



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“En la rata con SOPQ la respuesta al estímulo gonadotrópico depende de la información que transcurre por el NOS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

Brenda Paloma Juarez Jimenez

Directora de tesis: Dra. Leticia Morales Ledesma

ASESORAS

Dra. Rosa Linares Culebro

Dra. Julieta Azucena Espinoza Moreno

Ciudad de México

2021



ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR UNAM-DGAPA-PAPIIT No. IN216519



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Contenido

ABREVIATURAS	i
RESUMEN.....	ii
INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO	3
OVARIO	3
FOLICULOGÉNESIS	4
ATRESIA FOLICULAR	7
ESTEROIDOGÉNESIS	8
EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO.....	12
INERVAÇÃO OVÁRICA	14
FUNCIÓN DEL NERVIO OVÁRICO SUPERIOR.....	16
SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO	17
VALERATO DE ESTRADIOL Y SU EFECTO SOBRE EL OVARIO	20
ESTEROIDOGÉNESIS EN EL SOPQ	21
PARTICIPACIÓN DEL NOS EN EL ANIMAL CON SOPQ.....	22
GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA.....	23
GONADOTROPINA CORIÓNICA HUMANA	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS PARTICULARES	26
MATERIAL Y MÉTODOS	27
RESULTADOS	32
DISCUSIÓN.....	57
CONCLUSIONES	67
BIBLIOGRAFÍA.....	68

ABREVIATURAS

E₂: Estradiol

eCG: Gonadotropina Coriónica Equina

FSH: Hormona Folículo Estimulante

GCMS: Ganglio Celiaco Mesentérico Superior

GnRH: Hormona Liberadora de Gonadotropinas

hCG: Gonadotropina Coriónica Humana

H-H-O: Hipotálamo Hipófisis Ovario

LH: Hormona Luteinizante

NA: Noradrenalina

NGF: Factor de Crecimiento Nervioso

NOS: Nervio Ovárico superior

NPO: Nervio del Plexo Ovario

NV: Nervio Vago

OSD: Operación Simulada Derecha

OSI: Operación Simulada Izquierda

P₄: Progesterona

SOPQ: Síndrome de Ovario Poliquístico

SNO: Sección del Nervio Ovárico

T: Testosterona

TH: Tirosina Hidroxilasa

VE: Valerato de estradiol **Vh**: Vehículo

RESUMEN

La regulación neural de las funciones de los ovarios es vía las fibras simpáticas y parasimpáticas. La inervación de tipo simpática llega al ovario a través del nervio ovárico superior (NOS). En el animal púber, la sección unilateral del NOS resulta en el aumento de la cuota ovulatoria por el ovario inervado, mientras que, en el denervado disminuye la ovulación o esta no ocurre. En estos animales la estimulación con las gonadotropinas no es capaz de restablecer la ovulación por parte de la gónada denervada.

En el animal con el SOPQ, inducido por la administración de Valerato de estradiol (VE), donde hay un bloqueo de la ovulación, la sección unilateral del NOS es capaz de inducir la ovulación en el ovario inervado.

En el presente estudio, se analizó la participación del NOS en la respuesta del folículo ovárico al estímulo gonadotrópico en dos modelos animales; en la rata adulta cíclica, y en la rata con SOPQ inducido por VE. Para ello, ratas hembra de la cepa CII-ZV, a los 10 días de edad se les administró Vh (Vehículo) o VE, a los 60 días de edad se les realizó la sección del NOS izquierdo (SNOI) o derecho (SNOD) o la operación simulada izquierda o derecha (OSI; OSD) y 10 días después de la cirugía se realizó la estimulación gonadotrópica que consistió en: a) la administración de 10UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) o b) la administración de 10UI de eCG y 48hrs después 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). Los animales fueron sacrificados al estro vaginal inmediato al estímulo hormonal.

En el animal cíclico con sección del NOS izquierdo o derecho, no se modificó la respuesta ovulatoria cuando se estimularon con una o ambas gonadotropinas. La masa ovárica del grupo con SNOI (eCG+hCG) aumentó respecto a su grupo con eCG. El peso relativo del útero en el grupo con SNOI (eCG+hCG) aumentó respecto al grupo con SNOI (eCG) y OSI (eCG+hCG).

La concentración sérica del estradiol (E₂) aumentó en los grupos con sección del NOS izquierdo o derecho y estimulados con eCG+hCG, respecto al grupo con operación simulada. La concentración sérica de progesterona y testosterona (P₄ y T) no se modificó.

En el animal con el SOPQ, no se modificó el porcentaje de animales ovulantes cuando se realizó la sección unilateral del NOS y se estimuló con una o ambas gonadotropinas. En el grupo con SNOI más eCG+hCG; el ovario denervado muestra disminución del número de ovocitos liberados, comparado con el ovario izquierdo del grupo con OS y estimulado con ambas gonadotropinas. Cuando se realizó la sección derecha, sólo respondió el ovario inervado. En el grupo con SNOD y eCG solo el ovario inervado fue capaz de ovular y mostró un mayor número de ovocitos liberados comparado con el grupo con OSD y eCG. En el grupo con SNOD y eCG+hCG sólo el ovario inervado ovuló.

La concentración sérica de P₄ en el grupo con SNOI (eCG) fue mayor que la de los grupos con sección, operación simulada y estimulados. Mientras que fue menor en el grupo con SNOD (eCG+ hCG) respecto al grupo con OSD (eCG+hCG).

La concentración sérica de T disminuyó con la sección izquierda o derecha respecto al grupo con VE, y aumentó en el grupo con SNOD (eCG), respecto al grupo con SNOD. La concentración de E₂ fue mayor en los grupos con sección unilateral y estimulados con eCG, respecto a los grupos con sección y sin estímulo gonadotrópico o al grupo con operación simulada y estimulados con eCG.

INTRODUCCIÓN

Los ovarios son dos glándulas ovaladas alojados en la pelvis, fijados a la superficie posterior del ligamento ancho por el mesovario (Tresguerres y col., 2005). Estas glándulas sexuales rigen dos procesos importantes, la foliculogénesis, que culmina con la ovulación y la esteroidogénesis, ambas funciones se encuentran reguladas por una vía hormonal y nerviosa.

El eje hipotálamo-hipófisis-ovario es el responsable de la regulación neuroendocrina de estos procesos, a través de la liberación pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que es sintetizada en el hipotálamo; esta neurohormona regula la secreción de las gonadotropinas (Tresguerres y col., 2005), la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), hormonas que son sintetizadas en la adenohipófisis; donde la FSH es responsable del desarrollo folicular y la LH está implicada en el proceso de ovulación (Prieto-Gómez y Velázquez-Paniagua, 2002).

En el caso de la vía nerviosa, que regula las funciones ováricas, se ha mostrado que el ovario de la rata recibe inervación simpática, por medio del Nervio del Plexo Ovárico (NPO) y del Nervio Ovárico Superior (NOS) e inervación parasimpática por el Nervio vago (Nv). Los primeros dos paquetes nerviosos se originan en el ganglio celiaco mesentérico superior (GCMS) (Moore y Bloom, 1979). Las fibras nerviosas que corren por el NOS inervan la glándula intersticial, folículos primordiales y en desarrollo, y aunque no tiene contacto con células de la granulosa ni del cuerpo lúteo, estos expresan receptores β -adrenérgicos, lo que indica que el NOS participa en el desarrollo folicular, así como en la esteroidogénesis (Burden, 1972; Araya y col., 2004).

Cualquier alteración en alguna de las vías de regulación del ovario puede generar patologías reproductivas, la más común, es el síndrome de ovario poliquístico (SOPQ). En la mujer, el SOPQ se caracteriza por irregularidad menstrual, anovulación, hiperandrogenismo y ovarios poliquísticos, aunque su etiología es desconocida (Singh, 2005; Bremer, 2010). Brawer y colaboradores en 1978

mostraron que, en la rata, el Valerato de estradiol (VE) induce algunas de las características semejantes a las observadas en mujeres con el síndrome.

Se han planteado tres hipótesis respecto al origen del SOPQ: 1) disfunción neuroendocrina, 2) alteración en la capacidad esteroidogénica y la 3) hiperactividad de las fibras simpáticas. En el presente trabajo nos enfocaremos en la tercera hipótesis que implica una alteración en la inervación simpática ovárica.

En la rata, la sección unilateral del NOS resulta en la disminución en el número de ovocitos liberados por el ovario denervado, mientras que, el ovario intacto puede presentar un incremento en la cuota ovulatoria (Morales y col., 1993). Cuando estos animales reciben una estimulación gonadotrópica se observa la misma respuesta asimétrica que se presenta cuando se realiza únicamente la sección (Morales y col., 1998). Dada esta respuesta, se ha concluido que en el animal cíclico el NOS regula de manera estimulante la respuesta de los folículos a las gonadotropinas. En el animal con SOPQ, el cual no ovula, la sección unilateral del NOS resulta en una baja cuota ovulatoria por parte del ovario denervado y un incremento del número de ovocitos liberados por parte del ovario inervado, a pesar de que éste presenta un tono simpático alto (Morales-Ledesma y col., 2010). En el presente estudio, se analizó en el animal con SOPQ, el papel del NOS en la respuesta de los folículos a las gonadotropinas.

MARCO TEÓRICO

OVARIO

Los ovarios son dos órganos sólidos que se encuentran alojados en la pelvis, fijada a la superficie posterior del ligamento ancho por medio del pliegue peritoneal que se denomina mesovario, por el cual recibe aporte nervioso, vascular y linfático. En la mujer, tienen consistencia dura y forma de almendra, con un diámetro de unos 3.5 cm y 1.5 cm de espesor. Cuentan con una superficie lisa antes de la pubertad, pero, a partir de la maduración de los folículos y la ovulación va presentando una superficie irregular. En la menopausia, con el cese de las ovulaciones, tiende a volverse liso (Tresguerres y col., 2005).

El ovario está constituido por tres estructuras importantes: 1) la **corteza** que está formada por células germinales (ovocitos). Es la estructura más importante ya que en ella se llevan a cabo la mayoría de los cambios asociados con el funcionamiento normal de la gónada, como es la maduración de los ovocitos y la secreción de hormonas; 2) la **médula** está conformada por células heterogéneas y abundantes vasos sanguíneos y 3) el **hilio** que es la zona por donde ingresan los nervios, vasos sanguíneos, linfocitos, tejido conectivo de sostén (Figura 1) (Tresguerres y col., 2005).

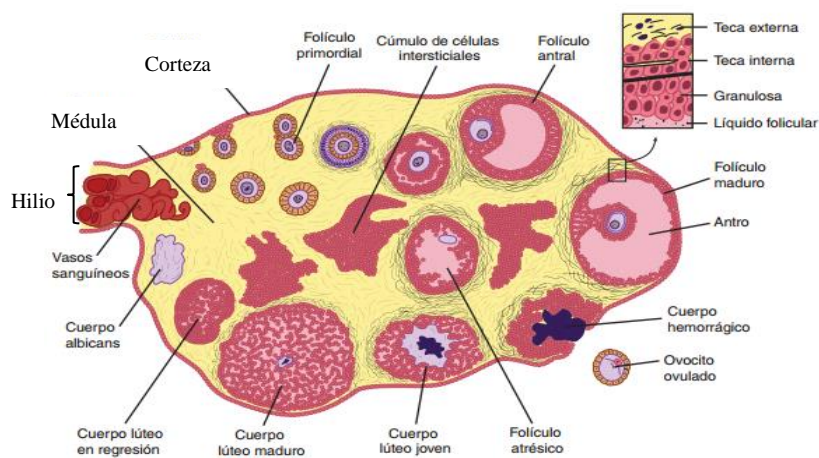


Figura 1. Esquema de un ovario donde se muestran las estructuras que lo conforman y el desarrollo folicular. Modificado de Barrett y col., 2010.

En roedores, el mesenterio ovárico conecta el ovario con el ligamento ancho, que forma una cápsula que encierra el ovario y una cavidad que contiene líquido, esta cápsula se denomina bursa ovárica y es requerida para el proceso de ovulación y reproducción (Li y col., 2007).

Las funciones del ovario son la producción de células germinales (ovocitos), que permiten la continuidad de la especie, esto a través del proceso de foliculogénesis y la generación de moléculas bioactivas, principalmente esteroides (estrógenos y progestinas) a través del proceso de esteroidogénesis, estas son hormonas indispensables para el desarrollo sexual femenino y mantenimiento del embarazo, ambas funciones se encuentran reguladas por una vía endocrina y una nerviosa (Tresguerres y col., 2005; Morales y col., 1993).

La unidad anatómica y funcional del ovario es el folículo que está formado principalmente por el ovocito, las células de la granulosa, una membrana limitante y células de la teca (Urbina y Biber, 2008).

FOLICULOGÉNESIS

Es la formación y maduración de los folículos ováricos, a partir del folículo primordial hasta períodos intermedios o finales. De acuerdo con la etapa de desarrollo, se distinguen distintos tipos de folículos (Figura 2).

Folículo primordial: está constituido por un ovocito detenido en profase de la primera división meiótica, el ovocito está rodeado por una capa (a veces incompleta) de células aplanadas, que están separadas del estroma ovárico circundante. Estas células aplanadas proliferan y completan dos capas que rodean al ovocito, con lo que se inicia la formación de la **membrana basal** (Eynard y col., 2008). Estos folículos miden aproximadamente 50 μm de diámetro. Aunque todavía no se conoce totalmente la transición del folículo primordial a folículo primario, la iniciación de esta transición está relacionada con factores de crecimiento como el “kid ligando” (KL) y su receptor C kit. El KL es producido por las células de la granulosa y el C kit, por el ovocito (Eynard y col., 2008; Urbina y Biber, 2008; Fábregues y Balasch, 2009). En

las primeras fases del desarrollo folicular no se requiere de la presencia de gonadotropinas, ya que las señales de tipo paracrino entre el ovocito y las células circundantes son las responsables directas del inicio de la maduración folicular (Urbina y Biber, 2008).

Folículo primario: la transición del folículo primordial al folículo primario se visualiza cuando las células pregranulosas planas del folículo primordial se transforman en células de la granulosa cúbica, y desarrollan puentes intercelulares entre sí (Urbina y Biber, 2008). Bajo estímulo de la hormona folículo estimulante (FSH), estradiol y factores de crecimiento estos folículos continúan desarrollándose. En mujeres, este folículo mide aproximadamente 300 μm (Urbina y Biber, 2008).

Folículo secundario: el ovocito primario se rodea de una sustancia glucoproteica de aspecto gelatinoso denominado zona pelúcida que funciona como una membrana (Urbina y Biber, 2008). Se presentan más de dos capas de células de la granulosa y se forman cavidades llamadas “espacios de Call-Exner”, mientras tanto, las células tecales se diferencian en forma gradual en teca interna y teca externa.

La teca interna posee un rico plexo capilar y está formada por grandes células pálidas que poseen un REL (retículo endoplásmico liso) muy desarrollado. La teca externa está compuesta por tejido conjuntivo denso y es atravesada por vasos sanguíneos que irrigan la teca interna (Eynard y col., 2008).

Folículo preovulatorio: en la mujer también es llamado folículo de Graff. Los espacios de call-exner se unen y originan el antro folicular, las células de la granulosa alejadas del ovocito segregan líquido folicular y las células que rodean al ovocito se denominan corona radiada y células del *cumulus oophorus* que posteriormente impulsarán al ovocito para ser liberado.

Desde el comienzo del desarrollo del antro folicular, parece iniciarse una mayor actividad metabólica que va acompañada de una intensa actividad esteroidogénica. Evidencias indican que las células de la granulosa (parietales y las que conforman el *cumulus oophorus*) contribuyen a través de factores paracrinos a que el ovocito reasuma la meiosis, e induce a la maduración del citoplasma de este. Este folículo

específicamente en sus células de la granulosa posee una gran capacidad esteroideogénica, en especial para la síntesis de estradiol (Urbina y Biber, 2008).

Cuando la concentración en suero de estradiol llega a valores de 200 pg/mL a 300 pg/mL durante más de 36 horas, se desencadena la oleada de hormona luteinizante (LH) proveniente de la hipófisis, la cual inicia el proceso de maduración del ovocito, con la disolución de su membrana nuclear, para completar la meiosis (expulsión del primer cuerpo polar).

Este folículo mide aproximadamente entre 18 y 22 mm de diámetro. Las células de la granulosa de estos folículos son más grandes y adquieren inclusiones lipídicas mientras que las de la teca están más vascularizadas: razón por la cual tiene una apariencia hiperémica por lo que aproximadamente a las 36 horas del inicio del pico ovulatorio de LH ocurre la ovulación (Urbina y Biber, 2008).

Ovulación: El abrupto incremento en la LH lleva al ovocito **primario** a comenzar la meiosis II, pero el ovocito es detenido en metafase, 3 horas antes del comienzo de la ovulación. La superficie del ovario comienza a presentar un abultamiento local, en cuyo vértice aparece una mancha avascular, llamada estigma. La elevada concentración de LH aumenta la actividad de la colagenasa y de las prostaglandinas, lo que causa contracciones musculares en la pared del ovario. Estas contracciones expulsan el ovocito (ovulación) que, junto con células de la granulosa que lo rodean; desde la región del *cumulus oophorus*, se desprenden y flotan fuera del ovario (Sadler, 2019). De allí, será captado por las fimbrias de la trompa ipsilateral y transportado al interior del útero.

Cuerpo lúteo: El folículo remanente de la ovulación se llena rápidamente de sangre, lo que da origen a la formación de un cuerpo hemorrágico. Las células de la teca y la granulosa que revisten al folículo proliferan rápidamente y la sangre coagulada es sustituida por células lúteas, formando el cuerpo lúteo (dichas células contienen abundantes lípidos y son de color amarillento).

De esta manera, empieza la fase lútea, durante la cual las células lúteas secretan estrógenos y progesterona (Barrett y col., 2010).

En las diferentes etapas del desarrollo folicular, la mayoría de los folículos (con excepción del preovulatorio) detiene su crecimiento e inicia un proceso de involución y degeneración llamado atresia folicular (Urbina y Biber, 2008).

A lo largo del proceso de foliculogénesis pueden ocurrir algunas anomalías que tienen como consecuencia la formación de estructuras quísticas o prequísticas.

Quiste: En general, los quistes foliculares se producen por falta de ruptura del folículo maduro en el momento de la ovulación. Los quistes son más grandes que un folículo y varían de los 3 a 8 cm (Fleischer y col., 1999).

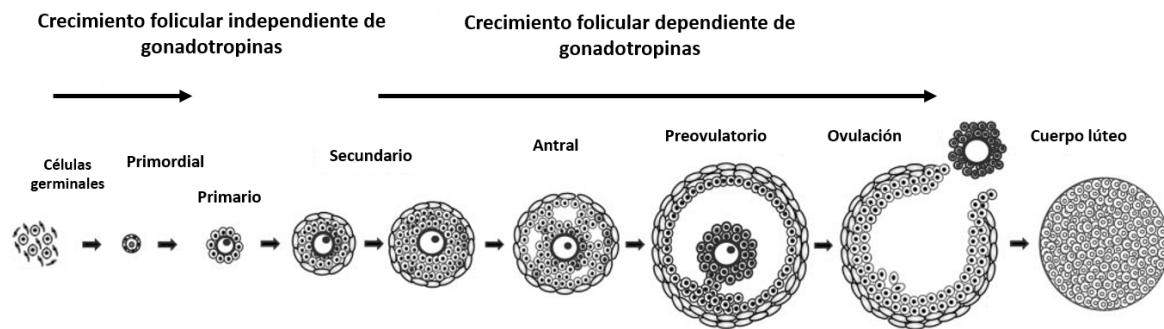


Figura 2. Clasificación de las etapas de la foliculogénesis en mamíferos; cuando son independientes o dependientes de gonadotropinas. Modificado de Edson y col., 2009.

ATRESIA FOLICULAR

Al momento del nacimiento los ovarios de la mujer contienen alrededor de 2 millones de folículos detenidos en el estadio primordial de su desarrollo. A lo largo de la vida, estos folículos primordiales van desarrollándose. La vida reproductiva se inicia con aproximadamente 400,000 folículos; en la menarquia se postula que la pérdida folicular es de alrededor de unos 1000 folículos por mes, durante la vida reproductiva llega a ovular unos 400 folículos. Desde el nacimiento a la menopausia, el 99.9% restante de la dotación folicular iniciará su desarrollo, pero debido a que no reciben el estímulo gonadotrópico adecuado estos folículos están destinados a la atresia (Tilly y col., 1991; Fábregues y Balasch, 2009).

Durante la atresia los folículos detienen su crecimiento e inician un proceso de involución y degeneración, donde existe la pérdida o eliminación de la mayoría de los ovocitos antes de llegar a la ovulación (Flores-Pérez y col., 2005; Urbina y Biber, 2008). Al comienzo de este proceso, se aprecia un deterioro progresivo de las células de la granulosa, con disminución del líquido de la cavidad antral del folículo y colapso de la cavidad, que va acompañado de la degeneración *in situ* del ovocito y desaparición progresiva de la teca, la cual es sustituida por tejido fibroso (Urbina y Biber, 2008). Hay varios signos morfológicos que permiten caracterizar la atresia de un folículo; la formación de núcleos picnóticos dentro de las células de la granulosa, engrosamiento de las capas de las células de la teca, desprendimiento de las células de la granulosa a la cavidad antral y alteraciones en la estructura del ovocito (Tilly y col., 1991).

Existe una acción determinante del E₂ y las gonadotropinas, fundamentalmente de FSH, sobre los folículos reclutados en cada ciclo ovárico que promueve su desarrollo. La LH, al unirse a sus receptores, estimula la producción de andrógenos de origen teco-intersticial, los cuales inducen la atresia en aquellos folículos que, para el momento del predominio de la LH sobre FSH, no son capaces de aromatizar los andrógenos, ni de mantener niveles de estradiol y progesterona en cantidades suficientes; como para antagonizar el efecto originado por estos andrógenos intraováricos (Urbina y Biber, 2008).

ESTEROIDOGÉNESIS

Las hormonas esteroides se clasifican en esteroides sexuales (andrógenos, estrógenos y progestágenos), glucocorticoides (cortisol) y mineralocorticoides (aldosterona), los cuales son sintetizados en las glándulas suprarrenales, las gónadas, la placenta y el sistema nervioso central; estas hormonas modulan las funciones reproductivas. Este proceso puede ser regulado a corto o largo plazo dependiendo del tejido, en las gónadas y las glándulas suprarrenales la regulación es a corto plazo, mientras que, en el cerebro y en la placenta la regulación es a larga (Gómez-Chang y col., 2012).

Las hormonas sexuales femeninas, de naturaleza esteroidea, producidas en el ovario son el estradiol (E_2), la progesterona (P_4) y la testosterona (T), aunque también se producen pequeñas cantidades de estrona y varias hormonas proteicas, como la inhibina y la relaxina.

Todos los esteroides ováricos se producen en las estructuras foliculares y derivan del colesterol, que se obtiene a partir de tres fuentes principales: el colesterol que circula en la sangre unido a lipoproteínas, el que se sintetiza dentro del ovario a partir de acetil coenzima A y el que se libera de los ésteres del colesterol almacenados en las gotas lipídicas. El colesterol, independientemente de su origen, se transporta después a las membranas mitocondriales, donde comienza la biosíntesis esteroidea (Tresguerres y col., 2005).

En el cuerpo lúteo la biosíntesis de las hormonas sexuales sigue la vía Δ_4 , que lleva la conversión de pregnenolona en progesterona, mientras que en el folículo es preferente la vía Δ_5 , ya que las células de la teca son más eficientes para metabolizar la 17- hidroxipregnenolona que la 17-hidroxiprogesterona (Tresguerres y col., 2005).

