomía e histología. Series: Libros de Cátedra. Buenos Aires, Argentina: Editorial de la Universidad de La Plata.
- Stein IF., Leventhal ML.** (1935). Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 29: 181-191.
- Stener-Victorin E., Lundeberg T., Cajander S., Aloe L., Manni L., Waldenström U., Janson PO.** (2003). Steroid-induced polycystic ovaries in rats: effect of electroacupuncture on concentrations of endothelin-1 and nerve growth factor (NGF), and expression of NGF mRNA in the ovaries, the adrenal glands, and the central nervous system. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(1): 33.
- Strauss III JF., Bhavi M., McAllister JM.** (2014). Regulation of Steroidogenesis. En Ulloa-Aguirre A., Conn P. M. (Eds.), *Cellular endocrinology in health and disease* (1.^a ed., pp. 285-309). New York, USA: Academic Press.
- Strauss III JF., Williams JC.** (2009). Neuroendocrinology of Reproduction. En: Strauss JF., Barberi RL. (Eds.), *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology* (6.^a ed., pp. 155-190). New York, USA: Elsevier.
- Sun J., Jin C., Wu H., Zhao J., Cui Y., Liu H., Zhu B.** (2013). Effects of electroacupuncture on ovarian P450arom, P450c17 α and mRNA expression induced by letrozole in PCOS rats. *PLoS One*, 8(11):1-10.
- Taketani Y.** (1990). Pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Hormone Research in Paediatrics*, 33(2): 3-4.
- Tapia FL.** (2007). Citología del tracto genital femenino y de la glándula mamaria. (pp. 223-227). Madrid, España: Editorial Vértice.

- Teede H., Deeks A., Moran L.** (2010). Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC medicine*, 8(1): 1-10.
- Tehrani FR., Noroozadeh M., Zahediasl S., Piryaei A., Azizi F.** (2014). Introducing a rat model of prenatal androgen-induced polycystic ovary syndrome in adulthood. *Experimental Physiology*, 99(5): 792-801.
- Tena-Sempere M.** (2014). Control of the GnRH Pulse Generator. En: A. Ulloa-Aguirre, PM. Conn, (Eds.), *Cellular endocrinology in health and disease* (1.^a ed., pp. 311-323). New York, USA: Academic Press.
- Toda K., Takeda K., Okada T., Akira S., Saibara T., Kaname T., Shizuta Y.** (2001). Targeted disruption of the aromatase P450 gene (Cyp19) in mice and their ovarian and uterine responses to 17beta-oestradiol. *Journal of Endocrinology*, 170(1): 99-111.
- Tonetta SA., Dizerega GS.** (1989). Intraovarian regulation of follicular maturation. *Endocrine Reviews*, 10(2): 205-229.
- Tresguerres JHF.** (2010). Fisiología del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. En JA. Tresguerres (Ed.), *Fisiología humana* (4.^a ed., pp.1042-1058) Madrid, España: Editorial McGraw-Hill.
- Tresguerres JAF., Castillo C.** (2005). Fisiología del eje hipotálamo-hipófisis-ovárico. En FM Teruel, V Cachofeiro, MR. Pardo, EAB. de Lugo, JAFT. Hernández, JT Menéndez, JAH. Tresguerres (Eds.), *Fisiología Humana* (3.^a ed., pp. 1007-1023). Distrito Federal, México: McGraw-Hill.
- Trujillo A., Gutiérrez G., Linares R., Cortés MC., Eguibar J.** (2015). El Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovarios Un Viejo Conocido, Nuevos Hallazgos y más por Conocer. En: *Procesos Fisiológicos y Toxicológicos de la Reproducción* (pp. 95-111). Puebla, México: Editorial BUAP, Dirección de Fomento Editorial.
- Tsafiriri A., Reich R.** (1999). Molecular aspects of mammalian ovulation. *Experimental And Clinical Endocrinology and Diabetes*, 107(1): 1-11.
- Uchida S., Kagitani F., Hotta H., Hanada T., Aikawa Y.** (2005). Cutaneous mechanical stimulation regulates ovarian blood flow via activation of spinal and supraspinal

- reflex pathways in anesthetized rats. *The Japanese Journal of Physiology*, 55(5): 265-277.
- Uilenbroek J.T.J., Richards J.S.** (1979). Ovarian follicular development during the rat estrous cycle: gonadotropin receptors and follicular responsiveness. *Biology of Reproduction*, 20(5): 1159-1165.
- Ullah A., Jahan S., Razak S., Pirzada M., Ullah H., Almajwal A., Rauf N., Afsar T.** (2017). Protective effects of GABA against metabolic and reproductive disturbances in letrozole induced polycystic ovarian syndrome in rats. *Journal of Ovarian Research*, 10(1): 62.
- Ulloa-Aguirre A., Timossi C.** (2000). Biochemical and functional aspects of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins. *Reproductive BioMedicine Online*, 1(2): 48-62.
- Urbanski H.F., Ojeda S.R.** (1985). The juvenile-peripubertal transition period in the female rat: establishment of a diurnal pattern of pulsatile luteinizing hormone secretion. *Endocrinology*, 117(2): 644-649.
- Urbanski H.F., Ojeda S.R.** (1986). The development of afternoon minisurges of luteinizing hormone secretion in prepubertal female rats is ovary dependent. *Endocrinology*, 118(3): 1187-1193.
- Urbanski H.F., Ojeda S.R.** (1987). Gonadal-independent activation of enhanced afternoon luteinizing hormone release during pubertal development in the female rat. *Endocrinology*, 121(3): 907-913.
- Vanderhyden B.C., Armstrong D.T.** (1989). Role of cumulus cells and serum on the in vitro maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biology of Reproduction*, 40: 720-728.
- Venegas B., Gordillo LYDL., 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): 1-10.
- Venegas B., Padilla J.F., Juárez C.E., Morán J.L., Morán C., Rosas-Murrieta N.H., Domínguez R.** (2015). Effects of ovarian dopaminergic receptors on ovulation. *Endocrine*, 50(3): 783-796.

