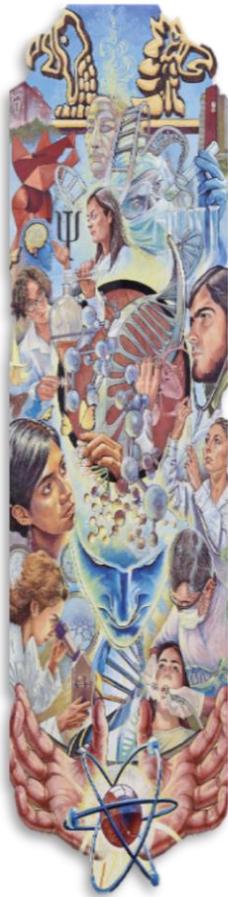




# Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



EFECTO DE LA MICROINYECCIÓN UNILATERAL DE  
GUANETIDINA EN LA BURSA OVÁRICA DE RATAS  
CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO  
SOBRE LA FUNCIÓN OVÁRICA

## T E S I S

Que para obtener el título de  
**Química Farmacéutico Bióloga**

## P R E S E N T A

Karina Sánchez Solís



DIRECTORA DE TESIS

Dra. Rosa Linares Culebro

ASESORAS

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dra. Juana Rosado Pérez

CDMX, a 7 Diciembre de 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.

## **AGRADECIMIENTOS**

*A la UNAM por todos los aprendizajes profesionales y personales que me ha brindado, por convertirse en mi segunda casa.*

*A la Dra. Rosa Linares, por brindarme la oportunidad de trabajar con usted, por todo el conocimiento que me brindó, porque bien dicen que ustedes se convierten en nuestras mamás académicas. Gracias por la confianza, paciencia y apoyo para la realización de este trabajo, y gracias por transmitirme parte de su amor y vocación para la investigación.*

*A la Dra. Leticia Morales, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por confiar en una QFB para esta línea de investigación, y sobre todo por siempre estar atenta en que sigamos nuestras metas tanto personales como profesionales e impulsarnos a seguir creciendo.*

*A los miembros del jurado:*

*Dra. Juana Rosado, Dra. Gabriela Rosas y Dra. Elizabeth Vieyra, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y sus aportaciones que contribuyeron a la mejora del mismo.*

*Al todo el personal del bioterio especialmente a las Dras. Adriana y Elizabeth y al Dr. Román, por los cuidados y atenciones con los animales utilizados en esta investigación. A las ratas de la cepa CII-ZV.*

*Al Biol. Roberto Chavira por su ayuda en la cuantificación de hormonas esteroides.*

*A mis compañeros del Laboratorio de Fisiología reproductiva de UMIEZ, los que han egresado durante mi estancia en el mismo y los que están en proceso, gracias por enriquecer el proyecto durante cada seminario, por el apoyo recibido en la parte experimental y sobre todo por hacer más amena la estadía en el laboratorio.*

*A la Dra. Azu Espinoza, gracias por los comentarios, observaciones y consejos para la realización de este trabajo.*

*Esta investigación recibió apoyo financiero por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) convenio No. IN216519.*

## **DEDICATORIAS**

*A mi mamá Alicia Solis, no existen palabras que me permitan agradecer todo que has hecho y haces y por mí, gracias por confiar en que podríamos romper los esquemas. Gracias por acompañarme en cada desvelo, por cuidarme y protegerme. Gracias por estar conmigo siempre, por guiarme en todo momento. Esto es más fruto de tu esfuerzo que del mío. Te amo mamá.*

*A mis hermanos Ernesto y Gustavo, gracias por protegerme, guiarme y apoyarme, sin ustedes esto tampoco habría sido posible, los amo mucho.*

*A Gus, por recordarme que no todo es escuela, por siempre estar al pendiente de mí.*

*A mis sobrinos Santi, Xime y Sofi, por ser la mejor motivación.*

*A mis personas favoritas, Santi y Xime, por llenarme la vida de amor y risas, por siempre andar molestando a su tía Yaya. Los amo mucho.*

*A Bibiana, mi psicóloga de cabecera, gracias infinitas por escucharme y aconsejarme cuando más lo necesito. Te quiero.*

*A mis abuelitos Juan Solis y Florentina Diosdado, gracias por confiar en que lo lograría, por creer en mí y estar siempre. Los quiero mucho.*

*A Lupe, por estar conmigo desde CCH y compartir con emoción cada logro, gracias por crecer conmigo, te adoro amiga.*

*A Pame, por ser como la hermana que no tuve, por cruzarte en mi camino y llenar de amor mi vida, porque aunque lejos siempre estás cerca, te adoro bebé.*

*A Santi Iturbe, por todo el amor que tienes para mí, por impulsarme a crecer y lograr mis metas, por siempre estar en las buenas y no tan buenas. Tú le haces bien a mi mundo. Te amo.*

*A mi papá Elias Sánchez, nos hizo falta tiempo. Nos vemos en la eternidad. Te amo.*

# CONTENIDO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	i
RESUMEN.....	ii
INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO .....	2
Etapas del desarrollo postnatal en la rata.....	3
Ciclo estral de la rata .....	7
Diferenciación gonadal.....	10
Ovario .....	11
Bursa ovárica .....	15
Foliculogénesis .....	17
Ovulación.....	22
Atresia folicular .....	24
Esteroidogénesis ovárica .....	28
Regulación neuroendocrina de las funciones ováricas .....	32
Inervación Ovárica .....	34
Papel de la inervación simpática en la regulación de las funciones del ovario.....	37
Síndrome de ovario poliquístico .....	40
Modelos de inducción del síndrome de ovario poliquístico .....	42
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	46
HIPÓTESIS .....	47
OBJETIVOS.....	47
MATERIAL Y MÉTODOS.....	48
RESULTADOS .....	58
Ciclo estral.....	58
Peso corporal y el peso relativo de órganos.....	59
Ovulación.....	61
Morfología ovárica.....	63
Concentración sérica de hormonas esteroides .....	66
Inmunoreactividad de TH en los ovarios.....	71
DISCUSIÓN.....	73
CONCLUSIÓN.....	82
PERSPECTIVAS .....	83
REFERENCIAS .....	85

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**17 $\beta$ -HSD:** 17 $\beta$ -hidroxiesteroide  
deshidrogenasa

**3 $\beta$ -HSD:** 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa

**AMPc:** Adenosina monofosfato cíclico

**ATP:** Trifosfato de adenosina

**BD:** Bursa ovárica derecha

**BI:** Bursa ovárica izquierda

**CGRP:** Péptido relacionado con el gen que  
codifica a la calcitonina

**DHEA:** Dehidroepiandrosterona

**FPM:** Factor promotor de maduración

**FSH:** Hormona folículo estimulante

**GCMS:** Ganglio celiaco mesentérico superior

**GMPc:** Guanosina monofosfato cíclico

**GnRH:** Hormona liberadora de  
gonadotropinas

**GTD:** Guanetidina

**HA:** Hiperandrogenismo

**hCG:** Gonadotropina coriónica humana

**IGF:** Factor de crecimiento similar a la  
insulina

**IM:** Intramuscular

**IP:** intraperitoneal

**LH:** Hormona luteinizante

**MAO:** Monoaminooxidasas

**NA:** Noradrenalina

**NGF:** Factor de crecimiento nervioso

**NOS:** Nervio ovárico superior

**NPO:** Nervio del plexo ovárico

**NPY:** Neuro-péptido Y

**NV:** Nervio vago

**OA:** Oligo-Anovulación

**PKA:** Proteincinasa A

**PO:** Peso ovárico

**QO:** Quistes ováricos

**RA:** Receptor de andrógenos

**SOPQ:** Síndrome de ovario poliquístico

**SP:** Sustancia P

**SS:** Solución salina

**StAR:** Proteína reguladora de la  
esteroidogénesis aguda

**TH:** Tirosina hidroxilasa

**TNF- $\alpha$ :** Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$

**VE:** Valerato de estradiol

**VEGF:** Factor de crecimiento del endotelio  
vascular

**VIP:** Péptido intestinal vasoactivo

## RESUMEN

El síndrome de ovario poliquístico (SOPQ) es un trastorno neuroendócrino-metabólico, caracterizado por hiperandrogenismo, oligo-anovulación y quistes ováricos. La etiología del SOPQ se encuentra asociada a la hiperactividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario, ya que la eliminación de estas por la sección bilateral del nervio ovárico superior (NOS) restablece la ovulación, lo que sugiere que alguno de los neurotransmisores que transcurre por este paquete nervioso participa en el desarrollo de dicho síndrome. Mediante modelos de denervación farmacológica por la administración i.p. de agentes neurotóxicos como la guanetidina (GTD), se restablece las funciones del ovario. Sin embargo, estos resultados no permiten discernir si dicho restablecimiento se debe exclusivamente a la disminución en la concentración de noradrenalina (NA) en el ovario.

Para evaluar el papel de la NA ovárica en la persistencia del SOPQ, en el presente estudio se analizó en animales con SOPQ, inducido por la inyección de valerato de estradiol (VE), el efecto de la denervación noradrenérgica de una de las gónadas con GTD. Para ello, ratas hembras de la cepa CII-ZV de 14 días de edad fueron inyectadas vía intramuscular con 2.0 mg de VE disuelto en 0.1 mL de aceite de sésamo, que fungió como el vehículo. A los 60 días de edad se les inyectó en la bursa ovárica izquierda (BI) o derecha (BD) 50 mg/kg de GTD disuelta en 20  $\mu$ L de solución salina (SS). Los animales fueron sacrificados entre los 64-68 días de edad en el día del estro vaginal y se evaluó el ciclo estral, la respuesta ovulatoria, la morfología ovárica, la concentración sérica de hormonas esteroideas, y la inmunoreactividad de las fibras simpáticas, mediante la expresión de tirosina hidroxilasa (TH).

La administración de VE resultó en irregularidad del ciclo estral, el bloqueo de la ovulación, morfología ovárica poliquística, incremento en la concentración sérica de testosterona y mayor expresión de TH en las tecas de prequistes. Estos efectos fueron revertidos por la microinyección de GTD en la bursa ovárica izquierda o derecha, en donde se recupera el patrón del ciclo estral en más del 50% de los animales, se restablece la ovulación por ambos ovarios en el 80% de los animales con una cuota ovulatoria similar a la de un animal control (VE+GTD BI:  $9.5 \pm 0.9$  vs. VE+SS BI: 0; VE+GTD BD:  $9.8 \pm 1$  vs. VE+SS BD: 0), y en la morfología ovárica se observan folículos en diferentes estadios del desarrollo sin inmunoreactividad a TH en el ovario microinyectado, mientras que, el ovario sin tratamiento aún presenta quistes que expresan TH, además de la disminución de la concentración sérica de testosterona (VE+GTD BI:  $24.8 \pm 7.1$  vs. VE+SS BI:  $68.2 \pm 3.7$  pg/mL; VE+GTD BD:  $22.0 \pm 4.2$  vs. VE+SS BD:  $126.6 \pm 21.3$  pg/mL).

Estos resultados permiten sugerir que en el animal con SOPQ inducido por la administración de VE, la NA ovárica proveniente de la inervación simpática regula de manera inhibitoria la ovulación y el desarrollo folicular, y de manera estimulante la secreción de testosterona así como la expresión de TH, y que entre los ovarios existen vías de comunicación noradrenérgicas que viajan vía el NOS.

## INTRODUCCIÓN

Los ovarios son los encargados de realizar dos funciones: la síntesis de hormonas y la ovulación. Ambas funciones están reguladas por señales endócrinas y nerviosas. La alteración de estas vías, tal como el incremento de la actividad nerviosa resulta en el desarrollo de fisiopatologías como el síndrome de ovario poliquístico (SOPQ). Este síndrome se caracteriza por la presencia de hiperandrogenismo acompañado de oligoanovulación y/o morfología ovárica poliquística.

En la actualidad aproximadamente el 6.6% de las mujeres mexicanas lo padecen y se sabe que algunas complicaciones de la fisiopatología pueden traer consigo el desarrollo de otras alteraciones metabólicas como sobrepeso, dislipidemias y resistencia a la insulina, que culminan en un cuadro de infertilidad.

La etiología del SOPQ se asocia entre otras cosas a la hiperactividad de las fibras noradrenérgicas que llegan al ovario vía el Nervio Ovárico Superior (NOS). La disminución de la hiperactividad simpática por la sección del NOS o bien mediante la denervación farmacológica restablece las funciones del ovario. Sin embargo, estos resultados no permiten discernir el papel de la noradrenalina a nivel ovárico sobre el desarrollo y persistencia del SOPQ, por lo que en el presente estudio se evaluará el efecto de la microinyección intrabursal de un agente neurotóxico como la guanetidina, sobre las funciones del ovario.

## MARCO TEÓRICO

La función ovárica es regulada por señales endocrinas y nerviosas. La alteración en alguna de estas vías de regulación resulta en el desarrollo de patologías como el síndrome de ovario poliquístico (SOPQ)<sup>1</sup>.

El SOPQ es la fisiopatología más común en mujeres de edad reproductiva. De forma clínica muestra diversos signos y síntomas entre los cuales se incluyen: el hiperandrogenismo clínico o bioquímico, oligo-anovulación y morfología ovárica poliquística<sup>2</sup>.

Debido a la variedad de fenotipos, la etiología del SOPQ es controversial. Una de las hipótesis que se plantean para explicar su desarrollo es la hiperactividad de las fibras noradrenérgicas que llegan al ovario vía el nervio ovárico superior (NOS)<sup>3</sup>. Un modelo que permite analizar el papel de la noradrenalina (NA) en la persistencia del SOPQ es el del animal inyectado con 2.0 mg de valerato de estradiol (VE), un estrógeno de larga actividad que provoca hiperactividad de las fibras simpáticas que inervan al ovario, lo que resulta en el desarrollo de las características de diagnóstico presentes en la mujer con dicha fisiopatología<sup>4,5</sup>.

La sección bilateral del NOS principal aporte noradrenérgico de la gónada, disminuye la concentración de NA ovárica, culminando en el restablecimiento de la ovulación y en la normalización de las concentraciones séricas de hormonas esteroides<sup>6</sup>. Sin embargo, Morales y colaboradores (4) mostraron que cuando se realiza la sección unilateral del NOS, se restablece la ovulación en el ovario inervado, no así en el denervado. Por otro lado, se ha mostrado que en animales con SOPQ, inducido por la inyección de VE, la

administración crónica de guanetidina (GTD) (cinco días a la semana durante tres semanas), un agente neurotóxico que destruye fibras noradrenérgicas, resulta en el restablecimiento de la ovulación y la normalización de la concentración de hormonas esteroides<sup>7</sup>. Sin embargo, estos resultados no permiten discernir si dicho restablecimiento se debe exclusivamente a la disminución de la NA ovárica.

A continuación se desarrolla la información teórica más relevante que permite delimitar y sustentar la presente investigación.

### **Etapas del desarrollo postnatal en la rata**

Existe cierta similitud en los procesos involucrados en la reproducción y la regulación de la función ovárica entre la rata y la mujer<sup>8</sup>. La rata nace en un estado de inmadurez equivalente a 150 días de gestación en el humano; en este momento se produce la diferenciación sexual del encéfalo, por la presencia o ausencia de testosterona<sup>9</sup>.

La pubertad en la rata hembra inicia con la apertura vaginal que se presenta entre los 35 a 40 días de edad, y se acompaña de cambios morfológicos y fisiológicos que desarrollarán los mecanismos que regulan la reproducción<sup>9</sup>.

El desarrollo postnatal en la rata hembra puede dividirse en cuatro etapas<sup>9</sup>:

- **Neonatal, abarca del día cero de nacimiento al día siete de vida:**

Al inicio de esta etapa el crecimiento folicular es independiente de la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). En el quinto día de desarrollo se observa la formación de receptores para FSH, mientras que, los receptores para la LH comienzan a presentar actividad a partir del día siete postnatal<sup>10</sup>.

Durante esta etapa, la FSH estimula la síntesis de la aromatasa la cual cataliza la formación de estradiol a partir de testosterona; sin embargo, la presencia de  $\alpha$ -fetoproteína en suero inactiva a los estrógenos al unirse a ellos<sup>9</sup>. Al final de esta etapa el ovario comienza a tener respuesta esteroideogénica, la FSH aumenta y la hormona luteinizante (LH) se mantiene baja<sup>9</sup>.

- **Infantil, abarca del día ocho al día 21 de vida:**

Durante esta etapa se presentan concentraciones altas de FSH que permiten el reclutamiento de los folículos para su posterior ovulación; la LH presenta picos esporádicos. Hacia el día 15 de vida disminuyen las concentraciones de FSH y desaparecen los picos de LH. Comienza a detectarse inhibina en suero que induce la supresión de la FSH a nivel hipofisiario, lo que estimula el feedback negativo de estradiol; por otro lado la desaparición de la  $\alpha$ -fetoproteína condiciona también un estímulo de retroalimentación negativo del estradiol a nivel hipotalámico<sup>9</sup>.

En ratas de la cepa CII-ZV se observa que entre los 14 y 16 días de edad la concentración de LH incrementa y tiende a disminuir en las etapas posteriores del desarrollo. La concentración de progesterona no se modifica, mientras que, la concentración sérica de

estradiol incrementa a medida que avanza el desarrollo de la rata. Por otro lado, entre los 10 y 16 días de edad predominan los folículos pequeños (<350 µm de diámetro), los cuales en el día 12 y 14 muestran una mayor incidencia de atresia. A partir del día 18 de desarrollo se observan folículos medianos (350- 499 µm de diámetro), los cuales en la etapa subsecuente son más propensos a la atresia. A partir del día 21 de vida se observan folículos preovulatorios<sup>11</sup>.

- **Juvenil, abarca del día 22 al día 30 de vida:**

En esta etapa la FSH disminuye, al inicio las concentraciones de LH son bajas. Al final del periodo la LH se comienza a secretar de manera pulsátil con una mayor amplitud de los pulsos durante la tarde, lo que establece un ritmo de secreción circadiano. En el ovario aumentan los receptores a LH, lo que conduce a una mayor esteroidogénesis. El estradiol proveniente de la esteroidogénesis induce el estímulo de retroalimentación positivo sobre la LH y negativo sobre la FSH<sup>9</sup>.

- **Peripúber a partir del día 30 de vida y hasta la apertura vaginal:**

Se establece el patrón circadiano de LH mediante la presencia de un pico por la tarde independiente del control esteroideo. En el ovario aumentan los receptores para FSH y LH, lo que incrementa la respuesta esteroidogénica. Las altas concentraciones de esteroides estimulan en el hipotálamo el pico preovulatorio de gonadotropinas que conduce a la primer ovulación<sup>9</sup>.

En ratas de la cepa CII-ZV en los días previos a la apertura vaginal (del día 35 al 38 de desarrollo postnatal), se observa un incremento en la concentración de progesterona; además, el incremento en la concentración de estradiol que comenzó en la etapa infantil se hace más evidente en el día 38 de vida del animal<sup>11</sup>.

## Ciclo estral de la rata

La actividad reproductiva de los animales se presenta de forma cíclica, cada ciclo comprende el tiempo transcurrido entre un celo y otro. En la rata, el ciclo estral tiene una duración de cuatro a cinco días y puede dividirse en cuatro fases<sup>12</sup> (Figura 1):

- **Diestro 1 ó Metaestro:** Se caracteriza por un predominio de leucocitos, con ausencia de células epiteliales nucleadas o células epiteliales escamosas cornificadas. Tiene una duración de seis a ocho horas<sup>8</sup>. La concentración de progesterona aumenta debido a la actividad esteroideogénica del cuerpo lúteo formado después de la ovulación, ello genera un estímulo de retroalimentación negativa sobre la secreción de gonadotropinas<sup>8, 12</sup>.
- **Diestro 2:** Presenta un predominio de leucocitos, acompañados por escasas células epiteliales nucleadas o células epiteliales escamosas cornificadas. Su duración es de 55 a 57 horas<sup>8</sup>. En ausencia de fecundación, se produce la degeneración del cuerpo lúteo mediante la luteólisis, lo que provoca la disminución en la concentración de progesterona y estrógenos. El útero se dilata y es poco contráctil, la mucosa vaginal es delgada<sup>12</sup>. Durante la tarde del diestro 2, el ovario secreta estradiol que actúa como un estímulo de retroalimentación positiva que induce la secreción de LH en el proestro<sup>8</sup>.
- **Proestro:** En esta etapa hay un predominio de células epiteliales redondas nucleadas que pueden aparecer en grupos o individuales, ocasionalmente pueden observarse algunas células epiteliales escamosas cornificadas y la ausencia de leucocitos. Tiene una duración de 12 a 14 horas<sup>8</sup>. El crecimiento de los folículos

ováricos inducido por la FSH ocasiona el incremento de la secreción de estrógenos lo que provoca un efecto de retroalimentación positiva sobre las gonadotropinas. El útero se empieza a distender y el epitelio vaginal se engrosa progresivamente<sup>12</sup>. En la tarde del proestro entre las 14:00 y las 15:00 h, las concentraciones de LH y FSH comienzan a aumentar hasta alcanzar elevadas concentraciones entre las 17:00 y 19:00 h. El pico en la concentración de LH induce la ruptura folicular y la ovulación que se llevará a cabo en el día del estro. La oleada de LH presenta una frecuencia pulsátil creciente con una amplitud de 600 ng/mL<sup>8</sup>.

- **Estro:** Se observan células epiteliales escamosas cornificadas con citoplasma granular y de conformación irregular. Tiene una duración de 25 a 27 horas<sup>8</sup>. Durante esta etapa el útero permanece distendido y tras las numerosas mitosis que experimenta la mucosa vaginal aparecen células epiteliales<sup>12</sup>.

La maduración de los folículos y el pico preovulatorio de gonadotropinas que se produjo en el proestro favorecen la ovulación. A partir de la mañana del estro, después de la ovulación las concentraciones sanguíneas de LH comienzan a disminuir hasta alcanzar concentraciones basales. Durante todo el día del estro los pulsos de LH están prácticamente ausentes con amplitudes de 15 a 40 ng/ml; la secreción de estradiol es baja. En la madrugada del estro comienza un aumento secundario de FSH que estimula el reclutamiento de los folículos que serán ovulados en el siguiente ciclo. Las concentraciones de FHS comienzan a disminuir hasta alcanzar concentraciones basales por la noche<sup>8</sup>.

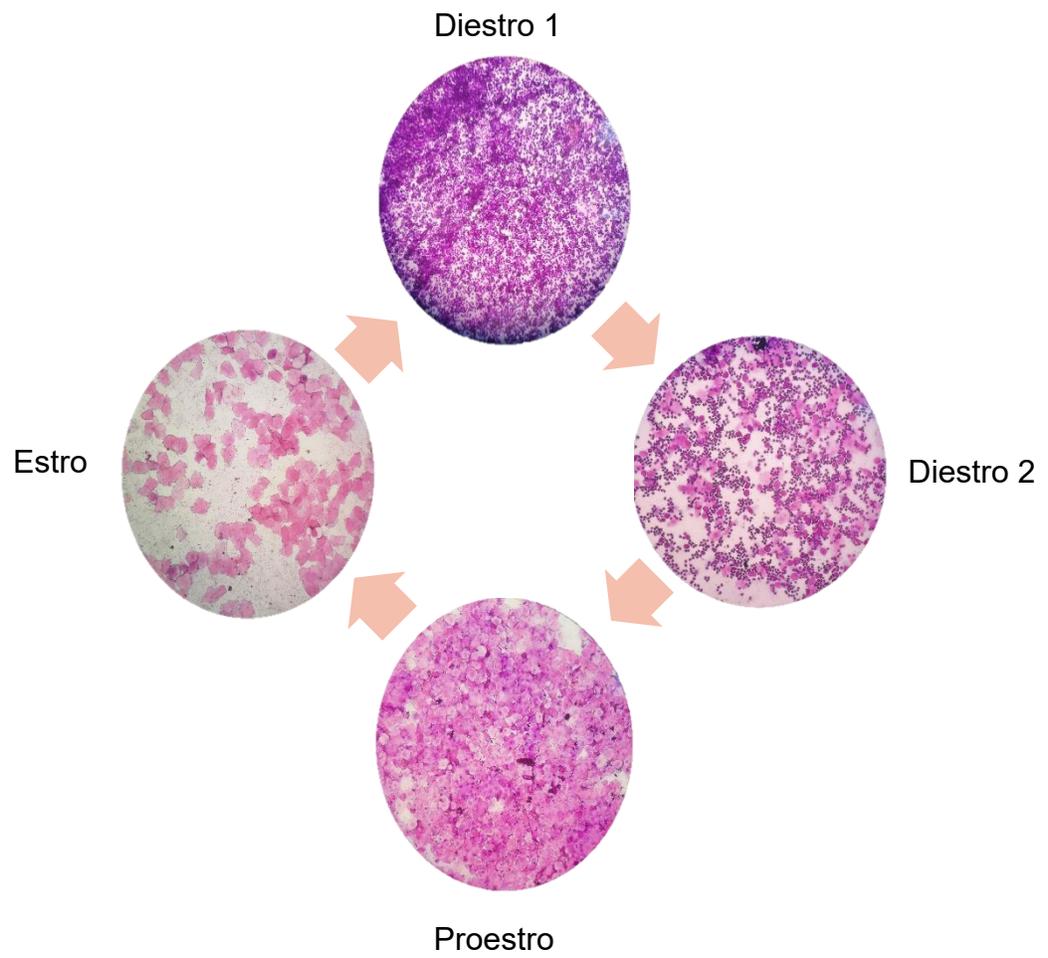


Figura 1. Citología de la mucosa vaginal de la rata, característica de cada día del ciclo estral. Tinción hematoxilina-eosina. Micrografías 20x.

