



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

CARRERA DE BIOLOGÍA

**Efecto de la microinyección de atropina
en la bursa ovárica sobre la ovulación en
ratas con o sin el síndrome de ovario
poliquístico**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA:

Xóchitl Nallely Acuña Escalona

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. LETICIA MORALES
LEDESMA.**



**Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo
financiero de UNAM-DGPAPA-PAPIIT No. IN217016**



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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

***EFFECTO DE LA MICROINYECCIÓN DE ATROPINA EN LA BURSA
OVÁRICA SOBRE LA OVULACIÓN EN RATAS CON O SIN EL
SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO.***

Tesis presentada por: Xóchitl Nallely Acuña Escalona

Directora de Tesis: Dra. Leticia Morales Ledesma

Realizada en el Laboratorio de Fisiología Reproductiva
en la Unidad de Investigación en Biología de la
Reproducción. UMIEZ. FES Zaragoza. UNAM.

Durante la realización de esta Tesis se contó con el Apoyo
Financiero de UNAM-DGAPA-PAPIIT No. IN217016

Ciudad de México

Abril 17,2018



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **ACUÑA ESCALONA XÓCHITL NALLELY**, con número de cuenta **412019788**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **17 de abril de 2018** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. PATRICIA ROSAS SAUCEDO

VOCAL Dra. LETICIA MORALES LEDESMA

SECRETARIO Dra. JUANA MONROY MORENO

SUPLENTE Dra. ELIZABETH VIEYRA VALDEZ

SUPLENTE Dra. ROSA LINARES CULEBRO

El título de la tesis que presenta es: **Efecto de la microinyección de atropina en la bursa ovárica sobre la ovulación en ratas con o sin el síndrome de ovario poliquístico.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 07 de marzo de 2018

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
DIRECCION

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, pero en especial a mi casa, la FES Zaragoza por permitirme concluir mis estudios.

A la **Dra. Leticia Morales Ledesma**, por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por tanta paciencia que ha tenido conmigo, sus consejos, sus pláticas, y sobre todo la confianza para realizar este trabajo, en verdad le agradezco infinitamente.

A las sinodales:

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dra. Juana Monroy Moreno

Dra. Elizabeth Vieyra Valdéz

Dra. Rosa Linares Culebro

Gracias a cada una por el tiempo en la revisión de este escrito y sobre todo por sus comentarios en pro de mejorar la estructura del mismo.

Al **Dr. Róman** y a las **Dras. Adriana y Eli**, por estar siempre al pendiente de los animales utilizados en este proyecto, les agradezco infinitamente su ayuda.

Al **Dr. Roberto Chavira** por su ayuda con la medición de las hormonas cuantificadas en el presente estudio.

Dra. Leticia Morales Ledesma: Gracias por todo, en verdad estoy muy agradecida con usted porque siempre nos apoya a cada uno de los que formamos parte del laboratorio, porque siempre está dispuesta a encontrar soluciones cuando nosotros mismos pensamos que no las hay. Gracias por sus regaños que no son regaños, por tener la paciencia para sentarse y explicarme las cosas una y otra vez. En verdad lo que más le agradezco es la confianza que depositó en mi para llevar a cabo este proyecto, espero no haberla defraudado, y que me siga brindando la confianza de pertenecer a su equipo de trabajo, quizá más adelante en otra etapa de mi vida académica. Muchas gracias doctora Lety por ser como es, la quiero mucho.

Dra. Rosa Linares Culebro: En realidad me faltan muchas palabras para decirte que tan agradecida estoy contigo. Me has apoyado desde que me adoptaste para la revisión de esta tesis, desde que se empezó de cero porque lo que tenía no era lo que debería, hasta el día de hoy que te estrenas como sinodal (si se pudo). Por que como asesora le dedicaste mucho tiempo a mi proyecto aun cuando no era lo que tu manejabas, te agradezco tus conocimientos y consejos, porque me apoyaste cuando me sentía frustrada por que las cosas no me salían como yo esperaba, me has compartido tu enfoque y ha quedado plasmado en cada hoja de esta tesis. Agradezco la relación que hemos podido llevar fuera del laboratorio y cada uno de tus consejos tanto a nivel educativo como personal. En verdad me faltan palabras, gracias por todo Rosa. Me siento muy orgullosa de pertenecer a tu grupo de “hijos”. Gracias por decirme que todo lo que yo hiciera contigo sería extraordinario, hoy veo los resultados del trabajo y son más que extraordinarios en todos los sentidos. GRACIAS, TE QUIERO MUCHISIMO.

A las Doctoras **Gaby, Ely, Dey** y **Azu** muchas gracias a ustedes porque cuando necesite de algún consejo de su parte nunca me lo negaron y me han ayudado mucho en mi estancia en el laboratorio. Todas y cada una son unas excelentes profesionales y unas grandes personas.

A mis compañeros de laboratorio **David, Hugo, Fer, Karis, Alejandro** y **Tania** porque sin ustedes el labo no sería lo mismo. Gracias por las cosas que hemos compartido, las risas, las comidas, los regaños. Con ustedes en él, todo es mejor. Los quiero.

A **Chío**: Fuiste un gran apoyo en todos los sentidos, fuiste la persona que estuvo conmigo en todo momento, la persona más dedicada que conozco. Te quiero mucho Chiito, gracias por ser mi amiga y ser parte de este trabajo. Aún nos quedan muchas cosas por hacer juntas, espero seguir contando con tu apoyo en lo académico y en lo personal.

A **Sus** y **Marín**: Gracias por permitirme disfrutar de su compañía, de sus pláticas y consejos. En verdad gracias a los dos porque nos dimos la oportunidad de conocernos.

A mis amigos **Domingo, Héctor, Diego**, porque sin ustedes la estancia en escuela hubiera sido muy aburrida.

DEDICATORIAS

A mis padres **PEPE** y **SANDRA** y a mi hermano **TEMO**, porque me han apoyado en todo lo que han podido y lo han dado a manos llenas, porque nunca me han dejado a mí, ni a mi familia sola. Porque gran parte si no es que todo lo que soy se los debo a ustedes. Por fin se cierra un ciclo que debió terminar hace tiempo, pero más vale tarde que nunca. Ojalá se sientan orgullosos de la persona que han formado. Los amo a los tres incondicionalmente.

Mario: GRACIAS, por absolutamente todo, porque has sabido soportar y apoyar cada una de mis decisiones, aun cuando no sean las correctas, porque eres incondicional y has sido mi pilar durante mucho tiempo. Esto es para ti y para nuestras hijas **ANDREA** y **MARIANA**. Porque ustedes han sido los que más han llevado la carga, porque me han soportado de todas las formas habidas y por haber. Mario, espero que te sientas orgulloso tú también de lo que hemos logrado juntos, te amo incondicionalmente. Prometo no hacerte víctima de la maldición.

A mi abuela **ANA**, mis tías **LUPE** y **VIOLE**: Sin ustedes esto no habría sido posible, gracias porque me apoyaron muchísimo con el cuidado de mis hijas mientras yo estaba estudiando. Gracias infinitas.

A mis tí@s **ARMANDO**, **LUZ**, **JOEL**, **LETY**, **TULES**, **RAÚL**, **LAURA** a mis prim@s: **CINTY**, **TONY**, **NIKKI**, **ANITA**, **ARMANDITO**, porque de una u otra forma estuvieron apoyándome en este camino.

A **DIANA**, **SRA. COCO**, **PELUCHE** y **LUIS**: Gracias por que al apoyar a Mario me apoyaban a mí, en verdad se los agradezco mucho.

A las personas que se me adelantaron antes de que pudieran ver concluido este proyecto: mi tía **IRMA** y el **SR. FELIPE**, sé que están de otras formas acompañándome.

A mis amigos que se han vuelto familia **NAVA**, **SARAHÍ** y **FRANCISCO**: Muchas gracias amigos por que han estado para mí en todo momento, por que disfruto de su compañía y nuestras pláticas. Los amo a los tres.