La biosíntesis de esteroides se realiza por acción de las enzimas que catalizan la conversión del colesterol a estrógenos, que son: el CYP11A1 p450scc, la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenada (3β -HSD), la CYP 17-hidroxilasa y la CYP-19 p450-aromatasa (Figura 3) (Tresguerres y col., 2005).

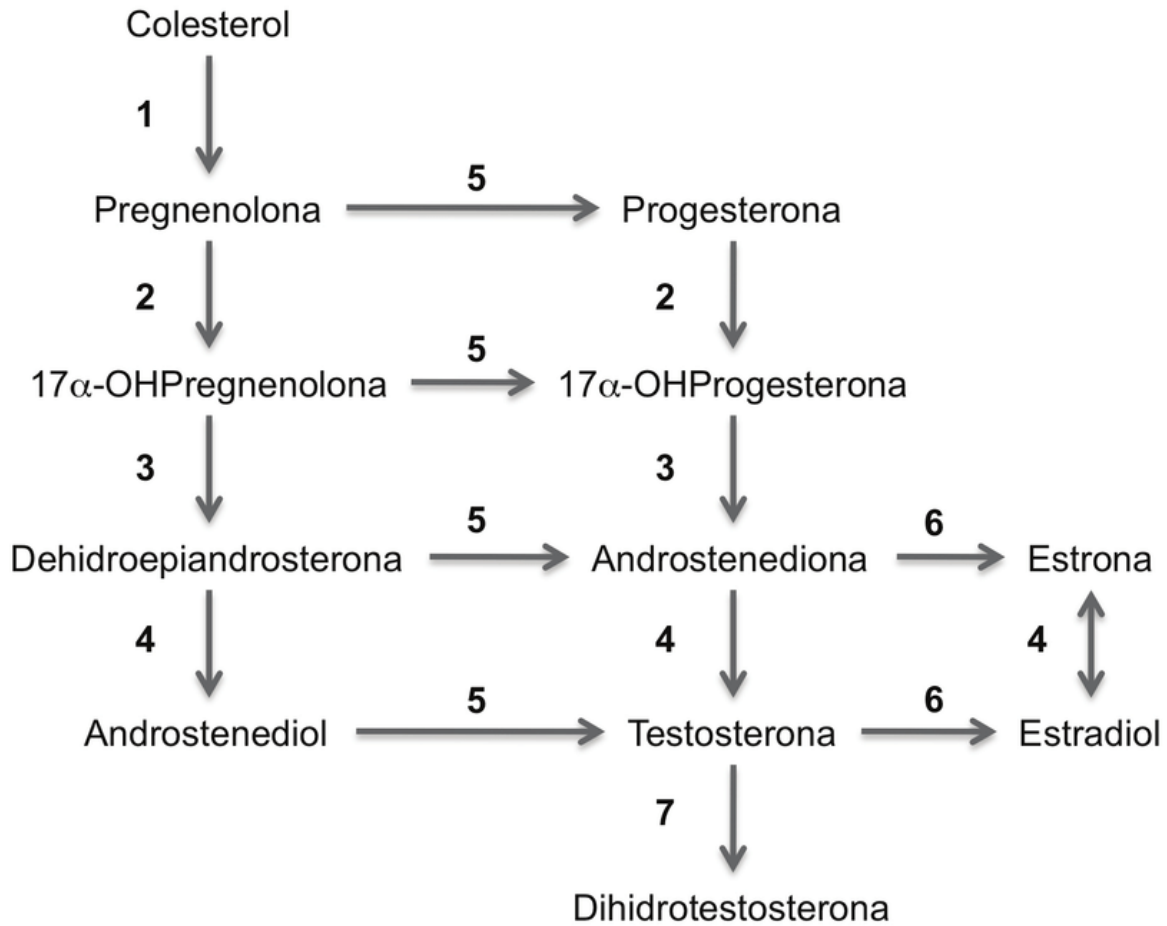


Figura 3. Biosíntesis de hormonas esteroideas en el ovario. (1) P450scc, (2) P450c17 (17 α -hidroxilasa), (3) P450c17 (17,20 liasa), (4) 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa, (5) 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa y 4,5 cetoesteroide isomerasa, (6) P450 aromatasa, (7) 5-reductasa Tomado de Tresguerres y col., 2005.

Se ha propuesto la **teoría de las dos células dos hormonas** para explicar la producción de estrógenos, luego de las observaciones de que las células de la teca interna contienen receptores específicos a la LH, y en respuesta a la administración exógena de LH sintetizan básicamente andrógenos; mientras que, las células de la granulosa tienen un sistema activo de aromatización, que se estimula con la FSH (Fernández-Morales y Mangel, 1983).

En las células de la teca interna, la LH se une a su receptor acoplado a la proteína G; con la consecuente estimulación del adenilato ciclasa y el aumento en las concentraciones intracelulares de AMPc (Adenosín Monofosfato Cíclico). La

respuesta es mediada por la vía del AMPc-PKA (Protein-Quinasa A) que involucra la fosforilación de enzimas como la hidrolasa de ésteres del colesterol o de proteínas que participan en el transporte del colesterol hacia la mitocondria (Gómez-Chang y col., 2012).

Las células de la teca secretan androstenediona y testosterona, estos andrógenos secretados son difundidos a través de la membrana basal del folículo hacia las células de la granulosa. La unión de la FSH a sus receptores, en las células de la granulosa, activa el AMPc el cual mediante la vía PKA induce la expresión de P450arom, enzima que aromatiza la androstenediona y T y las biotransforma en estrona, posteriormente por acción de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD1) se biotransforma a estradiol. Este estrógeno sintetizado pasa a la circulación y al líquido folicular (Figura 4) (Fernández-Morales y Mangel, 1983; Casabiell, 2006; Gómez-Chang y col., 2012).

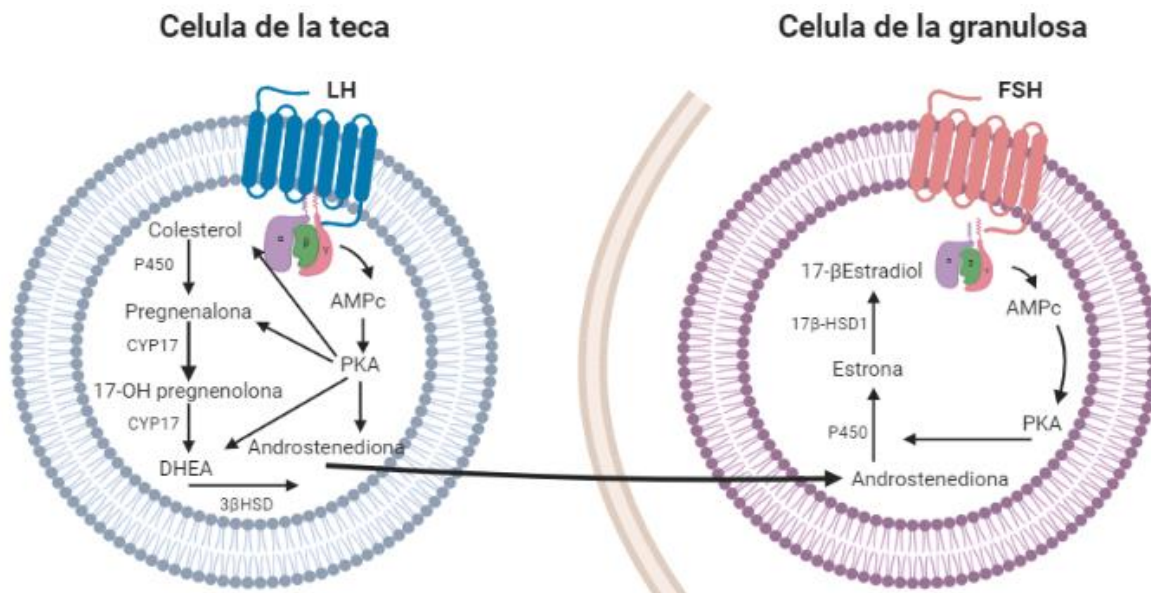


Figura 4. Síntesis de esteroides sexuales en células ováricas, se muestra la interacción entre las células de la teca y granulosa para la síntesis y liberación de andrógenos y estrógenos, respectivamente. Tomado de Tresguerres y col., 2005.

REGULACIÓN NEUROENDÓCRINA Y NERVIOSA DEL OVARIO

EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO

La GnRH es el decapeptido hipotalámico encargado de regular la secreción de las gonadotropinas hipofisarias, la FSH y la LH. Aunque el origen del decapeptido estimulante de las gonadotropinas es fundamentalmente hipotalámico, también existe una cierta producción a nivel ovárico, donde es capaz de inhibir de forma dosis-dependiente la producción de estrógenos en respuesta al estímulo de FSH, o también, la producción de progesterona (P_4) estimulada por gonadotropinas (Tresguerres y col., 2005).

El papel fisiológico de la GnRH a nivel ovárico podría ser como regulador adicional en el funcionamiento folicular en la producción de estrógenos en células de la granulosa como se mencionó anteriormente. En el hipotálamo la GnRH tiene una secreción pulsátil, que es capaz de incrementar o disminuir la secreción de ambas gonadotropinas y de regularlas por separado (Tresguerres y col., 2005).

La maduración gonadal y la esteroidogénesis son reguladas por las hormonas glucoproteicas FSH y LH (Prieto-Gómez y Velázquez-Paniagua, 2002). Las células de la granulosa secretan las hormonas peptídicas activina e inhibina, que regulan la síntesis y liberación de FSH en la hipófisis (Figura 5). Los estrógenos sintetizados por las células de la granulosa, cuando alcanzan ciertos niveles plasmáticos que coinciden con la maduración folicular, entre 36 y 48 hrs antes de la ovulación, inducen una retroalimentación positiva en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, como resultado, se libera LH (valor máximo) que induce la ruptura del folículo para que ocurra la ovulación y en el cuerpo lúteo estimula la activación enzimática para la producción de progesterona, a partir de colesterol (Guzmán y col., 2008).

Durante la fase lútea, la secreción de LH y FSH es reducida debido a la concentración elevada de estrógenos, progesterona e inhibina. Una vez iniciada la luteólisis, la concentración de estrógenos y progesterona desciende y la secreción de FSH y LH aumenta. En las mujeres, se forma un nuevo grupo de folículos y

posteriormente, un solo folículo dominante madura como resultado de la acción de las gonadotropinas. Aproximadamente a la mitad del ciclo, se incrementa la secreción estrogénica del folículo, lo que aumenta la respuesta de la hipófisis a la GnRH y desencadena la secreción de LH (Barrett y col., 2010).

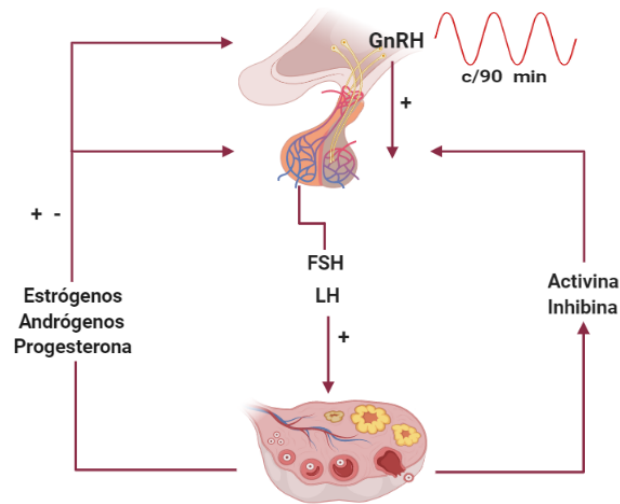


Figura 5. Esquema del eje hipotálamo-hipofisis-ovario. Modificado de Schaffer y col., 2017.

La síntesis y la liberación de las hormonas gonadotrópicas hipofisarias son reguladas por la GnRH, misma que provee el enlace entre los sistemas nervioso y endocrino. En el hipotálamo, neuronas parvicelulares secretoras de GnRH se encuentran en el núcleo arcuato, núcleo periventricular, el paraventricular y el área preóptica. A partir de estas zonas, la GnRH es transportada a la eminencia media y liberada al sistema porta-hipotálamico-hipofisiario, preferentemente en el surco infundibular. En los roedores, la GnRH es producida por un número relativamente pequeño de neuronas. En el hámster, el número de neuronas secretoras de GnRH es aproximadamente de 356 neuronas, mientras que en la rata hay de 560 a 1,300 neuronas (Prieto-Gómez y Velázquez-Paniagua, 2002).

El decapeptido GnRH, se libera en forma de pulsos, los cuales son regulados por señales externas al hipotálamo, tales como las hormonas esteroideas. En niñas prepúberes, la frecuencia de estos pulsos es de uno cada 3-4 horas, mientras que en la mujer adulta dicha frecuencia es de un pulso cada 90-100 minutos en la fase folicular temprana, y de uno cada 60 minutos en la fase folicular tardía

(Marshall y Griffin, 1993). Los pulsos lentos de GnRH (c/90min) estimulan la producción de FSH; y en la fase preovulatoria inmediata, los pulsos rápidos (c/60 min) liberan LH (Schaffer y col., 2017). La vida media de la GnRH en el humano se ha calculado ser menor de 10 minutos (Marshall y Griffin, 1993).

Recientemente se ha descrito que la maduración y la sensibilización de la actividad de GnRH, dependen no sólo de los esteroides sexuales sino también de un polipéptido conocido como kisspeptina. En el ratón las neuronas que expresan kisspeptina están presentes en el núcleo arcuato, el núcleo periventricular y el núcleo anteroventral periventricular. Se sugiere que la GnRH y la kisspeptina en el hipotálamo son componentes cruciales del eje hipotálamo-hipófisis-ovario que regula el inicio de la pubertad y que, en la adultez mantienen la función reproductiva, estimulando el crecimiento folicular y la síntesis de esteroides sexuales.

Se ha establecido que las señales de kisspeptina en el hipotálamo son responsables de la generación de pulsos de la GnRH, ya que la ausencia de kisspeptina condiciona un estado de inmadurez del eje hipotálamo-gónadas, donde, al bloquear su receptor GPR-54, se pierde la funcionalidad de esta vía, mientras que la adición de kisspeptina restablece la funcionalidad del eje (Ventura-Arizmendi y Hernández-Valencia, 2019).

INERVACIÓN OVÁRICA

Además de la regulación hormonal, las funciones del ovario son reguladas por la inervación simpática, sensorial y parasimpática que llega a la gónada (Figura 6) (Fernandois y col., 2014). Las señales nerviosas de tipo simpático llegan a los ovarios a través de dos nervios noradrenérgicos que se originan en el ganglio celiaco mesentérico superior y a través de las neuronas ubicadas en los ganglios paravertebrales (Domínguez y Cruz-Morales, 2011).

a) Nervios simpáticos que inervan al ovario:

1.- El nervio del plexo ovárico (NPO), viaja a lo largo de la arteria ovárica y sus fibras son principalmente perivasculares (Greinaer y col., 2005), inerva el ovario y

oviducto (Burden, 1972), por este nervio viaja noradrenalina (NA) y sustancia P (Fernandois y col., 2014). Algunas fibras del NPO son de naturaleza sensorial y aportan al ovario sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen que codifica a la calcitonina (CGRP).

2.-El nervio ovárico superior (NOS), que está asociado con el ligamento suspensorio (Greinaer y col., 2005), ingresa al ovario por el hilio e inerva además de la gónada al oviducto y útero, dentro del ovario las fibras nerviosas que corren por el NOS inervan la glándula intersticial, folículos primordiales y en desarrollo y aunque no tienen contacto con células de la granulosa ni del cuerpo lúteo, ambas expresan receptores β -adrenérgicos (Burden, 1972; Araya, 2004). Este nervio aporta al ovario NA, péptido intestinal vasoactivo (VIP) y Neuropeptido Y (NPY) (Fernandois y col., 2014).

Las fibras simpáticas que llegan al ovario son principalmente noradrenérgicas y participan en la regulación de la esteroidogénesis y el desarrollo folicular (Greinaer y col., 2005). La NA estimula la síntesis de receptores a FSH en los folículos primarios y se ha visto que actúa de manera sinérgica a LH (Dyer y Erickson, 1985; Mayerhoffer y col., 1997).

b) La inervación sensorial o parasimpática llega al ovario por el Nervio vago (Nv), por este nervio viaja VIP, acetilcolina y CGRP (Fernandois y col., 2014).

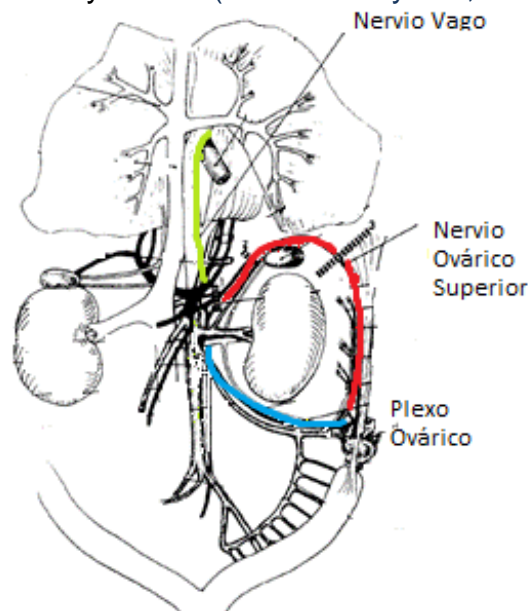


Figura 6. Representación esquemática del curso de los nervios que inervan al ovario. Modificado de Lawrence y Burden, 1980.

FUNCIÓN DEL NERVIO OVÁRICO SUPERIOR

La inervación simpática aportada por el NOS es esencialmente noradrenérgica y existen evidencias que sugieren que estos nervios facilitan el efecto de las gonadotropinas en el desarrollo folicular, en los procesos que culminan con la ovulación, y en la secreción de hormona ováricas (Aguado y Ojeda, 1984; Forneris y Aguado, 2002).

Una herramienta utilizada para analizar el papel del NOS en las funciones del ovario es mediante la sección quirúrgica de dicho nervio. La sección bilateral del NOS realizada a los cuatro días de edad, resulta en el retraso de la edad de la apertura vaginal. Cuando llegan a la etapa adulta, se observa la interrupción del ciclo estral, pese a que el número de cuerpos lúteos no se modifica. Dadas estas evidencias, los autores sugieren que la eliminación de la inervación simpática que llega al ovario mediante el NOS, es crítica en la regulación del desarrollo prepuberal y en la actividad cíclica del ovario de las ratas adultas (Forneris y Aguado, 2002).

En ratas prepúber (24 días de vida), la sección bilateral del NOS no altera la edad de la apertura vaginal ni la primera ovulación, pero disminuye el contenido de NA que se acompaña del aumento en el número de receptores adrenérgicos. Resultados que permiten sugerir el desarrollo de una hipersensibilidad del ovario, como resultado de la denervación (Aguado y Ojeda, 1984).

En la rata prepúber, la sección unilateral del NOS realizada a los 16, 20, 24, 28 o 32 días de vida, resulta en la disminución del número de ovocitos liberados por el ovario denervado; mientras que el ovario que mantiene intacta su inervación presenta un incremento en la cuota ovulatoria (Morales y col., 1993). Cuando los animales con sección unilateral del NOS son sometidos al estímulo gonadotrópico con PMSG (gonadotropina del suero de yegua preñada), hCG (gonadotropina coriónica humana) o la combinación de ambas hormonas, el ovario denervado no es capaz de ovular y si lo hace el inervado (Morales y col., 1998).

Se ha propuesto que la inervación simpática, aportada por el NOS, modula la respuesta de los folículos a las gonadotropinas, y que la información que llega al ovario por este nervio modula la ovulación de forma estimulante y asimétrica (Chávez y col., 1994). Además, ejerce un efecto estimulante en la regulación y diferenciación del crecimiento folicular (Morán y col., 2000).

Existen evidencias de que la alteración en alguna de las vías de regulación del ovario (nerviosa o neuroendocrina) puede generar patologías reproductivas, como es el síndrome de ovario poliquístico (SOPQ).

SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO

El SOPQ es la endocrinopatía más común que afecta entre el 5-7% de las mujeres en edad reproductiva (Machain-Vázquez y Hernández-Marín, 2014). Presenta una amplia gama de alteraciones endocrino-metabólicas, pero actualmente la etiología específica e incluso la fisiopatología es desconocida (Gamboa y Pérez, 2015).

Se han establecido diversos criterios para diagnosticar este síndrome (Cuadro 1).

Cuadro 1. Criterios de diagnóstico para el SOPQ.

CRITERIOS NIH 1990	CRITERIOS ROTTERDAM 2003	CRITERIOS SOCIEDAD DE AE-PCOS 2006
Anovulación crónica	Oligo/ anovulación	Signos de hiperandrogenismo clínico o bioquímico
Signos de hiperandrogenismo clínico o bioquímico	Signos de hiperandrogenismo clínico o bioquímico	Disfunción ovárica (definido por oligo/anovulación o morfología poliquística o ambos).
	Morfología ovárica quística en ausencia de un folículo dominante >20 mm	
Ambos criterios necesarios	2 o 3 criterios necesarios	Ambos criterios necesarios

Nota: los tres requieren la exclusión de otras endocrinopatías.

Abreviaturas: SOPQ: síndrome de ovario poliquístico; NIH: Instituto nacional de salud por sus siglas en inglés. AE-PCOS: exceso de andrógenos y síndrome de ovario poliquístico, por sus siglas en inglés. Modificada de Berger y Bates, 2014.

El SOPQ se caracteriza principalmente por: disfunción menstrual (oligo o amenorrea), signos cutáneos de hiperandrogenismo (acné, hirsutismo o alopecia), obesidad, concentraciones variables de gonadotropinas, ovarios poliquísticos y se ha asociado con defectos en la acción de la insulina (resistencia a la insulina) y en su secreción (disfunción pancreática de las células β).

Aunque el diagnóstico clínico y bioquímico del SOPQ es heterogéneo, el hiperandrogenismo es la anomalía bioquímica más constante y, por lo tanto, se considera el sello distintivo del síndrome (Singh, 2005; Bremer, 2010).

Se ha propuesto que una de las causas del origen del SOPQ durante la pubertad es la irregularidad en la liberación de GnRH, que tiene como resultado una alteración en la síntesis de FSH y LH (Ventura-Arizmendi y Hernández-Valencia, 2019).

Fisiopatología:

1. Anovulación

Se define como la falla repetitiva en la ovulación, a diferencia del patrón cíclico de las hormonas que se producen durante el ciclo ovárico normal, en el medio endocrino de las mujeres con anovulación las concentraciones de esteroides sexuales y gonadotropinas varían relativamente poco. La población de folículos antrales está aumentada, pero su desarrollo está detenido (Gamboa y Pérez, 2015). La histología ovárica, de mujeres con el síndrome, se caracteriza por aumento de folículos preantrales y antrales pequeños y un mayor reclutamiento folicular. Lo anterior se acompaña de una detención del proceso de selección folicular, lo que explica la ausencia de ovulación. Por lo tanto, en el SOPQ habría mayor reclutamiento folicular pero una menor selección, y el aumento del pool de folículos en crecimiento favorece la producción de andrógenos (Sir y col., 2013).

2. Hiperandrogenismo

Los folículos son esteroidogénicamente activos y son capaces de producir estrógenos y andrógenos. En el SOPQ se reporta que ocurren alteraciones en la secreción de LH; donde la frecuencia, amplitud y concentración de LH están elevadas. En las células de la teca aumentan los receptores a la LH, mientras que, en las células de la granulosa disminuyen los receptores para FSH.