- Vidal JD., Dixon D.** (2018). Ovary. En: Suttie AW. (Ed.), *Boorman's Pathology of the Rat*. (2.^a ed., pp. 523-536). London, United Kingdom: Academic Press.
- Vizcaíno MC., Gómez JE., Weining RM.** (2006). Síndrome del ovario poliquístico. (pp 63-68). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Walters KA., Allan CM., Handelsman DJ.** (2012). Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biology of Reproduction*, 86(5): 149-151.
- Ward RC., Costoff A., Mahesh VB.** (1978). The induction of polycystic ovaries in mature cycling rats by the administration of dehydroepiandrosterone (DHA). *Biology of Reproduction*, 18(4): 614-623.
- Waterman MR., Keeney DS.** (1996). Signal transduction pathways combining peptide hormones and steroidogenesis. *Vitamins and Hormones*, 52: 129-148.
- Webber LJ., Stubbs S., Stark J., Trew GH., Margara R., Hardy K., Franks S.** (2003). Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *The Lancet*, 362(9389): 1017-1021.
- Wickenheisser JK., Nelson-DeGrave VL., McAllister JM.** (2006). Human ovarian theca cells in culture. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 17(2): 65-71.
- Wildt L., Häusler A., Marshall G., Hutchison JS., Plant TM., Belchetz PE., Knobil E.** (1981). Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology*, 109(2): 376-385.
- Williams CL., Stancel GM.** (1996). Estrógenos y Progestágenos. En: Goodman y Gilman (Eds.) *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (9.^a ed., pp. 1497-1529). México: Editorial McGraw-Hill Interamericana.
- Willis DS., Watson H., Mason HD., Galea R., Brincat M., Franks S.** (1998). Premature response to luteinizing hormone of granulosa cells from anovulatory women with polycystic ovary syndrome: relevance to mechanism of anovulation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(11): 3984-3991.
- Winuthayanon W., Hewitt SC., Orvis GD., Behringer RR., Korach KS.** (2010). Uterine epithelial estrogen receptor α is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(45): 19272-19277.

- Witchel SF.** (2006). Puberty and polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 254: 146-153.
- Wood JR., Cupp AS.** (2018). Aromatization. En MK. Skinner (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction* (2.^a ed., Vol. 1, pp. 195-201). San Diego, USA: Elsevier.
- Wu XY., Li ZL., Wu CY., Li YM., Lin H., Wang SH., Xia OWF.** (2010). Endocrine traits of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female Sprague-Dawley rats. *Endocrine Journal*, 1-9.
- Wuttke W., Honma K., Lamberts R., Höhn KG.** (1980). The role of monoamines in female puberty. *Federation Proceedings*, 39 (7): 2378-2383.
- Yoffe N., Bronshtein M., Brandes J., Blumenfeld Z.** (1991). Hemorrhagic ovarian cyst detection by transvaginal sonography: the great imitator. *Gynecological Endocrinology*, 5(2): 123-129.
- Yoshimoto FK., Guengerich FP.** (2014). Mechanism of the third oxidative step in the conversion of androgens to estrogens by cytochrome P450 19A1 steroid aromatase. *Journal of the American Chemical Society*, 136(42): 15016-15025.
- Zarrow MX., Naqvi RH., Denenberg VH.** (1969). Androgen-induced precocious puberty in the female rat and its inhibition by hippocampal lesions. *Endocrinology*, 84(1): 14-19.
- Zawadzski JK., Dunaif A.** (1992). Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. En A. Dunaif, J. Given, F. Haseltine, G. Merriam (Eds.), *Polycystic Ovary Syndrome*. (pp. 39-50). Cambridge, USA: Blackwell Scientific Publications.
- Zurvarra FM., Salvetti NR., Mason JL., Velazquez MM., Alfaro NS., Ortega HH.** (2009). Disruption in the expression and immunolocalisation of steroid receptors and steroidogenic enzymes in letrozole-induced polycystic ovaries in rat. *Reproduction, Fertility and Development*, 21(7): 827-839.

XLIII — Reunión Anual —
DE LA ACADEMIA DE INVESTIGACIÓN
EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN



Puebla, Puebla, 27 al 30 de Mayo de 2018, Salón de proyecciones del Edificio Carolino

LA ACADEMIA DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN A.C.