Abreviaturas	i
Resumen	ii
Introducción	1
Marco teórico	2
Ciclo Estral	2
El Ovario	6
Bursa Ovárica	7
Foliculogénesis	9
Ovulación	14
Atresia Folicular	15
Esteroidogénesis	18
Inervación Ovárica	23
Regulación Neuroendócrina del eje Hipotálamo- Hipófisis- Ovario	24
Síndrome de Ovario Poliquístico	25
Hipótesis Sobre el Origen del Síndrome	27
Modelos de Inducción del Síndrome de Ovario Poliquístico	30
Valerato de Estradiol.	31
Síntesis y Liberación de Acetilcolina	32
Receptores a Acetilcolina	34
Atropina	36
Sistema Colinérgico en la Reproducción	38
Planteamiento del Problema	39
Hipótesis	40
Objetivo General	40
Objetivos Particulares	40
Materiales y métodos	41
Resultados	46
Discusión	59
Conclusiones	72
Bibliografía	73

ABREVIATURAS

SOPQ	Síndrome de Ovario Poliquístico	NA	Noradrenalina
H-H-O	Hipotálamo Hipófisis Ovario	VIP	Péptido Intestinal Vasoactivo
NOS	Nervio Ovárico Superior	NPY	Neuropéptido Y
ATR	Atropina	SP	Sustancia P
VE	Valerato de Estradiol	CGRP	Péptido Relacionado con el Gen que Codifica para la Calcitonina
GnRH	Hormona Liberadora de las Gonadotropinas	ACh	Acetilcolina
LH	Hormona Luteinizante	TH	Tiroxina Hidroxilasa
FSH	Hormona Folículo Estimulante	SNC	Sistema Nervioso Central
DI	Diestro I ó Metaestro	POA-AHA	Área Preóptica Hipotalámica Anterior
DII	Diestro II	ACTH	Hormona Adrenocorticotrópica
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante β	SHBG	Proteína Transportadora de Hormonas Sexuales
AMPc	Monofosfato de Adenosina Cíclico	GCMS	Ganglio Celíaco Mesentérico Superior
IL-6	Interleucina 6	DHT	Dehidrotestosterona
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral α	ChAT	Enzima Acetil-Colintransferasa
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal	POA	Área Preóptica
NGF	Factor de Crecimiento Neural	NPO	Nervio del Plexo Ovárico
IGF-I	Factor de Crecimiento Semejante a la Insulina 1	SNP	Sistema Nervioso Periférico
bFGF	Factor de Crecimiento de Fibroblasto Básico	VACHT	Transportador Vesicular de Acetilcolina
GDF-9	Factor de Crecimiento y Diferenciación 9	AChE	Acetil-colinesterasa
ATP	Adenosín Trifosfato	DXM	Dexametasona
PKA	Proteínas Cinasas A		
StAR	Proteína de la Regulación Esteroidogénica Aguda		
3 β -HSD	3- β Hidroxiesteroide Deshidrogenasa		
DHEA	Dehidroepiandrosterona		

RESUMEN

El ovario de ratas, primates y humanos cuenta con una distribución de receptores muscarínicos por los cuales la acetilcolina (ACh) participa en la regulación de las funciones ováricas. En ratas cíclicas, el bloqueo de los receptores muscarínicos en el día del proestro inhibe el pico preovulatorio de gonadotropinas y la ovulación en el día del estro esperado.

El principal aporte de ACh al ovario es el nervio vago. Al momento se desconocen las estructuras ováricas que reciben inervación vagal, sin embargo, el nervio vago participa en la modulación de las funciones ováricas, ya que en ratas sometidas a la vagotomía izquierda, el ovario que mantiene su inervación colinérgica intacta presenta un mayor número de folículos preovulatorios.

El Síndrome de Ovario Poliquístico (SOPQ) es una patología que se encuentra asociada con desordenes en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (H-H-O) y que trae como resultado un incremento en la concentración de andrógenos, la formación de quistes foliculares y la falta de ovulación. En animales con la patología, inducida por la inyección de valerato de estradiol (VE), la vagotomía unilateral o bilateral resulta en la ovulación del 75% de los animales y el restablecimiento de la morfología ovárica, caracterizada por la ausencia de quistes foliculares y la presencia de cuerpos lúteos recién formados, indicativos de que el animal ha ovulado.

Con el fin de analizar el papel que tiene la ACh en el mantenimiento del SOPQ, en el presente estudio se utilizaron ratas hembras de 10 días de edad que fueron inyectadas vía intraperitoneal con 0.1 mL de aceite de sésamo que fungió como vehículo (Vh) o con 2.0 mg de VE disueltos en 0.1 mL del aceite. A los 60 días de edad, en el día del diestro I, las ratas fueron microinyectadas en la bursa ovárica izquierda o derecha con 100 mg/Kg/pc de atropina (ATR), un antagonista no selectivo de los receptores muscarínicos. En otro experimento se analizó el efecto de la microinyección con ATR en ratas hembras cíclicas de 60 días de edad, donde el fármaco fue administrado en la bursa ovárica izquierda o derecha, en el día del diestro 1.

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación al estro inmediato a la cirugía. Se evaluó la tasa de animales ovulantes, el número de ovocitos liberados, así como la concentración de progesterona y testosterona en suero.

La microinyección de ATR en la bursa del ovario izquierdo de ratas cíclicas en diestro resultó en la disminución del 59% de la tasa de animales ovulantes, mientras que su inyección en el ovario derecho la disminuyó en un 75%. Sin embargo, no hubo diferencias en el número de ovocitos liberados.

La concentración de progesterona en suero aumentó cuando la microinyección de ATR se realizó en la bursa del ovario derecho, mientras que la de testosterona fue menor cuando el bloqueo de Ach fue realizado en cualquiera de las bursas ováricas.

La morfología de los ovarios de las hembras tratadas con la microinyección de ATR en la bursa ovárica izquierda mostró un mayor número de folículos preovulatorios mientras que cuando el bloqueo se realizó en la bursa derecha se apreció un mayor número de folículos en crecimiento.

En el animal con SOPQ la microinyección de ATR en la bursa del ovario izquierdo o derecho no restableció la ovulación, sin embargo, se observó una disminución en el peso de las gónadas independientemente si fueron tratadas en la bursa ovárica izquierda o derecha. La concentración de progesterona en suero disminuyó cuando el antagonista colinérgico fue microinyectado en cualquiera de las bursas ováricas, esta misma respuesta se observó en la concentración sérica de testosterona.

La morfología ovárica de los animales tratados con VE que fueron sometidos a la microinyección de ATR en la bursa izquierda o derecha mostró la presencia de quistes, prequistes, características que han sido observadas en los animales que presentan el SOPQ cuando este es inducido con VE, sin embargo la morfología de los ovarios contralaterales no es la típica del animal con SOPQ, dado que en el ovario derecho se encontraron folículos pequeños, así como prequistes, mientras que el ovario izquierdo presentó folículos grandes.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que el sistema colinérgico del ovario participa en la regulación de sus funciones, que difiere de un ovario a otro y que depende del estado endocrino del animal.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de ovario poliquístico (SOPQ) es la endocrinopatía más frecuente en mujeres en edad reproductiva, presentan desórdenes endocrinos, metabólicos, reproductivos, sexuales y psicológicos los cuales afectan la salud y el bienestar emocional a corto y largo plazo (Zore y col., 2017).

El SOPQ se caracteriza por la presencia de hiperandrogenismo clínico o bioquímico acompañado de anovulación o formación de quistes foliculares, lo cual puede conllevar a un cuadro de infertilidad. Estas anomalías pueden ser consecuencia de una disrupción en el eje Hipotálamo-hipófisis-Ovario (H-H-O) (Morales-Ledesma, 2015).

El origen del síndrome se asocia con la hiperactividad de las fibras simpáticas que llegan al ovario por medio del nervio ovárico superior (NOS) la cual se produce antes de la formación de los quistes foliculares (Morales-Ledesma, 2015).

La inervación colinérgica que recibe el ovario es proporcionada por el nervio vago. En animales con SOPQ, la eliminación de esta información restablece la esteroidogénesis ovárica (Linares y col., 2013), lo que permite sugerir que la hiperactividad simpática no es el único factor responsable de la fisiopatología.

En el presente estudio se decidió analizar el papel del sistema colinérgico, mediante el bloqueo de los receptores colinérgicos del ovario por medio de una microinyección intrabursal de un antagonista colinérgico no selectivo, como lo es la atropina (ATR). Para ello, se utilizaron dos modelos animales en el día del Diestro I, ratas sanas cíclicas, que no presentaban la fisiopatología y ratas con el SOPQ, inducido por la administración de valerato de estradiol (VE).

MARCO TEÓRICO

CICLO ESTRAL

Los cambios cíclicos en el comportamiento sexual y la citología vaginal se encuentran regulados por el eje H-H-O, donde el hipotálamo produce la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), ésta en la hipófisis estimula la secreción de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona folículo estimulante (FSH), las cuales en el ovario favorecen la producción de progesterona, testosterona y estradiol. A su vez, ambas hormonas vía mecanismos de retroalimentación negativa o positiva (feed-back de asa corta o asa larga) regulan este circuito (Feder, 1981; Mc Cann y Ojeda, 1992).

En las ratas, el ciclo estral tiene una duración de 4 a 5 días, en los cuales ocurren varios procesos dinámicos, entre ellos cambios en las concentraciones de hormonas esteroides secretadas por el ovario (Figura 1), que se acompañan de cambios morfológicos en la citología vaginal (Cora y col., 2015).