Los andrógenos son producidos predominantemente en las células de la teca interna, las cuales rodean al folículo; el complejo CYP17- α es una enzima clave en la producción de andrógenos ováricos. Normalmente estos andrógenos se trasladan a las células de la granulosa; las cuales por medio de la aromatasa convierten estos andrógenos en estrógenos. En las mujeres con SOPQ, la expresión del complejo enzimático CYP17- α de la hidroxilasa, del P40sc y del propio receptor a andrógenos están aumentados, lo que favorece la síntesis de andrógenos (Gamboa y Pérez, 2015).

3. Hiperinsulinemia

El grado de hiperinsulinemia se correlaciona con el grado de hiperandrogenismo; el exceso de insulina causa aumento de los andrógenos, esto es

porque la insulina posee un efecto estimulante en el complejo CYP17- α . El incremento de insulina, reduce la proteína transportadora de andrógenos, lo que favorece la mayor concentración de andrógenos libres activos (Gamboa y Pérez, 2015).

VALERATO DE ESTRADIOL Y SU EFECTO SOBRE EL OVARIO

En ratas, un modelo experimental utilizado para inducir el SOPQ, es mediante la inyección de una dosis de valerato de estradiol (VE). El VE es un estrógeno de acción prolongada (Shi y Vine, 2012). Brawer y colaboradores (1978) mostraron que en ratas hembra, la inyección de 2 mg de VE induce las características del SOPQ después de 8 semanas de su administración, dichas características son: pérdida del ciclo estral, en donde la citología vaginal mostraba cornificación vaginal persistente (estro constante), que se acompaña de anovulación y de ovarios poliquísticos.

La inyección de VE provoca cambios en la homeostasis de las catecolaminas ováricas. Estos cambios, incluyen aumento en el contenido de NA ovárica y en su liberación desde las terminales nerviosas ováricas y disminución en los receptores β -adrenérgicos presentes en las células de la teca y de la granulosa. El incremento de NA está precedido por un aumento de tiroxina hidroxilasa (TH) (enzima limitante en la biosíntesis de las catecolaminas) (Dissen y col., 2000; Araya y col., 2004).

En ratas inyectadas con VE, el incremento en la liberación de NA ovárica es observado a los 30 y 60 días después de la inyección; donde a los 60 días es más pronunciada, lo que coincide con el desarrollo completo de los quistes ováricos (Lara y col., 1993).

La inyección de VE, además, aumenta la síntesis intraovárica del factor de crecimiento nervioso (NGF) y de su receptor de baja afinidad en el ovario (p75 NGFR), lo cual estimula la expresión de la TH en el GCMS. El bloqueo intraovárico de las acciones de NGF, restaura la población de folículos antrales, reduce el número de folículos prequísticos y quísticos y restaura la ciclicidad estral; así como, la capacidad ovulatoria en la mayoría de los animales.

Estos resultados sugieren que la hiperactivación de la inervación simpática del ovario, causada por VE, está relacionada con una sobreproducción de NGF y su receptor de baja afinidad en el ovario, lo que contribuye a la formación de ovarios quísticos e interrupción de la ovulación (Figura 7) (Lara y col., 2000).

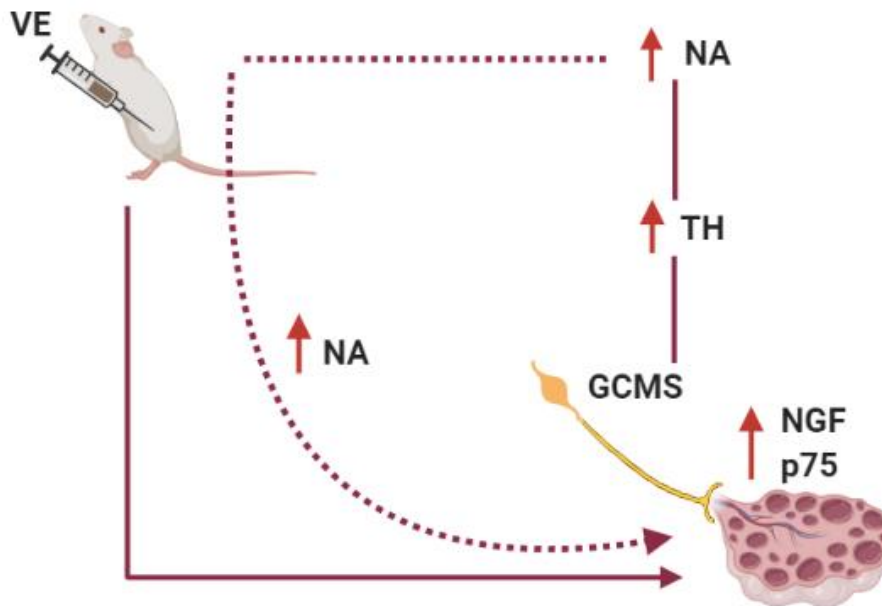


Figura 7 Mecanismo de acción del VE (valerato de estradiol). La administración de VE aumenta el NGF (Factor de crecimiento nervioso) y su receptor de baja afinidad el p-75, posteriormente aumenta la síntesis de la TH (Tirosina hidroxilasa) en el GCMS (ganglio celiaco mesentérico superior) esto trae como consecuencia aumento de la NA (noradrenalina) que llega al ovario y estimula la formación de quistes ováricos (Realizado a partir de Lara y col., 2000).

ESTEROIDOGÉNESIS EN EL SOPQ

Una hipótesis acerca de la etiología de este síndrome se basa en la teoría de la doble célula, doble hormona. Las evidencias apuntan a que el inicio del SOPQ se debe al aumento de andrógenos, resultado de la desregulación de la frecuencia de los pulsos de GnRH. En pacientes con SOPQ, la concentración de LH se encuentra elevada 40 a 60 % comparada con la que presentan mujeres sin el síndrome, debido al aumento en la amplitud y frecuencia de los pulsos de LH (Ventura-Arizmendi y Hernández-Valencia, 2019).

También se presenta una tendencia a producir un exceso de estradiol en todas las fases de maduración folicular (Figura 8). Si hay un exceso en la producción de andrógenos, en consecuencia, se muestra un desorden en el proceso de foliculogénesis, el cual se expresa con disminución de la maduración folicular e incremento en la atresia folicular (Ventura-Arizmendi y Hernández-Valencia, 2019).

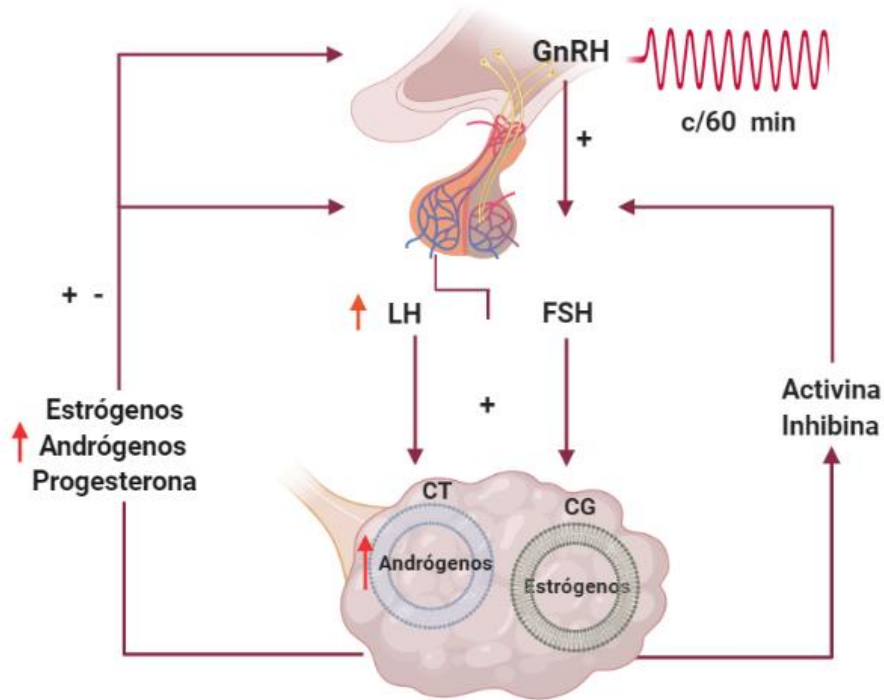


Figura 8. Esquema de la alteración del proceso de esteroidogénesis a diferentes niveles del eje hipotálamo-hipófisis-ovario en el SOPQ (Modificada de Bremer, 2010).

PARTICIPACIÓN DEL NOS EN EL ANIMAL CON SOPQ

Se ha propuesto que la mayor actividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario conduce al desarrollo del SOPQ, idea que se ve apoyada por el hecho de que, en la rata inyectada VE, la sección bilateral del NOS resulta en la disminución de la concentración de NA ovárica (Rosa-e-Silva y col., 2003), en el restablecimiento del ciclo estral, de la ovulación y de la secreción de las hormonas ováricas (Barria y col., 1993).

Resultados de nuestro laboratorio muestran que cuando se realiza la sección unilateral del NOS el ovario denervado, el cual presenta ahora un menor tono

simpático, no es capaz de restablecer la respuesta ovulatoria; lo que nos permitió postular que el SOPQ es más que la activación del sistema simpático (Morales-Ledesma y col., 2010).

Cuando los ovarios de ratas con SOPQ, inducido con VE, son cultivados en presencia de isoproterenol (agonista adrenérgico), hCG, o la combinación del isoproterenol con hCG resulta en el incremento de la concentración de progesterona y de andrógenos. Esta respuesta se ve abatida si los ovarios son previamente privados de la información que transcurre por el NOS. Estos resultados permiten sugerir que la información que transcurre por el NOS participa en la regulación del proceso esteroidogénico (Barria y col., 1993).

GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA

La gonadotropina coriónica equina (eCG), anteriormente conocida como gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG), es una hormona glucoproteica que contiene dos subunidades glicosiladas diferentes, denominadas α y β (Combarous y col., 2019). Esta hormona fue descrita hace más de 80 años, como un factor que se encuentra en la sangre circulante de la yegua preñada durante el primer tercio de la gestación. Tiene la particularidad de provocar un efecto similar al de la FSH, en especies diferentes a los equinos, a lo que se debe su alta potencia y más importante, a su larga vida media en la sangre. Existen numerosas aplicaciones para la eCG en especies domésticas que incluyen la inducción de la pubertad, superovulación, sincronización del estro o mayor duración de éste, mejora de la fertilidad y podría participar en el desarrollo lúteo (Hosseini y col., 2018; Combarous y col., 2019).

En la vaca tiene una vida media aproximada de 2 días y persiste por más de 10 días en la circulación sanguínea. La administración de eCG incrementa las concentraciones plasmáticas de progesterona luego de la ovulación, mejorando así, el desarrollo embrionario y el mantenimiento de la preñez (Bó y col., 2009).

GONADOTROPINA CORIÓNICA HUMANA

La hCG es una glucoproteína de 237 aminoácidos, formada por dos subunidades, una α y otra β codificadas por genes independientes, producida por la placenta humana. La actividad biológica depende de la integridad y correcto acoplamiento de las dos subunidades. La subunidad β es rica en residuos de prolina en el dominio carboxilo terminal, lo cual le otorga la especificidad biológica para la interacción con su receptor (Barrera y col., 2008).

La hCG lleva a cabo sus efectos al unirse con el receptor de LH/hCG, que pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G. Debido a la similitud estructural entre la hCG y la LH, ambas se unen al mismo receptor, aunque las acciones de la hCG son más potentes, ya que tiene mayor afinidad por el receptor y mayor vida media en la circulación sanguínea. Las funciones mejor documentadas de la hCG están relacionadas con eventos reproductivos, particularmente con el embarazo (Barrera y col., 2008). En las mujeres, la hCG induce superovulación y en clínica se usa para aumentar las tasas de embarazo al aumentar la cantidad de ovocitos (Pirinççi y col., 2018).

Se ha demostrado que la hCG es necesaria para evitar la luteólisis, así como para mantener la síntesis y la secreción de P4 por las células del cuerpo lúteo. Promueve la diferenciación de las células placentarias y la angiogénesis, e induce la producción de metaloproteinasas de matriz específicas que favorecen la invasión de los trofoblastos en el endometrio (Barrera y col., 2008). La administración de gonadotropinas exógenas estimula el desarrollo folicular y la ovulación en especies con inervación ovárica escasa, como la rata (Curry y col., 1984).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El SOPQ es la endocrinopatía más común que afecta a las mujeres en edad reproductiva, al momento, la etiología del síndrome es desconocida. Con el empleo de modelos animales se postula que el síndrome puede ser resultado de la hiperactividad de las fibras simpáticas, lo que culmina en la anovulación y la formación de quistes ováricos.

Por el NOS viaja el principal aporte de la NA que llega al ovario en la rata cíclica, la sección de este nervio resulta en la disminución en el número de ovocitos liberados por el ovario denervado, mientras que, el ovario intacto presenta un incremento en la cuota ovulatoria.

Cuando estos animales cíclicos y con sección del NOS son sometidos a una estimulación gonadotrópica, se observa la misma respuesta asimétrica que se presenta con la sección, por ello, se ha planteado que la información que viaja por el NOS regula de manera estimulante la respuesta de los folículos a las gonadotropinas. Por otro lado, en el animal con SOPQ, donde no hay ovulación, la sección unilateral del NOS resulta en una respuesta ovulatoria mínima por parte del ovario denervado, y un mayor número de ovocitos liberados por parte del ovario inervado, pese a su tono simpático alto.

Para observar si en el animal con SOPQ el NOS regula la respuesta de los folículos a las gonadotropinas, como en el animal cíclico, en el presente estudio se analizó en la rata cíclica o con SOPQ inducido por la inyección de VE, el papel del NOS ante un estímulo gonadotrópico, sobre la respuesta ovulatoria y la capacidad esteroideogénica.

HIPÓTESIS

En la rata cíclica, la información que transcurre por el NOS modula de manera estimulante y asimétrica la respuesta de los folículos a las gonadotropinas, y dado que, en la rata con SOPQ, la anovulación se asocia al incremento de la actividad de las fibras simpáticas, entonces, la sección unilateral del NOS disminuirá el tono noradrenérgico y estimulará la respuesta del folículo ante la estimulación gonadotrópica por el ovario inervado.

OBJETIVO GENERAL

Analizar en la rata con SOPQ, la respuesta del ovario denervado al estímulo gonadotrópico.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar si una vez establecido el SOPQ, el ovario inervado es capaz de ovular sin estimulación gonadotrópica.
- Analizar en el animal con SOPQ, sometido a la sección unilateral del NOS, la respuesta del ovario al estímulo gonadotrópico sobre:
 - El peso relativo de los ovarios, el útero y las adrenales.
 - La respuesta ovulatoria.
 - La histología ovárica.
 - La concentración sérica de la progesterona, la testosterona y el estradiol.

MATERIAL Y MÉTODOS

- **Animales**

Se utilizaron ratas hembra, de diez días de edad, de la cepa CII-ZV. Los animales fueron mantenidos con iluminación controlada de 14 h de luz y 10 h de oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h), temperatura de 22 ± 2 °C, con libre acceso a la madre hasta el destete y posteriormente al agua y alimento.

El día de nacimiento se consideró como el día 0 de vida, al día siguiente, los animales fueron sexados, y se colocaron un máximo de 5 hembras y 1 macho por caja. Al día 24 de vida los animales se destetaron y se marcaron. Durante todo el estudio se siguieron las normas establecidas para el manejo de animales (NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio) y se contó con la aprobación del comité interno para el uso y cuidado de animales de la FES-Zaragoza. Se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el número de animales usados en este estudio

Grupos experimentales

Los animales fueron inyectados a los 10 días de edad con una dosis de 0.1 mL de aceite de sésamo (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo. USA), que fungió como el vehículo (Vh). Para inducir el SOPQ, otros animales fueron inyectados, vía intramuscular, con una dosis de 2 mg de VE (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo. USA) disuelto en 0.1 mL de aceite de sésamo.

- **Animales con SOPQ intactos:** Un grupo de animales inyectado con VE fue sacrificado alrededor de los 70 días de vida, al presentar el estro vaginal y se analizó la respuesta ovulatoria.

Otros grupos de animales inyectados con Vh o VE al cumplir los 60 días de vida fueron asignados en alguno de los grupos que a continuación se describen (Figura 9). En cada caso los animales fueron anestesiados con éter.

- **a) Sección del NOS:** animales con Vh o VE se anestesiaron, se les realizó una incisión dorsolateral de aproximadamente dos cm de longitud en piel, músculo y peritoneo para tener acceso al ligamento suspensorio que contiene el NOS. Se extrajo el ovario izquierdo o derecho y se seccionó el NOS a uncm de la gónada, el ovario se regresó a la cavidad, se suturó la herida y se colocó yodo sobre ella. Estos animales se sacrificaron aproximadamente a los 70 días de vida, al presentar el estro vaginal.
- **Operación simulada:** animales tratados con Vh o VE se anestesiaron, posteriormente se realizó un corte lateral izquierdo o derecho que incluyo piel, músculo y peritoneo y sin tocar ningún órgano se suturó la herida y se colocó yodo sobre ella. Estos animales se sacrificaron a los 70 días de vida al estro vaginal.

Para analizar si en el animal con SOPQ, inducido por la inyección de VE, la información neural que transcurre por el NOS modula la respuesta del folículo a las gonadotropinas, a otro grupo de animales, diez días después de la cirugía, a los 70 días de edad, se les realizó una prueba de ovulación inducida que consistió en:

- **Estimulación con eCG:** Animales con el Vh o VE recibieron un estímulo mediante la inyección de 10 UI de eCG. Los animales fueron sacrificados al estro vaginal inmediato a la estimulación.
- **Estimulación con eCG+hCG:** En otros grupos inyectados con Vh o VE se realizó la estimulación con 10 UI de eCG y 56 horas después se inyectaron 8UI de hCG. Los animales fueron sacrificados al estro vaginal inmediato a la estimulación.
- **Testigo absoluto:** Ratas sin ningún tratamiento se sacrificaron a los 70 días de vida en estro.

Después de que los animales fueron asignados en alguno de los grupos experimentales e inyectados con el Vh o VE, fueron constantemente monitoreados hasta que presentaron la apertura vaginal, momento a partir del cual se comenzó a tomar los frotis vaginales, diariamente durante dos ciclos consecutivos. El frotis de todos los animales se reanudó dos semanas antes de que los animales fueran sometidos a cirugía y se continuó hasta el día del sacrificio.

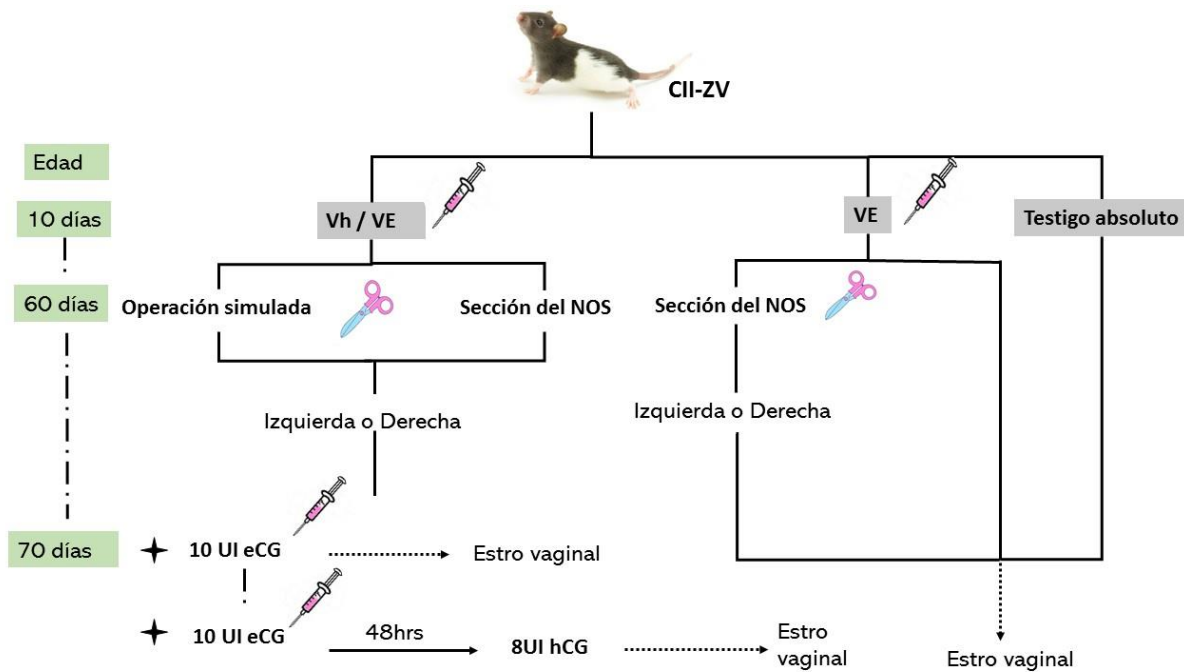


Figura 9. Diseño experimental del estudio, se muestran los diferentes grupos experimentales empleados en el presente estudio.

Autopsia

Los animales de todos los grupos experimentales se sacrificaron por decapitación en el día del estro vaginal, entre las 10:00 - 12:00 hrs. Se recolectó la sangre del tronco en tubos de ensayo, se centrifugó a 3500 r.p.m durante 15 minutos, se obtuvo el suero y se almacenó a -20° C hasta la cuantificación de las hormonas. A la autopsia se extrajeron los ovarios, útero y adrenales, y se pesaron en una balanza analítica. Los resultados fueron expresados como mg/100 g de peso corporal.

Los oviductos se diseccionaron y con la ayuda de un microscopio estereoscópico SMZ800N (Nikon Instruments Inc., USA), se contaron los ovocitos presentes, los ovarios se fijaron con solución Bouin por 24 horas y posteriormente se mantuvieron con alcohol al 70%, hasta el momento de realizar los cortes histológicos.

Histología ovárica

Se realizó una deshidratación de los ovarios, se incluyeron en paraplást (Surgipath Paraplast, Leica Biosystem, USA). Se realizaron cortes histológicos seriados de 10 μm en el microtomo rotatorio manual 202A (ECOSHEL, USA), los cuales fueron teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina. Posteriormente, los cortes se observaron al microscopio óptico (Nikon) y se buscó la presencia de folículos en desarrollo, cuerpos lúteos o quistes.

Un quiste fue aquel folículo que presentó una cavidad antral grande, sin ovocito, con pocas capas de células de la granulosa y la teca presenta un mayor tamaño.

Cuantificación de las hormonas esteroides

La cuantificación de la concentración de la progesterona, la testosterona y el estradiol se realizó mediante la técnica de Quimioluminiscencia. Se tomaron alícuotas con un volumen aproximado de 500 μL por muestra de suero y se colocaron dentro de un microtubo y se ingresaron al equipo IMMULITE 1000, con una sensibilidad de 0.2 ng/ml para P4, 15ng/dL para T y 9.7 pg/mL para E2 (Siemens Healthcare Diagnostics, USA).

El equipo tomó 25 μL de la muestra y la depositó en la fase sólida que contenía el anticuerpo policlonal para la progesterona, la testosterona o el estradiol. Momentos después se añadió la hormona conjugada con fosfatasa alcalina y se dejó incubar durante una hora a 37 °C para la cuantificación de la testosterona y el estradiol y 30 min para cuantificación de la progesterona. Después de la incubación, el conjugado enzimático no unido fue eliminado por centrifugación. Se agregó el

sustrato quimioluminiscente y se incubó durante 10 minutos.

El sustrato se hidrolizó a un anión inestable, la descomposición del anión produce una emisión sostenida de luminiscencia. Finalmente se transformó la intensidad de señal en una concentración. La intensidad de la señal es inversamente proporcional a la concentración de la hormona dentro de la muestra.