## Diferenciación gonadal

En roedores, el proceso de diferenciación gonadal se hace evidente por la presencia de folículos primordiales poco después del nacimiento<sup>13</sup>.

En la mujer, durante la segunda semana de desarrollo embrionario, las células germinales son identificables en el epiblasto del disco embrionario bilaminar. Hacia la tercera semana, durante la gastrulación, las células se desplazan hasta el saco vitelino, y a partir de la cuarta semana regresan al embrión y se ubican en el esbozo de la gónada<sup>14</sup>.

Durante este periodo, el mesodermo forma dos bandas longitudinales: la región lateral o nefrítica y la región medial o gonadal. El mesodermo intermedio crece y forma una protuberancia dentro del celoma denominada cresta urogenital. Dentro de este se forman dos tipos de poblaciones celulares: el blastema gonadal y el cordón nefrógeno. Tanto el blastema gonadal como el epitelio celómico dan origen a las células gonadales<sup>14</sup>.

A partir de la décima semana de desarrollo embrionario, las células procedentes del epitelio celómico forman los cordones sexuales en los que se incorporan las ovogonias. En la 12ª semana de gestación estas ovogonias son detenidas en la meiosis I en la fase de diploteno. Los cordones corticales se disgregan en cúmulos celulares dispuestos en una capa de células que rodean al ovocito, formando así al folículo primordial<sup>14,15</sup>.

En el quinto mes de desarrollo, la zona más superficial del ovario ya no tiene ovogonias, sino ovocitos que han iniciado la foliculogénesis, las zonas profundas contienen abundantes folículos primordiales<sup>15</sup>.

Junto con el desarrollo cortical, la médula de la gónada indiferenciada involuciona y se produce la diferenciación de células del mesénquima en células intersticiales o de la teca<sup>15</sup>.

En términos morfogénéticos, la formación del ovario se completa en torno al sexto mes de desarrollo intrauterino<sup>15</sup>. Al nacimiento las mujeres presentan un número finito de ovocitos inmaduros, cada ovario contiene de un millón a dos millones de ovocitos. En el transcurso de la vida femenina aproximadamente de 300 a 500 ovocitos maduran y son ovulados<sup>16</sup>.

## Ovario

Los ovarios son glándulas ovaladas en forma de almendra, localizados uno a cada lado del útero. Se mantienen en posición mediante varios ligamentos (Figura 1): El ligamento ancho del útero que es un pliegue del peritoneo parietal, que une a los ovarios por una capa doble de peritoneo denominado mesoovario. El ligamento propio del ovario, el cual fija los ovarios al útero y el ligamento suspensorio que los fija a la pared pelviana<sup>17,18</sup>.

En la mujer, los ovarios tienen dimensiones de aproximadamente tres centímetros de longitud, un centímetro de ancho y un centímetro de espesor y un peso de 6 a 8 gramos, que varía en función de la etapa del ciclo ovárico<sup>18,19</sup>. En la rata sus dimensiones aproximadas son de 4.35 x 5.5 x 1.6 mm, con un peso promedio de 30 mg por ovario<sup>20</sup>.

Anatómicamente el ovario consta de tres regiones: la médula, la corteza y el hilio (Figura 2)<sup>15,17</sup>:

1. **La corteza:** Está compuesta por tejido conectivo (estroma), que contiene células del estroma similares a fibroblastos y folículos ováricos en diferentes estadios de desarrollo<sup>15,17</sup>.

2. **La médula:** Es la región central del ovario que se compone de fibras elásticas, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y fibras nerviosas<sup>15,17</sup>.

3. **El hilio:** Es el punto de entrada de los nervios y vasos sanguíneos, contiene linfocitos, tejido conectivo de sostén, células esteroidogénicas denominadas células hiliares y microganglios<sup>15,17,21</sup>.

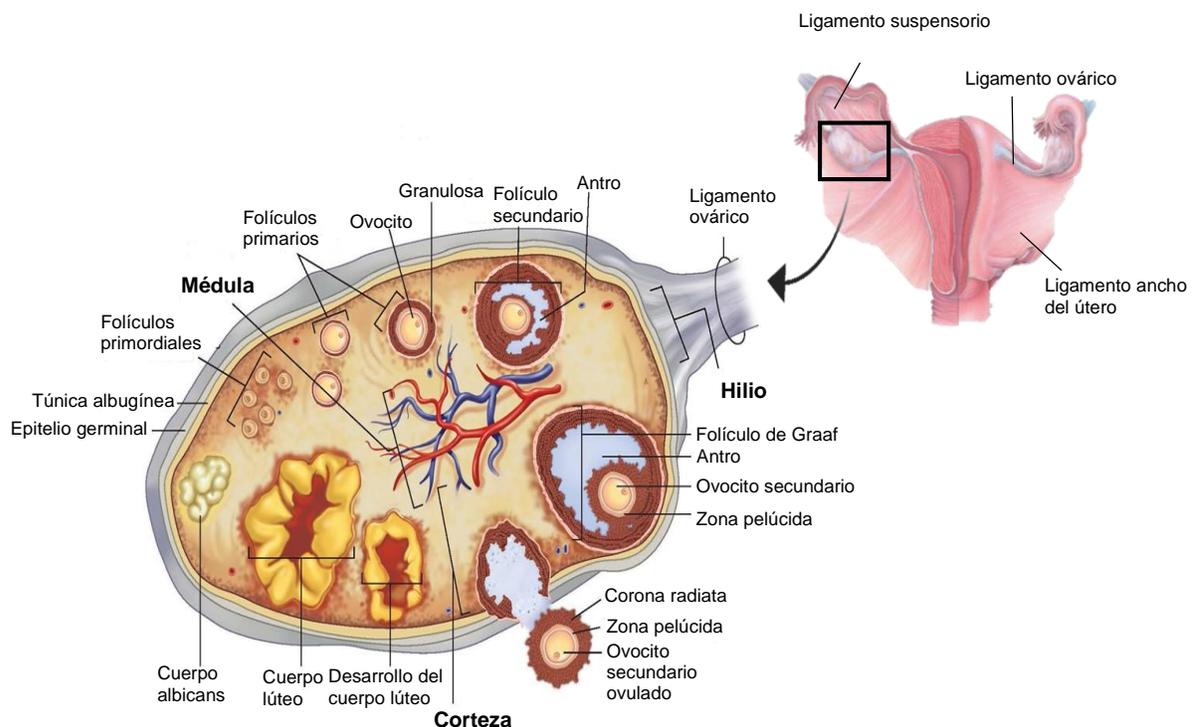


Figura 2. Esquema que muestra la estructura del ovario así como los ligamentos que lo sostienen. Se observan folículos en diferentes etapas del desarrollo y cuerpos lúteos. Hoffman, et al. 2014 (22).

De manera funcional los ovarios presentan tres compartimentos: el tejido intersticial, los folículos y los cuerpos lúteos<sup>15,23</sup>.

1. **Tejido intersticial:** Se encuentra formado por el estroma ovárico y presenta cuatro tipos de células:

- Las *células intersticiales primarias*: Constituyen una población transitoria de células productoras de andrógenos que aparecen en la doceava semana de gestación y desaparecen 8 semanas más tarde<sup>15,23</sup>.
- Las *células intersticiales tecales*: Proceden del estroma y emigran hacia la membrana basal de folículos secundarios, donde se diferencian en teca interna y teca externa y tras la adquisición de receptores para la LH se encargan de la secreción de andrógenos<sup>15,23</sup>.
- Las *células intersticiales secundarias*: Son células intersticiales tecales que han sido transformadas debido al proceso de atresia del folículo, estas mantienen la actividad esteroideogénica y son inervadas por terminales adrenérgicas<sup>15,23</sup>.
- Las *células intersticiales hiliares*: Se encuentran localizadas en el hilio. Son células luteíno-símiles que secretan andrógenos<sup>15,23</sup>.

2. **Folículo:** Es la unidad anatómica y funcional del ovario, el cual pasa por distintos estadios de desarrollo desde que es formado en la ovogénesis hasta la ovulación o bien hasta que se transforma en atrésico. Generalmente está constituido por un ovocito, células de la granulosa que rodean al ovocito, la membrana basal que

separa a las células de la granulosa de los otros componentes del folículo y las células de la teca interna y externa<sup>19,24</sup>.

3. **Cuerpo lúteo:** Se origina a partir de la diferenciación de las células de la granulosa y células de la teca después de que el ovocito y las células del cúmulo oóforo han sido expulsados del folículo ovárico maduro<sup>15,17</sup>.

## Bursa ovárica

Las especies poliovulantes como es el caso de la rata o la coneja presentan úteros bicornes que permiten la adecuada irrigación sanguínea hacia el feto. En especies monoovulantes como la mujer la cavidad uterina es única<sup>25</sup>.

En la mujer, después de la ovulación las fimbrias ováricas se encargan de recoger al ovocito y permiten su llegada a las trompas de Falopio<sup>25</sup>. En la rata, durante la ovulación, los ovocitos son liberados en la bursa ovárica (Figura 3) que es un repliegue de peritoneo que envuelve al ovario, el cual está fusionado con el extremo del oviducto<sup>25,26</sup>.

El oviducto (o tuba uterina) es una estructura que permite que los ovocitos sean recogidos, está constituido por cuatro regiones: fimbria, infundíbulo, ámpula e istmo<sup>27</sup>. En la rata, las fimbrias del oviducto se encuentran dentro de la bursa ovárica lo que permite evitar la pérdida de los ovocitos en el peritoneo<sup>25,26</sup>.

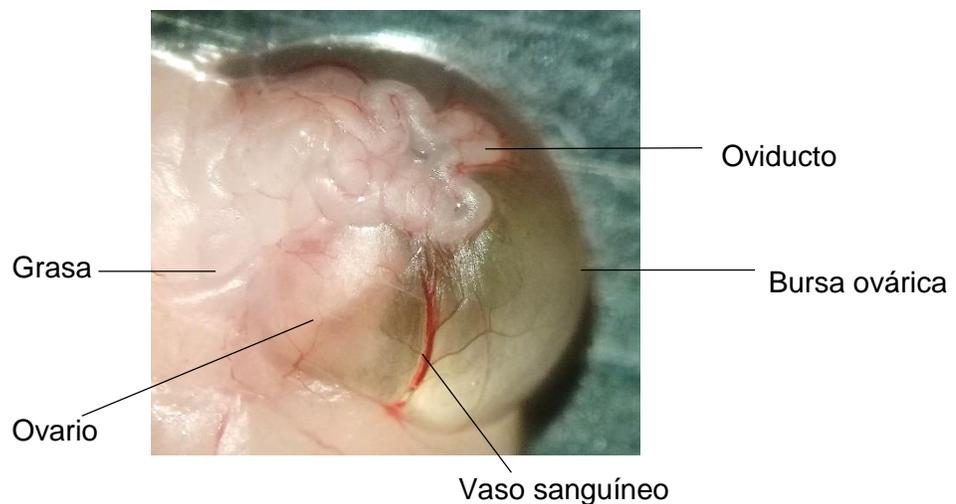


Figura 3. Fotografía de la bursa ovárica de rata de la cepa CII-ZV, donde se observa el oviducto, la red de vasos sanguíneos, el ovario contenido en la bursa, así como el líquido de la cavidad bursal.

La bursa ovárica está constituida por tres capas:

1. La capa interna formada por epitelio discontinuo que se encuentra orientado hacia el ovario<sup>28</sup>.
2. La capa media formada por tejido conjuntivo que contiene fibroblastos, vasos sanguíneos y células de musculo liso que regulan el volumen y la presión del líquido folicular<sup>28</sup>.
3. La capa externa formada por epitelio continuo que se encuentra en contacto con la cavidad peritoneal<sup>28</sup>.

Además de proteger a los ovarios del ambiente peritoneal, la bursa ovárica proporciona un microambiente hormonal necesario para la ovulación y permite el intercambio de sustancias con los vasos sanguíneos<sup>29,30,31</sup>. La disposición estructural de la bursa ovárica y su estrecha relación con el ovario ha permitido la realización de estudios de trasplante de células y tejidos, así como la administración local de fármacos implicados en la regulación de las funciones del ovario<sup>25,28,32</sup>.

## Foliculogénesis

La unidad funcional del ovario es el folículo, el cual pasa por distintos estadios de desarrollo desde que es formado en la ovogénesis hasta la ovulación o bien hasta que se transforma en atrésico, este proceso es denominado foliculogénesis<sup>24</sup>.

En la mujer el desarrollo folicular comienza en la 12ª semana de desarrollo intrauterino, momento en el que se forman los folículos primordiales que reanudarán su crecimiento en la pubertad<sup>14</sup>. En la rata, este evento tiene lugar poco después del nacimiento. Durante las primeras horas de vida es posible observar algunos folículos primordiales, cuyo crecimiento es independiente de las gonadotropias<sup>8,9</sup>. Malamed y colaboradores (33) mostraron que los ovarios de ratas de 19 días de desarrollo intrauterino; así como los ovarios de ratas de 15 horas de nacimiento, presentan inmunoreactividad para la tirosina hidroxilasa (TH), indicativo de que el crecimiento del folículo en esta etapa depende de la presencia de la inervación noradrenérgica<sup>33</sup>.

La foliculogénesis puede dividirse en dos fases: Crecimiento independiente de gonadotropinas o antral que se observa en etapas primarias del desarrollo y crecimiento dependiente de gonadotropinas o antral que se presenta a partir de la formación del folículo secundario, momento en el que su crecimiento comienza a depender de las gonadotropinas<sup>34-36</sup>. Otros estudios muestran que en folículos secundarios la FSH incrementa la expresión del ARNm de BMP-6, esta proteína regula el crecimiento, diferenciación y apoptosis de una variedad de tejidos, entre ellos el ovario, además de estimular la expresión del receptor a FSH<sup>37</sup>.

Durante el crecimiento y desarrollo, los folículos incrementan de manera progresiva su tamaño y la complejidad morfológica, lo que permite su clasificación en las siguientes etapas (Figura 4):

- **Folículo primordial:** Son los folículos más pequeños y numerosos, tienen un diámetro aproximado de 25 a 50  $\mu\text{m}$ <sup>15,19</sup>. La mujer, al llegar a la pubertad cuenta con un suministro de 400,000 a 500,000 folículos primordiales<sup>34</sup>. Cada uno de ellos está conformado por un ovocito esférico detenido en la profase de la meiosis I en la etapa de diploteno, rodeado por una capa de células foliculares aplanadas denominadas pregranulosa y delimitadas por la membrana basal que en esta etapa es poco evidente<sup>18,24</sup>.

La membrana basal es un barrera semipermeable de matriz extracelular compuesta por proteoglicanos y glucoproteínas, cuya función es el desarrollo de un microambiente dentro del folículo, esencial para el desarrollo folicular<sup>38,39</sup>.

En el citoplasma del ovocito se aprecia una condensación de los organelos celulares en forma de media luna que se adhiere a la membrana del núcleo, denominada cuerpo vitelino de Balbiani. Se ha sugerido que los cuerpos de Balbiani intervienen en la transferencia de información entre los componentes del folículo primordial, de manera que al activar el ADN nuclear se envía al citoplasma la orden de iniciar actividad metabólica, y como resultado su volumen aumenta hasta tres veces<sup>25</sup>.

- **Folículo primario:** Tienen un diámetro de 60  $\mu\text{m}$  y presentan células cuboidales también llamadas células de la granulosa, que van de una a seis capas. Aparecen

uniones intercelulares de tipo gap y desmosomas que comunican a las células de la granulosa entre sí y con el ovocito<sup>24,40</sup>, estas comunicaciones permiten el paso de nutrientes, iones y factores reguladores, además de permitir que las células sin receptores de gonadotropinas reciban señales de aquellas que sí los tienen<sup>41</sup>.

Durante esta etapa se forma entre el ovocito y las células de la granulosa una membrana gruesa denominada zona pelúcida, la cual está formada por glucoproteínas que permiten la fertilización por el espermatozoide. La zona pelúcida también actúa como una barrera que permite el intercambio de factores de crecimiento entre el ovocito y las células de la granulosa adyacentes<sup>18,42</sup>.

Por otra parte, las células del estroma se agrupan más estrechamente, dando origen a la teca, que en ésta fase, todavía no se diferencia en capas. La membrana basal se hace más evidente y el cuerpo vitelino de Balbiani desaparece<sup>18,25</sup>.

- **Folículo secundario:** Es un folículo que presenta alrededor de 6 a 10 capas de células de la granulosa, con un diámetro de 200  $\mu\text{m}$  y la acumulación de líquido folicular que se origina por extravasación de componentes plasmáticos y por secreción de las células foliculares. El líquido folicular que contiene proteínas, polipéptidos, FSH, LH, prolactina, progesterona, estrógenos y noradrenalina es almacenado en los espacios intercelulares de las células de la granulosa, denominados cuerpos de Call-Exner, estos espacios se fusionan formando un espacio amplio y único dentro de la granulosa, llamado antro folicular. La teca folicular se diferencia en una teca interna que posee receptores a LH y es capaz

de secretar hormonas esteroides y una externa formada por células de tejido conjuntivo sin actividad secretora<sup>18-19,24,43</sup>.

- **Folículo de Graaf:** También llamado folículo preovulatorio o terciario, presenta un diámetro de 500  $\mu\text{m}$ , en el momento de la ovulación alcanza de 18 a 25 mm. Es la última etapa del desarrollo del folículo. Estos son los folículos más grandes y se extienden por el espesor de la corteza ovárica<sup>43</sup>. En esta etapa del desarrollo, el ovocito ocupa una posición excéntrica rodeado de dos o tres capas de células de la granulosa, dando lugar al cúmulo oóforo, que se une al resto de las células de la granulosa por uno de sus lados y a la corona radiada, que permanecerá con el ovocito en el momento de la ovulación<sup>15,18,43</sup>. El antro folicular aumenta de tamaño, evento que provoca que el ovocito y las células del cúmulo oóforo se separen gradualmente del resto de la capa granulosa en preparación para la ovulación<sup>43</sup>. En la mujer, el folículo primario tarda de 10 a 14 días en alcanzar su madurez. En la rata el folículo requiere al menos de tres ciclos estrales para alcanzar el estado preovulatorio<sup>24</sup>.

Cuando el folículo alcanza su tamaño máximo forma una elevación en la superficie del ovario denominada estigma, sitio en el cual tendrá lugar la ovulación. El “pico” preovulatorio de la LH estimula la ruptura del folículo maduro y que el ovocito primario culmine la meiosis I e inicie la meiosis II, de tal manera que es liberado como un ovocito secundario detenido en la metafase de la meiosis II, la cual se reactivará sólo al ser fecundado, en caso contrario, el ovocito será eliminado durante el proceso de la menstruación<sup>18,44</sup>.

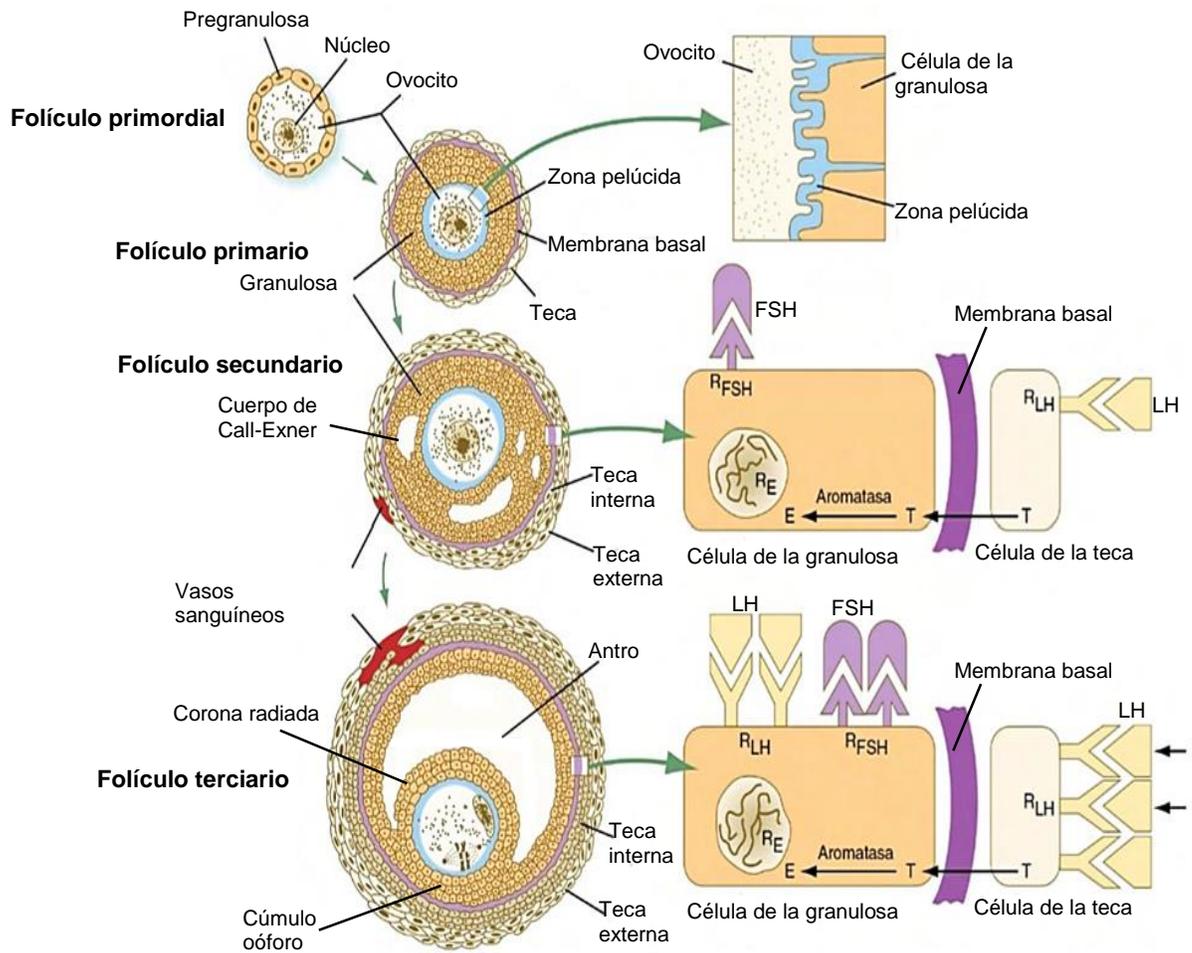


Figura 4. Esquema en el que se muestran los diferentes estadios del desarrollo de un folículo ovárico. E, estradiol; T, testosterona; RE, retículo endoplásmico; LH, hormona luteinizante; FSH, hormona folículo estimulante; RLH, receptor a la hormona luteinizante; RFSH, receptor a la hormona folículoestimulante. Carlson, 2014 (45).

## Ovulación

Una vez que el ovocito ha alcanzado el tamaño y grado de diferenciación adecuado, el folículo De Graaf se rompe y libera al ovocito secundario hacia el oviducto o tubas uterinas, este proceso es denominado ovulación<sup>17,24</sup>.

Al final de la fase folicular las concentraciones elevadas de estradiol ejercen un estímulo de retroalimentación positivo sobre el hipotálamo y la adenohipófisis, lo que culmina con el “pico” de LH. En la mujer, el “pico” de LH tiene una duración de 48 horas y la ovulación tiene lugar entre 35 y 40 horas después del inicio de este evento<sup>22</sup>. En la rata, el “pico” de LH se presenta durante la tarde del proestro y la ovulación se lleva a cabo entre las 03:00 y las 06:00 horas del día del estro<sup>8</sup>.