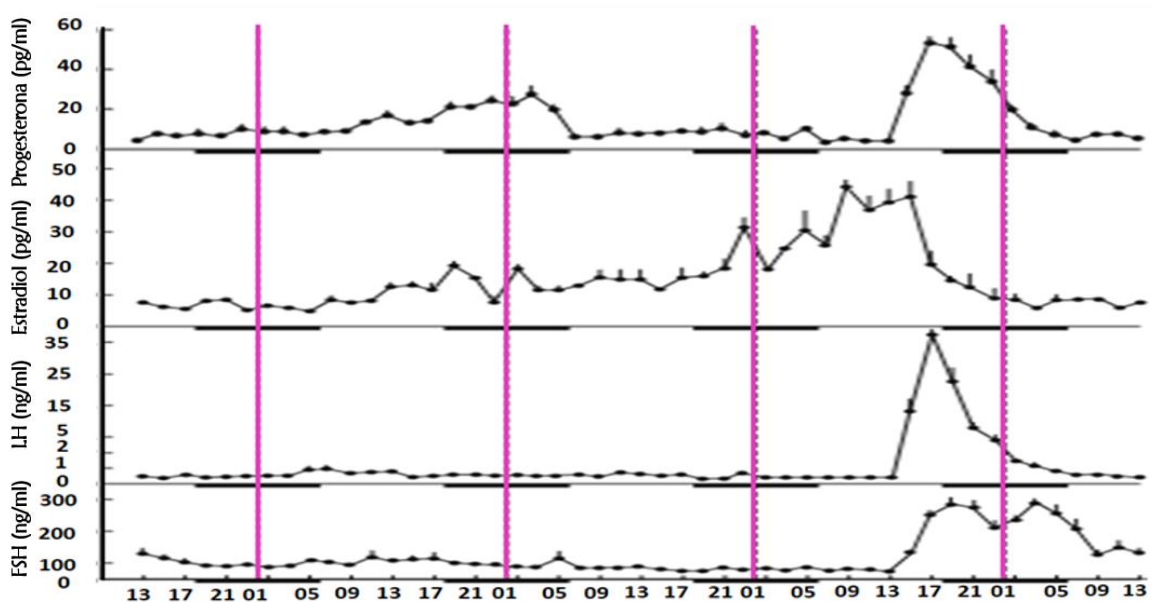


Figura 1. Concentraciones plasmáticas de la LH, FSH, estradiol y progesterona a lo largo de dos ciclos estrales consecutivos en la rata. Las líneas verticales rosas indican el lapso de 24 horas. (Tomado y modificado de Freeman, 2006).

Con base en la proporción y densidad de las células presentes en la citología vaginal (Figura 2) el ciclo estral se clasifica en: metaestro o diestro I, diestro II, proestro y estro (Figura 3) (Cora y col., 2015).

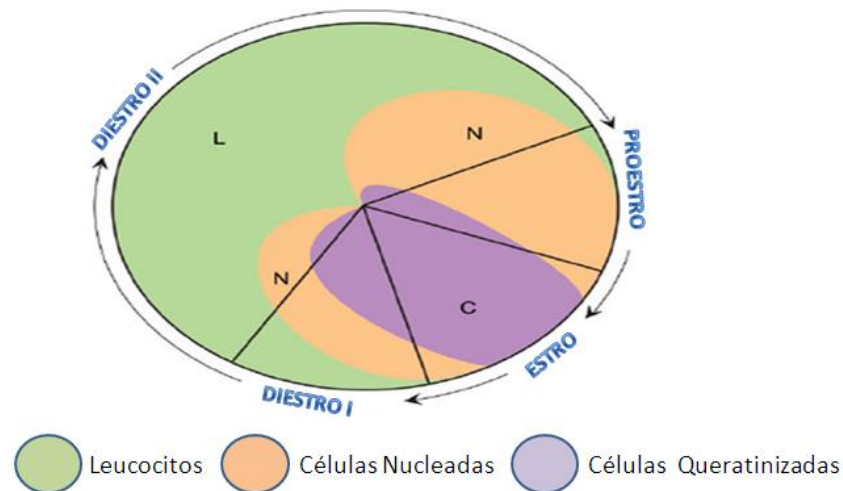


Figura 2. Representa la proporción de los diferentes tipos de células presentes durante las etapas del ciclo estral en la rata. El tamaño de cada cuadrante no es proporcional con la duración de cada etapa. (Tomado y modificado de Byers y col., 2012).

Metaestro o Diestro I (DI): Es la etapa más corta del ciclo, su duración es de 6 a 8 horas y se caracteriza por la presencia de células queratinizadas y leucocitos (Cora y col., 2015). Se observa aumento en las concentraciones de progesterona, mientras que las de estradiol, LH y FSH se encuentran basales (Levine, 2015).

Diestro II (D II): Tiene una duración de 48 a 72 horas, la citología vaginal predominante son leucocitos y células nucleadas, en ocasiones los leucocitos pueden encontrarse en cúmulos. Se pueden presentar secreciones vaginales de consistencia viscosa y elástica (Cora y col., 2015).

Las concentraciones de progesterona, LH y FSH continúan siendo basales mientras que la concentración de estradiol comienza su aumento de manera progresiva conforme el día del ciclo avanza (Levine, 2015).

Proestro: Es una etapa con una duración aproximada de 14 horas (Cora y col., 2015), se observan predominantemente células pequeñas de apariencia uniforme y con núcleo picnótico definido (Pichardo y col., 1999), se pueden apreciar de manera dispersa o formando racimos. De manera típica no se observan leucocitos (Cora y col., 2015).

En el proestro temprano las concentraciones de LH y FSH comienzan a incrementar. La FSH estimula en el folículo la proliferación de células de la granulosa, así como la formación de los receptores a LH en las células de la granulosa de folículos preovulatorios. En la teca interna se inicia la síntesis y secreción de androstenediona y testosterona, hormonas que serán el sustrato para la síntesis de estradiol, el cual regula la maduración folicular (Levine, 2015).

El aumento en la concentración de estradiol trae una elevación brusca de GnRH que se define como el “pico de gonadotropinas” lo que resulta en:

- ☼ La expulsión del ovocito II por parte de los folículos preovulatorios sanos.
- ☼ El inicio del proceso de atresia folicular en folículos que no completaron su ciclo vital (Feder, 1981).

Estro: Oscila entre las 24 y las 48 horas, se presentan células queratinizadas y en el estro tardío se pueden apreciar leucocitos (Cora y col., 2015).

Las concentraciones de progesterona, estradiol y LH se encuentran basales, mientras que en las primeras horas del estro se observa un segundo “pico” de FSH, el cual está implicado en la selección de los folículos que van a ovular en el siguiente ciclo (Levine, 2015).