La concentración sérica de progesterona se expresó en ng/mL, mientras que, testosterona y estradiol en pg/mL.

Análisis estadístico

Los pesos relativos de la masa ovárica, adrenal, del útero y las concentraciones de hormonas esteroides se analizaron con una prueba de ANDEVA, seguido por una prueba de Tukey-Kramer. Cuando se requirió la comparación entre dos grupos se utilizó la prueba de "t" de Student.

La proporción de animales ovulantes (número de animales ovulantes / número de animales tratados), se analizó mediante la prueba exacta de Fisher. El número de ovocitos liberados se analizó por la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de U de Mann-Whitney. Se consideró como estadísticamente significativos cuando el valor de p fue ≤ 0.05 .

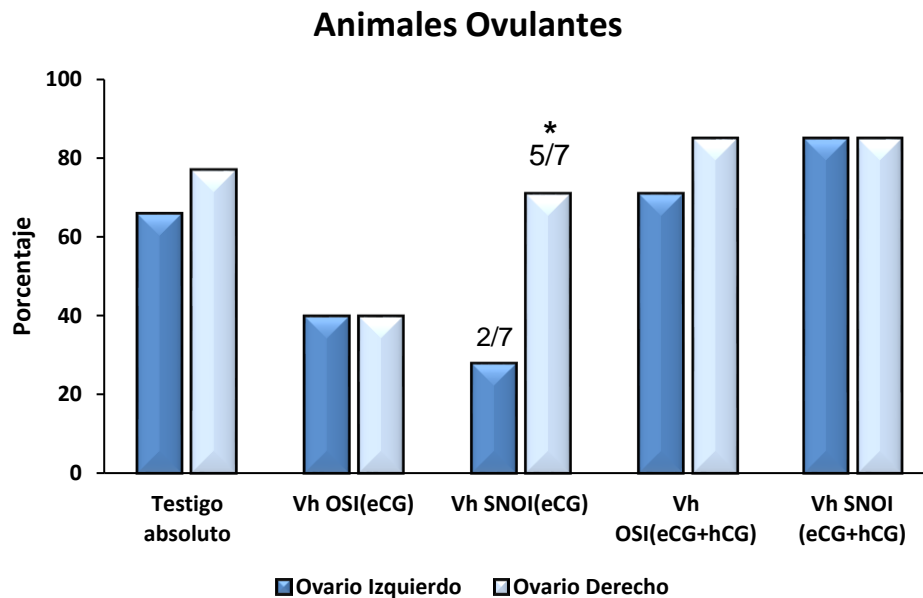
RESULTADOS

Animal cíclico con sección del NOS izquierdo estimulado con eCG o eCG+ hCG

Respuesta ovulatoria

El 88% de los animales testigo absoluto ovularon al estro vaginal. En el grupo con Vh OSI (eCG) se observó un menor porcentaje de animales ovulantes respecto al testigo absoluto, sin ser estadísticamente significativo. En el grupo con Vh SNOI (eCG), fue menor el porcentaje de animales ovulantes por parte del ovario denervado, comparado con el ovario inervado. En el grupo con OSI (eCG+hCG), el porcentaje de ovulación fue similar al testigo absoluto y al compararlo con el grupo con OSI (eCG), se observó una tendencia al incremento.

Con la sección del nervio ovárico izquierdo y estimulado con ambas gonadotropinas, el 85% de los animales ovuló por ambos ovarios (Gráfica 1).

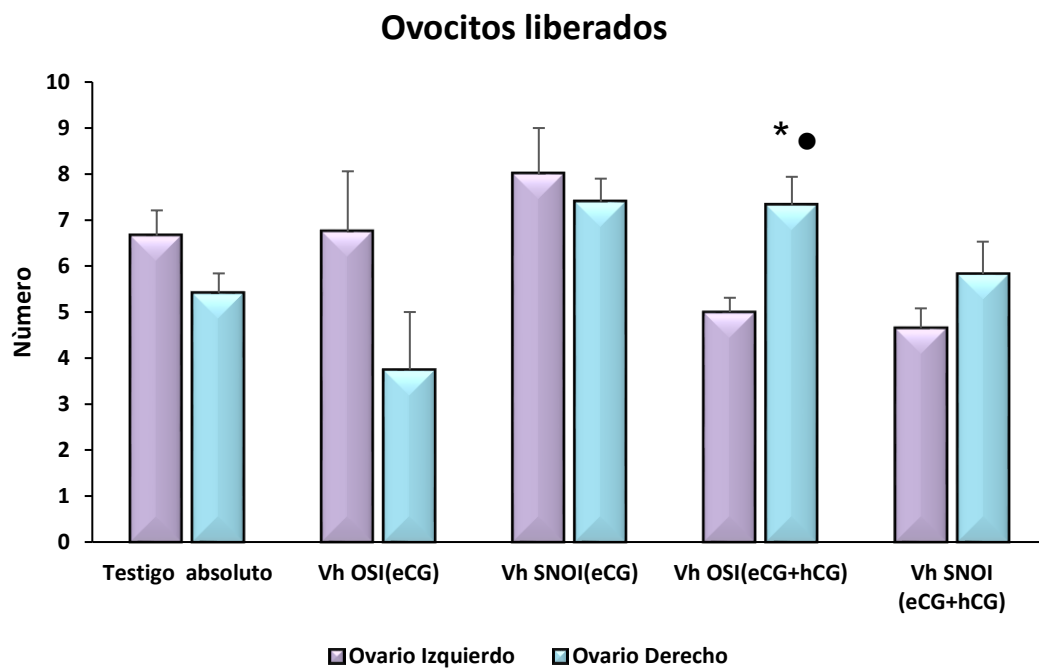


Gráfica 1. Porcentaje de animales ovulantes de hembras testigo absoluto, inyectadas con vehículo (Vh) y sometidas a la operación simulada izquierda (OSI) o sección del nervio ovárico izquierdo (SNOI) y estimuladas con 10 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) o 10UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). * $p < 0.0001$ vs. Su ovario izquierdo. Prueba exacta de Fisher.

Número de Ovocitos

El número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo de los animales con OSI (eCG) fue similar al testigo absoluto.

En el grupo OSI (eCG+hCG), el número de ovocitos liberados por parte del ovario derecho de fue mayor respecto al ovario izquierdo del mismo grupo. Este aumento también se observó, cuando se comparó con el ovario derecho del grupo con OSI (eCG) (Gráfica 2).



*Grafica 2. Media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados de animales testigo absoluto, inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) y sometidos a los 70 días de edad a la operación simulada izquierda (OSI) o sección del nervio ovárico izquierdo (SNOI) y estimulados con 10 UI de Gonadotropina coriónica equina (eCG) o 10UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). ● $p= 0.0404$ vs. Ovario derecho de Vh OSI (eCG); * $p=0.0297$ vs. Su Ovario izquierdo. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Mann-Whitney.*

Peso relativo de órganos

En las hembras con SNOI (eCG+hCG), aumentó la masa ovárica respecto al grupo con SNOI estimulado con eCG. El peso uterino de los animales con SNOI (eCG+hCG), fue mayor que el registrado en los animales con operación simulada y estimulados con ambas gonadotropinas; y con el grupo denervado y estimulado solo con eCG (Cuadro 2).

Cuadro 2. Media \pm e.e.m. de la masa ovárica, adrenal y útero (mg/100 g pc) de animales testigo absoluto, inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) y sometidos a los 70 días de edad a la operación simulada izquierda (OSI) o a la sección del nervio ovárico izquierdo (SNOI) y estimulados con 10 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) o 10 UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG).

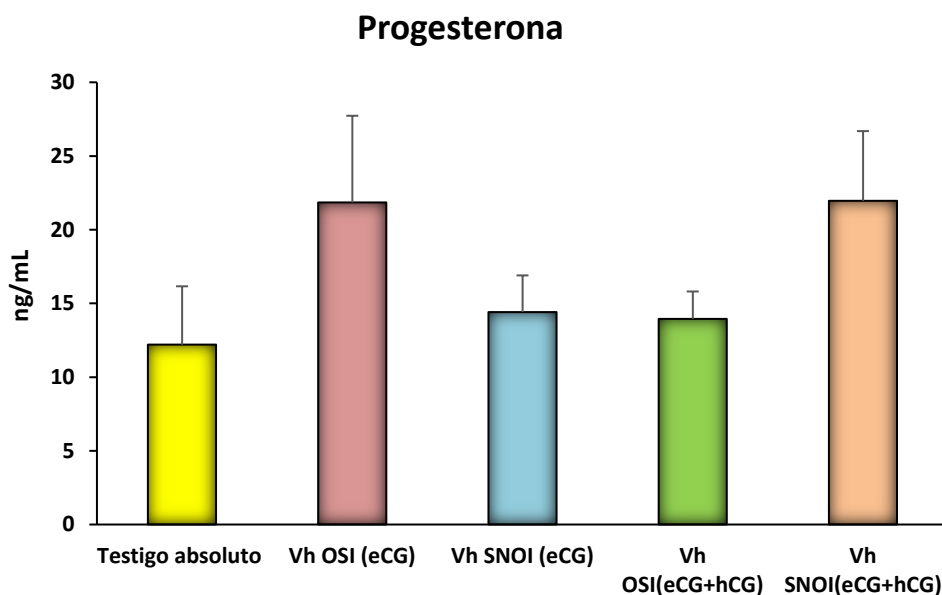
PESOS RELATIVOS DE LOS ÓRGANOS			
Grupo	Masa ovárica	Peso uterino	Masa adrenal
Testigo Absoluto	29.36 \pm 1.94	151.1 \pm 9.77	26.72 \pm 1.05
Vh OSI (eCG)	28.24 \pm 2.1	142.47 \pm 9.59	26.2 \pm 1.86
Vh SNOI (eCG)	33.28 \pm 1.47	163.45 \pm 10.55	22.37 \pm 1.88
Vh OSI (eCG+hCG)	32.44 \pm 3.5	160.08 \pm 7.37	26.23 \pm 1.84
Vh SNOI (eCG+hCG)	39.02 \pm 1.68●	242.1 \pm 14.1●▲	30.37 \pm 1.26

● $p < 0.0251$ vs. Vh SNOI (eCG); ▲ $p < 0.001$ vs. Vh OSI (eCG+hCG). Prueba de ANDEVA seguida por prueba de Tukey-Kramer.

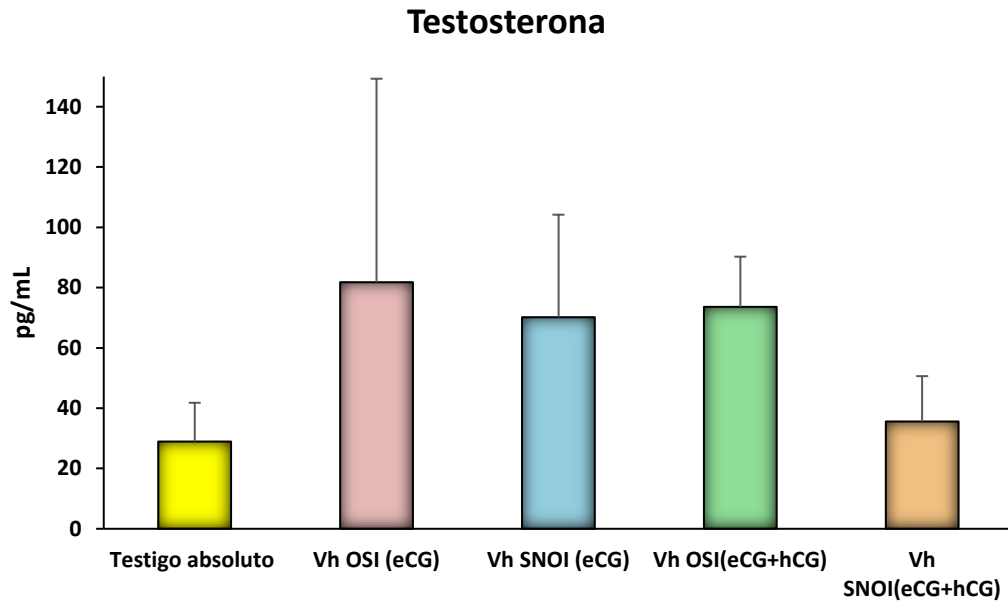
Concentración de hormonas esteroides

La concentración sérica de P₄ en el grupo con OSI (eCG) fue mayor, sin ser estadísticamente diferente. No se modificó la concentración de la hormona en las hembras con sección del NOS izquierdo, estimulado con una o ambas gonadotropinas (Gráfica 3).

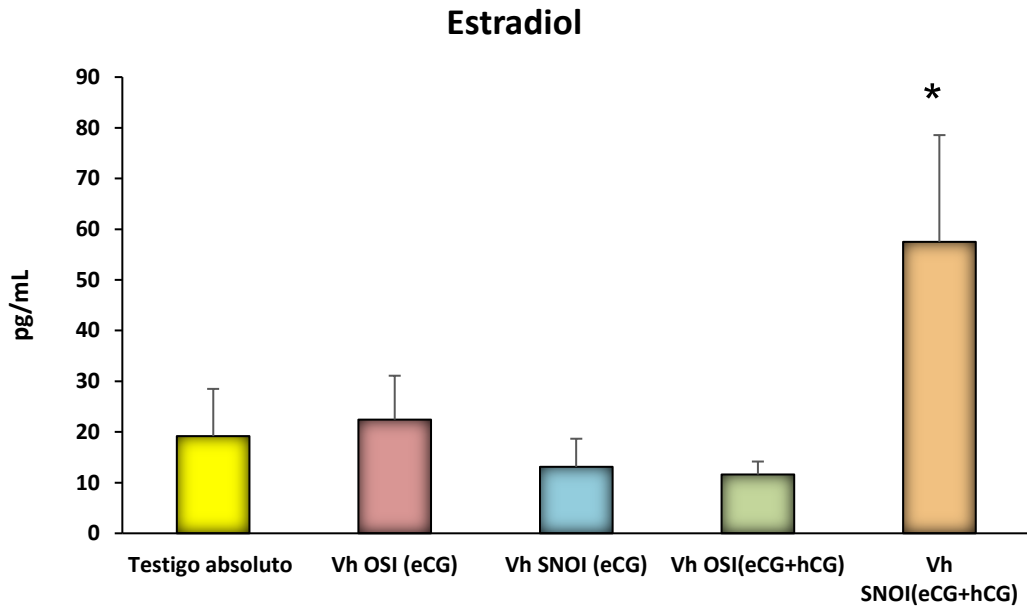
En los grupos con operación simulada izquierda o sección del NOS izquierdo y estimuladas con una o ambas gonadotropinas, no se modificó la concentración sérica de testosterona (Gráfica 4). Por otro lado, la concentración sérica de estradiol en los grupos estimulados con una gonadotropina no mostró diferencias significativas, mientras que, en el grupo con sección del NOS la estimulación con ambas gonadotropinas resultó en el aumento de la concentración de estradiol, respecto a su grupo con operación simulada (Gráfica 5).



Gráfica 3. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de progesterona (ng/ mL), de animales testigo absoluto, inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) y sometidos a los 70 días de edad a la operación simulada izquierda (OSI) o sección del nervio ovárico izquierdo (SNOI) y estimulados con 10 UI de Gonadotropina coriónica equina (eCG) o 10UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). Prueba ANDEVA seguida por prueba de Tukey-Kramer.



Gráfica 4. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de testosterona (pg/ mL) de animales testigo absoluto, inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) y sometidos a los 70 días de edad a la operación simulada izquierda (OSI) o sección del nervio ovárico izquierdo (SNOI) y estimulados con 10 UI de Gonadotropina coriónica equina (eCG) o 10UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). Prueba ANDEVA seguida por prueba de Tukey-Kramer.



Gráfica 5. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica estradiol (pg/ mL) de animales testigo absoluto, inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) y sometidos a los 70 días de edad la operación simulada izquierda (OSI) o sección del nervio ovárico izquierdo (SNOI) y estimulados con 10 UI de Gonadotropina coriónica equina (eCG) o 10UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). * $p < 0.05$ vs. Vh OSI (eCG+hCG). Prueba ANDEVA seguida por prueba de Tukey-Kramer.

Morfología ovárica

El ovario izquierdo o derecho, del grupo con Vh OSI (eCG), mostró la presencia de folículos en desarrollo, así como la presencia de cuerpos lúteos (Figura 10A y B). Cuando se realizó la sección del NOS izquierdo + eCG se observó la misma respuesta que con la operación simulada (Figura 10C y D).

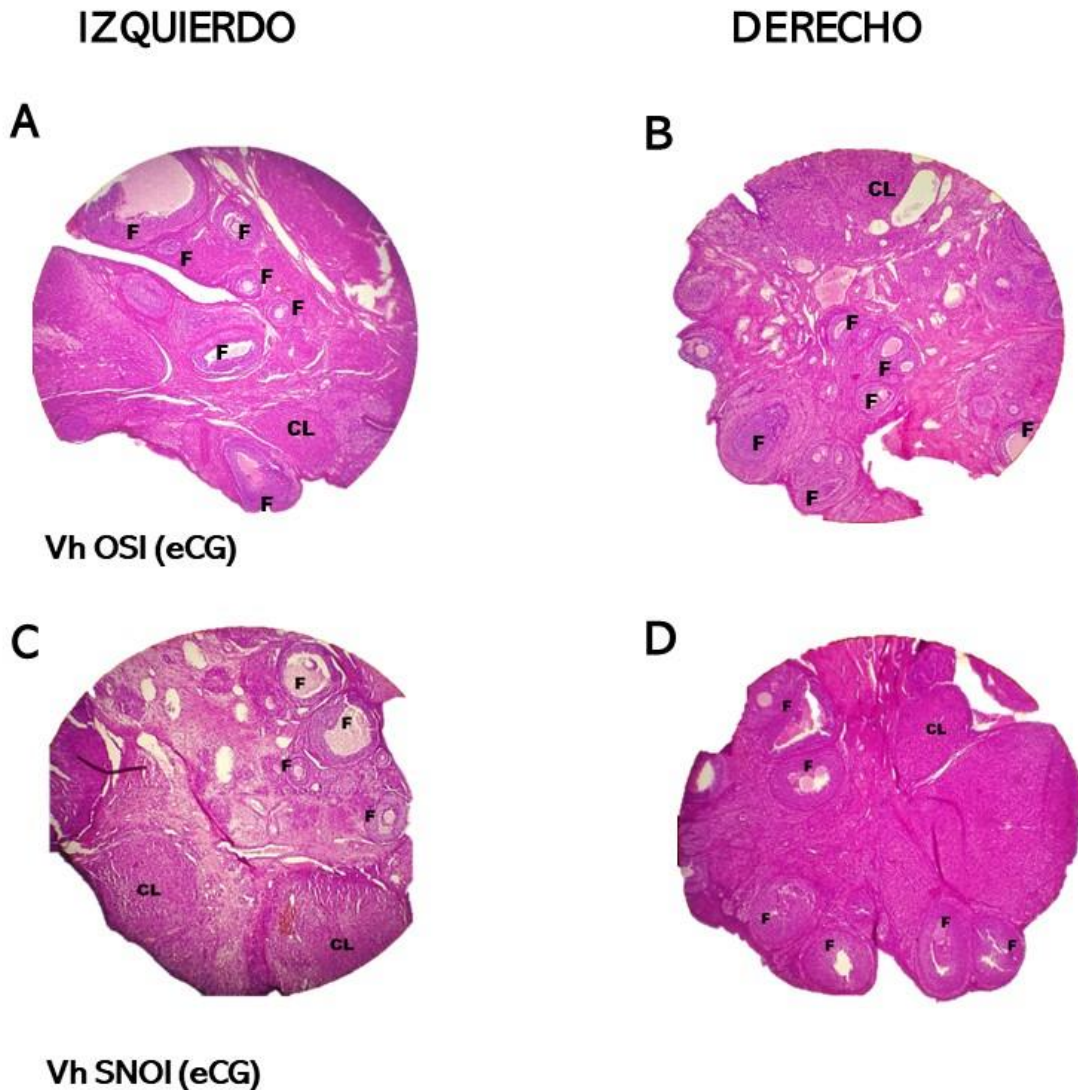


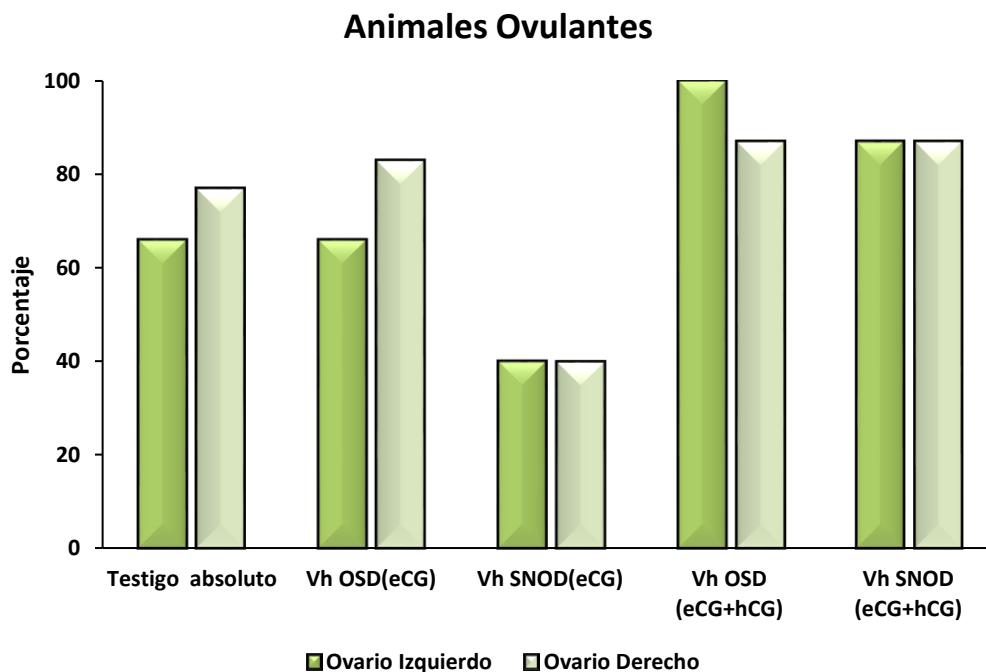
Figura 10. Micrografía a un aumento de 10x de ovario de rata inyectadas a los 10 días de edad con Vehículo (Vh) y sometidos a los 70 días de edad la operación simulada izquierda (OSI) o sección del nervio ovárico izquierdo (SNOI) y estimulados con 10 UI Gonadotropina coriónica equina (eCG). Vh OSI (eCG) (A y B) y Vh SNOI (eCG) (C y D) teñidos con hematoxilina-eosina, donde F: folículos en desarrollo; CL: cuerpos lúteos.

Animal cíclico con sección del NOS derecho estimulado con eCG o eCG+ hCG

Respuesta ovulatoria

En el grupo con OSD (eCG) el porcentaje de animales ovulantes es similar al testigo absoluto. En los animales con SNOD (eCG) el porcentaje de animales ovulantes por ambos ovarios fue igual, y tendió a disminuir respecto a la operación simulada, pero no llegó a ser estadísticamente diferente (Gráfica 6).

Cuando se realizó la sección del NOS derecho y se estimuló con ambas gonadotropinas, el porcentaje de animales ovulantes fue similar a su respectivo grupo control (Gráfica 6).