Como respuesta al “pico” de LH, algunos de los eventos que ocurren son: 1. La reactivación de la meiosis en el folículo dominante y 2. La inhibición de la meiosis en los folículos no dominantes. Ambos procesos son mediados por una cascada de señalización regulada por la adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y guanosín monofosfato cíclico (GMPc), que modulan la expresión del factor promotor de maduración (FPM). La disminución de ambos mensajeros resulta en la activación del FPM, lo cual favorece la reanudación de la meiosis en el folículo dominante<sup>45</sup>. Por otra parte, en las células de la granulosa de los folículos no dominantes la producción de AMPc inactiva al FPM y en consecuencia se inhibe la meiosis<sup>25,45</sup>.

Una vez reanudada la meiosis I en el folículo dominante, el ovocito primario diploide produce dos células haploides de tamaño desigual, cada una con 23 cromosomas. La

célula más pequeña llamada cuerpo polar es esencialmente un paquete de residuo nuclear, mientras que, la célula más grande llamada ovocito secundario recibe la mayor parte del citoplasma<sup>17</sup>. Durante la ovulación, la concentración de estrógenos disminuye en el líquido folicular, ello favorece la ruptura de uniones celulares como los desmosomas y los nexos de las células de la granulosa<sup>24</sup>.

La FSH, LH y la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) estimulan en las células de la granulosa la secreción del plasminógeno, que es convertido en plasmina, una enzima que contribuye a la digestión proteolítica de la pared folicular y en consecuencia disminuye su rigidez<sup>23,24</sup>. Por otra parte, el plasminógeno estimula en las células de la granulosa la secreción de fibrinolisisina, enzima que degrada las fibras de colágeno<sup>24</sup>. La ruptura de las fibras de colágeno crea una reacción antiinflamatoria que atrae leucocitos que secretan prostaglandinas dentro del folículo<sup>46</sup>.

Las prostaglandinas provocan la expansión del complejo cúmulo-ovocito (formado por el cúmulo oóforo, la corona radiada y el ovocito secundario), que resulta en el desprendimiento de este de la pared folicular<sup>47</sup>; así como en contracciones del músculo liso del ovario, que junto con el proceso inflamatorio propician la ruptura de la pared del folículo, evento que permite la expulsión del ovocito secundario. Éste comienza la meiosis II y se detiene en la metafase, que se completa sólo en caso de fecundación<sup>24,48</sup>.

Después de la ovulación, las células de la granulosa y las células de la teca interna contigua se diferencian en una unidad funcional nueva llamada cuerpo lúteo o cuerpo amarillo, en este momento reciben el nombre de células granulosoluteínicas (grandes y centrales) y tecoluteínicas (periféricas y pequeñas). En el cuerpo lúteo se establece una

red vascular extensa hacia la cual las células luteínicas secretan progesterona y estrógenos<sup>43</sup>.

Los ovarios de los mamíferos cuentan con un suministro de varios cientos de miles de folículos primordiales, sin embargo, solo un número limitado se desarrolla hasta la etapa preovulatoria, y logra ser ovulado. Sin embargo, más del 99%, serán eliminados mediante un proceso degenerativo denominado atresia<sup>49</sup>.

### **Atresia folicular**

La atresia folicular se ha considerado una posible ventaja evolutiva, ya que permite la selección de aquellos folículos que contienen un ovocito apto para ser ovulado y fecundado<sup>50</sup>. El proceso de atresia se favorece debido a la falta de capacidad por parte del ovocito para mantener el control metabólico del folículo<sup>24</sup>; así como por la falta de FSH, ya que aquellos folículos que reciben un aporte insuficiente de esta gonadotropina degeneran<sup>50</sup>. La atresia se presenta con mayor frecuencia en folículos antrales, sin embargo, es posible observarlo en cualquier estadio del desarrollo folicular tanto en la vida fetal como durante la etapa prepuberal, puberal y adulta<sup>24,51</sup>.

Las alteraciones iniciales de la atresia consisten en: 1) la condensación de la cromatina nuclear, evento durante el cual, las células se vuelven basófilas, logrando una tinción intensa con hematoxilina, evento denominado picnosis; y 2) en la disolución del citoplasma del ovocito, el folículo es invadido por macrófagos y otras células de tejido

conjuntivo, provocando que el ovocito degenere. La zona pelúcida puede plegarse o colapsarse, conservando su espesor y características tintoriales<sup>24,43,52</sup>.

De acuerdo a los cambios morfológicos e histológicos que experimenta el folículo, la atresia puede clasificarse en las siguientes etapas<sup>53</sup>:

- **Atresia I:** Se caracteriza por un pequeño número de células de la granulosa que presentan núcleos picnóticos (<10%), las cuales se localizan generalmente cerca del antro folicular. Algunas células de la granulosa aún se encuentran en mitosis<sup>50</sup>.
- **Atresia II:** En este estadio un mayor número de células de la granulosa presentan picnósis (10-30%), pocas células se encuentran en mitosis y se observan restos celulares dentro del antro folicular. La membrana basal pierde su integridad y se infiltran leucocitos en las células de la granulosa. En esta etapa la atresia es avanzada, y los folículos no pueden ser rescatados<sup>50</sup>.
- **Atresia III:** Se caracteriza por una reducción en el número de células de la granulosa, de las cuales ninguna se encuentra en mitosis. El folículo se fragmenta y la teca interna se hipertrofia. En los roedores, se estima que transcurren alrededor cuatro días antes de que un folículo antral alcance la etapa III de atresia<sup>50,54</sup>.

Además de estos eventos, ocurren procesos bioquímicos como la reducción en la síntesis de ADN en células de la granulosa<sup>55,56</sup>, la pérdida de las uniones comunicantes<sup>57</sup>, así como la disminución en la síntesis y expresión de ARNm para aromatasas y la pérdida de receptores a gonadotropinas<sup>58</sup>. Esto se traduce en la disminución de la capacidad de

aromatización de los andrógenos, por lo que su concentración aumenta dentro y alrededor del folículo<sup>24</sup>.

Algunos de los factores que regulan la atresia folicular son:

**1. Atretogénicos.** Son factores que llevan a los folículos a la atresia, entre ellos se encuentran:

- **Receptores de la familia del Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ):** Se expresan en células de la granulosa apoptóticas de folículos sanos y atrésicos así como en la gónada embrionaria<sup>59,60</sup>. Estos receptores inducen la muerte celular de las células foliculares mediante la expresión del receptor Fas. La unión de Fas a su ligando produce la activación de los dominios de muerte celular y de la cascada de caspasas que culmina con la apoptosis celular<sup>61</sup>.
- **Andrógenos:** Causan el deterioro de los folículos al aumentar la picnosis en las células de la granulosa y la degeneración del ovocito<sup>50</sup>. Se ha mostrado que los folículos antrales y atrésicos tardíos presentan mayor expresión del receptor de andrógenos (RA), por lo que altas concentraciones del esteroide podrían estar relacionadas con la atresia folicular<sup>62</sup>.

Billig y colaboradores (63) mostraron que los andrógenos favorecen la fragmentación del ADN en células de la granulosa, evento que es regulado por la actividad de las endonucleasas, enzimas que catalizan la ruptura de los enlaces fosfodiéster de la cadena del ADN. Es posible que los andrógenos disminuyan la capacidad de los estrógenos de inhibir la actividad de las endonucleasas ováricas,

sin embargo el mecanismo molecular responsable de la atresia mediado por endonucleasas aún es desconocido<sup>63</sup>.

- **Proteínas de la familia Bcl-2 apoptóticas:** El proceso de apoptosis celular se lleva a cabo principalmente en la mitocondria, lugar en el que se expresan oncogenes de la familia Bcl-2, las proteínas Bax, Bok, Bim y Bid miembros de esta familia favorecen la apoptosis celular, ya que su expresión determina la supervivencia o muerte celular. Se ha mostrado que los folículos atrésicos presentan un incremento en la actividad Bax, lo que sugiere su participación en el proceso de atresia<sup>64</sup>.

**2. Antiatretogénicos.** Son factores que rescatan a los folículos de la atresia, entre ellos se encuentran:

- **Hormonas:** La GnRH, FSH, LH y el estradiol son los factores de supervivencia más importantes para los folículos antrales. La inhibición de la atresia mediada por gonadotropinas en células de la granulosa está vinculada con los cambios en la expresión de varios genes relacionados con la muerte celular, mientras que, el estradiol está relacionado con la mayor expresión del ARNm para aromatasa, el receptor beta de estrógenos y los receptores a FSH y LH en células de la granulosa de los folículos dominantes<sup>60,65</sup>.
- **Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF):** Este factor estimula la proliferación de las células foliculares, incrementa la secreción de estradiol y la respuesta celular a las gonadotropinas en células de la granulosa<sup>66,67</sup>.

- **Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF):** Estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos en los ovarios, además de que facilita la distribución de hormonas, oxígeno y nutrientes requeridos por las células foliculares. La inhibición de la expresión de VEGF, ocasiona la disminución de la angiogénesis del folículo, lo que evita la maduración de los folículos antrales<sup>68</sup>.
- **Proteínas de la familia Bcl-2 antiapoptóticas:** La familia de proteínas antiapoptóticas está constituida por las proteínas Bcl-2, Bcl-xl y Boo. Las células de la granulosa de folículos en desarrollo muestran mayor expresión de Bcl-2, que inhibe la muerte por apoptosis<sup>59,64</sup>.

### **Esteroidogénesis ovárica**

Además de la ovulación, el ovario lleva a cabo el proceso de esteroidogénesis, mediante el cual secreta hormonas esteroides como: progestágenos (pregnenolona, 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona y progesterona), andrógenos (androstenediona y testosterona) y estrógenos (estrona y 17 $\beta$ -estradiol)<sup>22</sup>.

El colesterol, sustrato de la biosíntesis de esteroides proviene de tres fuentes principales:

1) El circulante en sangre en forma de lipoproteínas, 2) El sintetizado de *novo* dentro del ovario a partir de acetilcoenzima A y 3) El que es liberado de los ésteres del colesterol almacenado en las gotas lipídicas. La mayor parte de la esteroidogénesis ovárica se lleva a cabo a partir del colesterol esterificado proveniente de las lipoproteínas de alta y baja densidad<sup>15,69,70</sup>. La liberación del colesterol es mediada por las hidrolasas, cuya actividad es regulada por las gonadotropinas que a su vez inhiben la esterificación del colesterol<sup>70</sup>.

Las células de la teca interna expresan receptores a LH, mientras que las células de la granulosa presentan receptores a FSH. Ambos tipos celulares poseen receptores transmembranales acoplados a proteínas G. La unión de las gonadotropinas a su receptor activa la enzima adenilato ciclasa, que convierte el trifosfato de adenosina (ATP) en AMPc, este segundo mensajero activa la proteincinasa A (PKA), la cual en las células de la teca fosforila a la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) y estimula la expresión de enzimas esteroidogénicas, mientras que en las células de la granulosa estimula la expresión de aromatasas<sup>45,69,71</sup>.

El primer paso en la esteroidogénesis ocurre cuando el colesterol libre, es internalizado en la mitocondria de las células de la teca interna por la StAR. Dentro de la mitocondria la enzima 20-22 desmolasa del complejo P450<sub>scc</sub> corta la cadena lateral de seis carbonos del colesterol y produce pregnenolona y ácido isocaproico. Este es el paso limitante en la biosíntesis de esteroides<sup>15,70</sup>.

Una vez sintetizada la pregnenolona pasa al retículo endoplásmico liso, donde se encuentran las enzimas que la metabolizan a través de dos rutas (Figura 5):

- **Ruta  $\Delta 4$ :** La pregnenolona es convertida a progesterona por acción de la enzima la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $3\beta$ -HSD), después la  $17\alpha$ -hidroxilasa la convierte en  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona que experimenta la escisión de la ligadura C17-20 por acción de la 17,20 desmolasa, formando así androstenediona. Esta ruta es más frecuente en el cuerpo lúteo<sup>15,70</sup>.

- **Ruta  $\Delta 5$ :** La pregnenolona se convierte en  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona por medio de la  $17\alpha$ -hidroxilasa, la cual forma parte del complejo P450c17, esta pasa a dihidroepiandrosterona (DHEA) por efecto de la 17,20 desmolasa. La DHEA por acción de la  $3\beta$ -HSD es convertida en androstenediona y por efecto de la  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $17\beta$ -HSD) es metabolizada a testosterona. Esta ruta se lleva a cabo principalmente en las células de la teca interna<sup>15,70</sup>.

La androstenediona y testosterona, secretadas por las células de la teca interna difunden hacia el compartimento avascular de las células de la granulosa, en donde la unión de la FSH a su receptor favorece la síntesis de aromatasas que los transforma en estrona y estradiol respectivamente. La conversión de estrona en estradiol es catalizada por la  $17\beta$ -HSD, esta también puede ser designada como 17-cetoesteroide reductasa, ya que también es capaz de catalizar la reacción inversa<sup>70,72</sup>.

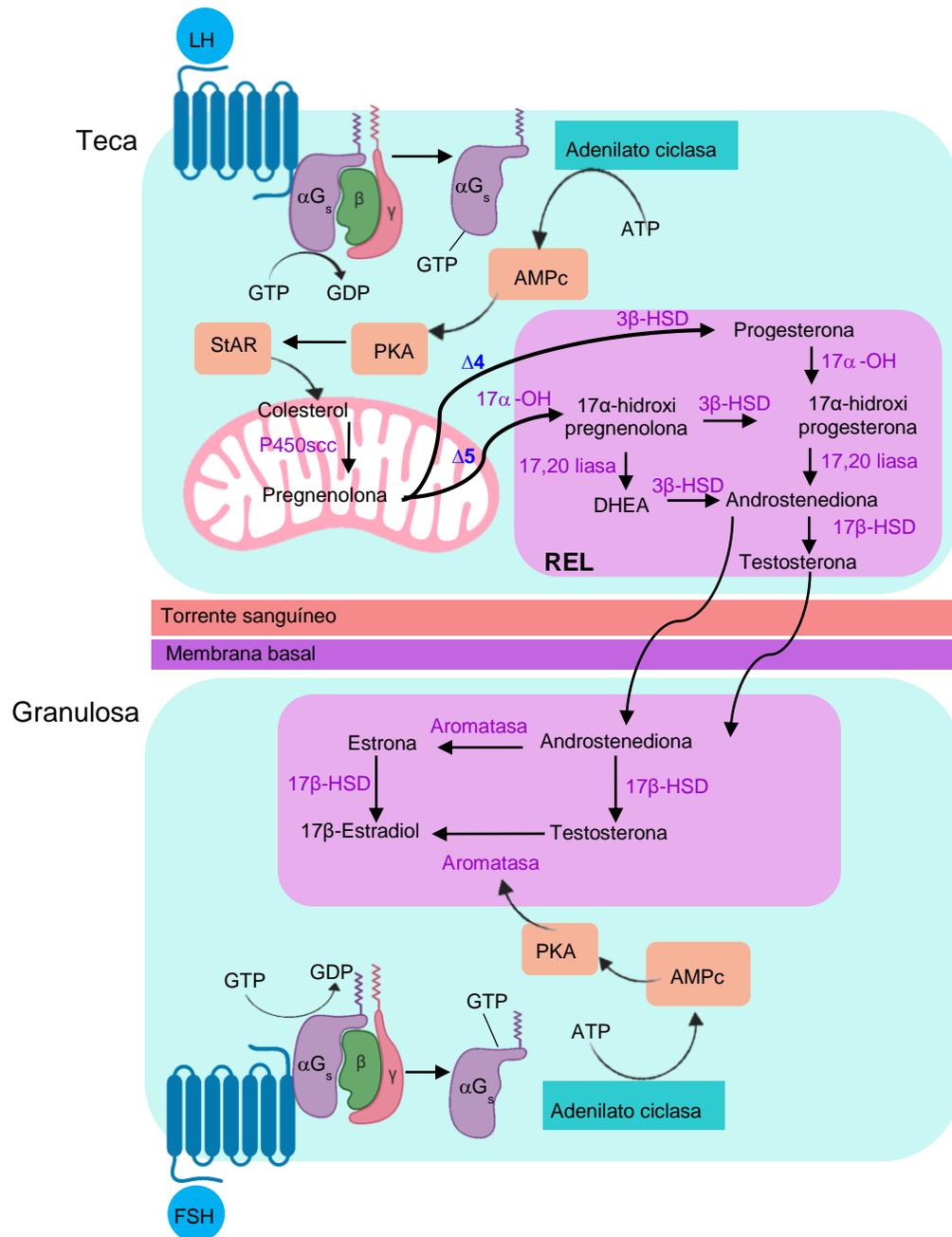


Figura 5. Esquema que muestra la esteroidogénesis ovárica: En las células de la teca la unión de la LH a su receptor inicia una cascada de señalización mediada por segundos mensajeros que activa a la proteína StAR, esta permite la internalización del colesterol en la mitocondria en donde se inicia la síntesis de pregnenolona, la cual sale para entrar al REL y continuar con la biosíntesis de andrógenos. En células de la granulosa la unión de la FSH a su receptor activa a la PKA, esta enzima favorece la expresión de las aromatasas las cuales convierten los andrógenos en estrógenos. FSH, hormona foliculoestimulante; LH, hormona luteinizante; GTP, guanosina trifosfato; GDP, guanosina difosfato; ATP, adenosina trifosfato; AMPc, adenosina monofosfato cíclico; PKA, proteincinasa A; StAR, proteína reguladora aguda esteroidogénica; P450<sub>scc</sub>, enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol; 17α-OH, 17α-hidroxilasa; DHEA, dehidroepiandrosterona; 3β-HSD, 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; 17β-HSD, 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; REL, retículo endoplásmico liso. Strauss y Williams, 2014 (69).

## **Regulación neuroendocrina de las funciones ováricas**

La liberación de óvulos maduros aptos para ser fecundados y la producción de hormonas esteroides y peptídicas, son funciones ováricas reguladas por señales endocrinas y nerviosas que llegan a la gónada<sup>15</sup>.

En las mujeres hay aproximadamente 1000 neuronas secretoras de GnRH, que constituyen la vía por la cual el sistema nervioso central controla la secreción de gonadotropinas<sup>73</sup>.

En la mujer, las neuronas GnRHérgicas se originan en la placoda olfatoria de donde migran y se dirigen a áreas rostrales del diencefalo, incluyendo el órgano vasculoso de la lámina terminal, el área preóptica hipotalámica anterior y los núcleos ventromedial y arqueado del hipotálamo<sup>73</sup>. En la rata, las neuronas productoras de GnRH se encuentran dispersas en el complejo de la banda diagonal de Broca, el septum medial, el hipotálamo rostral y el área preóptica hipotalámica anterior<sup>74-76</sup>.

La liberación de la GnRH se da en los axones localizados en la eminencia media del hipotálamo. La formación de un potencial de acción permite la entrada de iones de calcio a través de canales dependientes de voltaje, lo que provoca la fusión de vesículas que contienen a la hormona sobre la membrana de la terminal axonómica, lo cual resulta en la liberación por exocitosis de la GnRH<sup>73</sup>.

Una vez liberada, la GnRH entra a la circulación porta-hipotalámica-hipofisiaria hasta llegar a la adenohipófisis, en donde se une a receptores específicos de alta afinidad localizados en las membranas plasmáticas de los gonadotropos y estimula la secreción de FSH y LH<sup>73,77</sup>.

En la mujer adulta, la secreción pulsátil de GnRH varía en frecuencia y amplitud durante las diferentes etapas reproductivas. La FSH y LH son glicoproteínas estructuralmente relacionadas, que poseen una subunidad  $\alpha$  común y una subunidad  $\beta$  específica de cada hormona. Durante la fase folicular temprana se presenta un pulso de GnRH cada 90 a 100 minutos que favorece la secreción de la cadena  $\beta$  de FSH, mientras que en la fase folicular tardía aumenta la frecuencia a un pulso de GnRH cada 60 minutos lo que resulta en la secreción de la cadena  $\beta$  de LH<sup>73,78,79</sup>.

Una vez secretadas, ambas gonadotropinas (FSH y LH) ingresan a la circulación sistémica hasta llegar al ovario<sup>80</sup>. En los ovarios, la FSH actúa sobre las células de la granulosa, donde estimula el crecimiento y maduración folicular, y la síntesis de aromatasas que regulan la secreción de estrógenos. La LH en los folículos maduros estimula la ovulación y en las células de la teca la secreción de progesterona y andrógenos<sup>77</sup>.

La secreción de gonadotropinas es regulada a nivel hipotalámico e hipofisiario a través de feedback positivos y negativos ejercidos por hormonas esteroideas producidas por el ovario<sup>81</sup>.

A medida que los folículos ováricos crecen la concentración de estradiol incrementa hasta presentar un “pico” máximo que estimula el “pico” preovulatorio de LH y resulta en la ovulación. De igual manera esto favorece un pico de FSH que estimulará a la siguiente cohorte folicular que iniciará su desarrollo<sup>22</sup>.

Además de las hormonas esteroides los ovarios secretan inhibina, activina y folistatina que constituyen otra vía de estímulos de retroalimentación positivos y negativos sobre la regulación de la secreción de FSH a nivel hipofisiario. La activina en la adenohipófisis estimula la secreción de FSH, mientras que la inhibina la suprime. Por su parte, la folistatina liga a la activina, con lo que ejerce un efecto inhibitorio sobre la secreción de FSH<sup>15,22</sup>.

Aunado al eje de regulación neuroendocrina, la función gonadal está regulada por medio de la liberación secuencial y ordenada de neurotransmisores en frecuencia y amplitud específicas, que llegan al ovario vía la inervación extrínseca<sup>77,82</sup>.

### **Inervación Ovárica**

La inervación extrínseca del ovario de la rata (Figura 6) está formada por fibras del sistema nervioso simpático, parasimpático y sensorial, que ingresan por el hilio del ovario a través de tres paquetes nerviosos<sup>82</sup>:

1. **El nervio ovárico superior (NOS):** Sus fibras se originan en los segmentos T11 a L4 de la médula espinal y hacen sinapsis en el ganglio celiaco mesentérico superior (GCMS)<sup>83</sup>. Las neuronas del NOS viajan junto con el ligamento suspensorio del ovario, ingresan por hilio e inervan células de la teca y la glándula intersticial<sup>84</sup>. Por este nervio viajan fibras que transportan, péptido intestinal vasoactivo (VIP), neuropéptido Y (NPY) y en su mayoría noradrenalina (NA)<sup>83,85</sup>.
2. **El nervio del plexo ovárico (NPO):** Es un nervio mixto que contiene fibras simpáticas y sensoriales que acompañan a la arteria ovárica e inervan principalmente la vasculatura. Las fibras simpáticas secretan NA y NPY, mientras que, las fibras sensoriales sintetizan sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen que codifica a la calcitonina (CGRP)<sup>84</sup>. Las fibras sensoriales derivan de los ganglios de la raíz dorsal de los segmentos torácico inferior T9-T11 y lumbar superior L2-L4 y en el ganglio nodoso del vago, mientras que las fibras simpáticas derivan del GCMS<sup>83,86</sup>.
3. **El nervio vago (NV):** Sus fibras inervan la vasculatura ovárica y son en su mayoría de naturaleza parasimpática además de las fibras sensoriales y motoras<sup>83</sup>. Las fibras del NV derivan del ganglio de la raíz dorsal de los segmentos T10 a L2, además del ganglio nodoso<sup>82,86</sup>. Los somas de las neuronas del NV están ubicados en cuatro núcleos del bulbo raquídeo: el núcleo dorsal motor del vago, el núcleo del tracto solitario, el núcleo ambíguo

y el núcleo espinal del nervio trigémino<sup>87</sup>. Este paquete nervioso transporta acetilcolina, sustancia P, y en menor cantidad VIP, somatostatina y gastrina<sup>88</sup>.