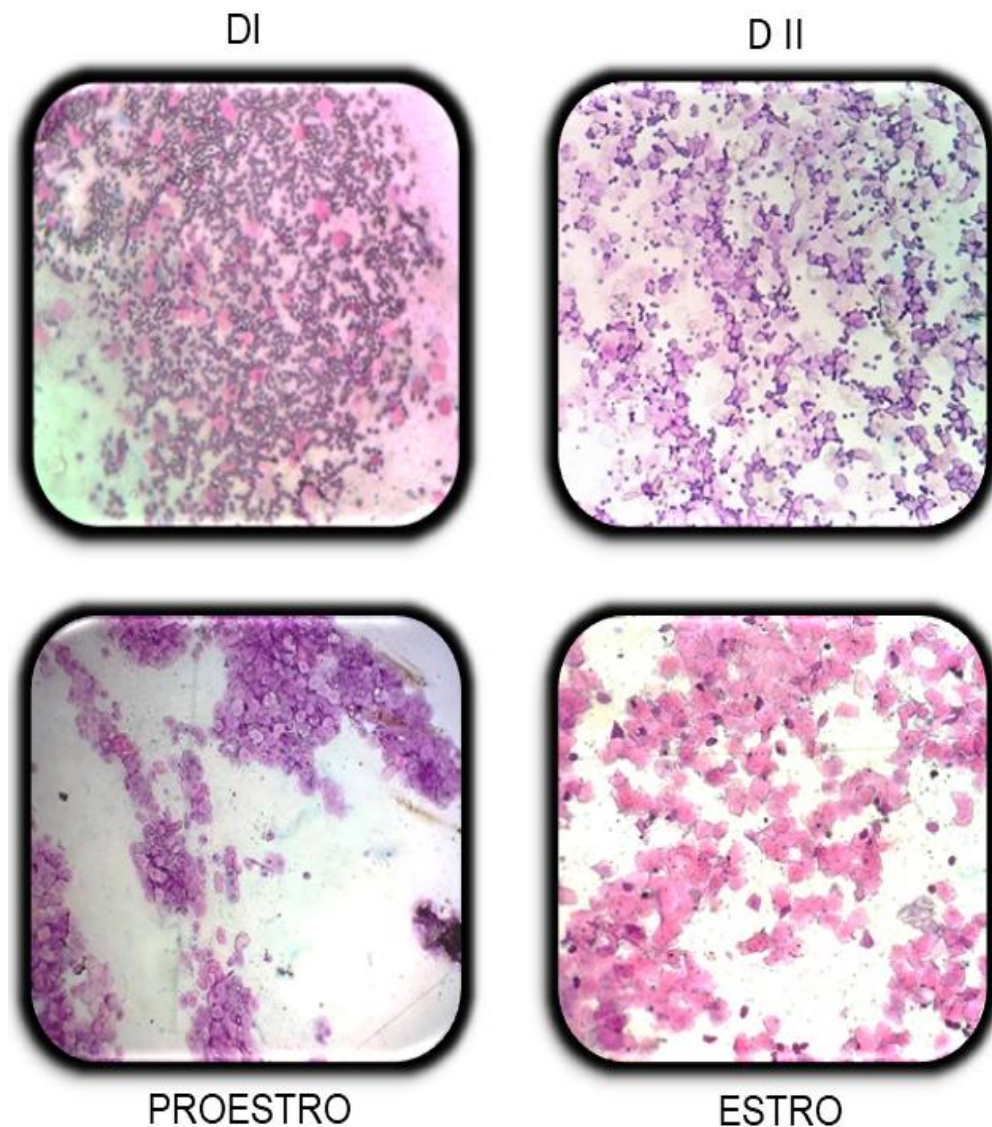


Figura 3. Fotomicrografías de frotis vaginales de ratas de la cepa CII-ZV, teñidos con Hematoxilina Eosina (H-E) y tomadas a un aumento de 100 x. En el Metaestro o diestro I (D I) se observa gran cantidad de leucocitos, células nucleadas y queratinizadas en cantidades casi proporcionales. En el diestro II (D II), gran cantidad de leucocitos, pocas células queratinizadas y células nucleadas. Durante el Proestro se presentan células nucleadas con acomodo en racimo. En el Estro, las células están queratinizadas y no presentan núcleos.

EL OVARIO

El ovario realiza dos procesos fisiológicos, la producción de los gametos femeninos y la secreción de hormonas esteroides (progesterona, testosterona y estradiol) y proteicas (activina, inhibina y folistatina) (Botella, 2005).

En la rata los ovarios pesan aproximadamente 30 mg cada uno, con dimensiones aproximadas de 4.35 x 5.5 x 1.6 mm (Navarrete, 2014). En la mujer se encuentran alojados en la pelvis, fijados a la superficie posterior del ligamento ancho por un pliegue del peritoneo llamado mesovario, el cual recibe el aporte nervioso, vascular y linfático (Tresguerres y Castillo, 2005).

La superficie del ovario transporta sustancias dentro y fuera de la cavidad peritoneal y se auto repara después de la ovulación (Strauss y Williams, 2014).

Aunque el tamaño de los ovarios varía entre las diferentes especies de mamíferos, su estructura es similar, de tal forma que en el ovario se distinguen tres zonas (Figura 4):

1.-**Corteza:** Está constituida por el estroma cortical que es una capa de tejido conectivo denso y la túnica albugínea (Tresguerres y Castillo, 2005) la cual confiere protección al ovario y se encuentra formada por fibroblastos y fibras de colágeno embebidas en una matriz extracelular, las células que se encuentran en la túnica albugínea presentan una morfología oval o redonda (Espey y Richards, 2005). El parénquima cortical está formado por los folículos ováricos, que están rodeados por haces de fibroblastos dispuestos en forma helicoidal. En la corteza del ovario se encuentran todos los tipos de folículos (Espey y Richards, 2005; Tresguerres y Castillo, 2005).

2.-**Médula:** Está situada a la mitad del ovario y presenta fibroblastos laxos embebidos en una matriz rica en colágeno, contiene fibras elásticas, vasos sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas. Se pueden encontrar cúmulos de células intersticiales secretoras de andrógenos, cuando se presentan en gran cantidad se denomina glándula intersticial, la cual está formada por células de la teca de los folículos atrésicos (Tresguerres y Castillo, 2005).

En esta zona podemos encontrar a los folículos atrésicos, así como a los cuerpos lúteos (Gougeon, 2004).

3.-Hilio: Está constituido por un grupo de células epiteloides de la médula ovárica, tienen una configuración similar a los organelos y contienen en su citoplasma lípidos y retículo endoplásmico liso. Por el ingresan los vasos sanguíneos y nervios que surgen del mesovario, el cual es un repliegue del peritoneo (Gougeon, 2004).

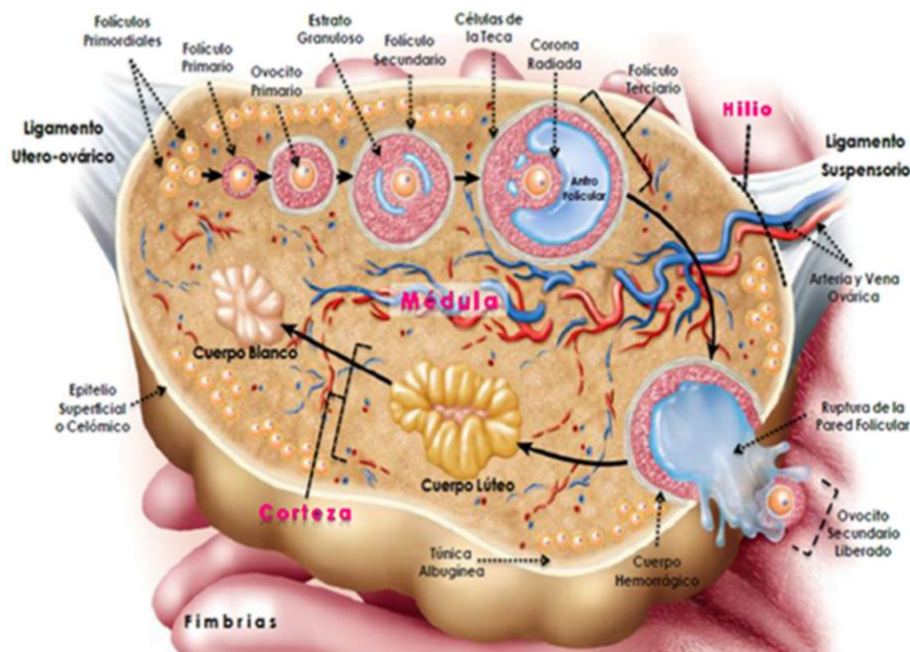


Figura 4. Imágen que muestra las partes que constituyen el ovario, así como el desarrollo de los folículos (Tomado y modificado de Netter, 2003).

BURSA OVÁRICA

Las especies poliovulantes presentan úteros bicornes como una adaptación que permite la correcta irrigación sanguínea de los fetos, tal es el caso de la coneja y la rata (Figura 5). En los primates superiores monoovulantes la cavidad uterina es única (Botella, 2005).



Figura 5. Fotografía que muestra la disposición del útero bicorne de rata de la cepa CII-ZV.

En la mujer que es monoovulante, las trompas de falopio se encuentran en estrecho contacto con la superficie del ovario y mediante las fimbrias, facilitan la recolección del ovocito, sin embargo, en los roedores este proceso no se presenta por lo cual existe la formación de la bursa ovárica, la que es un pliegue del peritoneo que envuelve al ovario y por la que los ovocitos son recogidos (Botella, 2005) (Figura 6).

El líquido folicular, contenido en la bursa ovárica de la rata o la coneja, pasa íntegro al útero a diferencia de los primates, en los cuales se pierde gran parte en el peritoneo (Botella, 2005).

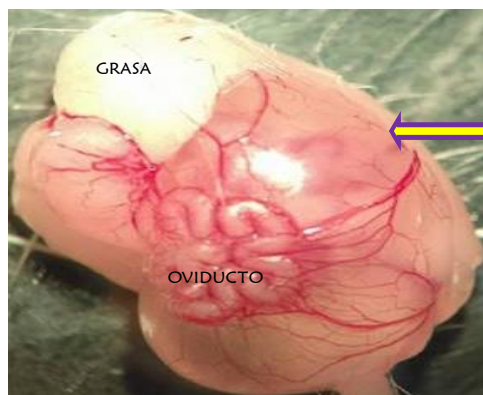


Figura 6. La flecha amarilla muestra la bursa ovárica de rata de 60 días de edad de la cepa CII-ZV donde se puede apreciar con detalle el oviducto, por detrás de este se encuentra situado el ovario y la red de vasos sanguíneos alrededor de la bursa ovárica.

La bursa se encuentra constituida por tres capas: 1) **Interna:** formada por un epitelio discontinuo, el cual se encuentra orientado hacia el ovario. 2) **Media:** con tejido conjuntivo el cual posee fibroblastos, células de músculo liso y vasos sanguíneos, y 3) **Externa:** constituida por un epitelio continuo, la cual entra en contacto con la cavidad peritoneal y dentro de esta se encuentra el líquido bursal cuyo volumen es regulado por las células musculares lisas. Funcionalmente la bursa permite el intercambio de sustancias entre ésta y los vasos sanguíneos ubicados dentro de ella, e impide la salida del líquido hacia el peritoneo (Martin y col, 1981).