OTORGA LA PRESENTE
CONSTANCIA

A

**Meza-Medina MF, Acuña-Escalona XN, Sánchez-Solís K, Linares R,
Morales-Ledesma L.**

Por la presentación del trabajo en cartel:

EFFECTO DE LA INYECCIÓN DE LETROZOL SOBRE LA RESPUESTA OVULATORIA DE LA RATA

durante la XLIII Reunión Anual de la AIBIR que se llevó a cabo del 27 al 30 de Mayo de 2018 en la ciudad de Puebla, Pue.

Dra. Angélica Trujillo Hernández
PRESIDENTE

Dra. Carolina Morán Raya
SECRETARIA



ANEXOS



SOCIEDAD MEXICANA DE
CIENCIAS FISIOLÓGICAS, A.C.



EDUCACIÓN CON
RESPONSABILIDAD
SOCIAL
UNIVERSIDAD DE COLIMA
COORDINACIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

OTORGA LA PRESENTE CONSTANCIA A:

María Fernanda Meza Medina

QUIEN ASISTIÓ Y PRESENTÓ EL TRABAJO

Efecto de la inyección de letrozol sobre la morfología ovárica de la rata

POR:

**Meza Medina María Fernanda, Acuña Escalona Xóchitl Nallely, Venegas Meneses Berenice,
Linares Culebro Rosa y Morales Ledesma Leticia**

En la modalidad de cartel durante el LXI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas del 12 al 16 de agosto del 2018 en la ciudad de Colima, Col.

Atentamente
Comité Organizador

Dr. Benjamín Florán Garduño
Presidente

Dr. José Clemente Vásquez Jiménez
Director del CUIB Universidad de Colima

Dr. Daniel Ortuño Sahagún
Vicepresidente

Dra. Ma. del Carmen Cortés Sánchez
Secretaria

Dra. Consuelo Morgado-Valle
Tesorera

ANEXOS

LA ACADEMIA DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN A.C.



**OTORGA LA PRESENTE
CONSTANCIA A**

**Meza-Medina MF, Linares R, Sánchez-Solis K, Ramírez-
Ramírez A, Acuña-Escalona XN, Morales-Ledesma L.**

Por la presentación del trabajo en cartel:

**EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS AROMATASAS SOBRE LA
RESPUESTA OVULATORIA DE LA RATA ADULTA**

**durante la XLIV Reunión Anual del AIBIR que se llevó a cabo del
26-29 de mayo del 2019. Oaxaca, Oax.**


Dra. Angélica Trujillo Hernández
PRESIDENTE


Dra. Carolina Morán Raya
SECRETARIA



LXII CONGRESO NACIONAL
SOCIEDAD MEXICANA DE
CIENCIAS FISIOLÓGICAS, A.C



OTORGA LA PRESENTE CONSTANCIA A:

Ma. Fernanda Meza Medina

QUIEN ASISTIÓ Y PRESENTÓ EL TRABAJO:

Efecto de la denervación noradrenérgica sobre la función
ovárica en la rata inyectada con letrozol

POR:

Meza Medina María Fernanda, Linares Culebro Rosa, Sánchez Solís Karina,
Cervantes Palafox Michelle Ariadna, Morales Ledesma Leticia

En presentación oral durante el LXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana
de Ciencias Fisiológicas, A. C. del 11 al 15 de agosto del 2019 en la Ciudad de Querétaro, Qro.

Dr. Benjamin Florán Garduño
Presidente de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas

Dra. Leticia Morales Ledesma
Rectora de la Universidad Autónoma de Querétaro



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA
DE MÉXICO



Constancia

Que otorga la
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA
a través de la Unidad de
Formación Integral

A María Fernanda Meza Medina, Rosa Linares
Culebro, Adriana Ramírez Ramírez, Ariadna
Michelle Cervantes Palafox, Xóchitl Nallely
Acuña Escalona y Leticia Morales Ledesma

Por su participación en la modalidad de **Exposición oral**,
titulada: *“Efecto de la sección bilateral del nervio ovárico
superior sobre la función ovárica en la rata inyectada con
letrozol”*, en el marco del **XXIV Foro de Investigación Escolar
en Biología**; organizado por la Carrera de Biología, el día 9 de
agosto del año en curso.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, 20 de septiembre de 2019.



Dr. Vicente Jesús Hernández Abad
Director



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA
DE MÉXICO



Constancia

Que otorga la
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA
a través de la Unidad de
Formación Integral

A María Fernanda Meza Medina, Rosa Linares Culebro, Adriana Ramírez Ramírez, Xóchitl Nallely Acuña Escalona, Karina Sánchez Solís y Leticia Morales Ledesma

Por su participación en la modalidad de **Exposición oral**, titulada: “*Efecto de la inhibición de la actividad aromataasa en ratas infantiles sobre la función ovárica en la rata púber*”, en el marco del **XXV Foro de Investigación Escolar**; organizado por la Carrera de Biología, el día 31 de enero del año en curso.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad de México, 4 de febrero del 2020.



Dr. Vicente Jesús Hernández Abad
Director