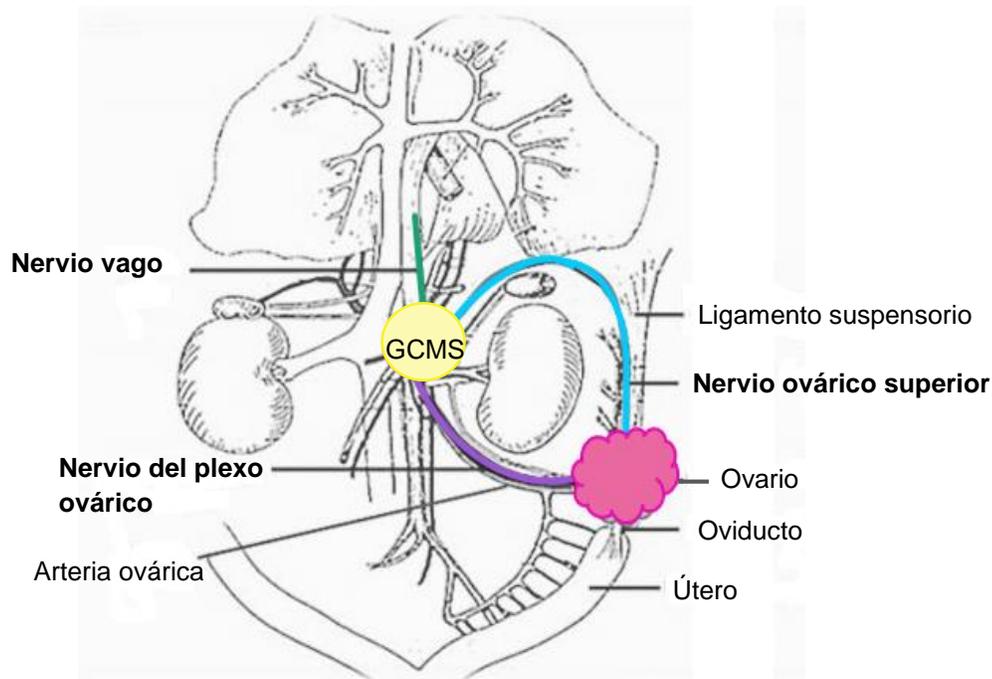


Figura 6. Esquema que muestra la inervación extrínseca que llega al ovario vía Nervio ovárico superior, Nervio del plexo ovárico y Nervio vago. GCMS, Ganglio celiaco mesentérico superior. Lawrence y Burden, 1980 (85).

Además de la inervación extrínseca, los ovarios de mamíferos presentan inervación intrínseca formada por microganglios de naturaleza catecolaminérgica y VIPérgica<sup>21,82</sup>. Se ha mostrado que incluso en una misma especie la inervación intrínseca puede o no estar presente. En la rata, la presencia de neuronas intrínsecas parece depender de la cepa. En la rata Wistar, se han observado neuronas catecolaminérgicas distribuidas en el hilio, la médula y la corteza de los ovarios las cuales no se observan en las cepas Sprague-Dawley y Long-Evans<sup>82,89</sup>.

En resumen, los ovarios reciben NA de tres fuentes:

1. La proveniente de la inervación vía el NOS y el NPO<sup>83</sup>.
2. La secretada por las glándulas adrenales<sup>90</sup>.
3. La intraovárica contenida en el líquido folicular, producida por células de la granulosa<sup>24</sup>.

## **Papel de la inervación simpática en la regulación de las funciones del ovario**

De acuerdo con Ricu y colaboradores (91) en la rata, la capacidad de los nervios noradrenérgicos para liberar NA parece desarrollarse completamente al momento de la pubertad, mostrando un incremento que se mantiene a medida que el animal se acerca a la etapa adulta. Estudios en roedores han mostrado que el papel de la NA en la regulación del crecimiento y diferenciación folicular y en la secreción de hormonas esteroides, es mediado por receptores  $\beta$ -adrenérgicos presentes en las células de la teca<sup>6,92</sup>.

Para estudiar el papel de la inervación simpática sobre las funciones del ovario se han empleado modelos de denervación quirúrgicos<sup>85</sup> (mediante la sección del NOS) o farmacológicos<sup>93</sup> (mediante la administración de agentes neurotóxicos).

Uno de los fármacos empleados como herramienta de denervación es la guanetidina (GTD), un fármaco adrenérgico postgangliónico cuyo mecanismo de acción bloquea el almacenamiento y recaptura de NA en las vesículas presinápticas por la gran afinidad del

fármaco hacia las proteínas intravesiculares, lo que permite que sea rápidamente metabolizada por las monoaminooxidasas (MAO) sinápticas o citoplasmáticas<sup>94</sup>.

En ratas adultas, la destrucción de la inervación simpática periférica por la administración crónica de 50 mg/kg de p.c. de GTD, disminuye la actividad de la TH y provoca infiltraciones de células linfocíticas en las neuronas catecolaminérgicas, que se traducen en la reducción de un 98% del número de fibras noradrenérgicas<sup>95,96</sup>. Por otro lado, la administración de GTD en ratas juveniles, disminuye la respuesta ovárica al estímulo gonadotrópico por las células de la granulosa y en consecuencia se reduce la población folicular y la concentración de estradiol<sup>93</sup>.

En ratas prepúberes se ha mostrado que, la sección bilateral del NOS resulta en la disminución de la concentración de progesterona 30 minutos después de realizada la denervación y en un incremento en la concentración de testosterona a los 60 minutos<sup>97</sup>. Mientras que, en ratas adultas la sección bilateral del NOS en la mañana del proestro conduce a la disminución inmediata de las concentraciones en suero de progesterona y estradiol. Cuando este procedimiento es realizado en la mañana del estro las concentraciones de estas hormonas no se modifican<sup>85</sup>. Los autores sugieren que la información nerviosa que transcurre por las fibras del NOS regula la secreción de hormonas esteroides dependiendo de la edad del animal y del día del ciclo estral en que se realiza la sección<sup>85</sup>.

Chávez y colaboradores (98) mostraron que en ratas de 3, 12 o 18 meses de edad la concentración de NA aumenta a medida que el animal envejece y ello se acompaña del incremento en el número de folículos atrésicos y la disminución en el número de ovocitos liberados. Sin embargo, cuando se realiza la denervación farmacológica con GTD y se aplica un estímulo gonadotrópico se observa un incremento en el número de folículos sanos y el restablecimiento de la ovulación en hembras adultas de mediana edad (12 meses de edad), contrario a lo observado en ratas senescentes (18 meses de edad), donde los animales presentan un mayor número de folículos atrésicos que aún con la depleción de NA, no ovulan. Lo que sugiere, que la inervación noradrenérgica ovárica ejerce un papel inhibitorio en la fisiología de la gónada durante el proceso de envejecimiento<sup>98</sup>.

Por otra parte, Garrido y colaboradores (99) mostraron que en ratas de siete días de edad la administración crónica de GTD por tres semanas resulta en la disminución del contenido de NA ovárica tres y cuatro meses después de la denervación, lo que se acompaña del aumento en el número de folículos primarios y el número de folículos antrales sanos, mismos que mostraron una reducción en su tamaño. En estos animales también se observó una disminución de la concentración sérica de estradiol. Cuando el animal, previamente tratado con GTD, alcanza los seis meses de edad el contenido de NA ovárica se restablece a valores semejantes a los de un animal control mientras que el contenido de NA adrenal aumenta. Asimismo, la actividad de TH disminuye y se observa una morfología ovárica semejante a la de animales sacrificados a los cuatro meses de edad; así como una disminución en la concentración de estradiol. Con estos

resultados, los autores sugieren que el restablecimiento de NA ovárica es proveniente de la NA adrenal y que la inervación simpática del ovario que se establece durante el desarrollo infantil, es necesaria para la adecuada respuesta de la función ovárica en etapas posteriores del desarrollo<sup>99</sup>.

## Síndrome de ovario poliquístico

El síndrome de ovario poliquístico (SOPQ) es la fisiopatología más común en mujeres de edad reproductiva. En la clínica, el SOPQ muestra diversos signos y síntomas entre los cuales se incluyen: hiperandrogenismo clínico o bioquímico, oligo-anovulación y morfología ovárica poliquística<sup>2</sup>. Debido a la variedad de fenotipos, diferentes asociaciones e institutos han establecido criterios que facilitan su diagnóstico (Cuadro 1).

Cuadro 1. Criterios diagnósticos del SOPQ de acuerdo con el Instituto Nacional de Salud, el Consenso de Rotterdam y la Sociedad de Exceso de Andrógenos y SOPQ<sup>2</sup>.

CRITERIO	Instituto Nacional de Salud 1990	Consenso de Rotterdam 2003	Sociedad de exceso de andrógenos y SOPQ 2006
<b>Hiperandrogenismo clínico o bioquímico (HA)</b>	Dos criterios requeridos: 1.HA	Dos de tres criterios requeridos: 1.HA	Criterio requerido: 1.HA
<b>Oligo-Anovulación (OA)</b>	2.OA	2.OA	Acompañado de OA, QO o ambas.
<b>Quistes ováricos (QO)</b>		3.QO	

Según los criterios diagnósticos del Instituto Nacional de Salud de 1990, la prevalencia del SOPQ a nivel mundial es del 4 al 7 %; del 15 al 18% de acuerdo a los criterios de Rotterdam y del 3 al 7 % de acuerdo a la Sociedad de Exceso de Andrógenos y SOPQ. En México, el 6.6% de la población femenina presenta el SOPQ según los criterios de Rotterdam<sup>100-102</sup>.

La heterogeneidad del SOPQ dificulta la determinación de su origen. Se han planteado diversas hipótesis para explicar su etiología:

1. **Alteración hipotalámica:** La hipótesis plantea que en mujeres con SOPQ se alteran los pulsos de secreción de la GnRH. En una mujer sin la fisiopatología se produce un pulso de GnRH cada 90 minutos, mientras que en pacientes con SOPQ este pulso se observa cada 60 minutos, lo cual favorece una mayor secreción de LH, así como un cambio en la relación LH/FSH a favor de la LH. Las elevadas concentraciones de LH estimulan a las células de la teca para producir andrógenos. La disminución de FSH altera la aromatización de los andrógenos a estrógenos en las células de la granulosa, el desarrollo folicular y la liberación de progesterona por el cuerpo lúteo, lo que conduce a un hiperandrogenismo sostenido y a la disfunción ovulatoria<sup>103-105</sup>.
2. **Disfunción ovárica:** Se menciona que en las células de la teca incrementa la actividad del complejo enzimático P450c17, el cual induce la hidroxilación de pregnenolona a 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona y mediante la 17,20 liasa permite la formación de DHEA precursor de la androstenediona, lo que culmina en una condición de hiperandrogenismo y en el desarrollo del SOPQ<sup>103</sup>.

3. **Hiperactividad simpática:** Está hipótesis postula que el SOPQ es el resultado del incremento en la actividad simpática de los nervios que llegan al ovario. Algunos estudios muestran que los ovarios de ratas con SOPQ, inducido por la inyección de un esteroide de larga actividad como el valerato de estradiol (VE), incrementa a nivel ovárico la síntesis del factor de crecimiento neural (NGF) y su receptor de baja afinidad, el p-75. La unión del NGF con su receptor genera una cascada de señalización que viaja de manera retrograda hasta llegar al GCMS, el origen de la inervación simpática del ovario, donde estimula la expresión de genes que codifican para la TH, enzima limitante en la síntesis de catecolaminas. Al incrementar la TH aumenta también la concentración de NA que viaja a través de las fibras simpáticas que inervan al ovario vía el NOS lo que resulta en el desarrollo del SOPQ<sup>3</sup>. La disminución del tono simpático mediante la sección bilateral del NOS, restablece la respuesta ovulatoria. Lo cual apoya que la hiperactividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario vía NOS están implicadas en el desarrollo del SOPQ<sup>4,6</sup>.

### **Modelos de inducción del síndrome de ovario poliquístico**

La variedad de hipótesis etiológicas sobre el SOPQ ha llevado al uso de modelos animales que permiten el estudio de su patogenia, siendo estos inducidos mediante diversos estímulos:

- **Andrógenos:** Debido a que el hiperandrogenismo es considerado como el principal criterio de diagnóstico del SOPQ, se han planteado modelos de inducción mediante la exposición prenatal<sup>106</sup> y postnatal<sup>107</sup> a andrógenos en roedores<sup>108</sup>.

Tehrani y colaboradores (106) mostraron que la inyección con 5 mg de testosterona a ratas con 20 días de gestación, cuyos efectos son evaluados en las crías en etapa adulta, resulta en aciclicidad estral, disminución en el número de cuerpos lúteos e incremento en la concentración sérica de testosterona y LH, sin cambios en las concentraciones de progesterona y estradiol. Este modelo reproduce algunas de las características del SOPQ en la mujer, sin embargo no favorece la formación de quistes ováricos en el animal adulto<sup>106</sup>.

En otro modelo de exposición postnatal a andrógenos, Wu y colaboradores (107), mostraron que en ratas infantiles la inyección de propionato de testosterona durante 28 días, resulta en el incremento de las concentraciones de testosterona y estradiol, y en la disminución en la concentración de progesterona. Estos animales mostraron morfología ovárica poliquística similar a la de mujeres con SOPQ<sup>107</sup>.

Este modelo de inducción provoca un hiperandrogenismo sostenido que ha sido asociado con alteraciones el eje hipotálamo-hipófisis-ovario que culminan con la anovulación<sup>106,107</sup>.

- **Estrógenos:** Uno de los fármacos empleados en este modelo es el VE, un estrógeno de acción prolongada que presenta una vida media de eliminación de 15 días<sup>6</sup>. La administración de una dosis de 2 mg de VE en ratas infantiles<sup>4</sup> o adultas<sup>5</sup> induce las características clínicas del SOPQ presentes en la mujer. Este

modelo conduce a la aciclicidad estral, en donde el animal permanece en estro constante, favorece la formación de quistes 56 días posteriores al tratamiento e incrementa la atresia folicular, además de bloquear la ovulación<sup>5</sup>. Las concentraciones séricas de progesterona no se modifican<sup>4</sup>, mientras que, las de testosterona y estradiol aumentan<sup>4,6</sup>. Este modelo incrementa la concentración de NA ovárica, por lo que la condición hiperandrogénica ha sido asociada a la hiperactividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario<sup>6</sup>.

- **Inhibidores de las aromatasas:** Una de las hipótesis fisiopatológicas del SOPQ es la disminución de la actividad de la aromatasas en el ovario, el modelo que permite su estudio es la administración de letrozol, un fármaco que al inhibir la actividad de las aromatasas favorece la condición de hiperandrogenismo, lo cual se asocia con la formación de quistes ováricos<sup>109</sup>.

Lee y colaboradores (110) mostraron que en ratas infantiles y adultas tratadas durante 21 a 23 días con letrozol, se interrumpe el ciclo estral en donde la mayoría de los animales se encuentra en diestro, incrementa el peso ovárico y los ovarios presentan quistes foliculares, folículos atrésicos y disminución o ausencia de cuerpos lúteos, indicador de oligo- anovulación. En este modelo de inducción del SOPQ incrementa la concentración sérica de testosterona y LH, mientras que la concentración de progesterona y estradiol disminuyen. Por otra parte, en los animales tratados con letrozol se observan altas concentraciones de insulina y la alteración en la tolerancia a la glucosa<sup>110</sup>.

- **Estrés:** Partiendo del modelo de la rata tratada con VE, en el cual la hiperactividad de las fibras simpáticas que inervan al ovario precede a la formación de quistes ováricos, Paredes y colaboradores (111) emplearon un modelo combinado de estrés por frío y restricción del movimiento en ratas adultas, este modelo induce el aumento del tono simpático del ovario tres semanas después de la exposición<sup>111</sup>. El aumento del tono simpático fue comprobado por el incremento en el contenido de NA en el GCMS y por la liberación de NA en el ovario. Dicho incremento de NA es correlacionado con el aumento en la secreción de andrógenos y estradiol, además de la presencia de prequistes y la disminución en el porcentaje de animales ovulantes<sup>111</sup>.

Por otra parte, Dorfman y colaboradores (112) mostraron que en un modelo de estrés por frío durante 4 semanas, las concentraciones de NA y NGF aumentan, efecto asociado a un mecanismo compensatorio por el NGF a nivel del GCMS, similar a lo observado en la rata con SOPQ inducido por VE. En estos animales se mantiene la disminución en la población folicular e incrementa el número de folículos antrales con hipertrofia de las células de la teca, lo que podría ser resultado del incremento de NA. Los autores concluyen que la inducción del SOPQ en el modelo de estrés crónico por frío es producido a través de la activación simpática de las fibras que inervan el ovario<sup>112</sup>.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El SOPQ es la principal causa de infertilidad en mujeres en edad reproductiva, cuya prevalencia en México es del 6.6%. Su cuadro clínico presenta un conjunto de signos y síntomas entre los cuales se incluyen: el hiperandrogenismo clínico o bioquímico, oligoanovulación y morfología ovárica poliquística. Uno de los fármacos que permite la inducción del SOPQ es el VE, el cual provoca la hiperactividad de las fibras simpáticas que inervan a la gónada vía el NOS, evidenciada por el incremento de la concentración de NA ovárica. En la rata con SOPQ inducido con VE, la sección bilateral del NOS disminuye la concentración de NA ovárica lo que permite el restablecimiento de las funciones del ovario. Además de NA, el NOS transporta otros péptidos, por lo cual se han planteado modelos de denervación farmacológica que destruyen exclusivamente fibras de naturaleza noradrenérgica, tal como la administración de GTD. La inyección crónica de GTD por vía i.p. destruye las fibras periféricas de NA y en la rata con SOPQ favorece el restablecimiento de la ovulación y la concentración sérica de hormonas esteroides. Dado que la denervación sistémica, no permite discernir si dicho restablecimiento se debe exclusivamente a la disminución de la NA ovárica, en el presente estudio nos hemos planteado la siguiente pregunta de investigación:

En ratas con SOPQ ¿Cuál es el efecto de la denervación noradrenérgica del ovario izquierdo o derecho con GTD, sobre la respuesta ovulatoria, la concentración sérica de hormonas esteroides, la morfología ovárica y la inmunoreactividad de las fibras simpáticas, mediante la expresión de TH?

## **HIPÓTESIS**

Dado que el desarrollo y persistencia del SOPQ son consecuencia de la hiperactividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario vía el NOS y por tanto del incremento de la concentración de NA ovárica, suponemos que en ratas con SOPQ, inducido por la inyección de VE, la eliminación selectiva de las fibras noradrenérgicas de una de las gónadas mediante la microinyección de GTD en la bursa ovárica restablecerá las funciones del ovario microinyectado.

## **OBJETIVOS**

### **General:**

Evaluar en el modelo de la rata con SOPQ, el papel de la NA ovárica en la persistencia de la fisiopatología.

### **Particulares:**

Evaluar en ratas con SOPQ, inducido por la inyección de VE, el efecto de la denervación noradrenérgica ovárica mediante la microinyección unilateral de GTD sobre:

- El ciclo estral.
- El peso de órganos.
- El porcentaje de animales ovulantes.
- El número de ovocitos liberados.
- La morfología ovárica.

- La concentración sérica de hormonas esteroides.
- La inmunoreactividad de TH en los ovarios.

## **MATERIALY MÉTODOS**

### **Población de estudio y diseño:**

Se emplearon ratas hembras recién nacidas de la cepa CII-ZV, las cuales se mantuvieron en condiciones de bioterio luces encendidas de 05:00 a 19:00 h y temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . En el día del nacimiento (día cero) las crías se sexaron y colocaron en camadas de seis individuos por caja, cinco hembras y un macho. Las ratas tuvieron libre acceso a la madre hasta el momento del destete (24 días de vida) y posteriormente al agua y al alimento, hasta el día de la autopsia. Los experimentos se realizaron en estricto apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Los animales fueron asignados al azar a uno de los siguientes grupos experimentales (Figura 7):

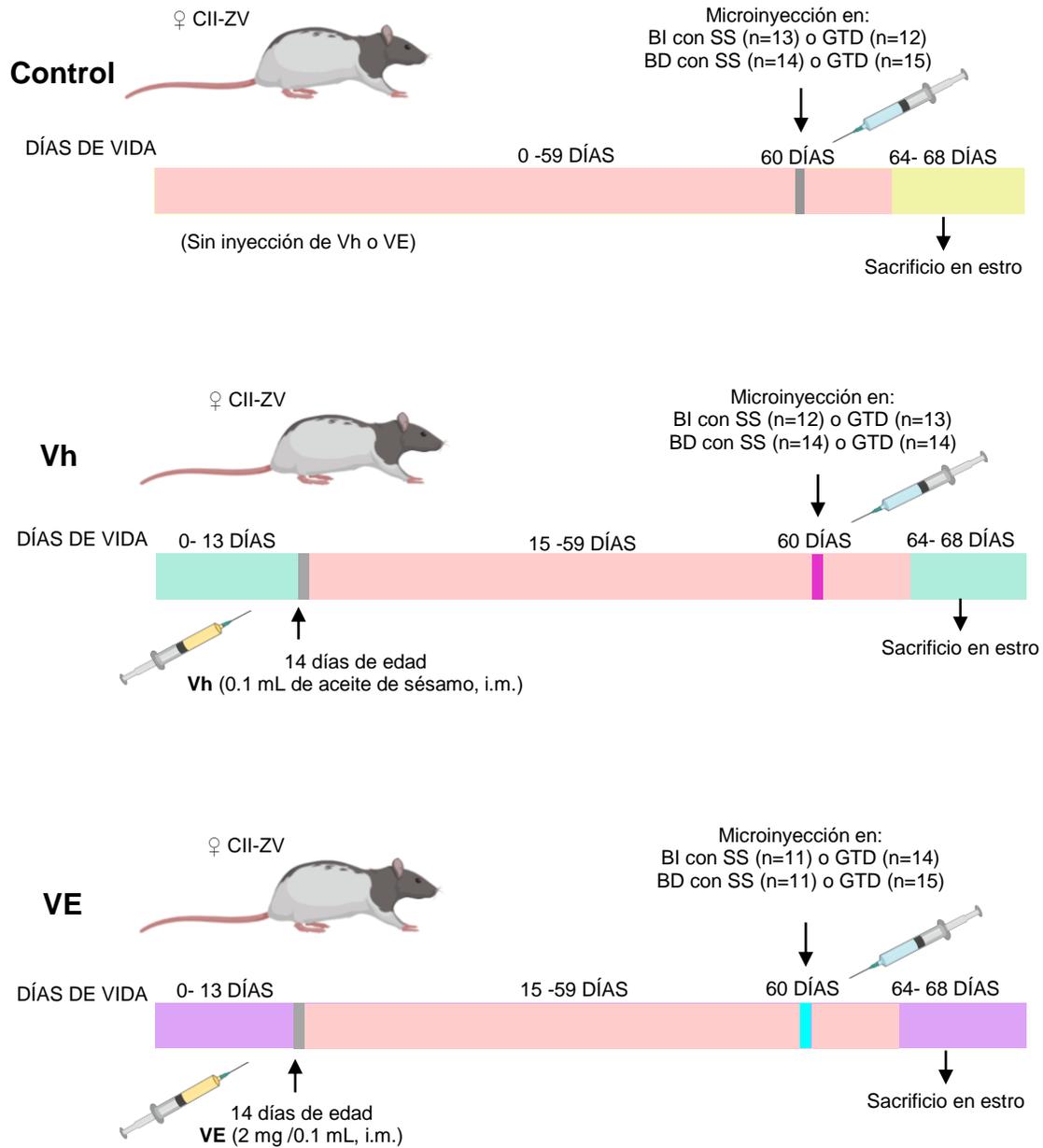


Figura 7. Esquema que muestra la metodología general de la investigación. BI, bursa izquierda; BD, bursa derecha; Vh, vehículo; VE, valerato de estradiol; SS, solución salina; GTD: guanetidina.

**Variables:**

- Independiente:
  - a) Microinyección de solución salina en la BI o BD.
  - b) Microinyección de GTD en la BI o BD.
- Dependiente:
  - a) Ciclo estral.
  - b) Peso de órganos.
  - c) Respuesta ovulatoria.
  - d) Morfología ovárica.
  - e) Concentración sérica de hormonas esteroideas.
  - f) Expresión de TH.

**Técnicas:**

1. **Inducción del Síndrome de Ovario Poliquístico:** Animales de 14 días de edad fueron inyectados por vía intramuscular con 2 mg de VE (Sigma Chem. Co., St. Luis, Mo. USA) disueltos en 0.1 mL de aceite de sésamo (SIGMA-ALDRICH, Co., St. Luis, USA) que fungió como vehículo (Vh), como grupos de comparación se emplearon animales inyectados con Vh o sin tratamiento. Se monitoreó diariamente la edad de apertura vaginal, parámetro que indica el

inicio de la pubertad en la rata, a partir de la cual se realizaron frotis vaginales por un lapso de dos semanas, mismos que se reanudaron dos semanas antes de que los animales cumplieran 60 días de edad.