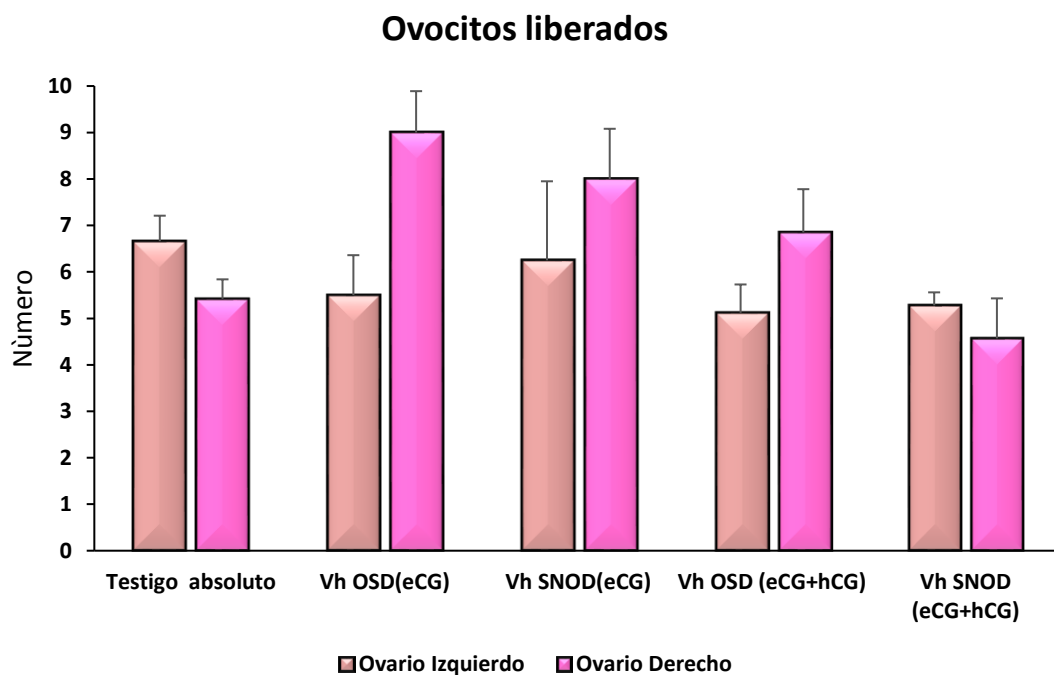


Gráfica 6. Porcentaje de animales ovulantes de hembras testigo absoluto, inyectadas a los 10 días de edad con vehículo (Vh) y sometidas a los 70 días de edad a la operación simulada derecha (OSD) o sección del nervio ovárico derecho (SNOD) estimuladas con 10 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) o 10UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). Prueba exacta de Fisher.

Número de Ovocitos

En los animales con OSD y estimulados con eCG, el número de ovocitos liberados tendió a aumentar respecto al testigo absoluto, sin embargo, no es estadísticamente diferente. Una respuesta similar, se observó en el grupo con SNOD estimulado con eCG (Gráfica 7).

El grupo de animales con SNOD y estimulados con ambas gonadotropinas mostró un número de ovocitos similar al grupo de operación simulada (Gráfica 7).



Gráfica 7. Media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados de animales testigo absoluto, inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) y sometidos a los 70 días de edad a la operación simulada derecha (OSD) o sección del nervio ovárico derecho (SNOD) estimulados con 10 UI de Gonadotropina coriónica equina (eCG) o 10UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (eCG). Prueba Kruskal-Wallis seguida de la prueba "U" de Mann-Whitney.

Peso relativo de órganos

Los animales tratados con Vh y sección del nervio ovárico derecho, que fueron estimulados con una o ambas gonadotropinas, no mostraron diferencias significativas en su masa ovárica, adrenal ni en el peso uterino (Cuadro 3).

Cuadro 3. Media \pm e.e.m. de la masa ovárica, adrenal y útero (mg/100 g pc) de animales inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) y sometidos a los 70 días de edad a la operación simulada derecha (OSD) o sección del nervio ovárico derecho (SNOD) y estimulados con 10 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) o 10 UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG).

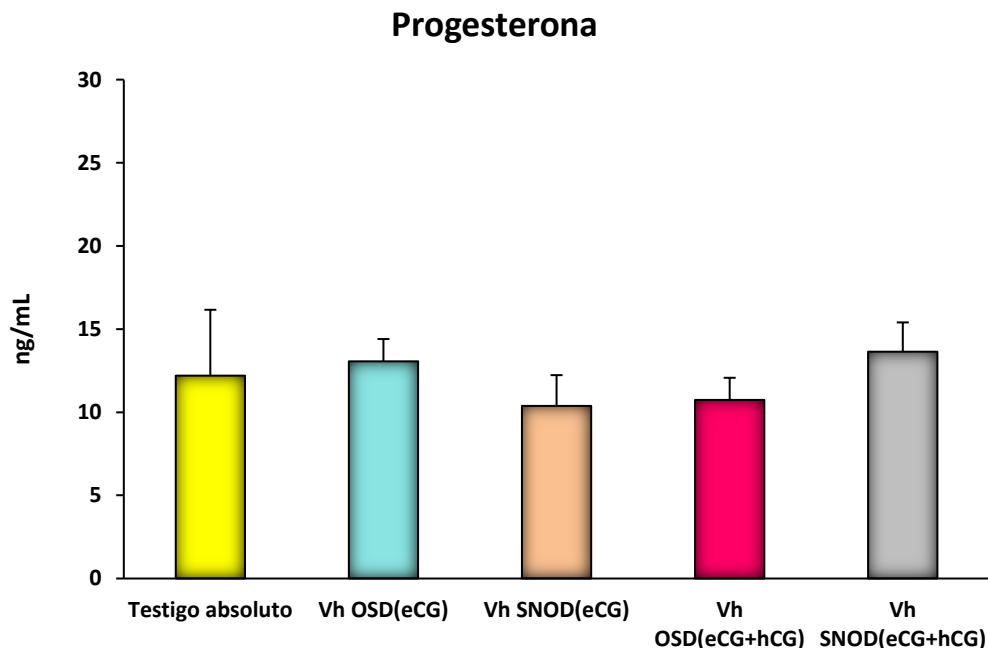
PESOS RELATIVOS DE LOS ÓRGANOS			
Grupo	Masa ovárica	Peso uterino	Masa adrenal
Testigo Absoluto	29.36 \pm 1.94	151.1 \pm 9.77	26.72 \pm 1.05
Vh OSD (eCG)	31.23 \pm 0.77	148.92 \pm 7.32	27.34 \pm 2.99
Vh SNOD (eCG)	31.55 \pm 1.73	163.49 \pm 6.45	29.79 \pm 1.97
Vh OSD (eCG+hCG)	34.61 \pm 1.54	164.38 \pm 6.91	27.49 \pm 1.56
Vh SNOD (eCG+hCG)	31.37 \pm 2.6	157.92 \pm 12.13	31.51 \pm 2.06

Prueba de ANDEVA.

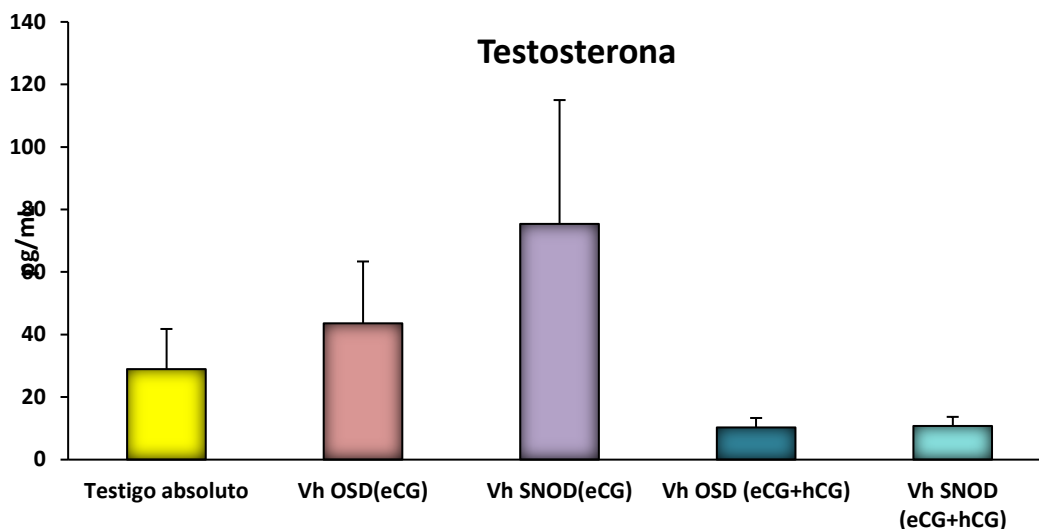
Concentración de las hormonas esteroides

En el grupo con sección del NOS derecho, estimulado con una o ambas gonadotropinas, la concentración sérica de P₄ fue similar a la de los animales con OS o testigo absoluto (Gráfica 8).

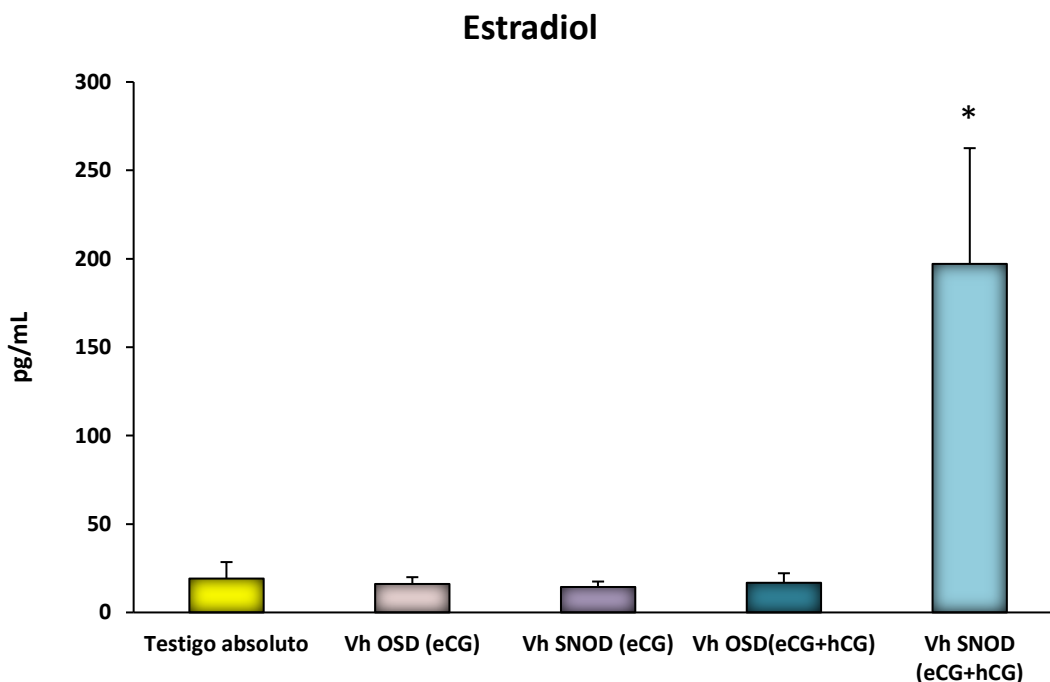
La concentración sérica de testosterona tendió a aumentar en el grupo con SNOD (eCG), respecto a su grupo control, sin llegar a ser estadísticamente diferente. En las hembras con operación simulada o sección del NOS derecho, y estimuladas con ambas gonadotropinas, la concentración sérica de testosterona no se modificó (Gráfica 9). Por otro lado, la concentración sérica de estradiol aumentó en el grupo con SNOD (eCG+ hCG), respecto al grupo con SNOD estimulado con eCG y al grupo con OSD estimulado con ambas gonadotropinas (Gráfica 10).



Gráfica 8. Media + e.e.m de la concentración sérica de progesterona (ng/ mL) de animales testigo absoluto, inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) y sometidos a los 70 días de edad a la operación simulada derecha (OSD) o sección del nervio ovárico derecho (SNOD) y estimulados con 10 UI de Gonadotropina coriónica equina (eCG) o 10UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). Prueba ANDEVA seguida por la prueba de Tukey-Kramer.



Gráfica 9. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de testosterona (pg/ mL) de animales testigo absoluto, inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) y sometidos a los 70 días de edad a la operación simulada derecha (OSD) o sección del nervio ovárico derecho (SNOD) y estimulados con 10 UI de Gonadotropina coriónica equina (eCG) o 10UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). Prueba ANDEVA seguida por prueba de Tukey-Kramer.



Gráfica 10. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de estradiol (pg/ mL) de animales testigo absoluto, inyectados a los 10 días de edad con vehículo (Vh) y sometidos a los 70 días de edad a la operación simulada derecha (OSD) o sección del nervio ovárico derecho (SNOD) y estimulados con 10 UI de Gonadotropina coriónica equina (eCG) o 10UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). * $p < 0.01$ vs. Vh SNOD (eCG) y $p < 0.05$ Vh OSD (eCG+hCG). Prueba ANDEVA seguida por prueba de Tukey-Kramer.

Morfología ovárica

En el grupo con Vh OSD (eCG), en ambos ovarios, se observó la presencia de folículos en desarrollo (Figura 10 A y B), así como cuerpos lúteos por parte del ovario derecho (Figura 10 B). Cuando se realizó la SNOD, la histología fue similar a la del grupo control (Figura 10 C y D).

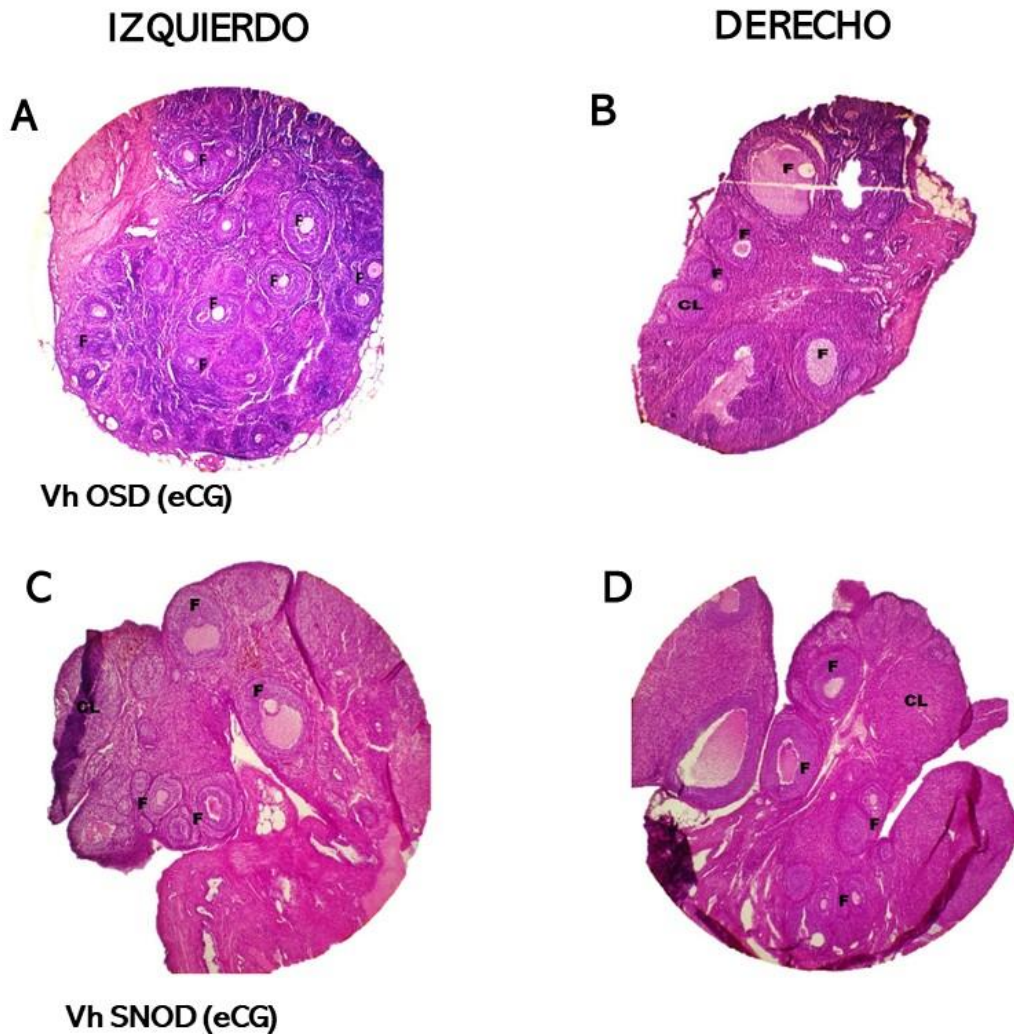


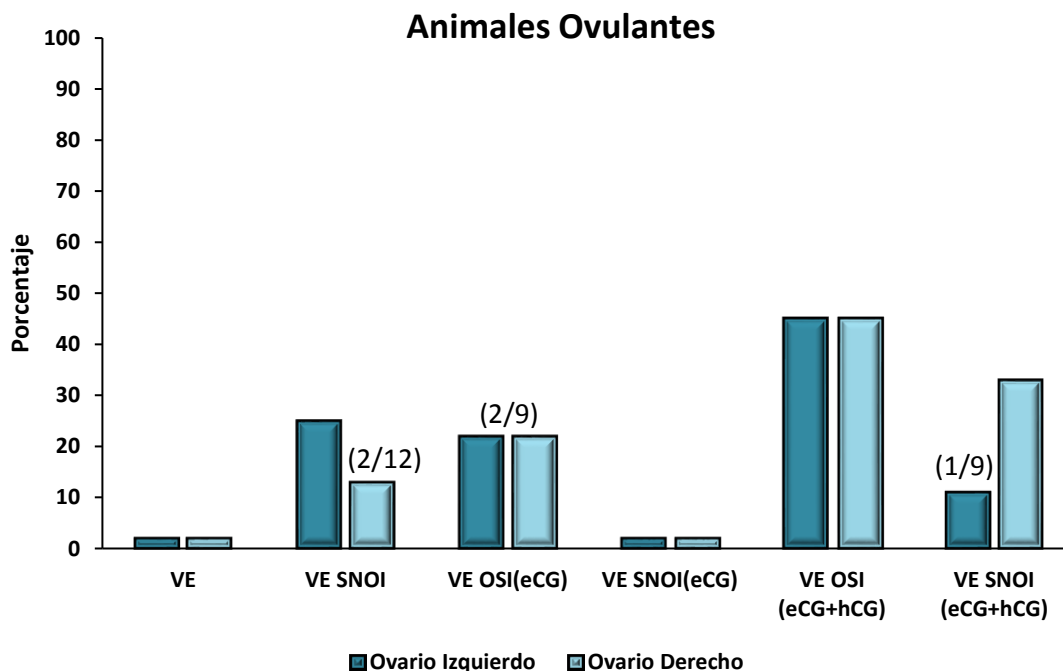
Figura 10. Fotomicrografía a un aumento de 10x de ovario de rata inyectadas a los 10 días de edad con Vehículo (Vh) y sometidos a los 70 días de edad a la operación simulada derecha (OSD) o sección del nervio ovárico derecho (SNOD) y estimulados con 10 UI Gonadotropina coriónica equina (eCG). Vh OSD (eCG) (A y B) y Vh SNOD (eCG) (C y D) teñidos con hematoxilina-eosina, donde F: folículos en desarrollo; CL: cuerpos lúteos.

Animal con VE y sección del NOS izquierdo estimulado con eCG o eCG+ hCG

Respuesta ovulatoria

En los animales tratados con VE se bloqueó la ovulación, y cuando se realizó la sección del NOS izquierdo ovuló el 25% de los animales. En el grupo con OSI (eCG) solo 2 de 9 animales lograron ovular, mientras que, en el grupo con SNOI más (eCG) se mantuvo el bloqueo de la ovulación (Gráfica 11).

En el grupo con OSI (eCG+hCG) el porcentaje de animales ovulantes fue del 45% para ambos ovarios, mientras que, cuando se realizó la sección del nervio izquierdo sólo un animal ovuló por el ovario denervado y tres por el ovario innervado (Gráfica 11).

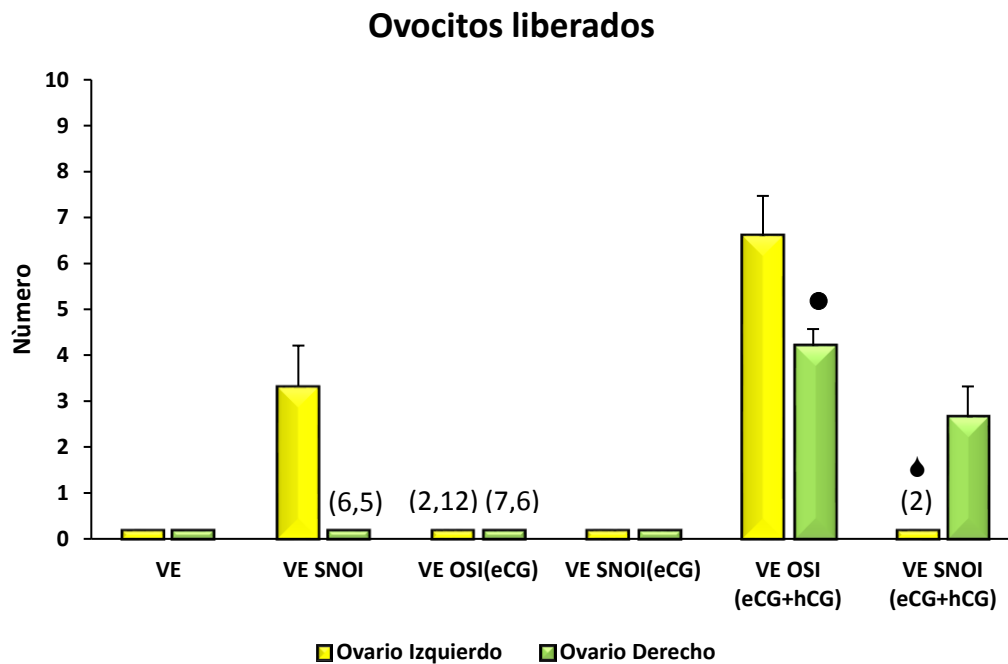


Gráfica 11. Porcentaje de animales ovulantes de hembras inyectadas a los 10 días de edad con valerato de estradiol (VE) y sometidas a los 70 días de edad a la operación simulada izquierda (OSI) o sección del nervio ovárico izquierdo (SNOI) y estimuladas con 10 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) o 10UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). Entre paréntesis se muestra el número de animales ovulantes. Prueba exacta de Fisher.

Número de Ovocitos

El ovario izquierdo de los animales con VE y SNOI liberó un mayor número de ovocitos respecto al grupo con VE, sin ser estadísticamente diferente. Los animales con SNOI no mostraron respuesta ante el estímulo con eCG (Gráfica 12).

Los animales con OSI (eCG+hCG) ovularon por ambos ovarios, y es el ovario izquierdo el que libera un mayor número de ovocitos. En este grupo aumentó significativamente el número de ovocitos liberados, respecto al grupo con OSI (eCG). Cuando se realizó la SNOI y se estimuló con ambas gonadotropinas, solo un animal liberó dos ovocitos por parte del ovario denervado; esta respuesta fue mucho menor que la observada en el grupo de OSI (eCG+hCG) (Gráfica 12).



Gráfica 12. Media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados de animales inyectados a los 10 días de edad con Valerato de estradiol (VE) y sometidos a los 70 días de edad a la operación simulada izquierda (OSI) o sección del nervio ovárico izquierdo (SNOI) estimulados con 10 UI de Gonadotropina coriónica equina (eCG) o 10UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (eCG). ● $p < 0.001$ vs. VE OSI (eCG); ▲ $p < 0.05$ vs. Ovario izquierdo de VE OSI (eCG+hCG). Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn.