FOLICULOGÉNESIS

Los folículos ováricos son la unidad anatómica y funcional del ovario (Yen, 2001), y su crecimiento es regulado por factores como las gonadotropinas, los factores de crecimiento, neurotransmisores y por relaciones intrafoliculares (Hafez y Hafez, 2002).

En la rata el proceso de foliculogénesis da inicio 24 horas después del nacimiento. El grupo de Malamed (1992) observó que entre las 120 y 168 horas postnacimiento, los folículos expresan receptores a FSH y LH, lo que indica que el inicio de la foliculogénesis es independiente de las gonadotropinas. El desarrollo folicular está dividido en dos etapas, la fase folicular y la fase lútea (Hall, 2014).

1) **Fase folicular:** En la mujer, esta fase inicia el primer día de la menstruación y abarca desde el periodo de reclutamiento de los folículos, hasta la aparición y crecimiento del folículo dominante (Hall, 2014), la concentración de LH en la fase temprana de la fase folicular (del día 9 al 14) hacen que el pulso de GnRH se de cada 90 a 100 minutos, a mitad del ciclo esta frecuencia se presenta cada 60 minutos lo cual está relacionado con el feed-back negativo de estradiol que es secretado por los folículos en desarrollo (Hall, 2014), estos procesos hacen que se estimule el crecimiento de los folículos pasando de folículos primordiales a primarios, antrales y preovulatorios (Yen, 2001). En la rata inicia el día del estro (Levine, 2015).

2) **Fase lútea:** En la mujer la fase lútea comienza inmediatamente después de la ovulación y se acelera de forma considerable durante la expulsión del ovocito desde el folículo, el cuerpo lúteo formado involuciona después de 14 días si no se ha producido la fecundación. En la rata, la fase lútea es relativamente corta de 1-2 días, con una escasa secreción de progesterona (Berne y Levy, 2001; Cora, 2015; Levine, 2015).

Folículos Primordiales: Se encuentran localizados en la superficie de la corteza ovárica, debajo de la túnica albugínea (Yen, 2001; Flores-Pérez y col., 2005), presentan un diámetro aproximado de 0.05 mm (Erickson y Shimasaki, 2001), contienen un ovocito I con un núcleo excéntrico (Figura 7), rodeado de células planas o pre granulosa, delimitadas por una membrana basal. En la rata los folículos primordiales se encuentran a razón de 1 por ovario a las doce horas del nacimiento, a las 24 horas se pueden encontrar alrededor de 500 por ovario y 36 horas post-nacimiento los ovarios contarán con un aproximado de 1300 folículos por ovario (Malamed y col., 1992).

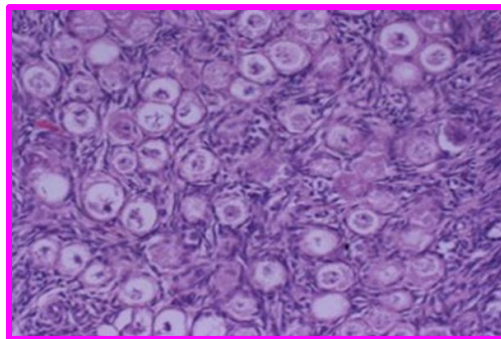


Figura 7. Microfotografía que muestra el folículo primordial, donde las células germinales están rodeadas de células aplanadas (Tomado y modificado www.thinglink.com).

Folículos primarios: Se da un cambio conformacional de las células planas que rodean al ovocito a células cúbicas las cuales reciben el nombre de células de la granulosa (Levin, 2015; Flores-Pérez y col, 2005), al mismo tiempo que estas se desarrollan, se forma una capa homogénea de características retráctiles y acidófilas con alto contenido de glucoproteínas y glucosaminoglucanos llamada zona pelúcida, la cual separa a las células foliculares adyacentes, además provee de nutrientes al ovocito.

Los folículos primarios tienen un diámetro de 60 a 120 μm (Erickson y Shimasaki, 2001) presentan de 2 a 8 estratos de células de la granulosa, estas células secretan estrógenos e inhibina, y en su estrato más externo se encuentran rodeadas por una lámina basal (Figura 8).

En la periferia de la lámina basal, se puede observar la teca folicular, la cual está constituida por células del estroma (Erickson y Shimasaki, 2001).

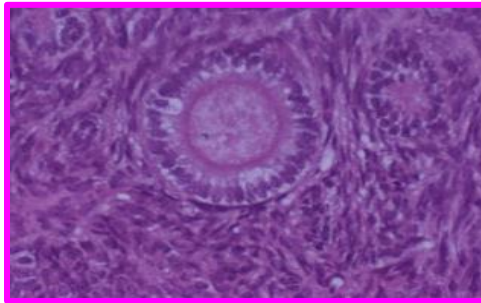


Figura 8. Folículo primario, las células planas periféricas adquieren una conformación cúbica. (Tomado y modificado de www.thinglink.com).

Folículos secundarios o antrales: Presentan de 8 a 10 capas de células de la granulosa, lo que resulta en el incremento del diámetro folicular alcanzando en la mujer, hasta los 16 mm (Erickson y Shimasaki, 2001). Este crecimiento es independiente de FSH o de LH; la comunicación entre el ovocito y las células de la granulosa inducen la liberación de TGF- β (Factor de crecimiento transformante β ,) el cual es el responsable del crecimiento del folículo al estimular la hiperplasia e hipertrofia de las células de la granulosa (Levine, 2015). En la rata los folículos secundarios se pueden apreciar desde el séptimo día después del nacimiento (Irusta, 2008).

Las células de la granulosa forman una población homogénea y presentan receptores a FSH, hormona necesaria para su posterior desarrollo, simultáneamente da comienzo la proliferación de otra capa de células alrededor del folículo originadas del estroma las cuales constituirán la teca folicular, que se asocia a la vascularización del folículo. Conforme la vascularización del folículo avanza, se comienzan a expresar los receptores a LH y con esto la capacidad del folículo de sintetizar hormonas esteroideas (Geva y Jaffe, 2000).

Comienza el desarrollo de las arteriolas que posteriormente irrigarán los capilares de la membrana basal (Strauss y Williams, 2014), la cual es una barrera especializada de la matriz extracelular localizada entre la granulosa y las células de la teca que envuelven al folículo (Rodgers y Rodgers, 2000).

Bajo la influencia de LH, FSH y TGF- β , los folículos adquieren una forma vesicular y empiezan a formarse pequeñas cavidades entre las células de la granulosa, llamadas Cuerpos de Call-Exner, que se llenan con fluido intracelular (Figura 9). Conforme el líquido se acumula, los espacios intracelulares se reorganizan en una cavidad en forma de media luna constituyendo el antro folicular, que contiene líquido rico en ácido hialurónico, esteroides y factores de crecimiento; cuya función es regular a las células de la granulosa alrededor del antro (Hafez y Hafez, 2002).

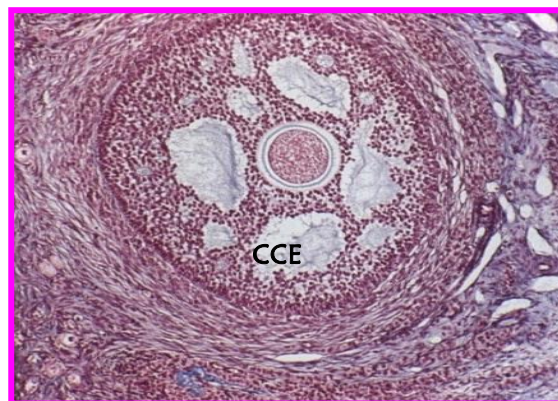


Figura 9. Microfotografía de un folículo secundario antral, donde se pueden apreciar los cuerpos de Call-Exner (CCE) (Tomado y modificado de www.facmed.unam.mx).

Folículo terciario o folículo de Graff: Mediante la proliferación sostenida de las células de la granulosa hasta multiplicarse aproximadamente, unas 600 veces (Yen, 2001). En la mujer los folículos antes de su ovulación alcanzan un tamaño aproximado de 2.5 cm (Levine, 2015) mientras que en la rata estos alcanzan un tamaño superior a las 500 μ m (Peluso y col., 1976).

El aumento de tamaño es debido a la acumulación rápida de líquido folicular, el cual contiene entre otras sustancias, progesterona, la cual es necesaria en la ovulación. La disposición de las células de la granulosa es uniforme excepto en la zona que forma el *cumulus oophorus*, lugar donde se encuentra el ovocito (Hafez y Hafez, 2002).