2. **Denervación noradrenérgica ovárica:** Animales intactos o previamente inyectados con Vh o VE al cumplir los 60 días de edad, fueron microinyectados en la bursa ovárica izquierda o derecha con 20  $\mu$ L de GTD (dosis de 50 mg/kg de p.c.) o solución salina. Para ello los animales se anestesiaron con éter, se realizó una incisión dorsolateral en la piel, músculo y peritoneo de aproximadamente 2 cm de largo a través de la cual se expuso el ovario unido al útero, se identificó la bursa ovárica y se procedió con la microinyección, se regresó el ovario a la cavidad peritoneal y se suturó la herida.

Todos los tratamientos, frotis y cirugías se realizaron entre las 08:00 y las 11:00 horas.

Los animales fueron sacrificados entre los 64-68 días de edad al presentar un estro vaginal. El 80% de los animales fueron sacrificados por decapitación mientras que, el 20% restante fue sacrificado por perfusión intracardiaca.

3. **Sacrificios por decapitación:** Se colectó la sangre del tronco, se permitió la coagulación a temperatura ambiente y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos. El suero obtenido fue colocado en tubos eppendorf que se mantuvieron a -20°C hasta la cuantificación de progesterona, testosterona y estradiol por quimioluminiscencia.

A la autopsia de los animales, se extrajeron ambos ovarios, el útero y el bazo, todos los órganos se pesaron en una balanza analítica. Se separaron los oviductos de los ovarios y dentro de ellos se contó el número de ovocitos con ayuda de un microscopio estereoscópico (Nikon C-PS).

Los ovarios se fijaron en solución de Bouin durante 24 horas, posteriormente se deshidrataron en etanol al 70, 80, 96 y 100 % v/v, y por último en cloroformo; inmediatamente después de la deshidratación se incluyeron en paraplast (Leica Biosystems, Richmond, USA). Se realizaron cortes histológicos seriados a 10 µm, que fueron teñidos con hematoxilina-eosina y posteriormente montados con entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Se realizó el análisis de los cortes a 4, 20 y 40x con el fin de buscar la presencia de prequistes y quistes foliculares, cuerpos lúteos o folículos en desarrollo.

Los quistes foliculares se definieron como folículos desprovistos de ovocitos, que muestran una gran cavidad antral, una capa gruesa de células de la teca y un compartimento adelgazado de células de la granulosa que contiene células aparentemente sanas. Los folículos prequísticos se definieron como folículos grandes, con o sin ovocitos, que contienen cuatro o cinco capas de células de granulosa pequeñas con núcleo densamente empaquetado, que rodean una cavidad antral grande y con un compartimento de células de la teca aparentemente normal <sup>5</sup>.

4. **Sacrificios por perfusión intracardiaca:** Este método de sacrificio se realizó para la preservación de los ovarios empleados en la inmunohistoquímica para expresión de TH. Esta técnica de sacrificio permite la conservación de tejidos y la eliminación de restos sanguíneos dentro de este, mediante la administración de fijadores, lo que permite evitar ruido de fondo. Los animales fueron inyectados por vía i.p. con 40 mg/ kg de p.c. de pentobarbital sódico (Pisa Agropecuaria, S.A. de C.V.), se realizó la perfusión intracardiaca con una bomba peristáltica, a través de la cual se pasaron 150 mL de solución salina (solución para limpiar los órganos), seguido de 150 mL de paraformaldehído al 4% (solución fijadora), a una velocidad de 8 mL/ min. Al finalizar la perfusión con la solución fijadora, se extrajeron ambos ovarios y las glándulas adrenales las cuales fungieron como controles positivos para TH. Ambos tejidos se mantuvieron en paraformaldehído por 24 horas. Posteriormente se colocaron en solución buffer de fosfatos (PBS) durante un día. Por último los órganos se colocaron en sacarosa al 10, 20 y 30% durante 24 horas en cada solución, después del último cambio de sacarosa los órganos se incluyeron en tissue-tek (Sakura Finetek Inc., U.S.A.) y se congelaron a -20 °C, posteriormente se realizaron cortes histológicos a 7 µm de grosor de la parte medular de los órganos con ayuda de un criostato. Los cortes se montaron en laminillas previamente silanizadas.

**5. Inmunohistofluorescencia de TH:** Los cortes de ovarios de animales sacrificados por perfusión intracardiaca se enjuagaron una vez con PBS y dos veces con buffer de fosfatos (PBS) con 0,5% de Triton X-100. Se incubaron las secciones durante 30 minutos en albúmina de suero bovino al 2% libre de IgG (BSA sigma) para reducir la tinción de fondo. Posteriormente se incubó durante toda la noche a 4 °C con un anticuerpo primario policlonal de conejo anti-TH (1:200) (Santa Cruz Biotechnology Inc., EE. UU., sc-14,007). Al día siguiente, fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a fluoresceína FITC (1:200) (Jackson Immuno Research Laboratories Inc.) durante una hora. Se realizó la contratinción de los núcleos con DAPI Vecta-shield (Vector Labs., CA, EE. UU., H-1200). Las secciones de los ovarios se observaron usando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400, Japón) y se tomaron fotografías con una cámara digital (Nikon DS-U2, Japón). El análisis de la imagen se realizó utilizando el sistema Nis-Elements BR 3.0 (Nikon).

**6. Cuantificación de hormonas esteroides:** La cuantificación de hormonas esteroides en suero se realizó por quimioluminiscencia mediante el sistema Immulite 1000. En este inmunoensayo la cuantificación de la hormona de interés depende de la reacción competitiva entre un antígeno marcado con una enzima (fosfatasa alcalina) y un anticuerpo (Figura 8). La fosfatasa alcalina cataliza la desfosforilación del sustrato luminiscente (fosfato de adamantil dioxetano), dando como intermedio a un anión inestable que emite un fotón en la

descomposición. La cantidad de luz emitida es directamente proporcional a la cantidad de fosfatasa alcalina unida al anticuerpo e inversamente proporcional a la cantidad de la hormona libre<sup>113-116</sup>. El luminómetro del equipo detecta la señal y realiza el recuento de fotones de la luz emitida por la reacción en un rango de longitud de onda de 425 a 500 nm y mediante la interpolación en una curva estándar se transforma en concentración<sup>114,116</sup>.

El proceso de cuantificación para todas las hormonas se llevó a cabo mediante la siguiente secuencia de pasos<sup>116</sup>:

1. Se colocaron aproximadamente 500  $\mu$ L de suero de cada muestra dentro de un microtubo y se ingresó al equipo.
2. El equipo mide 25  $\mu$ L de muestra y la deposita en la fase sólida que contiene el anticuerpo policlonal para progesterona, testosterona o estradiol, según sea el caso.
3. Se añade la hormona conjugada con fosfatasa alcalina (fase líquida).
4. Se incuba durante una hora a 37 °C con agitación intermitente para la determinación de testosterona y estradiol, y 30 minutos para progesterona.
5. La hormona en la muestra de suero compite con el antígeno marcado, es decir la hormona marcada con la fosfatasa alcalina.
6. El conjugado enzimático no unido es eliminado por centrifugación.
7. Se agrega el sustrato quimioluminiscente (fosfato de adamantil dioxetano).
8. Se incuba durante 10 minutos.
9. El sustrato se hidroliza a un anión inestable catalizado por la fosfatasa alcalina.

10. La descomposición del anión produce una emisión sostenida de luminiscencia que es cuantificada por el luminómetro.

11. Se transforma la intensidad de señal en una concentración mediante la interpolación dentro de la curva estándar, la intensidad de la señal es inversamente proporcional a la concentración de la hormona dentro de la muestra.

Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron 6.7% y 7.9% (progesterona), 6.4% y 7.3% (testosterona) y 7.1% y 8.3% (estradiol).

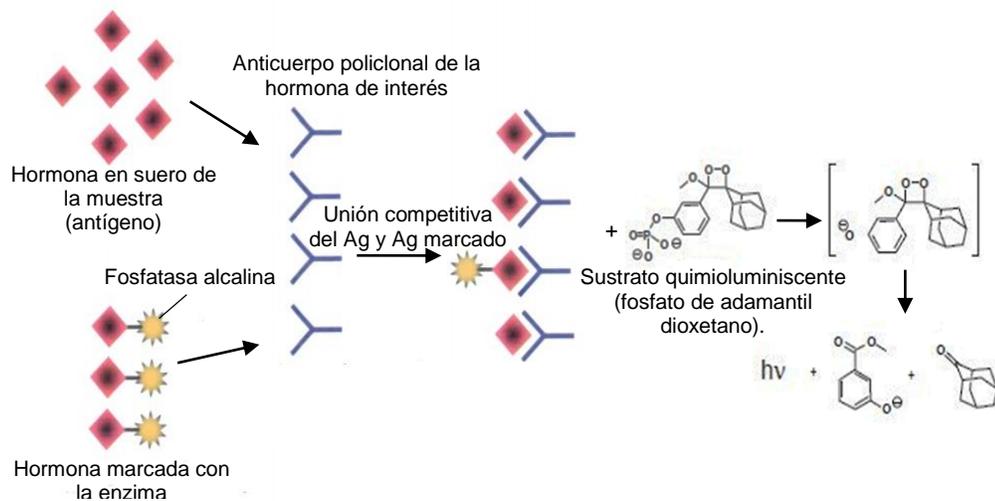


Figura 8. Esquema que muestra el inmunoensayo competitivo por quimioluminiscencia. Ag: antígeno. Jandreski, 1998 (113).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La media  $\pm$  e.e.m. del peso corporal, peso de los órganos y la concentración sérica de hormonas esteroideas, fueron analizados por la prueba de Análisis de Varianza Multifactorial de dos vías (ANDEVA de dos factores) seguida de la prueba de Tukey-Kramer. El porcentaje de animales ovulantes y el porcentaje de animales acíclicos se analizó por la prueba exacta de Fisher para proporciones. La media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados fue analizada por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de Dunn. Todo el análisis estadístico se realizó usando el programa estadístico *GraphPad Prism 8.3.0*. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias cuya probabilidad sea igual o menor a 0.05 ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS

### Ciclo estral

La inyección de VE a ratas de 14 días de edad resultó en la alteración del ciclo estral en el 100% de los animales, en donde la mayoría de estos mostraron periodos de estros persistentes. El tratamiento con GTD revirtió este efecto en el 57% de los animales cuando se microinyectaron del lado izquierdo y en el 47% cuando se hizo del lado derecho. Este efecto no se observa en los animales con SOPQ microinyectados con solución salina, ya que el 100% de estos son acíclicos (Figura 9).

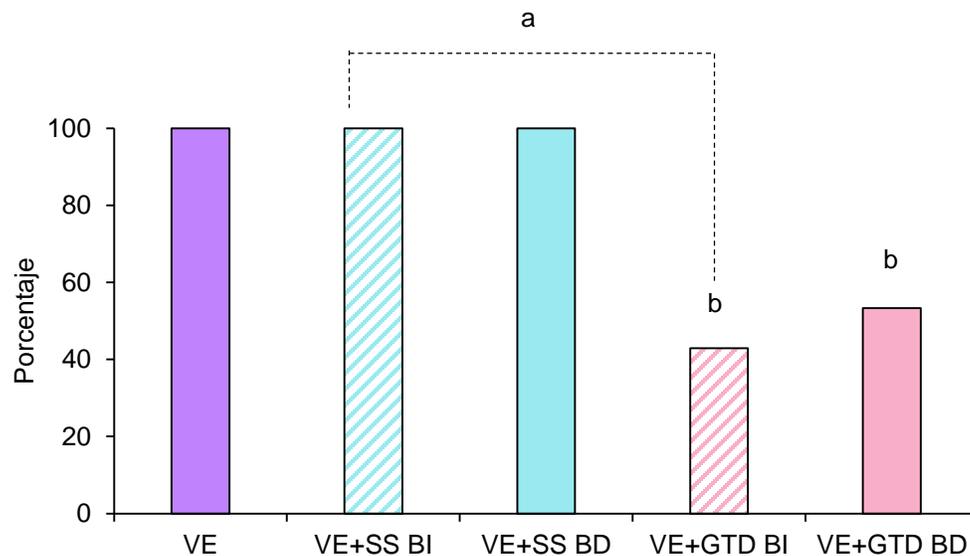


Figura 9. **Porcentaje de animales acíclicos** inyectados con valerato de estradiol (VE) en el día 14 de vida, antes y después de ser microinyectados con solución salina (SS) o guanetidina (GTD) en la bursa ovárica izquierda (BI) o derecha (BD) a los 60 días de edad. Los animales fueron sacrificados entre los 64-68 días de edad en el día del estro vaginal. a  $p < 0.05$  vs. VE+SS (Bursa izquierda), b  $p < 0.01$  vs. VE. Prueba exacta de Fisher.

## **Peso corporal y el peso relativo de órganos**

El **peso corporal** de animales tratados con VE y microinyectados con solución salina en la bursa ovárica izquierda o derecha fue menor, respecto a los animales inyectados con Vh microinyectados con solución salina. Mientras que, en animales tratados con VE, la microinyección de GTD en la bursa derecha resultó en el aumento del peso corporal, respecto a los animales con SOPQ microinyectados con solución salina (Cuadro 2).

En animales tratados con Vh, la microinyección con GTD en la bursa izquierda resultó en la disminución de la **masa ovárica**, en comparación con animales Vh microinyectados con solución salina. La masa ovárica de los animales tratados con VE y microinyectados unilateralmente con solución salina fue menor que los tratados con Vh, mientras que en los microinyectados con GTD en la bursa del ovario derecho fue mayor que en los microinyectados con solución salina (Cuadro 2).

El **peso del útero** fue menor en animales tratados con VE y microinyectados con solución salina en la bursa del ovario derecho, respecto a los animales inyectados con Vh. Mientras que, la microinyección con GTD en la bursa del ovario derecho de animales con SOPQ, resultó en el incremento del peso del útero en comparación con animales con la patología microinyectados con solución salina y aquellos microinyectados con GTD en la bursa izquierda (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Peso corporal y peso relativo (mg/100 g de peso corporal) de la masa ovárica y del útero por grupo de estudio.

Grupo	Peso corporal (gramos)	Masa ovárica (mg/100g pc)	Útero (mg/100g pc)
SS-BI	193.5± 3.6	26.5± 1.2	176.3± 11.4
SS-BD	199.9± 3.4	31.8± 1.8	167.9± 9.9
GTD-BI	190.5± 5.7	28.0± 2.8	170.5± 14.9
GTD-BD	205± 4.2	30.2± 1.4	172.4± 9.2
Vh+SS-BI	210.2± 5.5	32.1± 3.2	147.4± 7.5
Vh+SS-BD	191.2± 7.1	30.7± 2.0	167.9± 10.2
Vh+GTD-BI	203.2± 4.5	26.0± 1.7 a	144.4± 6.0
Vh+GTD-BD	205.4± 3.1	29.0± 1.5	169.9± 6.2
VE+SS-BI	172.0± 7.2 a	23.4± 2.5 a	131.0± 12.3
VE+SS-BD	161.0± 14.0 a	18.2± 3.7 a	124.3± 9.9 a
VE+GTD-BI	190.4± 6.0	25.2± 1.2	125.0± 8.4
VE+GTD-BD	196.3± 5.1 b	28.3± 1.0 b	157.6± 10.3 bc

Media ± eem del peso corporal y peso relativo (mg/100 g de peso corporal) de la masa ovárica y del útero animales sin tratamiento previo o inyectados vía intramuscular con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) a los 14 días de edad y microinyectados a los 60 días de edad en la bursa ovárica izquierda (BI) o derecha (BD) con solución salina (SS) o guanetidina (GTD). Los animales fueron sacrificados entre los 64-68 días de edad en el día del estro vaginal. a  $p < 0.01$  vs Vh+SS (su respectiva bursa); b  $p < 0.01$  vs VE+SS (Su respectiva bursa); c  $p < 0.05$  vs VE+GTD (BI). Prueba de ANDEVA de dos factores seguida de Tukey-Kramer.

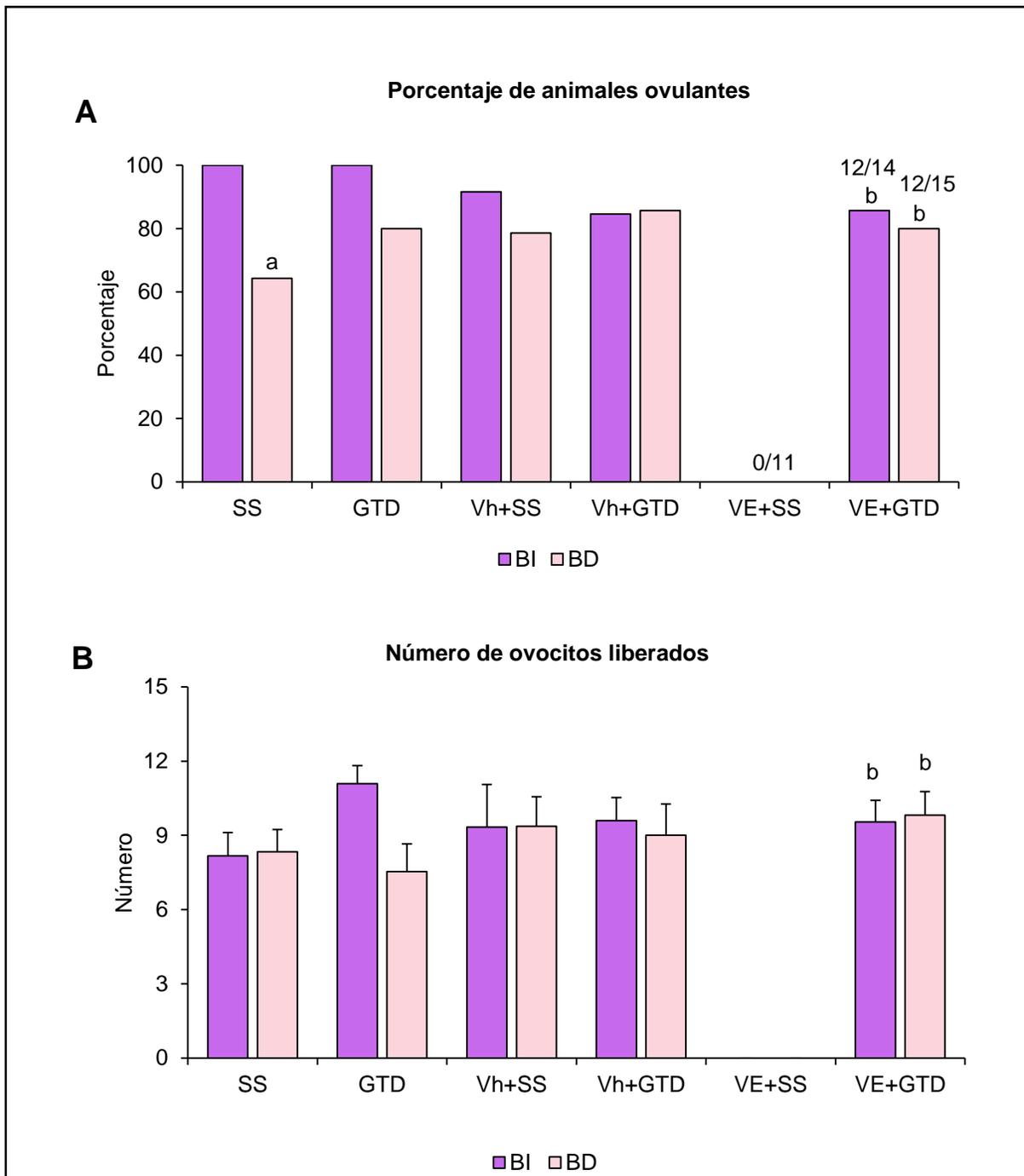
## Ovulación

La microinyección de solución salina en la bursa del ovario derecho disminuyó el porcentaje de animales ovulantes en comparación con los animales microinyectados en la bursa izquierda (Figura 10A). El número de ovocitos liberados no se modificó por la microinyección de solución salina o GTD (Figura 10B).

En los animales inyectados con Vh, la microinyección de solución salina o GTD no modificó el porcentaje de animales ovulantes (Figura 10A), ni el número de ovocitos liberados (Figura 10B).

En animales con SOPQ, la microinyección de solución salina en la bursa ovárica izquierda o derecha resultó en un bloqueo de la ovulación.

En tanto que, en las ratas tratadas con VE y microinyectadas con GTD en la bursa izquierda o derecha el 80% de los animales ovuló por ambos ovarios, con una cuota ovulatoria similar a la del grupo Vh microinyectado con GTD (Figura 10A, 10B).



**Figura 10. Porcentaje de animales ovulantes (A) y Media  $\pm$  eem del número de ovocitos liberados (B) por los ovarios izquierdo y derecho de animales intactos o tratados con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) a los 14 días de edad y microinyectados a los 60 días de edad en la bursa ovárica izquierda (BI) o derecha (BD) con solución salina (SS) o guanetidina (GTD). Los animales fueron sacrificados entre los 64-68 días de edad en el día del estro vaginal. a  $p < 0.05$  vs SS (BI); b  $p < 0.01$  vs VE+SS (su respectiva bursa). Prueba exacta de Fisher (para el porcentaje de animales ovulantes) y Prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la prueba de Dunn (para el número de ovocitos liberados).**

## **Morfología ovárica**

Los animales que fueron tratados con Vh y microinyectados con solución salina o GTD, en la bursa del ovario izquierdo (Figura 11A, 11B) o derecho (Figura 12A, 12B) mostraron folículos en diferentes estadios del desarrollo y cuerpos lúteos tanto en el ovario microinyectado como en el contralateral.

En ratas con SOPQ la microinyección de solución salina no revirtió el efecto del VE, ya que en la histología del ovario microinyectado se observaron múltiples quistes y prequistes foliculares (Figura 11C, 12C). Mientras que, la microinyección con GTD resultó en la presencia de cuerpos lúteos y de folículos en desarrollo en el ovario microinyectado y quistes foliculares en el contralateral (Figura 11D, 12D).

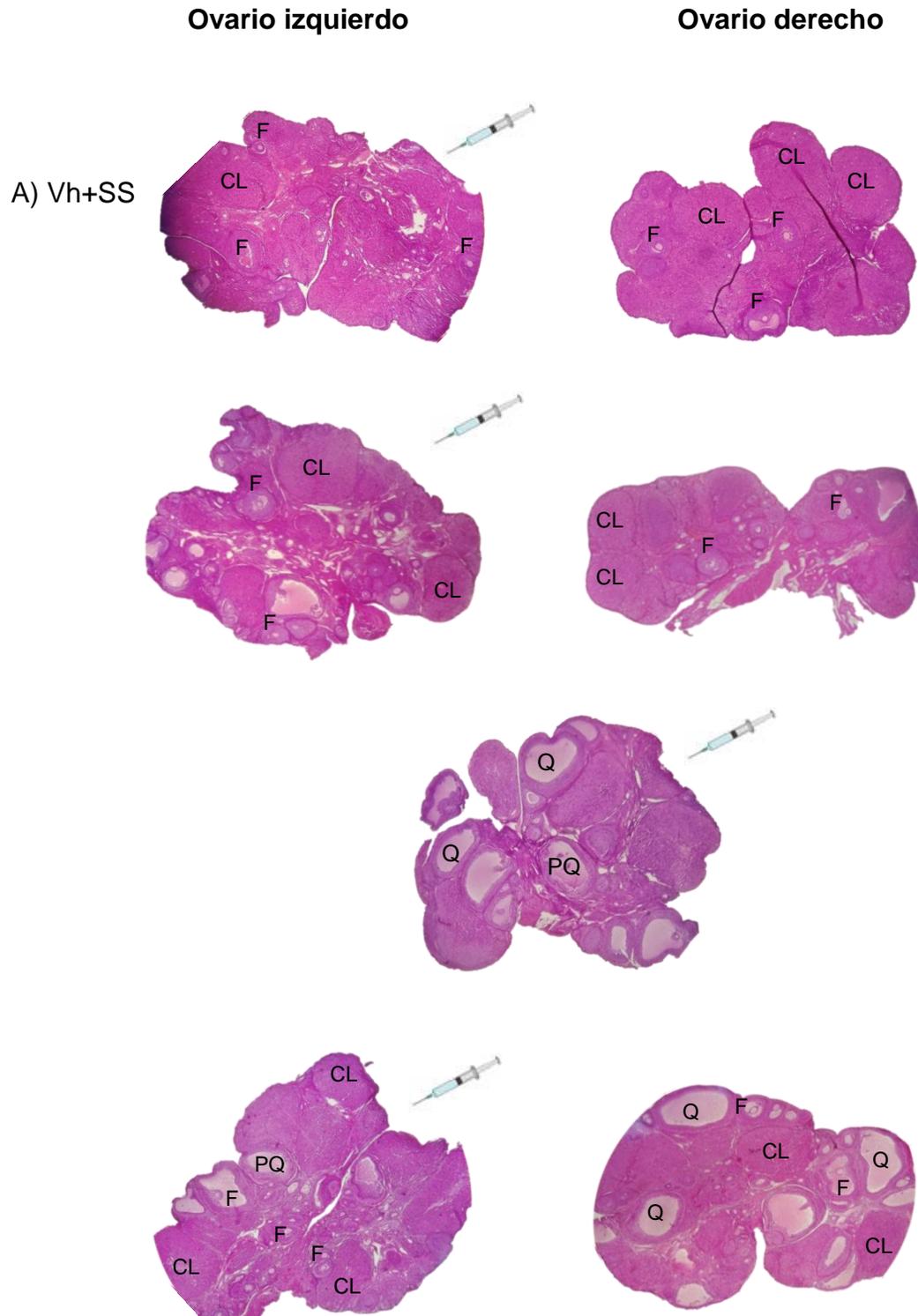


Figura 11. **Micrografías de los cortes histológicos** de ovarios de ratas inyectadas a los 14 días de edad con vehículo (Vh) o con valerato de estradiol (VE) y microinyectadas a los 60 días de edad en la bursa del ovario izquierdo (BI) con solución salina (SS) o guanetidina (GTD). Los animales fueron sacrificados entre los 64-68 días de edad en el día del estro vaginal. Cortes a 10  $\mu$ m de grosor teñidos con HE, 40x. F, folículo; CL, cuerpo lúteo; Q, quiste; PQ, prequiste. La jeringa indica el ovario que fue microinyectado (ovario izquierdo).