Peso relativo de órganos

El grupo con VE y sección del nervio ovárico izquierdo y estimulado con una o ambas gonadotropinas, no se observó diferencias significativas en la masa ovárica, adrenal y peso del útero (Cuadro 4).

Cuadro 4. Media \pm e.e.m. de la masa ovárica, adrenal y útero (mg/100 g pc) de animales inyectados a los 10 días de edad con valerato de estradiol (VE) sometidos a los 70 días de edad a la operación simulada izquierda (OSI) o sección del nervio ovárico izquierdo (SNOI) y estimulados con 10 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) o 10 UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG).

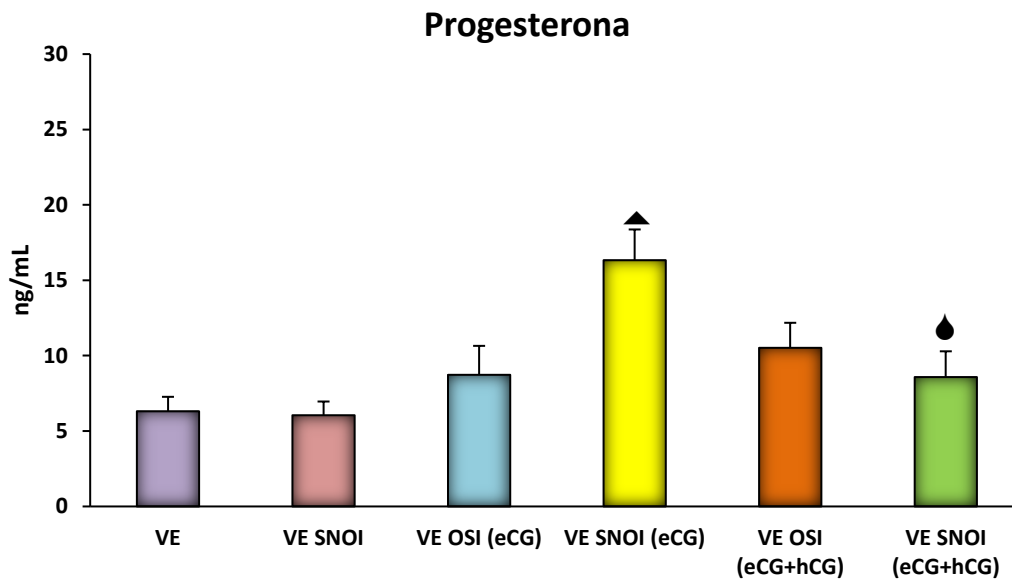
PESOS RELATIVOS DE LOS ÓRGANOS			
Grupo	Masa ovárica	Peso uterino	Masa adrenal
VE	19.81 \pm 2.94	129.08 \pm 10.72	26.23 \pm 1.34
VE SNOI	27.98 \pm 2.66	136.09 \pm 9.69	27.03 \pm 1.02
VE OSI (eCG)	25.5 \pm 2.22	134.44 \pm 8.16	27.65 \pm 3.23
VE SNOI (eCG)	21.93 \pm 2.27	139.5 \pm 5.41	27.6 \pm 1.04
VE OSI (eCG+hCG)	29.08 \pm 3.67	124.84 \pm 7.09	25.69 \pm 1.25
VE SNOI (eCG+hCG)	29.69 \pm 3.3	127.89 \pm 12.12	27.17 \pm 1.12

Concentración de las hormonas esteroides

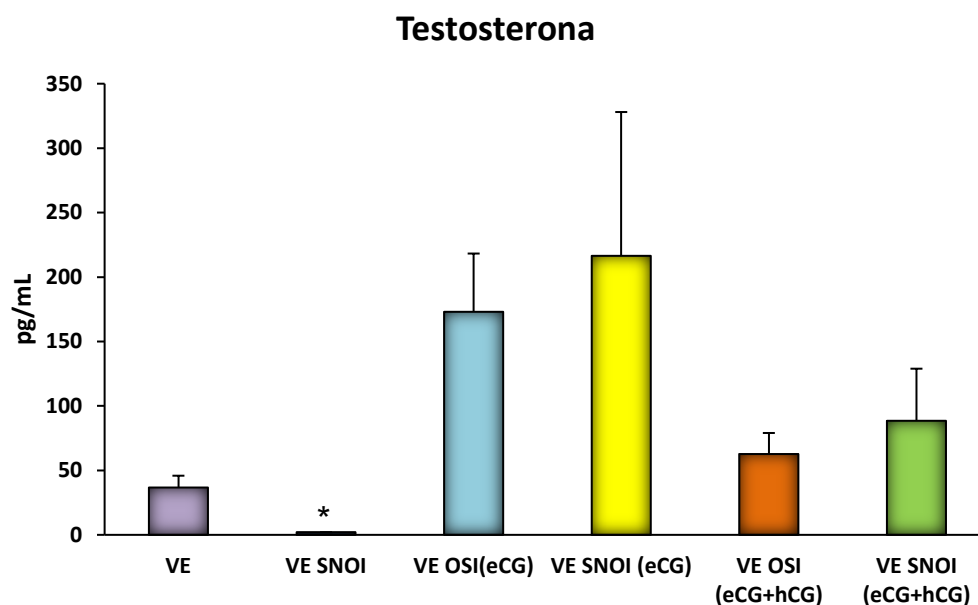
En los animales con SNOI (eCG) la concentración sérica de progesterona aumentó, respecto a los grupos con SNOI o con OSI (eCG). Cuando se realizó la SNOI y se estimuló con ambas gonadotropinas, la concentración sérica de progesterona fue menor respecto al grupo con SNOI (eCG) (Gráfica 13).

Los animales inyectados con VE tienen una concentración más alta de T, que un animal sin VE. La concentración sérica de testosterona en el animal con SNOI se encontró por debajo de la sensibilidad del método. Cuando se realizó la sección del NOS izquierdo más eCG, la concentración de testosterona tendió a incrementar respecto al grupo con OSI (eCG), sin embargo, no llegó a ser estadísticamente diferente. Cuando se realizó la estimulación con ambas gonadotropinas, no se modificó la concentración de la hormona (Gráfica 14).

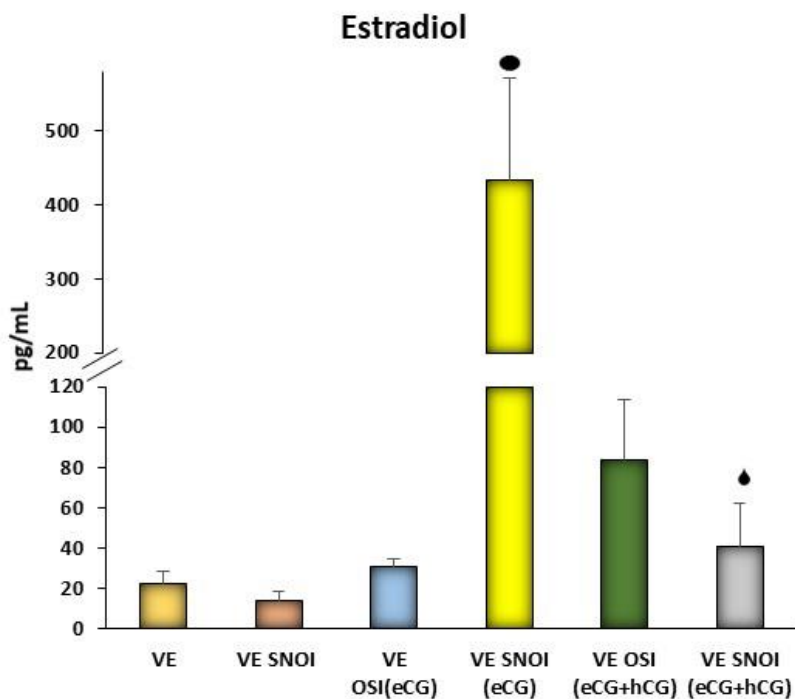
La concentración sérica de estradiol fue mayor en el grupo con SNOI (eCG), respecto al grupo con SNOI o con OSI (eCG). En el grupo con SNOI estimulado con ambas gonadotropinas, la concentración sérica de estradiol disminuyó, respecto al grupo con SNOI (eCG) (Gráfica 15).



Gráfica 13. Media \pm e.e.em. de la concentración sérica de progesterona (ng/ mL), de animales inyectados a los 10 días de edad con valerato (VE) y sometidos a los 70 días de edad a la operación simulada izquierda (OSI) o sección del nervio ovárico izquierdo (SNOI) y estimulados con 10 UI de Gonadotropina coriónica equina (eCG) o 10UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). ▲ p<0.05 vs. VE OSI (eCG); ◆ p<0.05 vs. VE SNOI (eCG). Prueba de ANDEVA seguida por prueba de Tukey-Kramer.



Gráfica 14. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de testosterona (pg/ mL) de animales inyectados a los 10 días de edad con valerato (VE) y sometidos a los 70 días de edad a la operación simulada izquierda (OSI) o sección del nervio ovárico izquierdo (SNOI) y estimulados con 10 UI de Gonadotropina coriónica equina (eCG) o 10UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). * $p < 0.0027$ vs.VE. Prueba de ANDEVA seguida por prueba de Tukey-Kramer.



Gráfica 15. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de estradiol (pg/ mL) de animales inyectados a los 10 días de edad con valerato (VE) y sometidos a los 70 días de edad a la operación simulada izquierda (OSI) o sección del nervio ovárico izquierdo (SNOI) y estimulados con 10 UI de Gonadotropina coriónica equina (eCG) o 10UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). ● $p < 0.001$ vs. VE SNOI y VE OSI (eCG); ◆ $p < 0.001$ vs. VE SNOI (eCG). Prueba de ANDEVA seguida por prueba de Tukey-Kramer.

Morfología ovárica

En los grupos con VE SNOI estimulados con una (Figura 11 A y B) o ambas gonadotropinas (Figura 11 C y D), se observó la presencia de folículos en desarrollo y quistes por ambos ovarios.

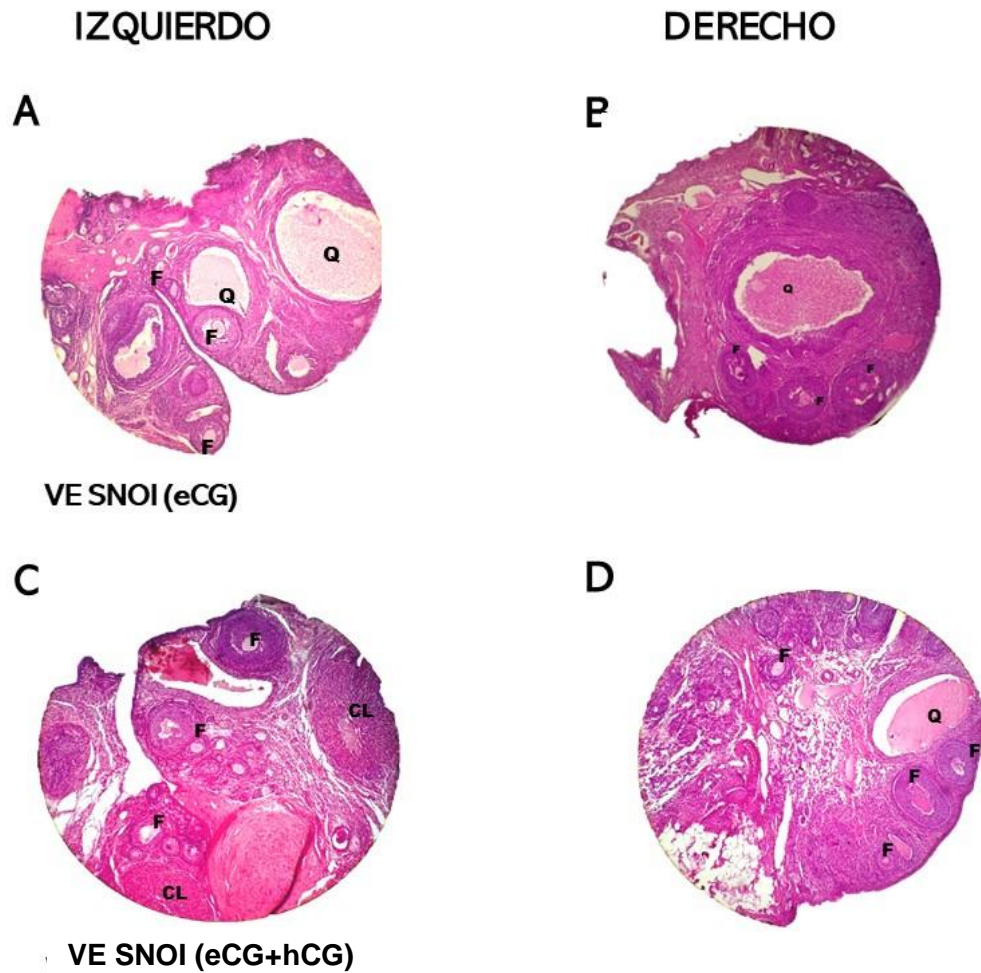


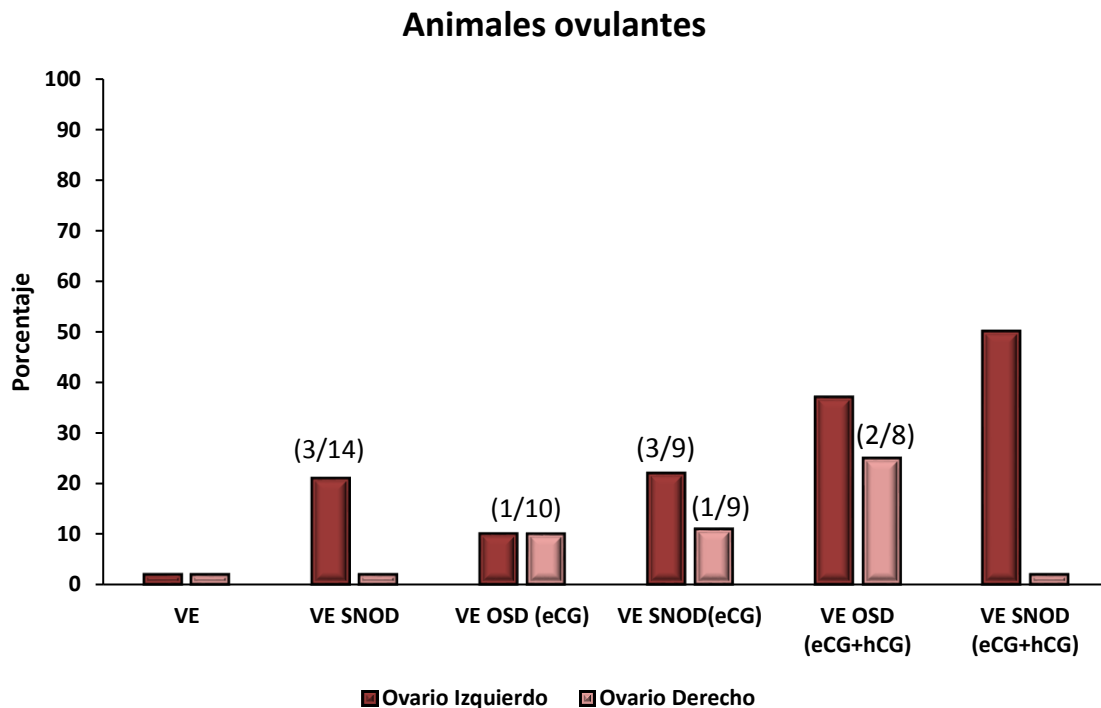
Figura 11. Fotomicrografía a un aumento de 10x de ovario de rata inyectadas a los 10 días de edad con Valerato de estradiol (VE) y sometidas a los 70 días de edad a la sección del nervio ovárico izquierdo y estimuladas con 10 UI de Gonadotropina coriónica equina (eCG) o 10 UI de eCG + 8UI de Gonadotropina Coriónica humana (hCG). VE SNOI (eCG) (A y B) y VE SNOI (eCG+ hCG) (C y D) teñidos con hematoxilina-eosina, donde F: folículos en desarrollo; CL: cuerpos lúteos.

Animal con VE y sección del NOS derecho estimulado con eCG o eCG+hCG

Respuesta ovulatoria

En el grupo con VE SNOD, solo tres de 14 animales ovularon por parte del ovario inervado, y el ovario denervado no mostró respuesta. De los animales con operación simulada y estimulados con eCG, solo un animal ovuló. Mientras que, en el grupo con VE SNOD (eCG) el 33% de los animales ovuló (Gráfica 16).

En las hembras con sección del nervio ovárico derecho y estimuladas con las dos gonadotropinas, el 50% ovuló por el ovario intacto, mientras que la gónada denervada no respondió (Gráfica 16).



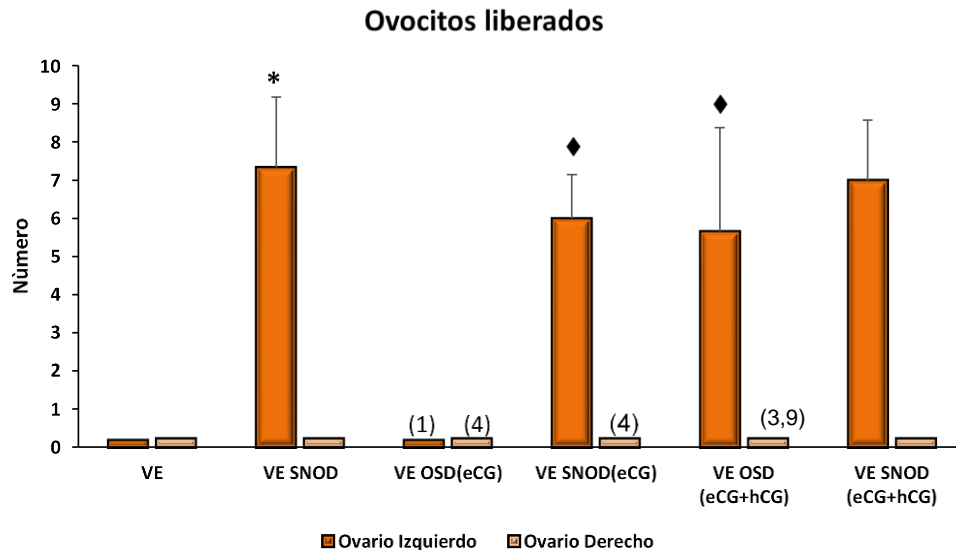
Gráfica 16. Porcentaje de animales ovulantes de hembras inyectadas a los 10 días de edad con Valerato de estradiol (VE) y sometidas a los 70 días de edad a la operación simulada derecha (OSD) o sección del nervio ovárico derecho (SNOD) y estimuladas con 10 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) o 10UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). Entre paréntesis se muestra el número de animales ovulantes. Prueba exacta de Fisher.

Número de Ovocitos

En el ovario inervado de los animales con sección del NOS derecho, incrementó el número de ovocitos liberados, comparado con el grupo con VE, y el número de ovocitos liberados fue similar a los liberados por animales intactos (7.33 ± 1.85 vs. 6.66 ± 0.55 respectivamente), mientras que, el ovario denervado no ovuló. En el grupo con OSD y estimulado con eCG, el animal que logró ovular lo hizo con un ovocito por parte del ovario izquierdo y 4 por el ovario derecho.

El ovario inervado del grupo con SNOD (eCG) incrementó el número de ovocitos liberados, comparado con el grupo de OSD (eCG), mientras que, por el ovario denervado solo responde un animal con 4 ovocitos.

El ovario izquierdo, de las hembras con OSD estimuladas con ambas gonadotropinas, aumentó el número de ovocitos liberados respecto a las hembras con OSD estimuladas con eCG, mientras que, el ovario derecho de las hembras con



OSD y estimuladas con ambas gonadotropinas, los dos animales que ovularon liberaron 3 y 9 ovocitos, respectivamente. En las hembras con SNOD estimuladas con eCG+hCG solo responde el ovario inervado (Gráfica 17).

*Gráfica 17. Media \pm eem del número de ovocitos liberados de animales inyectados a los 10 días de edad con Valerato de estradiol (VE) y sometidos a los 70 días de edad a la operación simulada derecha (OSD) o sección del nervio ovárico derecho (SNOD) estimulados con 10 UI de Gonadotropina coriónica equina (eCG) o 10UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (eCG). * $p < 0.005$ vs. VE; ♦ $p < 0.05$ vs. VE OSD (eCG). Entre paréntesis se muestra el número de ovocitos liberados por animal. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn.*

Peso relativo de órganos

Los animales con SNOD y estimulados con eCG+hCG mostraron un aumento en su masa ovárica, comparado con su grupo con OSD o con SNOD estimulado con eCG. El peso uterino de los animales con VE SNOD (eCG) aumentó respecto a los siguientes grupos: VE SNOD, VE OSD (eCG) y VE SNOD (eCG+hCG). La masa adrenal no se vio modificada (Cuadro 5).

Cuadro 5. Media \pm e.e.m. de la masa ovárica, adrenal y útero (mg/100 g pc) de animales inyectados a los 10 días de edad con Valerato de estradiol (VE) sometidos a los 70 días de edad a la operación simulada derecha (OSD) o sección del nervio ovárico derecho (SNOD) y estimulados con 10 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) o 10 UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG).

PESOS RELATIVOS DE LOS ÓRGANOS			
Grupo	Masa ovárica	Peso uterino	Masa adrenal
VE	19.81 \pm 2.94	129.08 \pm 10.72	26.23 \pm 1.34
VE SNOD	26.78 \pm 2.1	140.75 \pm 11.5	24.82 \pm 1.0
VE OSD (eCG)	24.42 \pm 2.44	115.76 \pm 10.33	22.73 \pm 1.05
VE SNOD (eCG)	27.25 \pm 1.91	150.85 \pm 5.81 \blacklozenge	32.0 \pm 1.47
VE OSD (eCG+hCG)	28.03 \pm 2.04	115.12 \pm 6.94	22.46 \pm 1.84
VE SNOD (eCG+hCG)	51.27 \pm 3.26 \blacktriangle *	128.1 \pm 8.06*	23.22 \pm 1.49

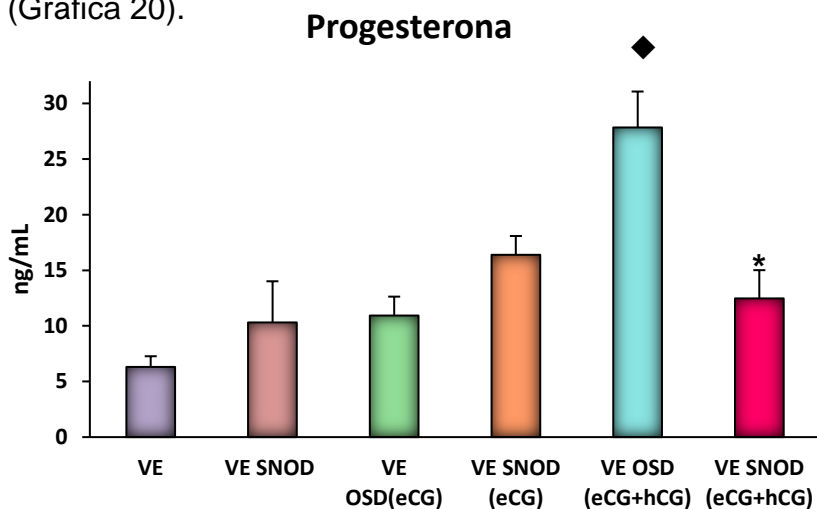
\blacktriangle $p < 0.001$ vs. VE OSD (eCG+hCG); * $p < 0.001$ vs. VE SNOD (eCG); \blacklozenge $p < 0.001$ vs. VE OSD (eCG); \bullet $p < 0.01$ VE SNOD. Prueba de ANDEVA seguida de Tukey-Kramer.