La formación constante de líquido folicular hace que el *cúmulo oophorus* y la corona radiada se desprendan de la base, haciendo que floten libremente en la cavidad antral, dependiendo de una frágil unión que se encuentra ubicada en la pared del folículo, formando el pedúnculo de fijación constituido por células de la granulosa externa, conforme el volumen del líquido aumenta se adelgaza esta capa de células, por lo que la posición (Figura 10 A) del ovocito es excéntrica (Yen, 2001; Tresguerres y Castillo, 2005; Levine, 2015).

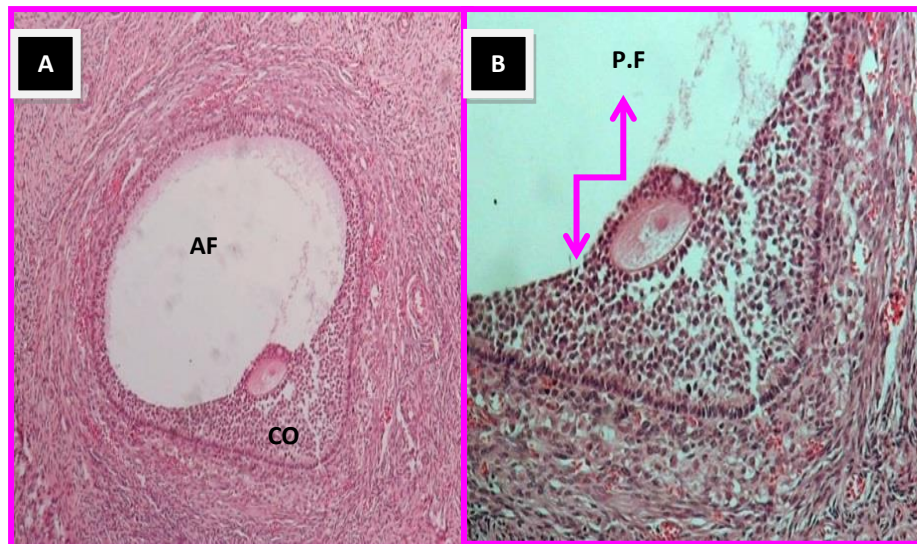


Figura 10. Fotomicrofotografías de un folículo de Graff donde en A: se puede apreciar el *cumulus oophorus* (CO) y el antro folicular (AF). En B se pueden apreciar con mayor detalle las características del cumulus oophorus, así como el pedúnculo de fijación (P.F) (Tomado y modificado de www.facmed.unam.mx).

OVULACIÓN

Una vez que el folículo ha alcanzado el tamaño y el grado de diferenciación adecuado, el “pico” de LH y FSH, resulta en la activación de una serie de eventos que culminan con la rotura y la liberación del ovocito secundario hacia el oviducto (Domínguez y col., 1991; Espey y Richards, 2005). Este proceso puede tomar de 10 a 36 horas dependiendo de la especie. Los eventos regulados por el “pico” preovulatorio de LH son:

1.- La reanudación y culminación de la meiosis I, lo cual da origen al ovocito secundario que inicia la segunda división meiótica hasta la metafase. El ovocito secundario es expulsado al momento de la ovulación y solo reanuda la segunda división meiótica si se lleva a cabo la fecundación.

2.- Incrementa la concentración de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), inhibiendo la proliferación de las células de la granulosa, mismas que sintetizan fibrinolisisina que degrada a los desmosomas presentes en las células de la teca y de la granulosa, así como a las fibras de colágeno en el folículo (Domínguez y col., 1991; Sánchez-Criado, 1999). Los productos de esta lisis son los que provocan las reacciones inflamatorias en el interior del folículo, causando la contracción de las fibras musculares, lo cual produce la rotura de la pared folicular (Domínguez y col., 1991).

3.- Aumenta la concentración de prostaglandinas que disgregan *al cumulus oophorus* y provocan una respuesta pseudoinflamatoria. Las prostaglandinas favorecen la formación del estigma en la teca externa mediante la estimulación de la contracción de las células musculares lisas (Domínguez y col., 1991).

Aunado al aumento en la concentración de LH existen factores parácrinos (esteroides, prostanglandinas, histaminas, activador de plasminógenos, enzimas colagenolíticas y contracción ovárica) y vasculares que regulan el proceso ovulatorio (Botella, 2005).

Después de completar el proceso de ovulación, la pared folicular se colapsa y hay migración de las células tecales al antro folicular, que junto con las células de la granulosa llenaran esta cavidad, comenzando así la formación del cuerpo lúteo que sintetiza progesterona (Domínguez y col., 1991).

ATRESIA FOLICULAR

En la mujer en el comienzo de la ovogénesis se produce una reducción en el número de ovocitos por medio de la apoptosis, por lo que al momento del nacimiento se cuenta con 2 millones de ovocitos primarios, de los cuales al comenzar la pubertad solo quedaran 400 mil, constituyendo la dotación de óvulos potenciales para toda la vida fértil, los cuales se ovularan a razón de uno o en algunos casos dos por mes (Botella, 2005; Berne y Levy, 2006).

La atresia es un proceso normal por el cual se eliminan del ovario todos aquellos folículos que por distintas razones habiendo iniciado el proceso de crecimiento y diferenciación no ovulan, este evento puede presentarse en cualquier estadio del desarrollo folicular, tanto en la vida fetal, prepuberal, puberal y en la vida adulta (Greenwald y Roy, 1994).

Se pueden distinguir dos tipos de atresia folicular: **1) Tipo A:** involucra a la necrosis, con cambios en el ovocito y en la zona pelúcida, las alteraciones en la zona pelúcida y en las células de la granulosa son consideradas como secundarias. **2) Tipo B:** degeneración de las células de la granulosa sin que haya cambios en el ovocito y en la zona pelúcida (Greenwald y Roy, 1994).

En el ovario existen diversos factores que se encargan de regular este proceso. Hay factores atretogénicos, es decir, que llevan al folículo a la atresia, como los andrógenos, GnRH-like, interleucina- 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), y se activan en función del estadio en el cual se encuentran los folículos (Flores-Pérez y col., 2005; Kapia y Hsueh, 1997).

También se encuentran los factores antiatrétogenicos que rescatan a los folículos dependiendo del grado de atresia que presenten, entre los cuales se encuentran las gonadotropinas, los estrógenos, factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento neural (NGF), factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-I) así como el factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF) (Braw y Tsafirri, 1980, Gougeon, 2004).

La muerte del ovocito, es el evento que conduce a la apoptosis de las células de la granulosa, lo que resultará en el fenómeno de atresia folicular, este efecto es logrado mediante la comunicación que existe entre el ovocito y las células de la granulosa, en el cual participan factores como el GDF-9 (Factor de crecimiento y diferenciación), derivado de la TGF- β /Activina, que son producidos por el ovocito de los folículos primarios, el cual le permite seguir su crecimiento, pero no su desarrollo (Ojeda y Skinner, 2006).

Las alteraciones subsecuentes incluyen la pérdida de los receptores de FSH y LH en las células de la granulosa, por lo cual se vuelve incapaz de aromatizar los andrógenos, haciendo que estos aumenten en la periferia del folículo, así mismo las células de la teca también pierden esta capacidad, pero mantienen la síntesis de progesterona y de AMPc (Domínguez y col., 1991).

Se han dictaminado diversos criterios para establecer el grado de atresia (Figura 11) que presentan los folículos (Hsueh y col., 1994).

- ☼ **Atresia I:** Se encuentran núcleos picnóticos en las células de la granulosa.
- ☼ **Atresia II:** El líquido folicular presenta restos celulares.
- ☼ **Atresia III:** Fragmentación del ovocito, hipertrofia de las células de la teca interna y pocas células de la granulosa.