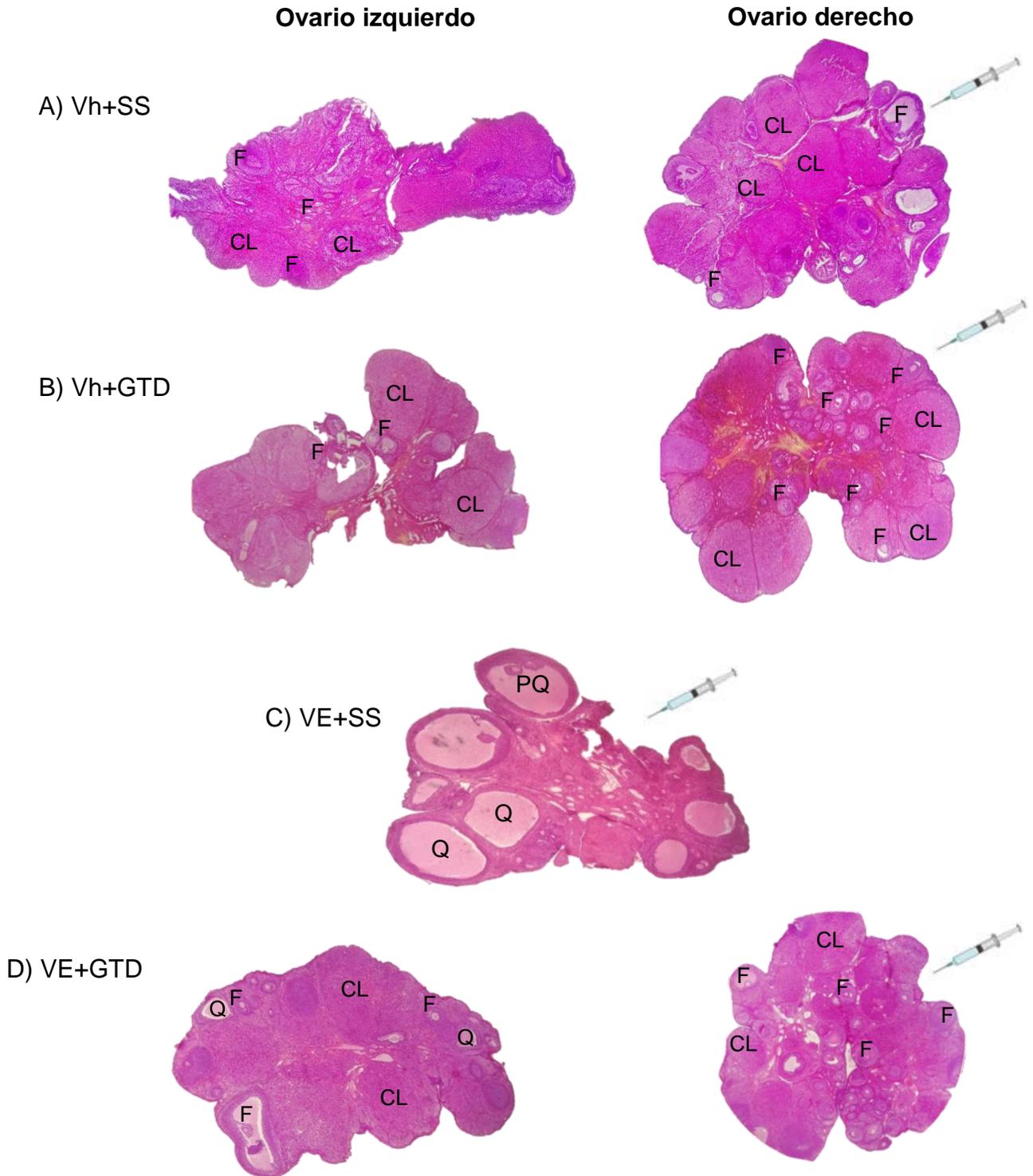


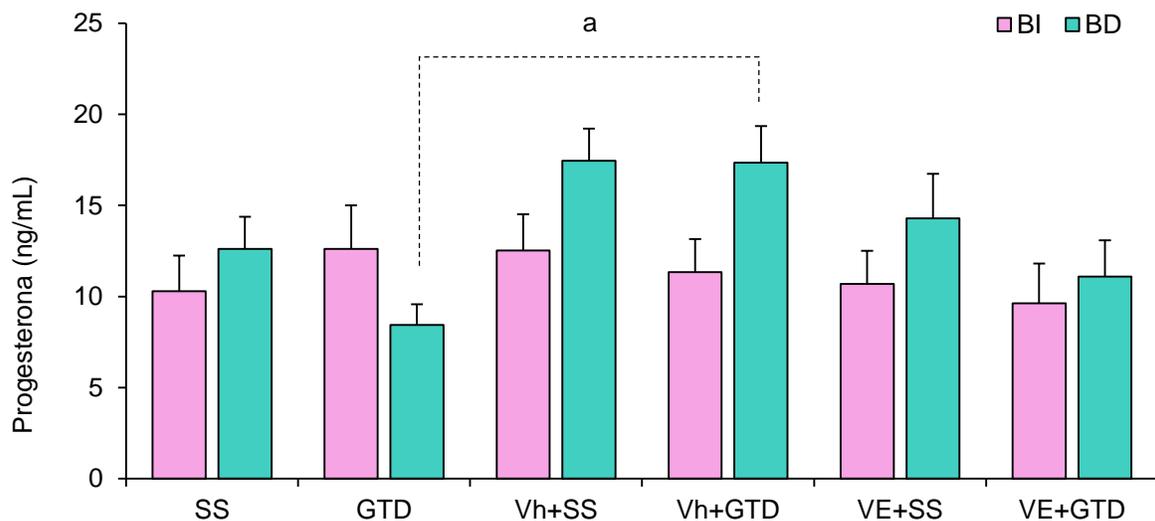
Figura 12. **Micrografías de los cortes histológicos** de ovarios de ratas inyectadas a los 14 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) y microinyectadas a los 60 días de edad en la bursa del ovario derecho (BD) con solución salina (SS) o guanetidina (GTD). Los animales fueron sacrificados entre los 64-68 días de edad en el día del estro vaginal. Cortes a 10  $\mu$ m de grosor teñidos con HE, 40x.

F, folículo; CL, cuerpo lúteo; Q, quiste; PQ, prequiste. La jeringa indica el ovario que fue microinyectado (ovario derecho).

## Concentración sérica de hormonas esteroides

### Progesterona

La microinyección en la bursa izquierda o derecha con solución salina o GTD, no modificó la concentración en suero de progesterona. En los animales tratados con Vh y microinyectados con GTD en la bursa del ovario derecho la concentración de progesterona fue mayor respecto al grupo sin tratamiento microinyectado con GTD en la bursa derecha. En animales con VE la denervación con GTD no modificó la concentración sérica de progesterona (Figura 13).



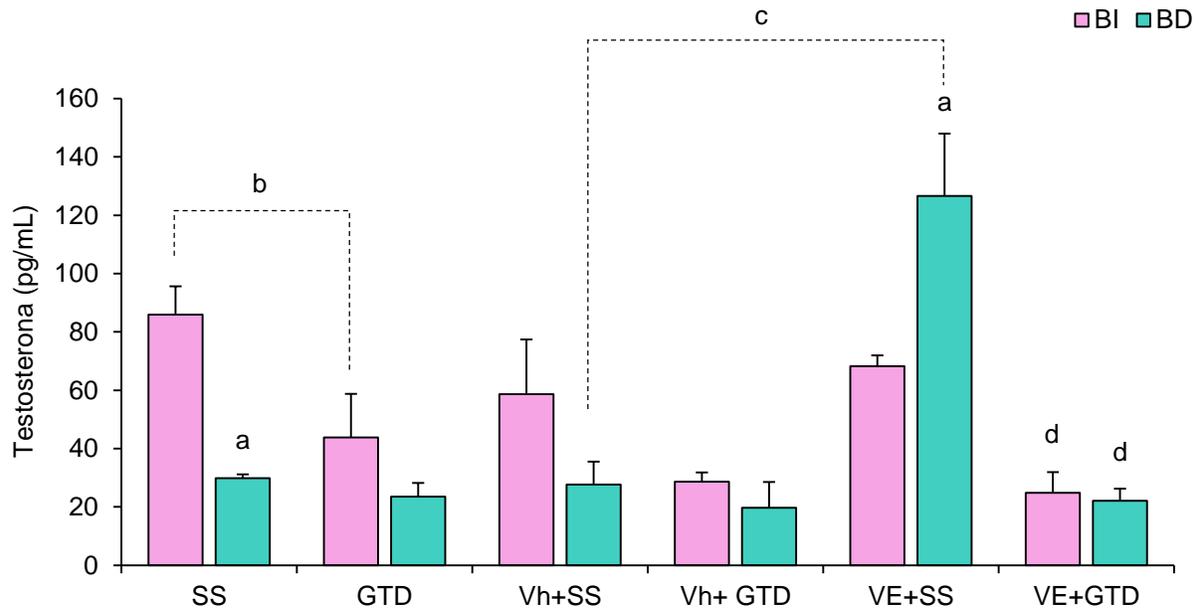
**Figura 13.** Media  $\pm$  eem de la **concentración sérica de progesterona** de animales sin tratamiento previo o tratados con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) a los 14 días de edad y microinyectados a los 60 días de edad en la bursa ovárica izquierda (BI) o derecha (BD) con solución salina (SS) o guanetidina (GTD). Los animales fueron sacrificados entre los 64-68 días de edad en el día del estro vaginal. a  $p < 0.01$  vs GTD (BD). Prueba de ANDEVA de dos factores seguida de Tukey-Kramer.

## **Testosterona**

La microinyección de solución salina en la bursa del ovario derecho resultó en una menor concentración de testosterona en comparación con la bursa del ovario izquierdo. La concentración de testosterona en animales microinyectados con GTD en la bursa del ovario izquierdo fue menor respecto a los animales microinyectados con solución salina (Figura 14).

La microinyección de solución salina o GTD en la bursa izquierda o derecha de animales tratados con Vh, no modificó la concentración de testosterona (Figura 14).

En animales con SOPQ microinyectados con solución salina en la bursa del ovario derecho la concentración sérica de testosterona fue mayor en comparación con los animales tratados con Vh microinyectados con solución salina en la bursa derecha y que en los animales tratados con VE y microinyectados con solución salina en la bursa del ovario izquierdo. La concentración sérica de testosterona fue menor en animales tratados con VE y microinyectados con GTD en la bursa ovárica izquierda o derecha en comparación con el grupo tratado con VE y microinyectado con solución salina (Figura 14).



**Figura 14.** Media  $\pm$  eem de la **concentración sérica de testosterona** de animales sin tratamiento previo o tratados con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) a los 14 días de edad y microinyectados a los 60 días de edad en la bursa ovárica izquierda (BI) o derecha (BD) con solución salina (SS) o guanetidina (GTD). Los animales fueron sacrificados entre los 64-68 días de edad en el día del estro vaginal. a  $p < 0.05$  vs su BI; b  $p < 0.01$  vs SS (BI), c  $p < 0.01$  vs Vh+SS (BD), d  $p < 0.01$  vs VE+SS (su respectiva bursa). Prueba de ANDEVA de dos factores seguida de Tukey-Kramer.

## **Estradiol**

La microinyección de solución salina o GTD tiene efectos asimétricos sobre la concentración sérica de estradiol, es decir, cuando se microinyecta solución salina en la bursa derecha la concentración de la hormona es menor. Mientras que, se observan mayores concentraciones de estradiol cuando se microinyecta GTD la bursa del ovario derecho (Figura 15).

La concentración de estradiol disminuyó en animales tratados con Vh y microinyectados con solución salina en la bursa del ovario izquierdo, en comparación con los animales sin tratamiento y microinyectados con solución salina en la bursa izquierda. En animales inyectados con Vh y denervados con GTD por el ovario derecho la concentración sérica de estradiol fue menor respecto al grupo sin tratamiento microinyectado con GTD en la bursa del ovario derecho (Figura 15).

La concentración sérica de estradiol en animales con SOPQ no se modificó por la microinyección de solución salina o GTD en la bursa izquierda o derecha del ovario en comparación con animales tratados con Vh (Figura 15).

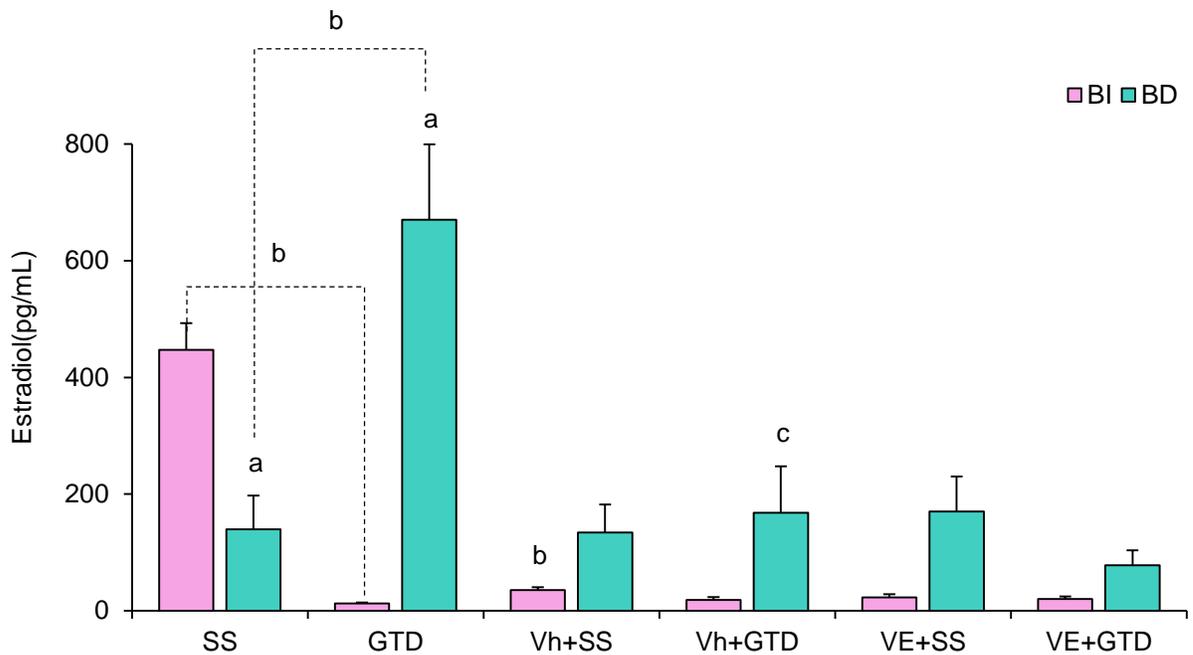


Figura 15. Media  $\pm$  eem de la **concentración sérica de estradiol** de animales sin tratamiento previo o tratados con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) a los 14 días de edad y microinyectados a los 60 días de edad en la bursa ovárica izquierda o derecha con solución salina (SS) o guanetidina (GTD). Los animales fueron sacrificados entre los 64-68 días de edad en el día del estro vaginal. a  $p < 0.05$  vs su BI, b  $p < 0.01$  vs SS (su respectiva bursa), c  $p < 0.01$  vs GTD (BD). Prueba de ANDEVA de dos factores seguida de Tukey-Kramer.

### **Inmunoreactividad de TH en los ovarios**

En los ovarios de los animales con SOPQ, microinyectados con solución salina se observó la presencia de prequistes cuyas células de la teca presentan inmunoreactividad para la enzima TH (Figura 16).

La población folicular observada en los ovarios de animales tratados con Vh y microinyectados con GTD en la bursa del ovario izquierdo no presentó inmunoreactividad a la TH, sin embargo, en el cuerpo lúteo se observó una baja expresión de la enzima. Mientras que, cuando la GTD se microinyectó en el ovario derecho, las estructuras foliculares si presentaron inmunoreactividad (Figura 16).

En los animales tratados con VE se observó que cuando el ovario izquierdo es microinyectado con GTD este muestra inmunoreactividad a TH en los cuerpos lúteos, mientras que, el ovario derecho presenta quistes que expresan inmunoreactividad a TH, así como folículos en diferentes estadios del desarrollo (Figura 16).

Si la microinyección se realiza en el ovario derecho, este muestra inmunoreactividad a TH en folículos y cuerpos lúteos, mientras que los prequistes observados en el ovario izquierdo no presentan inmunoreactividad (Figura 16).

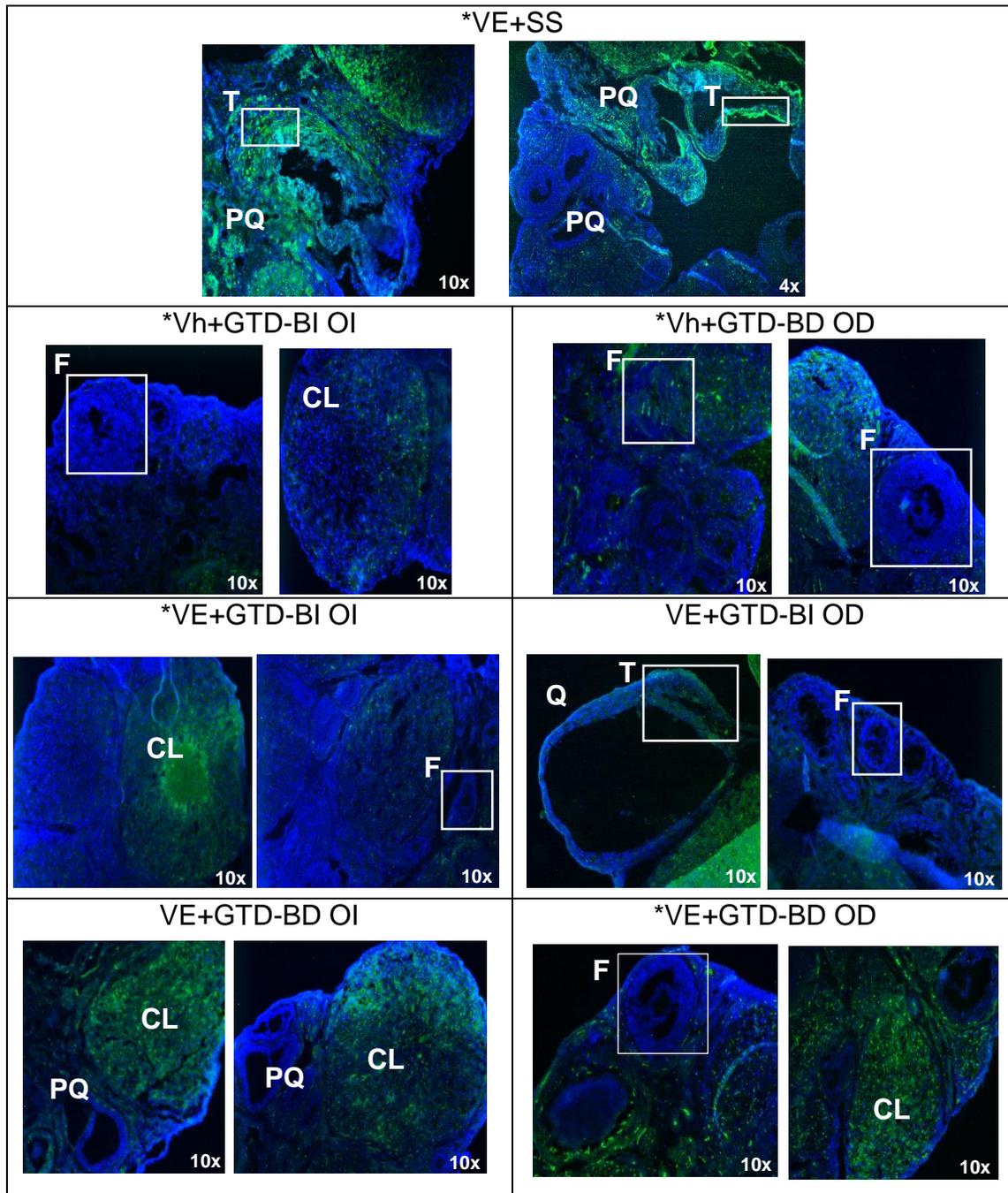


Figura 16. Fotomicrografías que muestran la inmunoreactividad para la **tirosina hidroxilasa (TH)** en cortes de ovario de animales inyectados a los 14 días de edad con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) y microinyectados a los 60 días de edad en la bursa ovárica izquierda (BI) o derecha (BD) con solución salina (SS) o guanetidina (GTD). Todos los animales fueron sacrificados entre los 64-68 días de edad en el día del estro vaginal. Las secciones de los ovarios fueron teñidas con anticuerpo anti-TH (color verde) y los núcleos con DAPI (color azul). OI, ovario izquierdo; OD, ovario derecho; PQ, prequiste; T, células de la teca; F, folículo; CL, cuerpo lúteo; Q, quiste. El \* indica el ovario microinyectado. El recuadro blanco indica folículos en desarrollo, así como la teca de quistes y prequistes foliculares.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que en ratas con SOPQ la microinyección unilateral de GTD restablece, tanto en el ovario microinyectado como en el que no lo fue, la respuesta ovulatoria en el 80% de los animales, lo cual se corrobora por la presencia de cuerpos lúteos y se acompaña de la disminución en la concentración sérica de testosterona. Estos resultados nos permiten sugerir que la persistencia del SOPQ es regulada de manera estimulante por la NA ovárica y son una evidencia más de la comunicación entre las gónadas (Figura 17).

El tratamiento con VE a ratas de 14 días de edad resultó en la alteración del ciclo estral, con periodos de estros persistentes, menor peso corporal, disminución en la masa ovárica, falta de ovulación y presencia de quistes, tal y como ha sido reportado<sup>5,-7, 117.120,</sup>.

En mujeres con SOPQ se ha mostrado que la proporción LH/FSH se altera y ello favorece un incremento en la secreción de LH, lo que conduce a la irregularidad del ciclo menstrual<sup>104</sup>. En ratas con SOPQ, inducido por el tratamiento con VE, se observa un patrón de aciclicidad con cornificación vaginal persistente, que se acompaña de alteraciones en las concentraciones de LH<sup>5,118,121</sup>. Es posible que en nuestros animales tratados con VE y microinyectados en la bursa izquierda o derecha con solución salina, la alteración en el ciclo estral se explique por la modificación en los pulsos de secreción de GnRH, inducidos por el VE. Por otro lado, se ha planteado que el hiperandrogenismo, así como la hiperactividad de las fibras noradrenérgicas inducen una condición de

aciclicidad<sup>6,117</sup>. En el presente estudio, se observó una condición de hiperandrogenismo sólo en los animales con SOPQ que fueron microinyectados con solución salina en la bursa derecha, tal asimetría podría deberse a las diferencias en el número de fibras simpáticas que reciben los ovarios<sup>88</sup> y al número de conexiones tras-sinápticas que presentan las gónadas con el sistema nervioso central (SNC)<sup>126</sup>. Estos resultados permiten sugerir que el ciclo estral no sólo está regulado por las concentraciones séricas de hormonas esteroides, sino también por la NA ovárica.