Concentración de las hormonas esteroides

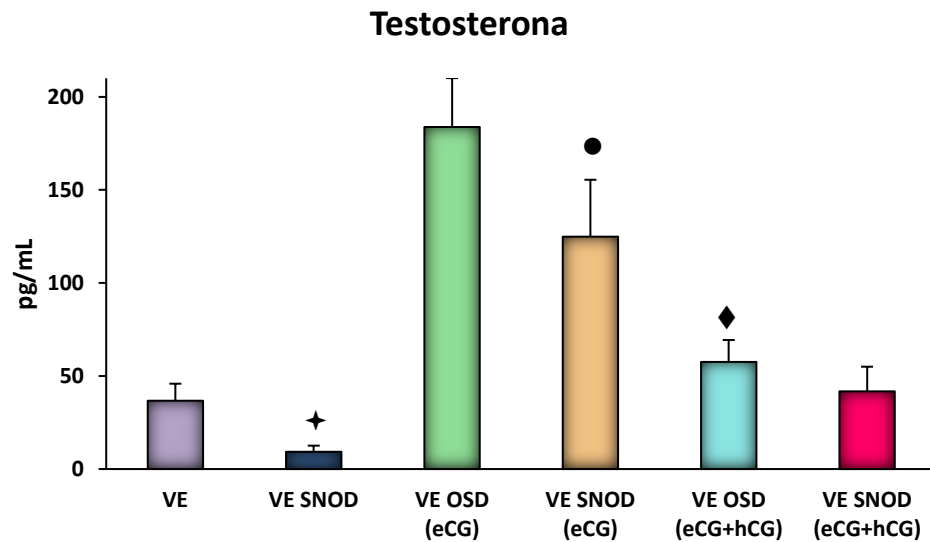
En los animales inyectados con VE y con operación simulada o sección del NOS derecho estimulados con eCG, la concentración sérica de progesterona no se modificó. En el grupo con OSD (eCG+hCG), la concentración fue mayor que el grupo con OSD (eCG). En los animales con SNOD estimulados con ambas gonadotropinas la concentración sérica de progesterona fue menor, respecto al grupo con OSD (eCG+hCG) (Gráfica 18).

La concentración sérica de testosterona disminuyó cuando se realizó la sección del NOS derecho, respecto al grupo con VE. Se observó un incremento en el grupo con SNOD estimulado con eCG, respecto al grupo con SNOD. Cuando se realizó la OSD (eCG+hCG), la concentración de testosterona disminuyó respecto al grupo con OSD (eCG) (Gráfica 19).

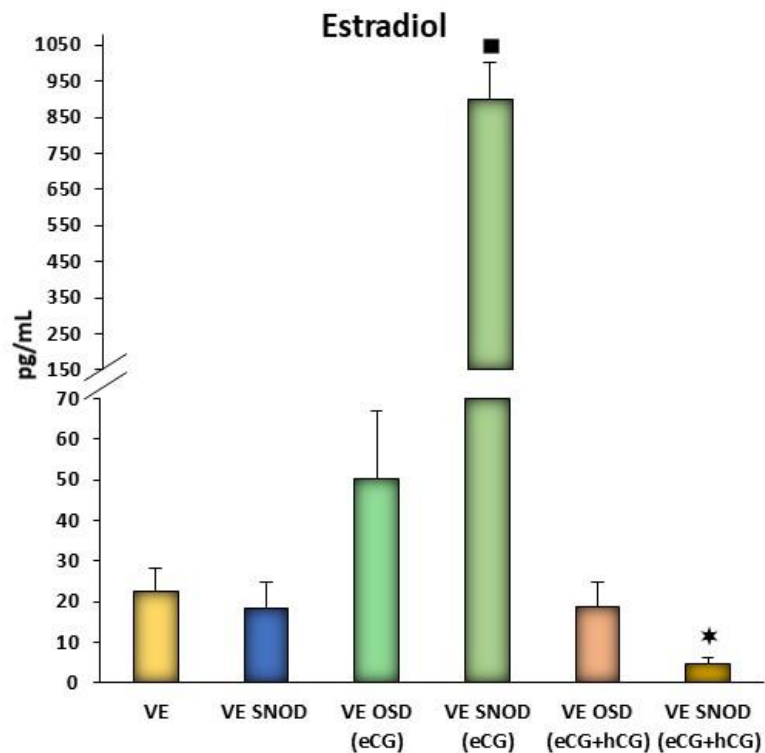
En el grupo con SNOD estimulado con eCG, la concentración sérica de estradiol, aumentó respecto a los grupos con SNOD o con OSD estimulado con eCG. Cuando se realizó la SNOD y se estimuló con ambas gonadotropinas la concentración sérica de estradiol disminuyó drásticamente respecto al grupo con SNOD (eCG) (Gráfica 20).



Gráfica 18. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de progesterona (ng/ mL) de animales inyectados a los 10 días de edad con Valerato de estradiol (VE) y sometidos a los 70 días de edad a la operación simulada derecha (OSD) o sección del nervio ovárico derecho (SNOD) y estimulados con 10 UI de Gonadotropina coriónica equina (eCG) o 10UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). \blacklozenge $p < 0.01$ vs. VE OSD (eCG); * $p < 0.01$ vs. VE OSD (eCG+hCG). Prueba de ANDEVA seguida por prueba de Tukey-Kramer.



Gráfica 19. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de testosterona (pg/ mL) de animales inyectados a los 10 días de edad con valerato (VE) y sometidos a los 70 días de edad a la operación simulada derecha (OSD) o sección del nervio ovárico derecho (SNOD) y estimulados con 10 UI de Gonadotropina coriónica equina (eCG) o 10UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). ✦ $p < 0.140$ vs. VE; ● $p < 0.05$ vs. VE SNOD; ◆ $p < 0.001$ vs. VE OSD (eCG). Prueba de ANDEVA seguida por prueba de Tukey-Kramer.

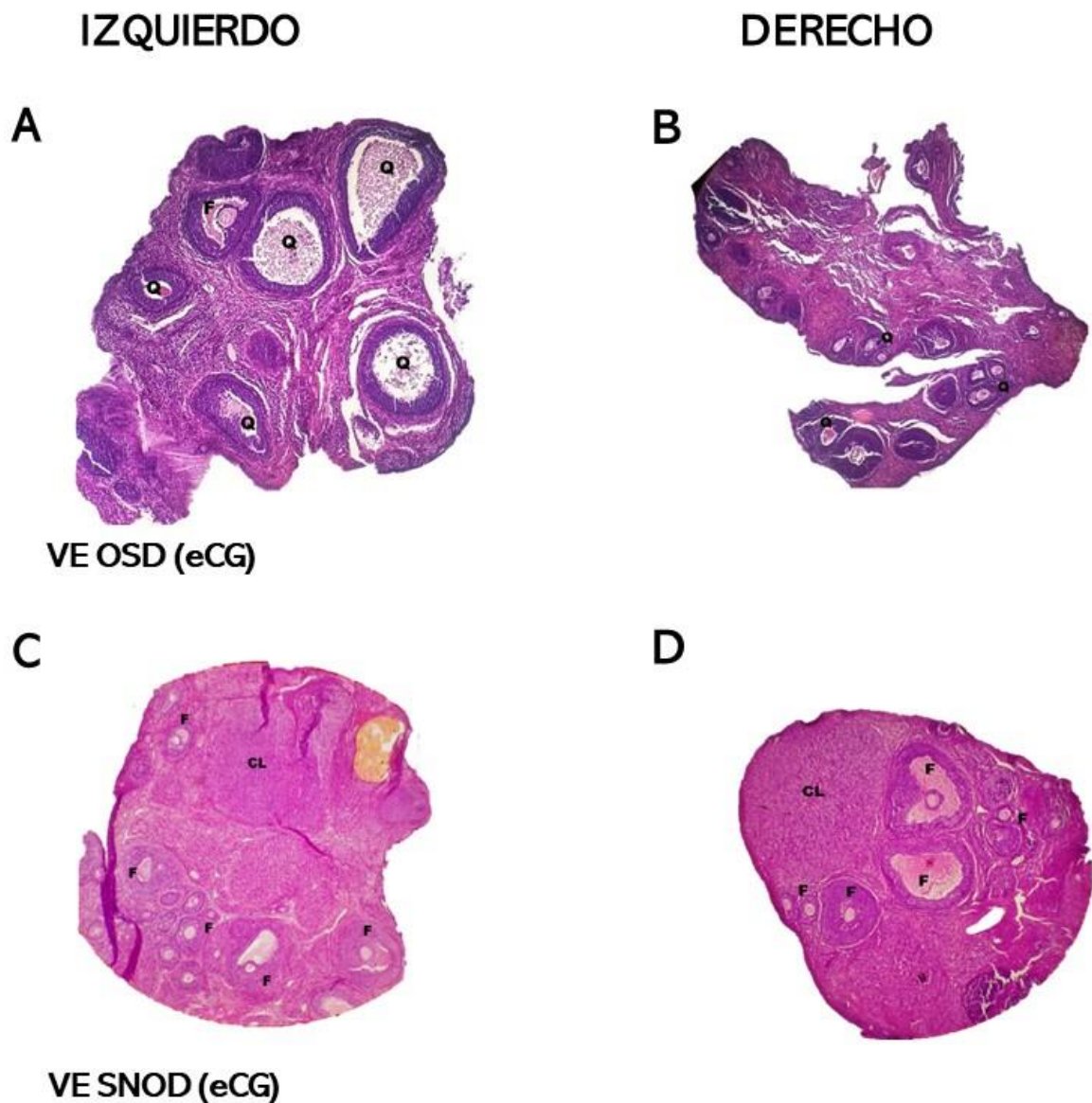


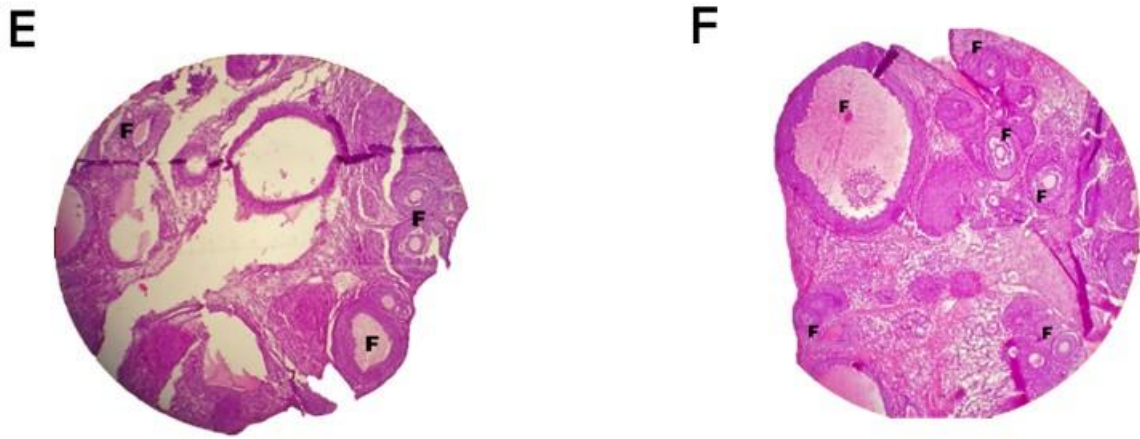
Gráfica 20. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de estradiol (pg/ mL) de animales inyectados a los 10 días de edad con valerato (VE) y sometidos a los 70 días de edad a la operación simulada derecha (OSD) o sección del nervio ovárico derecho (SNOD) y estimulados con 10 UI de Gonadotropina coriónica equina (eCG) o 10UI de eCG más 8UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). ■ $p < 0.001$ vs. VE OSD (eCG) y VE SNOD; * $p < 0.001$ vs. VE SNOD (eCG). Prueba de ANDEVA seguida por prueba de Tukey-Kramer.

Morfología ovárica

En el grupo con VE OSD (eCG) se observaron varios quistes foliculares, en ambos ovarios (Figura 12 A y B). En el grupo con VE SNOD (eCG), el ovario inervado (Izquierdo) y el denervado (derecho), mostraron la presencia de varios folículos en desarrollo, así como la presencia de cuerpos lúteos (Figura 12C, D).

En el grupo con VE SNOD (eCG+hCG), el ovario inervado (izquierdo) y el ovario denervado (derecho) presentaron varios folículos en desarrollo (Figura 12 E y F).





VE SNOD (eCG+hCG)

Figura 12. Fotomicrografía a un aumento de 10x de ovarios de rata inyectadas a los 10 días de edad con Valerato de estradiol (VE) y sometidas a los 70 días de edad a la operación simulada derecha (OSD) o sección del nervio ovárico derecho (SNOD) y estimulados con 10 UI de Gonadotropina coriónica equina (eCG) o 10 UI de eCG+ 8UI de Gonadotropina coriónica humana (hCG). VE OSD (eCG) (A y B), VE SNOD (eCG) (C y D) y VE SNOD (eCG+hCG) (E y F) teñidos con hematoxilina-eosina, donde F: folículos en desarrollo; CL: cuerpos lúteos.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que en el animal cíclico o con el SOPQ, la inervación simpática, aportada por el NOS, modula la respuesta del folículo a las gonadotropinas

ANIMAL CÍCLICO

En el animal cíclico con sección unilateral del NOS, la respuesta ovulatoria por ambos ovarios fue semejante ante el estímulo gonadotrópico.

La sección unilateral del NOS, en ratas prepúberes (Morán y col., 2000; Morales-Ledesma y col., 1993; Morales-Ledesma y col., 2015) o adultas (Chávez y Domínguez, 1994), resulta en la disminución en el número de ovocitos liberados por parte del ovario denervado, y un aumento por parte del ovario inervado; resultados que permiten sugerir que la inervación aportada por el NOS, modula la ovulación de forma estimulante y asimétrica. Ferruz y colaboradores (1991) postulan que, en el animal con sección del NOS, el incremento del tono simpático en el ovario inervado puede dar como resultado el aumento en la cantidad de ovocitos liberados.

Evidencias experimentales muestran que la función de la inervación simpática es modulada por la inervación sensorial. Cuando se realiza la destrucción permanente de las fibras sensoriales, por la administración de capsaicina, y los animales son sometidos a la sección unilateral del NOS, no se presenta asimetría en la respuesta ovulatoria. Resultados que llevaron a sugerir a los autores que la inervación simpática regula la ovulación y que las fibras sensoriales modulan la acción de la inervación simpática en el ovario (Morales-Ledesma y col., 2015). Efectos semejantes se observan en el presente estudio, cuando los animales tratados con Vh son sometidos a la sección del NOS. Por lo que, sugerimos que en los animales denervados, la gónada intacta incrementa su capacidad ovulatoria en respuesta a la integridad de la inervación sensorial.

Morán y colaboradores (2000), muestran que en la rata de 16 días de edad sometida a la sección del NOS derecho, y sacrificada 16 días después de la cirugía, disminuye el número total de folículos por el ovario derecho y aumenta la cantidad de folículos por parte del ovario izquierdo. Por otro lado, cuando se realiza la sección del NOS izquierdo y los animales son sacrificados 12 días después de la cirugía, aumenta significativamente el número de folículos en ambos ovarios. Por ello, los autores sugieren que la inervación simpática del ovario, que llega a través del NOS, tiene un papel modulador en la regulación de la diferenciación y crecimiento folicular. Esto sugiere que los efectos de la sección unilateral del NOS dependen del nervio seccionado, por lo que, cada ovario está regulado de manera diferente por la información que llega por NOS (Morales-Ledesma y col., 2015).

Se ha reportado que la respuesta ovulatoria es asimétrica en los animales sometidos a la sección unilateral del NOS, efecto que no se observó en el presente estudio; cuando los animales con sección del NOS izquierdo o derecho son estimulados con una o ambas gonadotropinas. Lo que permite sugerir que las gonadotropinas podrían regular de manera independiente la respuesta ovulatoria. El hecho de que nosotros no encontremos una respuesta asimétrica, pudiera deberse al tiempo que transcurre entre la cirugía y la autopsia.

El hecho de que con la sección unilateral del NOS disminuya la capacidad ovulatoria por el ovario denervado, llevó a sugerir que la información neural que transcurre por dicho nervio estimula la respuesta del folículo a las gonadotropinas (Morales y col., 1993).

Esta idea se vio reforzada por el hecho de que en la rata peripúber (32 días), 4 días después de la sección unilateral del NOS, el estímulo gonadotrópico con PMSG o PMSG seguida de hCG no fue capaz de restablecer la respuesta ovulatoria por parte del ovario denervado. Lo que permitió plantear que la información neural que viaja por el NOS regula de manera estimulante la respuesta de folículo a las gonadotropinas (Morales y col., 1998).

Cuando en ratas adultas cíclicas se realiza la denervación noradrenérgica, por la inyección de guanetidina (GTD) durante un mes, resulta en un menor número de ovocitos liberados, mientras que este tratamiento en la rata recién nacida resulta en una mayor cantidad de ovocitos liberados. Resultados que permitieron proponer que en la rata adulta la inervación noradrenérgica ovárica modula de manera estimulante el crecimiento folicular y la ovulación, mientras que, en la rata púber la regulación que ejerce es de tipo inhibitoria (Flores y col., 1990).

Contrario a lo reportado anteriormente, en el presente estudio observamos que en los animales con sección del NOS izquierdo o derecho, tanto el ovario innervado como el denervado respondieron de igual manera al estímulo con eCG o con eCG más hCG. La diferencia entre nuestros resultados y los de Morales y colaboradores (1993), Chávez y Domínguez (1994), Morales y colaboradores (1998), Morán y colaboradores (2000) y Morales-Ledesma colaboradores (2015) puede ser atribuida a que la regulación del ovario por la inervación simpática, depende de la edad del animal en el que se lleva a cabo la denervación, o del tiempo transcurrido entre la denervación y la estimulación.

En el presente estudio la denervación se realizó en un animal adulto joven de 60 días de edad y el tiempo que transcurrió entre la cirugía y la estimulación gonadotrópica fue de 10 días, mientras que, en los trabajos mencionados anteriormente, la denervación se realizó en animales prepúber (16 o 32 días) y la estimulación se realizó cuatro días después.

Zhang y colaboradores (2010) sugirieron que la participación de la inervación simpática en la regulación de la ovulación varía con la edad del animal. Ellos proponen que la integridad del NOS es fundamental para que se lleve a cabo la respuesta ovulatoria ante un estímulo gonadotrópico antes de la pubertad, pero no es necesaria en la edad adulta. Esto basado en el hecho de que, en los animales con sección bilateral del NOS a los dos días de vida, muestran un menor número de ovocitos liberados cuando los animales tienen 30 días de edad, pese a que se estimularon con ambas gonadotropinas 16 horas antes del sacrificio. Por otra parte, en los animales sacrificados a los 90 días de edad, la sección no modificó el número

de cuerpos lúteos, lo que indica que no hay cambios en la ovulación.

Lo anterior es apoyado en el presente estudio, ya que en el animal adulto sometido a la sección unilateral del NOS, la respuesta al estímulo gonadotrópico fue igual por ambos ovarios, estos animales fueron sacrificados en la edad adulta (70 días), donde la inervación simpática no es necesaria para la regulación ovulatoria, según lo reportado por Zhang y colaboradores (2010).

Espinoza y colaboradores (2018) observaron que la morfología de los ovarios de ratas denervadas con GTD a los 7, 14 o 70 días de edad, durante 21 días consecutivos, mostraron varios folículos primarios y secundarios, así como numerosos cuerpos lúteos, lo cual indica que, la denervación con GTD no modifica el desarrollo folicular ni la ovulación respecto a los animales testigo absoluto. En el presente estudio, en los ovarios de animales con sección unilateral del NOS, observamos varios folículos en desarrollo, así como cuerpos lúteos en todos los grupos (indicativo de ovulación). Resultados que nos llevan a sugerir que a pesar de la disminución en el aporte de NA, resultante de la sección del NOS, la ovulación se produce ya que otros factores pueden participar en el mantenimiento de esta función, respecto a esto, se ha reportado que cuando hay una disminución del sistema noradrenérgico se aumenta el sistema sensorial (Morales-Ledesma y col., 2015).

Existen varias evidencias que sugieren que la información neural que transcurre por el NOS participa en el proceso de esteroidogénesis, y que depende de la edad del animal. (Aguado y Ojeda 1984; Morales-Ledesma y col., 2012; Ramírez y col., 2020).

En ratas tratadas con Vh, la sección unilateral del NOS realizada a los 20 o 28 días de vida no modificó la secreción de P₄ (Morales-Ledesma y col., 2015). Esta respuesta es semejante a la observada en el presente estudio, donde además los animales fueron estimulados con una o ambas gonadotropinas.

Zhang y colaboradores (2010), reportaron que la sección del NOS practicada en la etapa neonatal aumenta las concentraciones séricas de estradiol, cuando las

ratas son sacrificadas a los 30 días de edad y este efecto persiste hasta los 90 días de edad. Estos resultados sugieren que el NOS funciona como un regulador en la secreción de E₂.

Esta respuesta es semejante a la obtenida en el presente estudio con el animal adulto cíclico con sección del NOS izquierdo o derecho y sometido a un estímulo gonadotrópico (hCG+ hCG). Esto podría estar dado por una respuesta mayor por parte de las células de la granulosa, ya que se encontraron varios folículos en desarrollo que no fueron ovulados.

ANIMAL CON SOPQ

Nuestros resultados muestran que en el animal adulto con SOPQ, el NOS regula de manera estimulante y asimétrica la respuesta ovulatoria ante el estímulo gonadotrópico, y que el NOS izquierdo está mayormente implicado en esta respuesta.

En ratas con SOPQ, inducido por la inyección única de VE, se ha observado adelanto de la apertura vaginal, aciclicidad estral y bloqueo de la ovulación; lo que ha sido explicado por el incremento en la actividad de las fibras simpáticas (Brawer y col., 1986; Barría y col., 1993; Rosa-e-Silva y col., 2003). Esta activación se evidencia por el aumento en el contenido de NA ovárica y disminución del número de receptores β -adrenérgicos ováricos (Barria y col., 1993).

El grupo de Rosa-E-Silva (2003) mostró que los animales con SOPQ, inducido por el VE, presentan estros vaginales continuos por más de 15 días y no ovulan. En este modelo, la sección bilateral del NOS restablece la ciclicidad estral y la ovulación. Efectos semejantes se observaron en el presente estudio después de la sección unilateral del NOS (datos no mostrado).

Previamente nuestro grupo ha sugerido que en el animal con SOPQ, la alta concentración de NA en los ovarios, no es el único factor que explica el origen de la patología y que existen otros mecanismos neurales que regulan las funciones ováricas en este modelo, ya que en el animal con SOPQ sometido a la sección unilateral del NOS, el ovario que ovula es aquel que mantiene su inervación intacta y por ende un tono simpático alto (Morales-Ledesma y col., 2010).

La eliminación del principal aporte simpático del ovario, por la sección bilateral del NOS, disminuye la concentración de NA y no modifica la respuesta ovulatoria (Aguado y Ojeda, 1984), mientras que, en el animal tratado con VE, la caída en NA se traduce en el restablecimiento de la ovulación (Rosa-e-Silva y col., 2003).

Al parecer el restablecimiento de la respuesta ovulatoria depende del período transcurrido entre la denervación y la autopsia, como ha sido mostrado por el grupo de Del Campo (2019), donde animales tratados con VE a los 24 días de edad y sometidos a la sección del NOS izquierdo a los 54 días de edad, presentan cuerpos lúteos viejos 30 días después de la denervación, mientras que, se observan cuerpos lúteos nuevos después de 60 días pos-denervación, lo que sugiere que 60 días después de la denervación hay un restablecimiento de la ovulación. Recientemente nuestro grupo ha mostrado que en animales con VE y denervados farmacológicamente con GTD, a partir de los 7, 14 o 70 días de edad, se restablece la ovulación cuando los animales son sacrificados a los 90 días de edad (Espinoza y col., 2018).