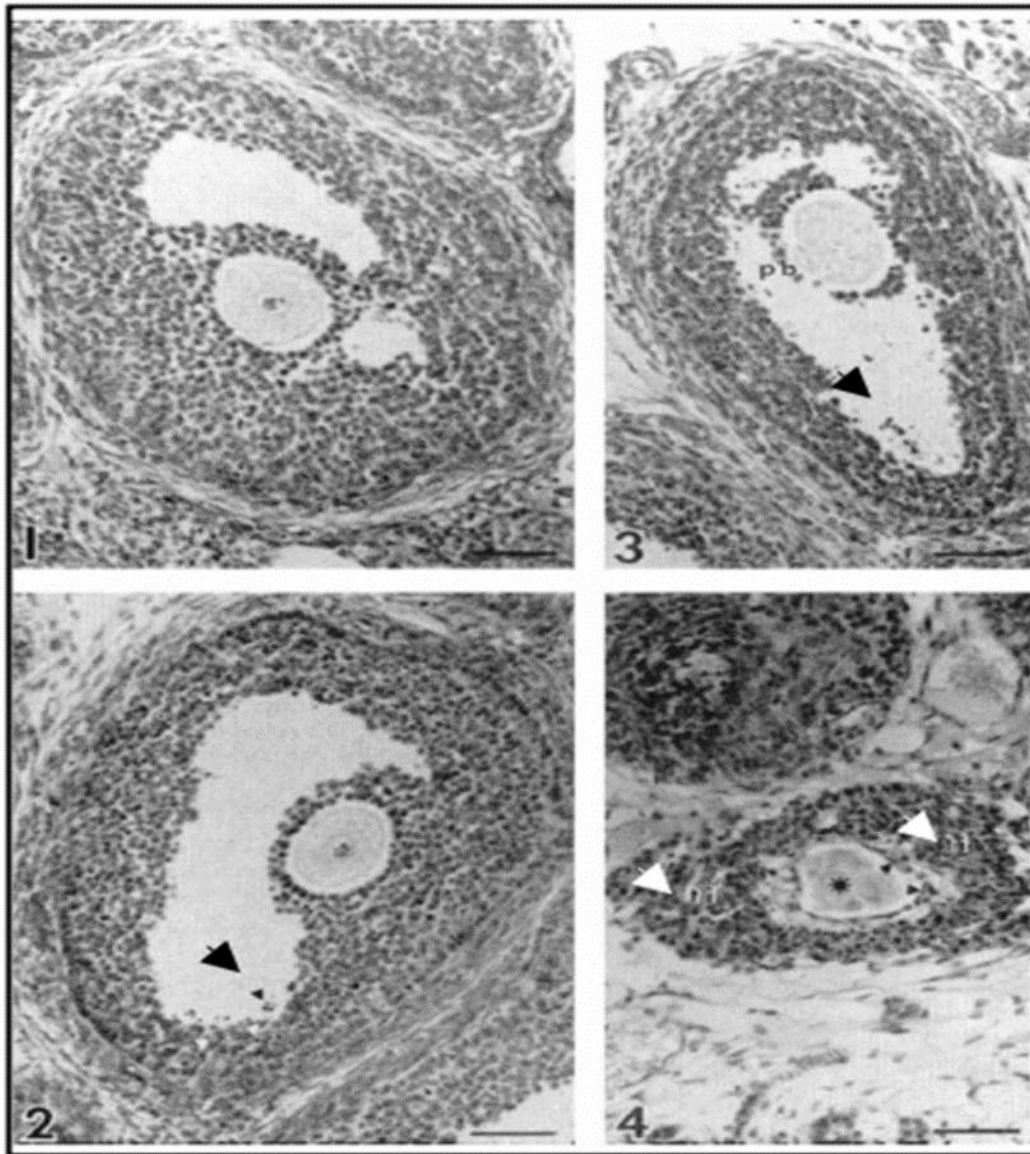


Figura 11. Microfotografías de cortes histológicos de rata que muestran los diferentes grados de atresia folicular. **1.-**muestra un folículo ovárico sano. **2.-** folículo en atresia grado I donde las células de la granulosa presentan núcleos picnóticos, la flecha señala indicios de descamación . **3.-** folículo en atresia grado II las flechas señalan restos celulares en el antro folicular .**4.-** se muestra un folículo con atresia grado III, donde el asterisco indica la fragmentación del ovocito, las flechas indican la hipertrofia de las células tecales, las células de la granulosa son poco visibles y el folículo se encuentra colapsado. Las barras inferiores indican una escala de 50 μ m (Tomado y modificado de Irusta,2008).

ESTEROIDOGÉNESIS

La función reproductiva es regulada por las hormonas esteroideas sintetizadas por las gónadas, las adrenales, el cerebro y la placenta. Las hormonas esteroideas son responsables del desarrollo y la manutención de los caracteres sexuales secundarios (Gómez-Chang y col., 2012).

El colesterol es la molécula limitante en la síntesis de hormonas esteroideas. Su estructura consta de 27 átomos de carbono, los cuales forman una estructura de cuatro anillos fusionados a los cuales se les denomina ciclopentanoperhidrofenantreno, posee una cadena lateral formada por ocho átomos de carbono, que están insertos en el carbono 17 (Figura 12), lo cual hace que se clasifiquen como esteroides (Yen, 2001).

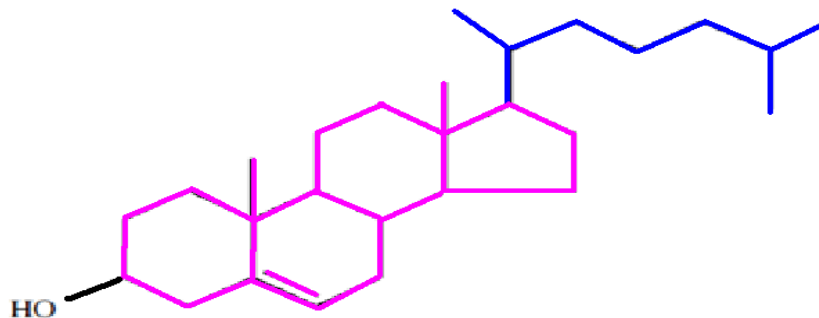


Figura 12. Muestra la estructura química del colesterol; formada por el ciclopentanoperhidrofenantreno y la cadena lateral de 8 átomos de carbonos, (Tomada y modificada de Saavedra y col., 2012).

El proceso esteroideogénico depende de la demanda aguda o crónica (como en cerebro y placenta) por parte del organismo. En las gónadas y en las adrenales la respuesta es aguda, por lo que la internalización del colesterol para su conversión en pregnenolona se lleva a cabo en minutos (Gómez-Chang y col., 2012).

En los ovarios, tres son los tejidos capaces de llevar a cabo la esteroideogénesis. **1)** Las células de la granulosa son secretoras de estrógenos. **2)** Las células de la teca y la glándula intersticial son secretoras de testosterona y androstenediona, y **3)** los cuerpos lúteos secretores de progesterona (Hu y col., 2010).

De acuerdo a Hu y colaboradores (2010) estos tejidos pueden obtener colesterol a partir de tres fuentes:

1. Del que se sintetiza de *novo* a partir del acetato.
2. Obtenido a través de proteínas de baja densidad (LDL) y de proteínas de alta densidad (HDL), que se encuentran en el torrente sanguíneo. El uso de LDL o HDL depende de la especie, en la rata la fuente de colesterol más utilizada es a partir de HDL, vía la activación del receptor SR-BI (Scavenger receptor class B member 1).
3. De la hidrólisis de esteres de colesterol que se encuentran almacenados en forma de gotas lipídicas.

La esteroidogénesis se inicia por el estímulo de mensajeros primarios, los cuales pueden ser de naturaleza hormonal, como lo son la FSH y LH que tienen receptores membranales en las células de la granulosa y teca respectivamente. Estos receptores están formados por siete dominios transmembranales y se acoplan a proteínas G (Gómez Chang y col., 2012; Strauss y Williams, 2014).

Una vez que FSH y LH se unen a su receptor, desencadenan una cascada de señalización (Figura 13) donde estas, como primeros mensajeros tendrán una interacción con los receptores de los siete dominios transmembranales de las proteínas G, a partir del cual se activa adenilato ciclasa y cataliza la formación de AMPc intracelular a partir de adenosín trifosfato (ATP). El AMPc actúa como un segundo mensajero y activa a las proteínas cinasa (PKA), estas fosforilan a la proteína de regulación esteroidogénica aguda (StAR) que transporta el colesterol hacia la mitocondria y promueve la esteroidogénesis en el ovario (Gómez-Chang y col., 2012).

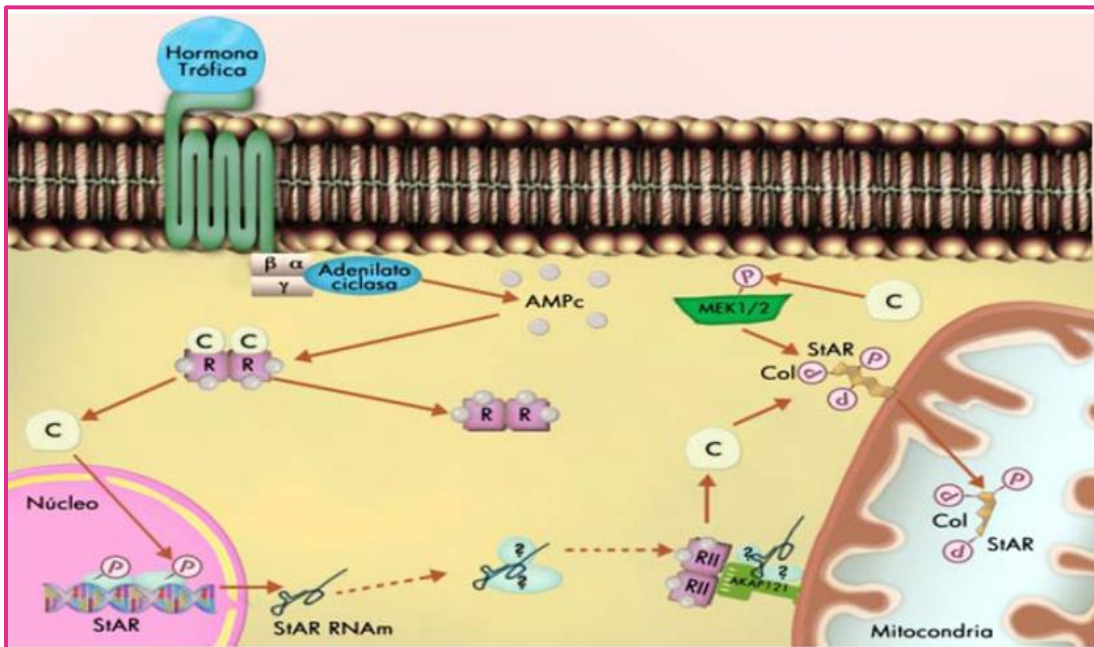


Figura 13. Muestra la regulación de la esteroidogénesis. La activación de receptores acoplados a proteínas G y de la vía mediada por AMPc-PKA produce la fosforilación de la proteína StAR o de factores de la transcripción, donde C: colesterol, R: receptor, P: fósforo (Tomado y modificado de Gómez-Chang y col., 2012).