Los estudios de Barria y colaboradores (6) y Rosa-E-Silva (118) apoyan nuestra interpretación, ya que mostraron que en la rata con SOPQ inducido por VE, el patrón del ciclo estral se recupera al eliminar la hiperactividad de las fibras simpáticas. En el presente estudio se observó que en el modelo del animal con SOPQ, la destrucción farmacológica de las fibras simpáticas por la microinyección con GTD restablece el patrón del ciclo estral en el 50% de los animales.

Aproximadamente el 50% de las mujeres con SOPQ tienen sobrepeso u obesidad, la mayoría de estas presentan el fenotipo abdominal misma que ha sido relacionada con alteraciones metabólicas como la resistencia a la insulina<sup>122</sup>. Contrario a estas observaciones nuestros resultados muestran que en el modelo de la rata con SOPQ, inducido con VE, hay una pérdida en el peso corporal, tal y como ha sido reportado<sup>119,123</sup>. Stener-Victorin y colaboradores (123) sugieren que en ratas con la fisiopatología, la disminución en el peso corporal se debe al aumento en el metabolismo de grasas que se

producen en respuesta al incremento en la producción de glucocorticoides suprarrenales<sup>123</sup>, ya que en roedores el aumento de la concentración sérica de glucocorticoides favorece la actividad lipolítica sobre los adipocitos, lo que provoca la disminución del tejido adiposo y por tanto del peso corporal<sup>124</sup>.

Por otro lado, Wellman (125), mostró que la activación del receptor adrenérgico  $\alpha 1$  en el núcleo paraventricular inhibe la ingesta de alimentos. En ratas con SOPQ, inducido por VE, se ha observado un incremento en la expresión de dicho receptor en el núcleo paraventricular, que se acompaña de hiperactividad de las fibras simpáticas<sup>123</sup>, lo cual podría explicar la pérdida de peso observado en nuestros animales. Asimismo, mostramos que en ratas con SOPQ, la microinyección de GTD en la bursa del ovario derecho favoreció la ganancia del peso corporal, en tanto que en los animales microinyectados con GTD en la bursa del ovario izquierdo el peso corporal permaneció bajo. Hasta el momento no contamos con una explicación para tal respuesta asimétrica.

El desarrollo folicular es regulado de manera estimulante por la secreción pulsátil de FSH a partir de la formación de folículos secundarios, momento en el cual los folículos expresan receptores a dicha gonadotropina<sup>36,37</sup>. Nuestros resultados muestran una disminución de la masa ovárica en los animales con SOPQ microinyectados con solución salina, que puede ser atribuida a la disminución de las concentraciones circulantes de gonadotropinas tras la administración del VE, lo que conllevaría a un menor desarrollo folicular<sup>5</sup>. En nuestros animales la presencia de quistes foliculares, la ausencia de cuerpos lúteos y el escaso desarrollo folicular, apoyan esta teoría.

Se ha mostrado que la eliminación de las fibras noradrenérgicas, mediante la inyección i.p. de GTD resulta en la disminución del desarrollo folicular<sup>93</sup> y de la masa ovárica<sup>127</sup>. En el presente estudio se observó que en los animales tratados con Vh la microinyección de GTD en la bursa del ovario izquierdo disminuye la masa ovárica en comparación con un animal control. Estos resultados apoyan la hipótesis de que además de las gonadotropinas, las catecolaminas participan de manera estimulante en la regulación del crecimiento folicular, que repercute en el peso de la gónada.

Sin embargo, en ratas con SOPQ, inducido por VE, la disminución del tono simpático a nivel sistémico por la administración de GTD<sup>7</sup> o local por el bloqueo de receptores  $\beta$ -adrenérgicos con propanolol<sup>32</sup>, favorece el crecimiento folicular, lo que ha llevado a sugerir que en la rata con SOPQ, la inervación noradrenérgica ejerce un efecto inhibitorio sobre la dinámica del desarrollo folicular y favorece la formación de quistes. Es posible que el aumento en la masa ovárica observada en nuestros animales con SOPQ y microinyección de GTD en la bursa del ovario derecho se explique por la disminución del tono noradrenérgico y que la ausencia de efecto sobre la masa ovárica al microinyectar GTD en la bursa del ovario izquierdo, indique que el desarrollo folicular se reactiva de manera más eficiente en el ovario derecho. Esta respuesta puede estar relacionada con la inervación recibida por los ovarios<sup>77</sup>, ya que se ha mostrado que el ovario derecho recibe un mayor número de fibras nerviosas<sup>88</sup>.

Por otra parte en la mujer, se han mostrado asimetrías entre los ovarios izquierdo y derecho, siendo el ovario derecho el que cuenta con un 8% más de folículos antrales y

10% más de volumen que el ovario izquierdo<sup>128</sup>. En cobayas prepúberes, el porcentaje de folículos sanos con un diámetro promedio inferior a 350  $\mu\text{m}$  es significativamente mayor en el ovario derecho que en el izquierdo<sup>129</sup>. Por lo que no se descarta que en nuestros animales con SOPQ, el tratamiento con GTD haya favorecido el crecimiento de un mayor número de folículos por el ovario derecho, dando como resultado el incremento en la masa ovárica.

En los animales con SOPQ microinyectados con solución salina en la bursa del ovario derecho se observó una disminución en el peso del útero, que podría explicarse por el incremento en la concentración sérica de testosterona observado en nuestros animales; ya que se ha mostrado que esta hormona inhibe la proliferación de células del estroma uterino<sup>130</sup>. El aumento en el peso del útero observado en los animales con SOPQ y denervados con GTD en la bursa del ovario derecho, apoyan esta idea, ya que la concentración de testosterona fue menor. Sin embargo, este aumento en el peso uterino no se observa cuando la GTD se microinyecta en la bursa izquierda a pesar de la disminución en la concentración de testosterona, probablemente este hecho sea debido al porcentaje de fibras noradrenérgicas que inervan al útero ya que el 90% de estas provienen del NPO, y sólo el 3% son positivas a TH<sup>131</sup>. Se ha mostrado que las neuronas que inervan al útero contienen en su mayoría SP y CGRP<sup>132</sup> y que el aumento de ambos péptidos es paralelo al crecimiento uterino<sup>133</sup>. Brauer y colaboradores (133) mostraron que la eliminación de las fibras sensoriales con capsaicina en ratas neonatales incrementa la densidad de las fibras noradrenérgicas en el útero, y la concentración de NA uterina, con lo que los autores sugieren que la hiperactividad de las fibras

noradrenérgicas después de la denervación sensorial se produce como consecuencia de una mayor disponibilidad del NGF para los nervios simpáticos<sup>133</sup>. Con estas evidencias sugerimos que la innervación sensorial podría estar participando en la regulación del peso uterino y dado que el ovario izquierdo y derecho tienen conexiones tras sinápticas diferentes con el SNC<sup>126</sup>, el mecanismo compensatorio de la innervación sensorial a consecuencia de la destrucción de las fibras noradrenérgicas es distinto.

En nuestros animales inyectados con VE, el bloqueo en la respuesta ovulatoria que se acompaña de morfología ovárica poliquística, puede deberse a una mayor actividad de las fibras simpáticas que inervan el ovario. Lara y colaboradores (3) mostraron que el desarrollo de quistes foliculares por el tratamiento con VE está precedido por un aumento en el ovario de la síntesis de NGF y su receptor de baja afinidad el p75, la unión del NGF a su receptor provoca una cascada de señalización retrógrada lo que conduce al aumento en la actividad de neuronas noradrenérgicas localizadas en el GCMS que inervan la glándula<sup>3</sup>. Cuando se bloquea esta cascada de señalización por la sección bilateral del NOS, principal aporte noradrenérgico de la gónada, disminuye la NA ovárica y se restablece la ovulación<sup>6,118</sup>. En el presente estudio, la denervación farmacológica con GTD en la bursa del ovario izquierdo o derecho permitió el restablecimiento de la ovulación en ambos ovarios en el 80% de los animales, en cuya morfología es evidente la presencia de cuerpos lúteos y folículos en desarrollo. Estos resultados apoyan la idea de que el incremento de la NA ovárica favorece el desarrollo y persistencia del SOPQ, y que entre los ovarios existe una vía de comunicación nerviosa que permitió que el ovario sin microinyección respondiera al tratamiento. En apoyo a esta idea, Morales y

colaboradores, (134) han mostrado que la sección unilateral del NOS en ratas prepúberes produce una disminución de la ovulación en el ovario denervado y la ovulación normal o compensatoria por el ovario inervado<sup>134</sup>. Asimismo Chávez y colaboradores (135), mostraron que la sección del NOS derecho resulta en la disminución de NA por el ovario denervado y en el incremento de la misma por el ovario intacto, por lo que los autores sugieren que existen vías de comunicación nerviosa entre los ovarios que podrían estar dadas por el NOS<sup>135</sup>.

En el presente estudio la microinyección de solución salina en la bursa izquierda o derecha no modificó la concentración sérica de progesterona. Sin embargo, la concentración sérica de testosterona y estradiol fue mayor cuando se microinyectó en la bursa del ovario izquierdo en comparación con la microinyección en el ovario derecho. Esta respuesta puede explicarse por asimetrías en las señales nerviosas recibidas por el ovario izquierdo y derecho, las cuales son traducidas de manera diferente, tal y como ha sido reportado<sup>136</sup>. Tóth y colaboradores (126) mostraron que el ovario izquierdo presenta un mayor número de conexiones tras-sinápticas con el cerebro que el ovario derecho.

En nuestros animales tratados con vehículo la microinyección de GTD en la bursa del ovario derecho resultó en un incremento de la concentración de progesterona, diferente a lo reportado por Espinoza y colaboradores (7), quienes mostraron una disminución. Estas diferencias pueden ser explicadas por el modelo de administración de GTD utilizado, ya que en el presente estudio se eliminó solamente las fibras noradrenérgicas ováricas provenientes de la inervación intrínseca y extrínseca, mientras que en el modelo de Espinoza y colaboradores destruyen las fibras noradrenérgicas periféricas<sup>7</sup>.

Dyer y Erickson (137) mostraron que las catecolaminas aumentan hasta un 300% la producción de andrógenos en presencia de la gonadotropina coriónica humana (hCG) y que esta respuesta es dependiente de los receptores adrenérgicos  $\beta_1$  y  $\beta_2$ . Estos resultados son una evidencia más del papel estimulante que ejerce la NA ovárica sobre la secreción de andrógenos en respuesta al estímulo gonadotrópico, lo que podría explicar la disminución de testosterona en nuestros animales microinyectados con GTD en la bursa del ovario izquierdo.

Lara y colaboradores (93) mostraron que en ratas neonatales la inyección crónica de GTD destruye las neuronas catecolaminérgicas del ovario, lo que provoca la reducción de la respuesta ovárica al estímulo gonadotrópico por las células de la granulosa y en consecuencia disminuye la concentración de estradiol lo que se traduce en un menor desarrollo folicular<sup>93</sup>. Asimismo, Garrido y colaboradores (99) sugieren que la disminución de NA ovárica provocada por el tratamiento con GTD disminuye la expresión de las aromatasas en las células de la granulosa, lo que resulta en la disminución de la secreción de estradiol<sup>99</sup>. Estas evidencias permiten explicar la disminución en la concentración de estradiol observada en animales microinyectados con GTD en la bursa del ovario izquierdo. Por otro lado, el aumento en la concentración de estradiol en animales con microinyección de GTD en la bursa del ovario derecho nos permite sugerir que el papel de la NA sobre la esteroidogénesis ovárica depende de la gónada denervada. En apoyo a esta interpretación, Ramírez y colaboradores (138), mostraron

que la sección del NOS izquierdo resulta en la disminución de la concentración sérica de estradiol y en el incremento de la misma cuando la sección es bilateral<sup>138</sup>.

En ratas con SOPQ, inducido por la inyección de VE, se ha reportado que las concentraciones séricas de progesterona<sup>1,4,7</sup>, y estradiol<sup>117</sup> no se modifican, tal y como se observó en el presente estudio, donde la microinyección de solución salina en animales con SOPQ no modificó las concentraciones séricas de progesterona y estradiol. Previamente se ha mostrado que en ratas con SOPQ las concentraciones séricas de testosterona aumentan<sup>4,7,117</sup> o se mantienen<sup>1,6</sup>, lo cual podría ser atribuido a la edad de administración del VE. En nuestros animales, se observó una asimetría en la secreción de testosterona, presentando una mayor concentración de la hormona cuando los animales son microinyectados con solución salina en la bursa del ovario derecho, resultados similares fueron reportados por Ramírez (139), en animales tratados con VE a los diez días de edad.

En nuestros animales tratados con VE, la microinyección en la bursa ovárica izquierda o derecha con GTD, disminuyó la concentración sérica de testosterona en comparación con los animales con SOPQ microinyectados con solución salina, un efecto similar se observa en animales con SOPQ con sección uni o bilateral del NOS<sup>4</sup>. Estos resultados pueden ser explicados por la disminución del tono noradrenérgico del ovario provocado por la GTD, ya que se ha mostrado que en el animal con SOPQ, la NA ejerce un efecto estimulante sobre la secreción de dicha hormona<sup>32,117,140</sup>.

En animales con SOPQ inducido por una dosis de VE se ha observado incremento en la actividad y expresión de TH, enzima limitante en la síntesis de catecolaminas que es usada como marcador de la biosíntesis de NA<sup>3,7,141</sup>. La inmunoreactividad de TH se observa en las tecas de folículos y prequistes foliculares después de 60 y 76 días del tratamiento con el estrógeno<sup>7,141</sup>. Similar a lo observado en el presente estudio, en donde animales con VE microinyectados con solución salina en la bursa ovárica presentaron inmunoreactividad de TH en células de la teca de prequistes.

Se ha mostrado que el cuerpo lúteo presenta concentraciones de dopamina 2 a 4 veces mayores que de NA, además de presentar dopamina- $\beta$ -hidroxilasa, lo que sugiere la síntesis de *novo* de NA dentro de este tejido<sup>142, 143</sup>.

Battista y colaboradores (143) mostraron que en el cuerpo lúteo bovino la NA, estimula la secreción de progesterona, a través de la activación de los receptores beta adrenérgicos. Los cuerpos lúteos recién formados contienen concentraciones más altas de NA que los cuerpos lúteos en regresión<sup>142</sup>, lo que podría explicar el incremento en la expresión de TH observada en los cuerpos lúteos de los ovarios de animales con SOPQ microinyectados con GTD, en los cuales la ovulación fue restablecida.

Tomados en conjunto, estos resultados nos permiten sugerir que en el animal con SOPQ inducido por VE, la participación de la información simpática en la regulación de su persistencia y desarrollo dependen del aporte noradrenérgico que recibe y que tiene el propio ovario; así como de la comunicación que existe entre ellos.

## **CONCLUSIÓN**

En el modelo de la rata con SOPQ, inducido por la la inyección con VE, el papel de la inervación noradrenérgica en el desarrollo y persistencia de la fisiopatología, depende de la vía de comunicación entre los ovarios que se activa ante la destrucción de fibras noradrenérgicas, por la microinyección de GTD en la gónada izquierda o derecha.

## **PERSPECTIVAS**

- Realizar un análisis detallado que implique el conteo de folículos en sus diferentes etapas y ver en cual de ellos hay una mayor expresión de TH, que pudieran explicar las asimetrías observadas por efecto de la microinyección unilateral de GTD.
- Desarrollar herramientas farmacológicas que permitan seguir investigando los beneficios del bloqueo de la hiperactividad noradrenérgica como una posible alternativa terapéutica en mujeres con SOPQ.

## MODELO

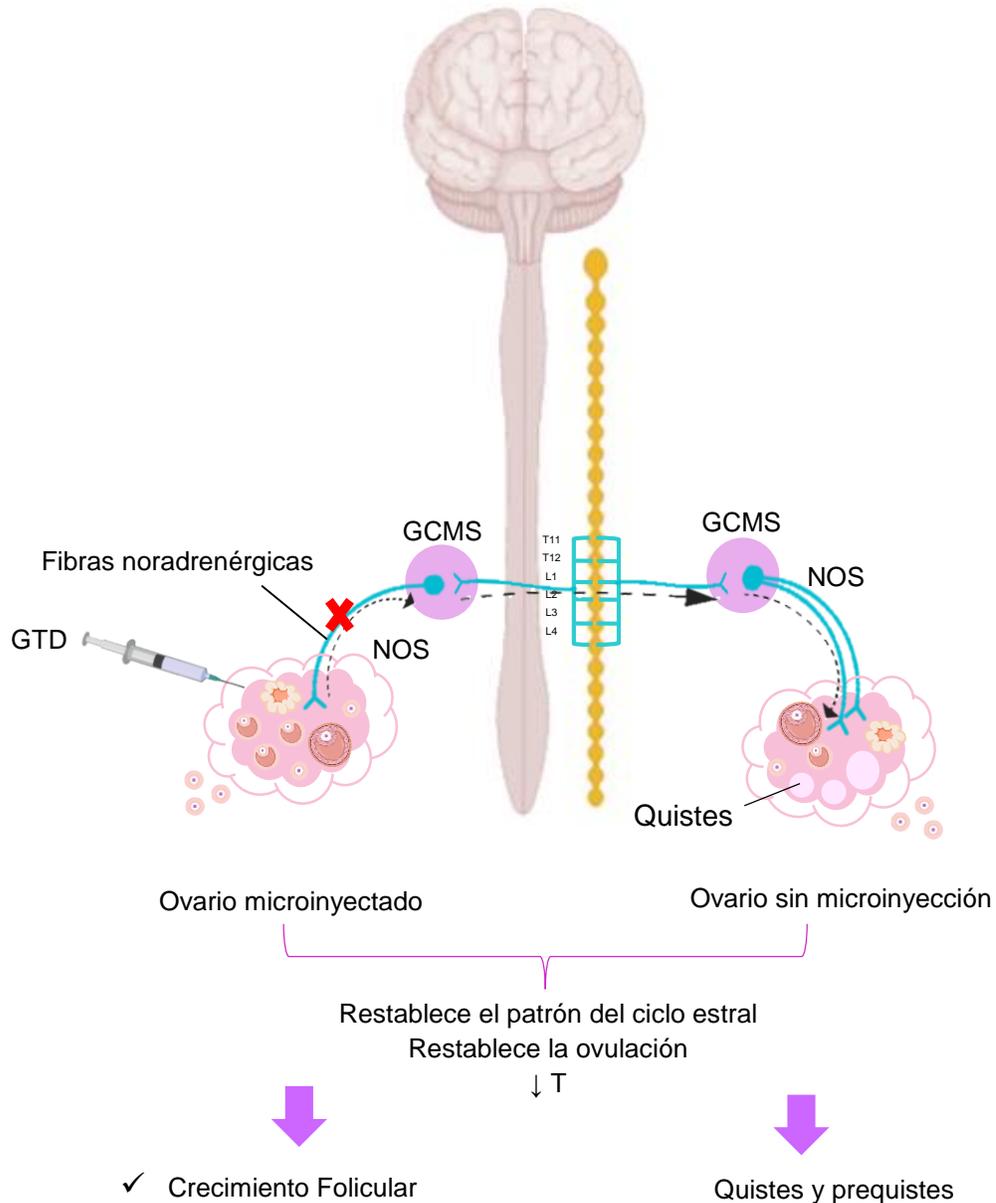


Figura 17. En animales con SOPQ, inducido por la inyección de VE, la microinyección de guanetidina (GTD) en la bursa del ovario izquierdo o derecho bloquea la hiperactividad noradrenérgica que llega al ovario vía el NOS, la ausencia de esta hiperactividad es recibida por el GCMS, origen de la inervación simpática ovárica, y transmitida al ovario sin microinyección de GTD. Dado que el ovario derecho recibe un mayor aporte simpático respecto al izquierdo, la microinyección con GTD en esta gónada elimina un mayor número de fibras noradrenérgicas, lo que permite, que además del restablecimiento del patrón del ciclo estral, la ovulación y la disminución de la concentración sérica de testosterona, se restablezcan el peso corporal, la masa ovárica y el peso del útero.

## REFERENCIAS

1. Linares R, Hernández D, Morán C, Chavira R, Cárdenas M, Domínguez R, Morales-Ledesma L. Unilateral or bilateral vagotomy induces ovulation in both ovaries of rats with polycystic ovarian syndrome. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013;11:68.
2. Azziz R. Polycystic Ovary Syndrome. *Obstet Gynecol.* 2018;132(2):321-33 .
3. Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, Ojeda SR. An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of the steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology.* 2000;141(3):1059-72
4. Morales-Ledesma L, Linares R, Rosas G, Morán C, Chavira R, Cárdenas M, Domínguez R. Unilateral sectioning of the superior ovarian nerve of rats with polycystic ovarian syndrome restores ovulation in the innervated ovary. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010;8:99.
5. Brawer JR, Munoz M, Farookhi R. Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biol Reprod.* 1986;35(3):647-55.
6. Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE. Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology.* 1993;133(6):2696-703.
7. Espinoza JA, Alvarado W, Venegas B, Domínguez R, Morales-Ledesma L. Pharmacological sympathetic denervation prevents the development of polycystic ovarian syndrome in rats injected with estradiol valerate. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018;16(1):86 .
8. Freeman Me. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: Neill JD [Eds]. *Knobil and Neill's physiology of reproduction.* USA: Elsevier; 2006. p. 2327-88.
9. Becu-Villalobos D, Lacau-Mengido I. Control hormonal del desarrollo puberal en la rata hembra. *Acta physiol pharmacol latinoam.* 1990;40:1-17.
10. Sokka T, Hämäläinen T, Huhtaniemi L. Functional LH receptor appears in the neonatal rat ovary after changes in the alternative splicing pattern of the LH receptor mRNA. *Endocrinology.* 1992;130(3):1738-40.
11. Castro M. Cambios en la maduración y crecimiento del folículo ovárico, secreción de gonadotropinas esteroides ováricos y monoaminas hipotalámicas durante el desarrollo prepuberal de la rata [Tesis de licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 1999.
12. Mendiola P, Penalva A, Pérez L. Ciclo estral de la rata. En: De Costa J, Madrid JA, Zamora S [Eds]. *Manual de clases prácticas de fisiología animal.* Madrid: Universidad de Murcia; 1993. p. 147-48.
13. Keith L, Parker B and Bernard P. Schimmler. *Embryology and Genetics of the Mammalian Gonads and Duct.* En: Neill JD [Eds]. *Knobil and Neill's physiology of reproduction.* USA: Elsevier; 2006. p. 313-36.
14. Flores V, Fosser N. El periodo presomático. Segmentación de la célula huevo y gestulación. En: Flores V, Fosser N [Eds]. *Embriología humana. Bases moleculares y celulares de la histogénesis, la morfogénesis y alteraciones del desarrollo. Orientada a la formación médica.* Buenos Aires: Editorial médica panamericana; 2015. p. 31-50.
15. Tresguerres H. Fisiología del ovario. En: Tresguerres H [Eds]. *Fisiología humana.* 4ta ed. España: McGraw-Hill; 2010. p. 1020-35.
16. Holesh JE, Lord M. *Physiology, Ovulation.* StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019.
17. Tortora GJ, Derrickson B. Aparatos reproductores. En: Tortora GJ, Derrickson B [Eds]. *Principios de Anatomía y Fisiología.* 15a ed. España: Editorial médica panamericana; 2018. p. 1070-91.
18. White BA, Harrison JR. Sistema endócrino y aparato reproductor. En: Koeppen BM y Stanton BA [Eds]. *Berne y Levy. Fisiología.* 7a ed. España: Elsevier-Science; 2018. p. 686-866
19. Arias P. Endocrinología de la reproducción. En: Dvorkin M, Cardinali D, Iermoli R [Eds]. *Best y Taylor. Bases fisiológicas de la práctica médica.* Buenos Aires: Editorial médica panamericana; 2011. p. 719-49.
20. Acuña X. Efecto de la microinyección de atropina en la bursa ovárica sobre la ovulación en ratas con o sin el síndrome de ovario poliquístico [Tesis de licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2018.
21. D'Albora H, Anesetti G, Lombide P, Dees WL, Ojeda SR. Intrinsic neurons in the mammalian ovary. *Microsc Res Tech.* 2002;59(6):484-9.