En el presente estudio, en el animal tratado con VE más la sección del NOS izquierdo ambos ovarios ovulan y lo hace en mayor medida el ovario denervado, mientras que, cuando se realiza la sección del nervio derecho únicamente responde el ovario inervado. Esta respuesta podría sugerir que el NOS izquierdo está mayormente involucrado en la respuesta ovulatoria, lo que podría deberse a que cada ovario está inervado de manera distinta, donde el ovario derecho es inervado por un mayor número de fibras (Domínguez y col., 2003).

Chávez-Genaro y Anesetti (2018), mostraron que el 50% de las ratas tratadas neonatalmente (1-5 días) con dihidrotestosterona (DHT) ovulan después del tratamiento con PMSG y llegan a ovular hasta el 80% de los animales cuando son estimuladas con ambas gonadotropinas.

Algo similar ocurre en el presente estudio, donde en los animales con VE y sección del NOS derecho, la estimulación con eCG restableció la ovulación en el 22% de los animales, y cuando se estimuló con ambas gonadotropinas se alcanzó hasta un 50% de animales ovulantes. Además, cuando se realizó la sección del NOS izquierdo y estimulamos con eCG no hubo respuesta ovulatoria; pero al realizar la estimulación con ambas gonadotropinas el porcentaje de ovulación fue del 33%, lo que nos permite sugerir que los folículos necesitaban de un estímulo exógeno de LH para que pudieran culminar con la ovulación.

En ratas tratadas con T en la etapa neonatal, al llegar a la edad adulta, los ovarios presentan folículos quísticos que se caracterizan por ser grandes, con capas de células de la granulosa irregular, células descamadas en el antro y un ovocito con alteraciones. Cuando estos animales son estimulados con una dosis de 8UI de PMSG y hCG la histología ovárica no muestra cuerpos lúteos, pero con una dosis mayor de hCG (15UI) los animales logran ovular.

Resultados que permitieron sugerir a los autores, que los andrógenos además de sus efectos directos sobre los centros hipotalámicos de liberación de GnRH, también interfieren con la respuesta normal del folículo preovulatorio a las gonadotropinas, en particular de la LH, y que la ausencia de expulsión del ovocito podría asociarse a una parcial o total desensibilización a la LH (Chávez-Genaro y Anesetti, 2018).

En el presente estudio se observó un efecto semejante, en los animales con VE y sección del NOS izquierdo y estimulados con eCG donde ningún animal logró ovular, mientras que, al estimular con ambas gonadotropinas, se observó una respuesta ovulatoria mínima por ambos ovarios. Lo que podría deberse a que los

folículos que se encuentran en desarrollo necesitan de un mayor estímulo de LH para culminar con la ovulación.

En los animales inyectados con VE y sometidos a la sección del NOS derecho y estimulación con una o ambas gonadotropinas, únicamente respondió el ovario inervado, resultados que nos permiten sugerir que el NOS izquierdo está mayormente implicado en la respuesta de los folículos a las gonadotropinas.

Chávez-Genaro y Anesetti (2018), mostraron que, en ratas inyectadas al nacimiento con T, la estimulación con ambas gonadotropinas en el día postnatal 26 resultó en el incremento de la masa ovárica. Los autores refieren que dicho incremento en la gónada podría ser explicado por el mayor número de folículos observados. En el presente estudio, también aumentó la masa ovárica en los animales sometidos a la sección del NOS derecho estimulados con ambas gonadotropinas, respecto al grupo con operación simulada derecha más eCG+hCG y SNOD más eCG. Podemos atribuir este aumento a un efecto compensatorio derivado de la sección del NOS, como se ha visto en estudios anteriores. Posiblemente este aumento también sea resultado de un mayor desarrollo folicular en respuesta al estímulo gonadotrópico, sin embargo, necesitamos de más estudios para comprobar este evento.

También se observó que en los animales inyectados con Vh y sección del NOS izquierdo y estimulados con ambas gonadotropinas el peso del útero fue mayor, comparado con un animal estimulado con una sola gonadotropina o con operación simulada. En los animales con VE y sección del NOS derecho estimulado con ambas gonadotropinas, se observó una disminución en el peso uterino respecto al grupo estimulado sólo con una gonadotropina. Esta disminución está dada por el descenso de la concentración de estradiol observado en estos animales. Los estrógenos inducen el crecimiento del epitelio y estroma endometriales, e inducen la formación de receptores a progesterona (Pérez y Romano, 1996). Los receptores a estrógenos del tipo- α inducen la formación de receptores a andrógenos en el estroma y los receptores a andrógenos amplifican la señal de los receptores a estrógenos- α , esto por inducción del factor de crecimiento insulínico (IGF-I) lo que culmina en un

crecimiento del epitelio (Weihua y col., 2002). Por lo cual, la baja concentración de estradiol en estos animales ayuda a explicar el bajo peso uterino.

Estudios realizados previamente en nuestro grupo, muestran que los ovarios de ratas tratadas con VE son pequeños y no se observa un gran desarrollo folicular ni presencia de cuerpos lúteos, algunos de los folículos muestran picnosis en las células de la granulosa, además, los ovarios de estas ratas muestran numerosos quistes, donde se observa una cavidad antral muy grande, una capa de la granulosa atenuada y una engrosada capa de células de la teca (Espinoza y col., 2018).

En el presente estudio, en los animales tratados con VE observamos una morfología ovárica semejante a la reportada anteriormente, donde predominaban los quistes con características semejantes a las descritas y sin la presencia de cuerpos lúteos debido a la ausencia de ovulación.

Del campo y colaboradores (2019), reportaron que los ovarios de animales con SOPQ inducido por la inyección de VE y sometidos a la sección del NOS izquierdo, sacrificados 30 días después de la denervación, mostraron un porcentaje alto de cuerpos lúteos pequeños (600-800 μm), así como la presencia de quistes, mientras que, cuando fueron sacrificados 60 días después de la sección, mostraron un mayor porcentaje de cuerpos lúteos de mayor tamaño (1000-1200 μm); lo que indicó que los cuerpos lúteos eran frescos. En el presente estudio en el animal tratado con VE y sección del unilateral del NOS, pudimos observar cuerpos lúteos y varios folículos en desarrollo por parte del ovario inervado (datos no mostrados).

Por otro lado, en ratas inyectadas con T o DHT y estimuladas con ambas gonadotropinas, los ovarios muestran presencia de folículos en todas las etapas de crecimiento. En el presente estudio en los grupos con sección unilateral del NOS más el estímulo gonadotrópico, ya sea con eCG o eCG+hCG, observamos la presencia de folículos en diferentes etapas de desarrollo, que fue mayor cuando los animales fueron estimulados con ambas gonadotropinas, también se observaron cuerpos lúteos y en algunos casos la presencia de quistes.

En el modelo *in vivo* de la rata inyectada con VE, la sección bilateral del NOS reduce los niveles séricos de T y E₂ (Morales-Ledesma y col., 2010). En el presente estudio la sección unilateral del NOS también redujo la concentración de T respecto al grupo con VE. Otros estudios han mostrado que en ovarios extraídos de ratas inyectadas con VE, la estimulación *in vitro* de los ovarios con hCG incrementa la concentración de andrógenos. Si antes de la extracción de los ovarios, los animales son sometidos a la sección bilateral del NOS la concentración de andrógenos disminuye (Barria y col., 1993).

En el presente trabajo también se observó una mayor capacidad esteroidogénica ante el estímulo gonadotrópico, ya que en el grupo con VE SNOD (eCG) aumentó la concentración de T respecto a VE SNOD.

En la rata neonata la sección bilateral del NOS aumenta los niveles séricos de E₂, pero no tiene efectos en los niveles de P₄. Estos resultados sugieren que la información simpática que viaja por NOS tiene efecto inhibitorio sobre la secreción de E₂, pero no tiene efecto sobre la secreción de P₄ (Zhang y col., 2010). En el presente estudio, la concentración de P₄ aumentó en el grupo con VE SNOI (eCG) respecto a la operación simulada y únicamente a la sección, lo que muestra que la eCG exógena tiene un papel estimulante sobre la síntesis de P₄.

En nuestros animales la concentración de E₂ aumentó cuando se realizó la sección unilateral del NOS y se estimuló con eCG. Este aumento podría deberse, igual que en el animal cíclico, a la gran cantidad de folículos que se encuentran en desarrollo, ya que la función de eCG es la misma que la de FSH, donde FSH estimula el crecimiento folicular y la síntesis de estrógenos en las células de la granulosa.

La concentración de E₂ disminuyó en los grupos con VE más sección del NOS y estimulados con ambas gonadotropinas, respecto al grupo estimulado con una gonadotropina. Esta disminución podría estar dada por la administración de ambas gonadotropinas (eCG+hCG) ya que un aumento de FSH y LH provoca una

disminución de E2 de acuerdo con lo descrito que ocurre en el eje hipotálamo hipófisis ovario (Schaffer y col. 2017).

CONCLUSIONES

- En el animal adulto cíclico, el NOS regula de manera simétrica la respuesta de los folículos a las gonadotropinas.
- En el animal adulto cíclico, la información simpática que llega al ovario por el NOS no es fundamental para la respuesta ovulatoria ante el estímulo gonadotrópico.
- En el animal adulto cíclico, la información que viaja por el NOS no es fundamental para que se lleve a cabo la biosíntesis de P₄ y T, pero si, modula de manera inhibitoria la biosíntesis de estradiol.
- En el animal adulto con SOPQ, se requiere de la integridad del NOS para que el ovario ovule en respuesta al estímulo gonadotrópico.
- En el animal adulto con SOPQ, la información que transcurre por el NOS modula de manera inhibitoria la biosíntesis de estradiol, en respuesta al estímulo gonadotrópico.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguado LI., Ojeda SR. (1984). Prepubertal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. Role of noradrenergic innervation. *Endocrinology*, 114(5): 1845-1853.
- Araya V., Jara P., Lara HE. (2004). Cerebro, estrés y ovario poliquístico. Participación de la inervación simpática en el desarrollo del síndrome del ovario poliquístico. *Endocrinología y Nutrición*, 51(8): 473-477.
- Barrera D., Chirinos M., García-Becerra R. (2008). Mecanismos de regulación de la síntesis y secreción de la gonadotropina coriónica humana (hCG) durante el embarazo. *Rev Invest Clin Rev*. 60(2): 124-132.
- Barrett KE., Barman SM., Boitano S., Brooks HL. (2010). Gónadas: desarrollo y función del aparato reproductor. En: Barrett KE., Barman SM., Boitano S., Brooks HL. (Eds.), *Ganong Fisiología médica*. (23ª ed., pp. 391-428). Ciudad de México, México: McGraw-Hill Interamericana.
- Barria A., Leyton V., Ojeda SR., Lara HE. (1993). Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology*, 133(6): 2696-2703.
- Berger JJ., Bates GW. (2014). Optimal management of subfertility in polycystic ovary syndrome. *International Journal of Women's Health*, 6: 613-621.
- Bó GA., Cutaia LE., Souza AH., Baruselli ES. (2009). Actualización sobre protocolos de iatf en bovinos de leche utilizando dispositivos con progesterona. *Taurus*, 11(41): 20-34.
- Brawer JR., Munoz M., Farookhi R. (1986). Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biology of Reproduction*, 35(3): 647-655.
- Brawer JR., Naftolin F., Martin J., Sonnenschein C. (1978). Effects of a single injection of estradiol valerate on the hypothalamic arcuate nucleus and on reproductive function in the female rat. *Endocrinology*, 103(2): 501-512.

-
-
- Bremer AA. (2010). Polycystic ovary syndrome in the pediatric population. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 8(5): 375-394.
 - Burden HW. (1972). Adrenergic innervation in ovaries of the rat and guinea pig. *American Journal of Anatomy*, 133(4): 455-461.
 - Casabiell X. (2006). Eje Hipotálamo-hipófiso-ovárico. En: Catalina PF., Mallo F., Arce VM. (Eds.), *Endocrinología* (pp. 95–102). Madrid, España: Universidad de Santiago de Compostela.
 - Chávez R., Domínguez R. (1994). Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of compensatory ovarian hypertrophy: the effects of its section performed on each day of the oestrous cycle. *Journal of Endocrinology*, 140(2): 197-201.
 - Chávez R., Morales L., González ME., Domínguez R. (1994). Ovarian norepinephrine content in prepubertal rats with superior ovarian nerve section: temporal studies. *Medical Science Research*, 22(11): 789-790.
 - Chávez-Genaro R., Anesetti G. (2018). First ovarian response to gonadotrophin stimulation in rats exposed to neonatal androgen excess. *Journal of Molecular Histology*, 49(6): 631-637.
 - Combarous Y., Mariot J., Relav L., Nguyen TMD., Klett D. (2019). Choice of protocol for the in vivo bioassay of equine chorionic gonadotropin (eCG/PMSG) in immature female rats. *Theriogenology*, 130: 99-102.
 - Curry TE., Lawrence IE., Burden HW. (1984). Ovarian sympathectomy in the guinea pig. *Cell and Tissue Research*, 236(2): 257-263.
 - Del Campo M., Piquer B., Witherington J., Sridhar A., Lara HE. (2019). Effect of superior ovarian nerve and plexus nerve sympathetic denervation on ovarian-derived infertility provoked by estradiol exposure to rats. *Frontiers in Physiology*, 10: 1-10.
 - Dissen GA., Lara HE., Leyton V., Paredes A., Hill DF., Costa ME., Martínez-Serrano A., Ojeda SR. (2000). Intraovarian excess of nerve growth factor increases androgen secretion and disrupts estrous cyclicity in the rat. *Endocrinology*, 141(3): 1073-1082.

-
-
- Domínguez R., Cruz-Morales SE. (2011). The ovarian innervation participates in the regulation of ovarian functions. *Endocrinol Metabol Syndrome S*, 4: 1-10.
 - Domínguez R., Morales L., Cruz, M. E. (2003). Ovarian asymmetry. *Ann Rev Biomed Sci*, 5(95-104): 408.
 - Dyer CA., Erickson GF. (1985). Norepinephrine amplifies human chorionic gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by ovarian theca-interstitial cells. *Endocrinology*, 116(4): 1645-1652.
 - Edson MA., Nagaraja AK., Matzuk MM. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews*, 30(6): 624-712.
 - Espinoza JA., Alvarado W., Venegas B., Domínguez R., Morales-Ledesma L. (2018). Pharmacological sympathetic denervation prevents the development of polycystic ovarian syndrome in rats injected with estradiol valerate. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1): 1-11.
 - Eynard AR., Valentich MA., Rovasio RA. (2008). Ovarios: Relación estructura-función a lo largo del ciclo menstrual. En: Eynard AR., Valentich MA., Rovasio RA. (Eds.), *Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares*. (4ª ed., pp. 519-542). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
 - Fábregues F., Balasch J. (2009). Foliculogénesis: Papel de la FSH y LH. En: Arenas JMB., y Coroleu L. (Eds.), *Fundamentos de Reproducción* (pp. 23–28). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
 - Fernández-Morales D., Mangel T. (1983). Esteroidogénesis. *Acta Médica Costarricense*, 26: 144-149.
 - Fernandois D., Garrido M., Lara HE., Paredes A. (2014). Regulación Neuronal de la Función Ovárica durante el Envejecimiento Reproductivo. *Revista Farmacología de Chile*, 7(1): 47-55.
 - Ferruz J., Barria A., Galleguillos X., Lara HE. (1991). Release of norepinephrine from the rat ovary: local modulation by gonadotropins. *Biology of Reproduction*, 45(4): 592-597.
 - Fleischer AC., Cullinan JA., Kepple DM. (1999). Evaluación de las masas anexiales con ecografía transabdominal o transvaginal. En: Fleischer AC.

(Ed.), *Imágenes en ginecología* (pp. 47–61). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.

- Flores A., Ayala ME., Domínguez R. (1990). Does noradrenergic peripheral innervation have a different role in the regulation ovulation in the pubertal and the adult rat. *Med Sci Res*, 8: 817-818.
- Flores-Pérez FI., Rosas-Velasco C., Pardo MCR., Pérez-Martínez M. (2005). Apoptosis and follicular atresia: an essential binomial for ovarian development. *Veterinaria México*, 36(1): 87-103.
- Forneris ML., Aguado LI. (2002). Neonatal superior ovarian nerve transection disturbs the cyclic activity of the female rats. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 82(1): 75-82.
- Gamboa I., Pérez M. (2015). Síndrome de ovarios poliquísticos: Revisión bibliográfica. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 72(614): 175-181.
- Gómez-Chang E., Larrea F., Martínez-Montes F. (2012). Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15(1): 24-36.
- Greiner, M., Paredes, A., Araya, V., & Lara, H. E. (2005). Role of stress and sympathetic innervation in the development of polycystic ovary syndrome. *Endocrine*, 28(3): 319-324.
- Guzmán CL., Martínez EC., Orozco AJ. (2008). Introducción a la farmacología de la reproducción. En: Mendoza NP. (Ed.), *Farmacología médica*. (pp. 393-400). Distrito Federal, México. Editorial Médica Panamericana.
- Hosseini A., Niasari-Naslaji, A., Vojgani, M., & Gharagozloo, F. (2018). Effect of time of eCG administration on the fate of ovarian follicle in Holstein heifers. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 19(1): 15.
- Lara HE., Dissen GA., Leyton V., Paredes A., Fuenzalida H., Fiedler JL., Ojeda SR. (2000). An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology*, 141(3): 1059-1072.

-
-
- Lara HE., Ferruz JL., Luza S., Bustamante DA., Borges Y., Ojeda SR. (1993). Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*, 133(6): 2690-2695.
 - Lawrence Jr. IE., Burden HW. (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The Anatomical Record*, 196(1): 51-59.
 - Li M., Zhou TH., Gao Y., Zhang N., Li JC. (2007). Ultrastructure and estrogen regulation of the lymphatic stomata of ovarian bursa in mice. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*: 290(10): 1195-1202.
 - Machain-Vázquez RG., Hernández-Marín I. (2014). Rotterdam 2003. Criterio vigente para el diagnóstico de síndrome de ovario poliquístico en población adolescente. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción*, 6(2): 83-95.
 - Marshall JC., Griffin ML. (1993). The role of changing pulse frequency in the regulation of ovulation. *Human Reproduction*, 8(2): 57-61.
 - Mayerhofer, A., Dissen, G. A., Costa, M. E., & Ojeda, S. R. (1997). A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*, 138(8): 3320-3329.
 - Moore RY., Bloom FE. (1979). Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. *Annual Review of Neuroscience*, 2(1): 113-168.
 - Morales L., Chávez R., Ayala ME., Domínguez R. (1998). Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in prepubertal rats on the ovulatory response to gonadotrophin administration. *The Journal of Endocrinology*, 158(2): 213-219.
 - Morales L., Chávez R., Domínguez R. (1993). Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve. *Medical Science Research*, 21(1): 15-17.
 - Morales-Ledesma L., Linares R., Rosas G., Morán C., Chavira R., Cárdenas M., Domínguez R. (2010). Unilateral sectioning of the superior ovarian nerve of

rats with polycystic ovarian syndrome restores ovulation in the innervated ovary. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1): 99.

- Morales-Ledesma L., Trujillo A., Apolonio J. (2015). In the pubertal rat, the regulation of ovarian function involves the synergic participation of the sensory and sympathetic innervations that arrive at the gonad. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1): 1-8.
- Morales-Ledesma L., Vieyra E., Ramírez DA., Trujillo A., Chavira R., Cárdenas M., Domínguez, R. (2012). Effects on steroid hormones secretion resulting from the acute stimulation of sectioning the superior ovarian nerve to pre-pubertal rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1): 1-7.
- Morán C., Morales L., Quiróz U., Domínguez R. (2000). Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in infantile rats on follicular growth. *Journal of Endocrinology*, 166(1): 205-211.
- Pérez MM., Romano PMM. (1996). Interacción Inmunoendocrina en el Útero: Papel de las Hormonas esteroides Sexuales. *Ciencia Veterinaria*, 7: 191-212.
- Piriñçi N., Yildirim S., Taş A., Kuşcu Y., Ozan T., Firdolaş F., Demir H., Karakeci A. (2018). Evaluation of Prolidase Activity, Oxidative Stress, and Antioxidant Enzyme Levels in Testicular and Penile Tissues after Human Chorionic Gonadotropin Treatment in Rats by Predicting Infertility and Erectile Dysfunction. *Medical Principles and Practice*, 27(3): 217-221.
- Prieto-Gómez B., Velázquez-Paniagua M. (2002). Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 45(6): 252- 257.
- Ramírez DA., Vieyra E., Rosas G., Linares R., Espinoza JA., Ortega A., Morales-Ledesma, L. (2020). Role of the superior ovarian nerve in the regulation of follicular development and steroidogenesis in the morning of diestrus 1. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(6): 1477-1488.
- Rosa-e-Silva A., Guimaraes MA., Padmanabhan V., Lara HE. (2003). Prepubertal administration of estradiol valerate disrupts cyclicity and leads to cystic ovarian morphology during adult life in the rat: role of sympathetic innervation. *Endocrinology*, 144(10): 4289-4297.

-
-
- Sadler TW. (2019). Primera semana del desarrollo: de la ovulación a la implantación. En: Sadler TW. (Ed.), *Langman. Embriología médica*, (14ª ed., pp. 71-92). Buenos Aires, Argentina: Wolters Kluwer.
 - Shi D., Vine DF. (2012). Animal models of polycystic ovary syndrome: a focused review of rodent models in relationship to clinical phenotypes and cardiometabolic risk. *Fertility and Sterility*, 98(1): 185-193.
 - Singh KB. (2005). Persistent estrus rat models of polycystic ovary disease: an update. *Fertility and Sterility*, 84: 1228-1234.
 - Sir TP., Preisler RJ., Magendzo NA. (2013). Síndrome de ovario poliquístico. Diagnóstico y manejo. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(5): 818-826.
 - Tilly, J. L., Kowalski, K. I., Johnson, A. L., & Hsueh, A. J. (1991). Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*, 129(5): 2799-2801.
 - Tresguerres JAF., Castillo C. (2005). Fisiología del eje hipotálamo-hipófisis-ovárico. En FM Teruel, V Cachofeiro, MR. Pardo, EAB. de Lugo, JAFT. Hernández, JT Menéndez, JAH. Tresguerres (Eds.), *Fisiología Humana* (3ª ed., pp. 1007-1023). Distrito Federal, México: McGraw-Hill.
 - Urbina MT., Biber JL. (2009). Ovogénesis, foliculogénesis, síntesis de esteroides ováricos y reserva folicular. En: Urbina MT., Biber JL. (Eds.), *Fertilidad y reproducción asistida*. (pp. 125-149). D.F. México: Editorial Médica Panamericana
 - Ventura-Arizmendi E., Hernández-Valencia M. (2019). La esteroidogénesis en el síndrome de ovarios poliquísticos. *Gaceta Médica de México*, 155(2): 184-190.
 - Weihua Z., Ekman J., Almkvist A., Saji S., Wang L., Warner M., Gustafsson J. A. (2002). Involvement of androgen receptor in 17 β -estradiol-induced cell proliferation in rat uterus. *Biology of Reproduction*, 67(2): 616-623.
 - Zhang X., Zhang L., Huo S., Wang J., Cui S. (2010). Neonatal superior ovarian nerve transection inhibits follicle development by enhancing follicular atresia and suppressing granulosa cell proliferation in rats. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(7): 1148-1158.