22. Hoffman B, Schorge J, Schaffer J, Halvorson L, Bradshaw K, Cunningham F. Endocrinología de la reproducción. En: Javier de León Fraga [Eds]. Williams ginecología. 2a ed. México: McGraw-Hill; 2014. p. 400-39.
23. Yeh J, Adashi E. Ciclo ovárico. En: Yen S, Jaffe R, Barbieri R [Eds]. Endocrinología de la reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico. 4a ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2001. p. 164-202.
24. Domínguez R, Chávez R, Cruz ME. La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: Tópicos selectos de biología de la reproducción. México: Miguel Ángel Porrúa; 1991. p.163-81
25. Botella J. El ovario de los vertebrados. En: Botella J [Eds]. El ovario, fisiología y patología. Madrid: Editorial Díaz de Santos; 1995. p. 1-22.
26. Kellogg M. The postnatal development of the oviduct of the rat. *Anat Rec.* 1945 Dec;93:377-97.
27. Anzaldúa S, Perez M, Cerbon M, Camacho I. Actividad secretora del oviducto de mamíferos domésticos durante la fertilización y el desarrollo embrionario temprano. *Ciencia veterinaria.* 2003;9:229-68.
28. Martin GG, Sack M, Talbot P. Structure of bursae ovaricae surrounding the ovaries of golden hamster. *Anat Rec.* 1981;201(3):485-98.
29. Vanderhyden BC, Rouleau A, Armstrong DT. Effect of removal of the ovarian bursa of the rat on infundibular retrieval and subsequent development of ovulated oocytes. *J Reprod Fertil.* 1986;77(2):393-9.
30. Li M, Zhou TH, Gao Y, Zhang N, Li JC. Ultrastructure and estrogen regulation of the lymphatic stomata of ovarian bursa in mice. *Anat Rec (Hoboken).* 2007;290(10):1195-202.
31. Zhang H, Zhang Y, Zhao H, Zhang Y, Chen Q, Peng H, et al. Hormonal regulation of ovarian bursa fluid in mice and involvement of aquaporins. 2013;8(5):e63823.
32. Venegas B, De León L, Rosas G, Espinoza J, Morán C, Domínguez R, et al. In rats with estradiol valerate-induced polycystic ovary syndrome, the acute blockade of ovarian  $\beta$ -adrenoreceptors improve ovulation. *Reprod Biol Endocrinol.* 2019;17:95.
33. Malamed S, Gibney JA, Ojeda SR. Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat. *Cell Tissue Res.* 1992;270(1):87-93.
34. Cox E, Takov V. Embryology, Ovarian Follicle Development. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing;2019.
35. Butt WR, Crooke AC, Ryle M. Gonadotrophins and ovarian development; proceedings of the two Workshop Meetings on the Chemistry of the Human Gonadotrophins and on the Development of the Ovary in Infancy. Edimburgo: Livingstone; 1969. p. 255-70.
36. Salomon A, Leon K, Campbell M, Young K. Folliculogenic factors in photoregressed ovaries: differences in mRNA expression in early compared to late follicle development. *Gen Comp Endocrinol.* 2018;260:90-9.
37. Frota IM, Leitão CC, Costa JJ, van den Hurk R, Saraiva MV, Figueiredo JR, et al. Levels of BMP-6 mRNA in Goat Ovarian Follicles and in Vitro Effects of BMP-6 on Secondary Follicle Development. *Zygote.* 2011;21(3):270-8.
38. Irving-Rodgers HF, Hummertsch K, Murdiyarso LS, Bonner WM, Sado Y, Ninomiya Y, et al. Dynamics of extracellular matrix in ovarian follicles and corpora lutea of mice. *Cell Tissue Res.* 2010;339(3):613-24.
39. Christensen AP, Patel SH, Grasa P, Christian HC, Williams SA. Oocyte glycoproteins regulate the form and function of the follicle basal lamina and theca cells. *Dev Biol.* 2015;401(2):287-98.
40. Albertini DF, Anderson E. The appearance and structure of intercellular connections during the ontogeny of the rabbit ovarian follicle with particular reference to gap junctions. *J Cell Biol.* 1974;63:234.
41. Fletcher WH, Greenan JR. Receptor mediated action without receptor occupancy. *Endocrinology.* 1985;116:1660.
42. Rajkovic A, Matzuk MM. Functional analysis of oocyte-expressed genes using transgenic models. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;187(1-2):5-9.
43. Ross MH y Pawlina W. Aparato genital femenino. En: Jorge Horacio Negrete [Eds] Histología, texto y atlas color con biología celular y molecular. 5a ed. España: Editorial Médica Panamericana; 2006. p. 828-93.
44. Araujo R, Gastal M, Figueiredo J, Gastal E. Cultivo in vitro de folículos preantrales bovinos: una revisión. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014;12(78). p.1-14.
45. Carlson BM. Preparación para el embarazo En: Carlson BM [Eds] Embriología humana y biología del desarrollo. 5a ed. Barcelona: Elsevier; 2014. p. 2-23.
46. Levine J. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: Knobil and Neill [Eds] Physiology of the reproduction. 4a ed. USA: Elsevier; 2015. p. 1199-1257.

47. Arteaga-Martínez SM, García Peláez MI. Embriología humana y biología del desarrollo. México: Editorial médica panamericana; 2014. p. 89-100.
48. Yoshimura Y, Wallach EE. Studies of the mechanism(s) of mammalian ovulation. *Fertil Steril.* 1987;47:22.
49. Manabe N, Matsuda-Minehata F, Goto Y, Maeda A, Cheng Y, Nakagawa S, et al. Role of cell death ligand and receptor system on regulation of follicular atresia in pig ovaries. *Reprod Domest Anim.* 2008;43 Suppl 2:268-72.
50. Hsueh AJ, Billig H, Tsafriri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev.* 1994;15(6):707-24.
51. Quirk MS, Cowan GR, Harman MR, Hu LC, Porter AD. Ovarian follicular growth and Atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Sci* 2004;82(E Suppl):E40-E52.
52. Stevens A, Lowe J. Anatomía patológica. 2a ed. Madrid: Ediciones Harcourt; 2001. p. 30.
53. Sharma RK. Follicular atresia in goat: A review. *Indian J Anim Sci* 2000;70:1035-1046.
54. Byskov AG. Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary. *J Reprod Fertil.* 1974;37:277-285.
55. Greenwald GS. Temporal and topographic changes in ADN synthesis after induced follicular atresia. *Biol Reprod.* 1989;41:175-181.
56. Rosales-Torres AM, Avalos-Rodríguez A, Vergara-Onofre M, Hernández Pérez O, Ballesteros LM, García-Macedo R, et al. Multiparametric study of atresia in ewe antral follicles: Histology, flow cytometry, internucleosomal ADN fragmentation and lysosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid. *Molec Reprod Develop.* 2000;55:270-281.
57. Carson RS, Findlay JK, Burger HG, Trounson AO. Gonadotropin receptors of the ovine ovarian follicle during follicular growth and atresia. *Biol Reprod* 1979;21:75-87.
58. Tilly JL, Kowalski KI, Schomberg DW, Hsue AJW. Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. *Endocrinology.* 1992;131:1670-76.
59. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update.* 2005;11:162-178.
60. Kim JM, Yoon YD, Tsang BK. Involvement of the Fas/Fas ligand system in p53-mediated granulosa cell apoptosis during follicular development and atresia. *Endocrinology.* 1999;140:2307-17.
61. Wada M, Amae S, Sasaki H, Ishii T, Sano N, Nio M, Hayashi Y, Ohi R. The functional roles of porcine CD80 molecule and its ability to stimulate and regulate human anti-pig cellular response. *Transplantation.* 2003;75:1887-94.
62. Cheng G, Weihua Z, Mäkinen S, Mäkelä S, Saji S, Warner M, et al. A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen receptor beta knockout mouse ovary. *Biol Reprod.* 2002;66(1):77-84.
63. Billig H, Furuta I, Hsueh AJ. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology.* 1993;133(5):2204-12.
64. Nandedkar TD and Dharma SJ. Expression of Bcl(xs) and cMyc in atretic follicles of mouse ovary. *Reprod Biomed Online.* 2001;3:221-225.
65. Evans JLH, Ireland ME, Winn P, Lonergan GW, Smith PM, Coussens, Ireland JJ. Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. *Biol Reprod.* 2004;70:1475-84.
66. Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J Reprod Fertil.* 1995;49(Suppl):335-50.
67. Glister C, Tannetta DS, Groome NP, Knight PG. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. *Biol Reprod.* 2001;65:1020-28.
68. Fraser HM, Lunn SF, Kim H, Duncan WC, Rodger FE, Illingworth PJ, Erickson GF. Changes in insulin-like growth factor-binding protein-3 messenger ribonucleic acid in endothelial cells of the human corpus luteum: a possible role in luteal development and rescue. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:1672-77.
69. Strauss JF y Williams CJ. The ovarian life cycle. En: Yen y Jaffe's [Eds]. *Endocrinology of reproduction.* 7a edición. Philadelphia: Elsevier, 2014. p. 157-91.
70. Miller W, Styne D. Pubertad femenina y sus trastornos. En: Yen S, Jaffe R, Barbieri R [Eds]. *Endocrinología de la reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico.* 4a ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2001. p. 412-39.

71. Halvorson L, Chin W. Hormonas gonadotróficas: biosíntesis, secreción, receptores y acción. En: Yen S, Jaffe R, Barbieri R [Eds]. *Endocrinología de la reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. 4a ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2001. p. 86-117.
72. Gómez E, Larrea F, Montes F. Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *Tip rev espec cienc quím biol*. 2012; 15(1):24-36.
73. Trujillo A, Gutiérrez G, Linares R, Cortes M, Eguibar J. El eje hipotálamo-hipófisis-ovarios un viejo conocido, nuevos hallazgos y más por conocer. En: *Procesos fisiológicos y toxicológicos de la reproducción*. México: Editorial BUAP, Dirección de fomento editorial Puebla; 2015. p. 95-111.
74. Prieto B, Velázquez M. Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. *Rev Fac Med UNAM*. 2002;45(6):252-57.
75. Jennes L, Stumpf WE, Sheedy ME. Caracterización ultraestructural de las neuronas productoras de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). *The Journal of Comparative Neurology*. 1985;232(4):534-47.
76. Malik KF, Silverman AJ, Morrell JI. Gonadotropin-releasing hormone mRNA in the rat: distribution and neuronal content over the estrous cycle and after castration of males. *Anat Rec*. 1991;231(4):457-66.
77. Domínguez R, Cruz Morales SE. The Ovarian Innervation Participates in the Regulation of Ovarian Functions. *Endocrinol Metabol Syndrome Internet*. 2011; S4:001.
78. Marshall JC, Griffin ML. The role of changing pulse frequency in the regulation of ovulation. *Hum Reprod*. 1993;8(2):57-61.
79. Dalkin AC, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Ellis TR, Marshall JC. The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology*. 1989;125(2):917-24.
80. Jeong KH, Kaiser UB. Gonadotropin-releasing hormone regulation of gonadotropin biosynthesis and secretion. En: Neill JD [Eds]. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. USA: Elsevier; 2006. p. 1635-701
81. Mezquita C, Mezquita J, Mezquita B, Mezquita P. Sistema reproductor En: Mezquita C, Mezquita J, Mezquita B, Mezquita P [Eds]. *Fisiología médica. Del razonamiento fisiológico al razonamiento clínico*. Madrid: Editorial médica panamericana; 2011. p. 401-10.
82. Morales L. Regulación neuroendócrina del ovario. En: *Procesos fisiológicos y toxicológicos de la reproducción*. México: Editorial BUAP, Dirección de fomento editorial Puebla; 2015. p. 113-33.
83. Dissen GA, Ojeda SR. Ovarian innervation. *Encyclopedia of reproduction*. USA: Academic Press; 1999. p. 321-25.
84. Aguado LI, Ojeda SR. Ovarian adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion. *Endocrinology*. 1984;114(5):1944-56.
85. Lawrence IE Jr, Burden HW. The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *Anat Rec*. 1980;196(1):51-9.
86. Gerendai I, Banczerowski P, Halász B. Functional Significance of the Innervation of the Gonads. *Endocrine*. 2005;28(3):309-18.
87. Netter FH. *Sistema nervioso: anatomía y fisiología*. 10a ed. España: Editorial Masson; 2005.
88. Klein CM, Burden HW. Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neurosci Lett*. 1988;85(2):217-22.
89. D'Albora H, Lombide P, Ojeda SR. Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study. *Cell Tissue Res*. 2000;300(1):47-56.
90. Barco AI, Flores A, Chavira R, Damián-Matsumura P, Domínguez R, Cruz ME. Asymmetric effects of acute hemiovariectomy on steroid hormone secretion by the in situ ovary. *Endocrine*. 2003;21(3):209-15.
91. Ricu M, Paredes A, Greiner M, Ojeda SR, Lara HE. Functional Development of the Ovarian Noradrenergic Innervation. *Endocrinology*. 2008;149(1):50-6.
92. Luna SL, Neuman S, Aguilera J, Brown DI, Lara HE. In Vivo  $\beta$ -Adrenergic Blockade by Propranolol Prevents Isoproterenol-Induced Polycystic Ovary in Adult Rats. *Horm Metab Res*. 2012;44(9):676-81.
93. Lara HE, McDonald JK, Ahmed CE, Ojeda SR. Guanethidine-Mediated Destruction of Ovarian Sympathetic Nerves Disrupts Ovarian Development and Function in Rats. *Endocrinology*. 1990;127(5):2199-209.
94. Lorenzo P, Moreno A, Leza JC, Lizasoain I, Moro Sánchez M, et al. Velázquez. *Farmacología Básica y Clínica*. 18ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 2009. p. 178.
95. Manning PT, Powers CW, Schmidt RE, Johnson EM Jr. Guanethidine-induced destruction of peripheral sympathetic neurons occurs by an immune-mediated mechanism. *J Neurosci*. 1982;3(4):714-24 .

96. Burnstock G, Evans B, Gannon BJ, Heath JW, James V. A new method of destroying adrenergic nerves in adult animals using guanethidine. *Br J Pharmacol.* 1971;43(2):295-301.
97. Morales L, Vieyra E, Ramírez DA, Trujillo A, Chavira R, Cárdenas M, et al. Effects on steroid hormones secretion resulting from the acute stimulation of sectioning the superior ovarian nerve to pre-pubertal rats. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012;10:88.
98. Chávez-Genaro R, Lombide P, Domínguez R, Rosas P, Vázquez-Cuevas F. Sympathetic pharmacological denervation in ageing rats: effects on ovulatory response and follicular population. *Reprod Fertil Dev.* 2007;19(8):954-60.
99. Garrido MP, Fernandois D, Venegas M, Paredes AH. Effects of sympathectomy on ovarian follicular development and steroid secretion. *Reproduction.* 2018;155(2):173-81.
100. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril.* 2009;91:456-88.
101. Reyes ME, Ortega GC, Martínez CN. Association of obesity and overweight with the prevalence of insulin resistance, pre-diabetes and clinical-biochemical characteristics among infertile Mexican women with polycystic ovary syndrome: a cross-sectional study. *BMJ.* 2016;6:e012107.
102. Moran C, Tena G, Moran S, Ruiz P, Reyna R, Duque X. Prevalence of polycystic ovary syndrome and related disorders in Mexican women. *Gynecol Obstet Invest.* 2010;69(4):274-80.
103. Bremer AA. Polycystic ovary syndrome in the pediatric population. *Metab Syndr Relat Disord.* 2010;8(5):375-94.
104. Yen S. Síndrome del ovario poliquístico (anovulación crónica hiperandrogénica). En: Yen S, Jaffe R, Barbieri R [Eds]. *Endocrinología de la reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico.* 4a ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2001. p. 465-510.
105. De la Jara Díaz JF y Ortega GC. Síndrome de ovario poliquístico. *Rev Mex Reprod.* 2011;4(2):51-62.
106. Tehrani FR, Noroozadeh M, Zahediasl S, Piryaei A, Azizi F. Introducing a rat model of prenatal androgen-induced polycystic ovary syndrome in adulthood. *Exp Physiol.* 2014;99(5):792-801.
107. Wu C, Lin F, Qiu S, Jiang Z. The characterization of obese polycystic ovary syndrome rat model suitable for exercise intervention. *PLoS One.* 2014;9(6):e99155.
108. Satoko O, Natsuki N, Tomohiko M, Tomoko N, Maki G, Akira I, et al. Animal models of polycystic ovary syndrome: A review of hormone-induced rodent models focused on hypothalamus-pituitary-ovary axis and neuropeptides. *Reprod Med Biol.* 2019; 18(2): 151-60.
109. Noroozadeh M, Behboudi-Gandevani S, Zadeh-Vakili A, Ramezani Tehrani F. Hormone-induced rat model of polycystic ovary syndrome: A systematic review. *Life Sci.* 2017;191:259.
110. Lee BH, Indran IR, Tan HM, Li Y, Zhang Z, Li J, et al. A Dietary Medium-Chain Fatty Acid, Decanoic Acid, Inhibits Recruitment of Nur77 to the HSD3B2 Promoter In Vitro and Reverses Endocrine and Metabolic Abnormalities in a Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology.* 2016;157(1):382-94.
111. Paredes A, Gálvez A, Leyton V, Aravena G, Fiedler JL, Bustamante D, et al. Stress promotes development of ovarian cysts in rats: the possible role of sympathetic nerve activation. *Endocrine.* 1998;8(3):309-15.
112. Dorfman M, Arancibia S, Fiedler JL, Lara HE. Chronic intermittent cold stress activates ovarian sympathetic nerves and modifies ovarian follicular development in the rat. *Biol Reprod.* 2003;68(6):2038-43.
113. Jandreski MA. Chemiluminescence technology in immunoassays. *Lab Med.* 1998;29(9):555-60.
114. Darwish IA. *Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances.* *Int J Biomed Sci.* 2006;2(3):217-35.
115. Cinquanta L, Fontana DE, Bizzaro N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection?. *Auto Immun Highlights.* 2017;8(1):9. doi: 10.1007/s13317-017-0097-2.
116. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Manual del Operador del IMMULITE 1000 Número: 600964-0002. USA: Siemens Healthcare Diagnostics Inc; 2010.
117. Alvarado W. En la rata, el establecimiento del síndrome de ovario poliquístico depende de la activación de las fibras simpáticas [Tesis de licenciatura] México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2017.
118. Rosa-E-Silva A, Guimaraes MA, Padmanabhan V, Lara HE. Prepubertal administration of estradiol valerate disrupts cyclicity and leads to cystic ovarian morphology during adult life in the rat: role of sympathetic innervation. *Endocrinology.* 2003;144(10):4289-97.

119. Rosas G. Efecto de la inducción del Síndrome del Ovario Poliquístico en la rata infantil, sobre la dinámica del crecimiento folicular y la secreción de hormonas esteroideas [Tesis de licenciatura] México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2006.
120. Lara HE, Ferruz JL, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR. Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*. 1993;133(6):2690-5.
121. Hemmings R, Farookhi R, Brawer JR. Pituitary and ovarian responses to luteinizing hormone releasing hormone in a rat with polycystic ovaries. *Biol Reprod*. 1983;29(1):239-48.
122. Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R. Obesity and the Polycystic Ovary Syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002;26(7):883-96.
123. Stener-Victorin E, Ploj K, Larsson BM, Holmång A. Rats with steroid-induced polycystic ovaries develop hypertension and increased sympathetic nervous system activity. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:44.
124. Harvey I, Stephenson EJ, Redd JR, Tran QT, Hochberg I, Qi N, et al. Glucocorticoid-Induced Metabolic Disturbances Are Exacerbated in Obese Male Mice. *Endocrinology*. 2018;159(6):2275-87.
125. Wellman PJ. Norepinephrine and the control of food intake. *Nutrition*. 2000;16(10):837-42.
126. Tóth IE, Wiesel O, Boldogkoi Z, Bálint K, Tapaszi Z, Gerendai I. Predominance of supraspinal innervation of the left ovary. *Microsc Res Tech*. 2007;70(8):710-8.
127. Flores A, Ayala ME, Domínguez R. Does noradrenergic peripheral innervation have a different role in the regulation of ovulation in the prepubertal and the adult rat? *Med Sci Res*. 1990;18:817-8.
128. Korsholm AS, Westring H, Gasseholm J, Nyboe A, Birch K. Left-right Differences in Ovarian Volume and Antral Follicle Count in 1423 Women of Reproductive Age. *Gynecol Endocrinol*. 2017;33(4):320-23.
129. Riboni L. Effects of guanethidine administration on compensatory ovarian hypertrophy, compensatory ovulation and follicular development in the prepubertal female guinea pig. *Gen Comp Endocrinol*. 2002;127(3):279-84.
130. Bracho GS, Altamirano GA, Kass L, Luque EH, Bosquiazzo VL. Hyperandrogenism Induces Histo-Architectural Changes in the Rat Uterus. *Reprod Sci*. 2018;26(5):657-68.
131. Houdeau E, Rousseau A, Meusnier C, Prud'Homme MJ, Rousseau JP. Sympathetic Innervation of the Upper and Lower Regions of the Uterus and Cervix in the Rat Have Different Origins and Routes. *J Comp Neurol*. 1998;399(3):403-12.
132. Taurig HH, Papka RE, Shew RL. Substance P and Related Peptides Associated With the Afferent and Autonomic Innervation of the Uterus. *Ann NY Acad Sci*. 1991;632:304-13.
133. Brauer MM, Lincoln J, Sarnier S, Blundell D, Milner P, Passaro M, Burnstock G. Maturational Changes in Sympathetic and Sensory Innervation of the Rat Uterus: Effects of Neonatal Capsaicin Treatment. *Int J Dev Neurosci*. 1994;12(2):157-71.
134. Morales L, Chávez R, Domínguez R. Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve. *Med Sci Res*. 1993;21:15-17.
135. Chávez R, Morales L, González Ma E, Domínguez R. Ovarian norepinephrine content in prepubertal rats with superior ovarian nerve section: temporal studies. *Med Sci Res*. 1994;22:789-90.
136. Rosas G, Ramírez MI, Linares R, Trujillo A, Domínguez R, Morales-Ledesma L. Asymmetric steroidogenic response by the ovaries to the vasoactive intestinal peptide. *Endocrine*. 2015;48(3):968-77.
137. Dyer CA, Erickson GF. Norepinephrine amplifies human chorionic gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by ovarian theca-interstitial cells. *Endocrinology*. 1985;116(4):1645-52.
138. Ramírez DA, Vieyra E, González AI, Morán C, Domínguez R, Morales-Ledesma L. Both the Suprachiasmatic Nucleus and the Superior Ovarian Nerve Contribute to the Processes of Ovulation and Steroid Hormone Secretion on Proestrus. *Reprod Sci*. 2016;24(6):844-55.
139. Ramírez MI. Efecto del bloqueo de los receptores del Péptido Intestinal Vasoactivo en el ovario de la rata con Síndrome del Ovario Poliquístico, sobre la regulación de la secreción de progesterona y estradiol [Tesis de licenciatura] México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.
140. Ojeda SR, Lara HE. Role of the sympathetic nervous system in the regulation of ovarian function. En: Pirke KM, Wuttke W, Schweiger U [Eds]. *The Menstrual Cycle and Its Disorders*. Berlín: Springer-Verlag; 1989. p. 26-32.

141. Manni L, Holmång A, Lundeberg T, Aloe L, Stener-Victorin E. Ovarian expression of alpha (1)- and beta (2)-adrenoceptors and p75 neurotrophin receptors in rats with steroid-induced polycystic ovaries. *Auton Neurosci.* 2005;118(1-2):79-87.
142. Miszkiel G, Skarzynski D, Bogacki M, Kotwica J. Concentrations of Catecholamines, Ascorbic Acid, Progesterone and Oxytocin in the Corpora Lutea of Cyclic and Pregnant Cattle. *Reprod Nutr Dev.* 1999;39(4):509-16.
143. Battista PJ, Rexroad CE, Poff JP, Condon WA. Support for a physiological role of endogenous catecholamines in the stimulation of bovine luteal progesterone production. *Biol Reprod.* 1989;41(5):807-12.