Una vez que el colesterol se encuentra dentro de la mitocondria, se inicia su conversión a pregnenolona por acción del complejo P450scc formado por una flavoproteína, una ferredoxina y el citocromo P450. Este complejo se localiza al interior de la membrana mitocondrial donde cataliza tres reacciones (20 α - hidroxilación, 22 hidroxilación y una escisión de la unión carbono-carbono 20, 22) que convierten el colesterol a pregnenolona, la cual es limitante en la producción de hormonas esteroideas (Hu y col, 2010).

La pregnenolona es liberada hacia el retículo endoplásmico en donde puede seguir dos vías.

- 1) **Vía $\Delta 4$** , esta ruta se lleva a cabo preferentemente en el cuerpo lúteo, aquí la pregnenolona es convertida a progesterona, por acción de la enzima 3 β hidroxisteroide deshidrogenasa (3 β -HSD); después por acción de la 17 α -hidroxilasa la progesterona es convertida a 17 α -hidroxiprogesterona, esta es transformada por la 17, 20 liasa en androstenediona, que es el precursor de los andrógenos y estrógenos (Hu y col, 2010).

2) *Vía $\Delta 5$* , se lleva a cabo preferentemente en los folículos. En las células de la teca, la pregnenolona es biotransformada a 17 α -hidroxipregnenolona por la enzima 17 α -hidroxilasa, después la 17 α -hidroxipregnenolona es convertida en progesterona por acción de la 3 β -HSD y por acción de la 17, 20 liasa puede ser convertida a dehidroepiandrosterona (DHEA). La 3 β -HSD también cataliza la formación de DHEA en androstenediona, androstenediol (Figura 14) y testosterona (Yen, 2001).

En las células de la teca, se encuentra presente el complejo P450c17, formado por las enzimas 17 α -hidroxilasa y 17, 20 liasa, las cuales facilitan la producción de andrógenos (Tresguerres, y Castillo, 2005). En las células de la granulosa se lleva a cabo la aromatización de los andrógenos a estradiol mediante la acción de la enzima CYP19 aromatasa, la cual se encuentra en grandes cantidades en las células de la granulosa (Tresguerres y Castillo, 2005).

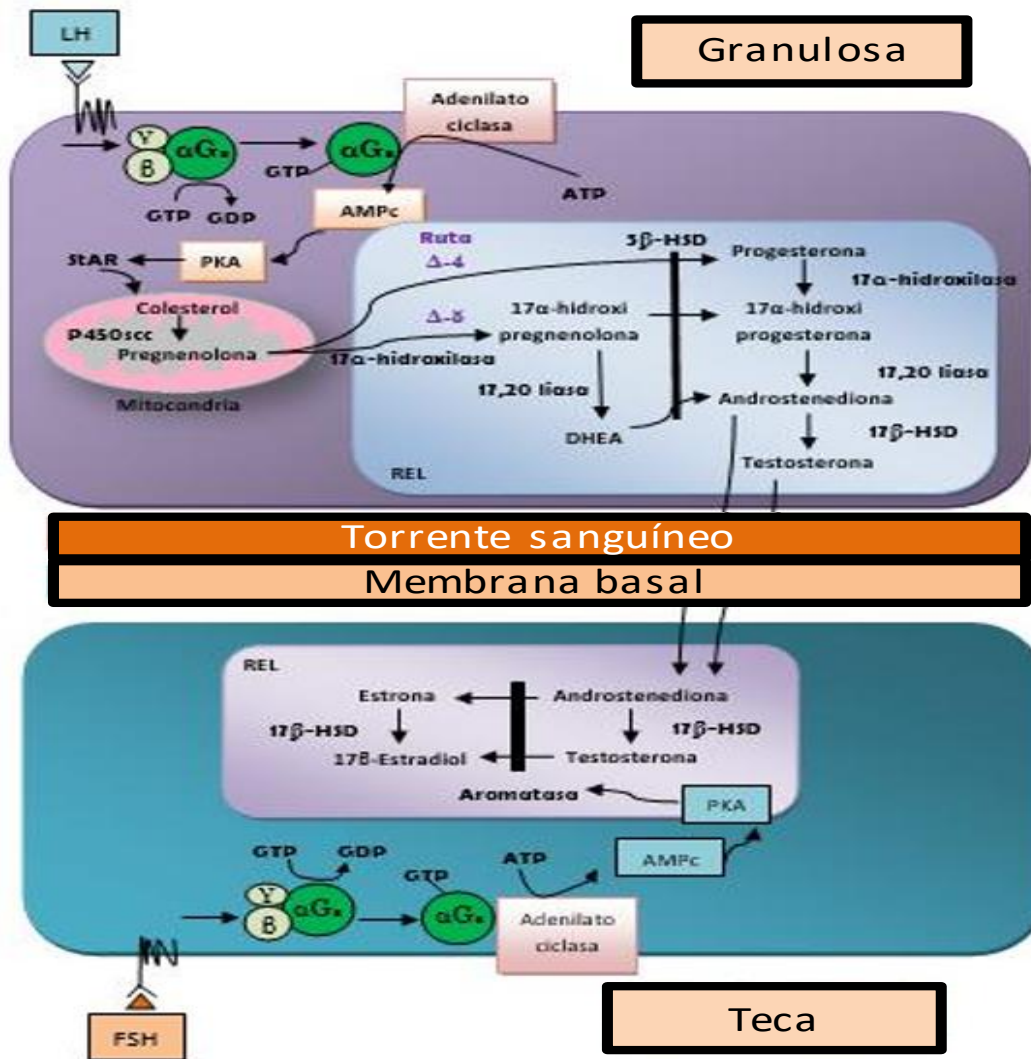


Figura 14. Esquema que muestra la biosíntesis de hormonas esteroideas llevada a cabo por la interacción de las células de la granulosa y de la teca, donde **LH**: hormona luteinizante, **FSH**: hormona folículo estimulante, **GTP**: trifosfato de adenosina, **GDP**: difosfato de guanosina, **ATP**: adenosín trifosfato, **AMPc**: monofosfato de adenosina cíclico, **PKA**: proteína cinasa A, **REL**: retículo endoplásmico liso, **Star**: proteína de la regulación esteroideogénica aguda, **3β-HSD**: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, **DHEA**: dehidroepiandrosterona, **17β-HSD**: 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, **P450_{scc}**: citocromo P450 de escisión de la cadena lateral de colesterol (Tomado y modificado de Ayala-Martínez, 2017).

INERVACIÓN OVÁRICA

La inervación ovárica consta de un componente simpático, uno sensorial y una pequeña proporción de fibras parasimpáticas. El soma de las neuronas simpáticas que inerva a los ovarios esta localizado en el cerebro o en los núcleos espinales de los ganglios periféricos y tiene dos vías de entrada (Dissen y Ojeda, 1999), las cuales son:

Nervio ovárico superior (NOS): Este nervio está asociado con el ligamento suspensorio del ovario, por sus fibras transcurren neurotransmisores como noradrenalina (NA), péptido intestinal vasoactivo (VIP) y neuropéptido Y (NPY) (Greiner y col, 2005). Inerva la vasculatura ovárica, las células de la teca, la glándula intersticial (Gerendai y col, 2000), el útero y el oviducto (Dissen y Ojeda, 1999).

Nervio del plexo ovárico (NPO): Esta vía corre junto con la vena y la arteria ovárica y lleva fibras sensoriales que contienen sustancia P (SP), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), así como fibras que contienen NPY y NA. Inerva la bursa, el oviducto, los cuernos uterinos, además de la médula, la región cortical del ovario y las paredes foliculares (Dissen y Ojeda, 1999; Fernandois y col, 2014).

Inervación parasimpática: Las fibras nerviosas parasimpáticas tienen origen en el tronco encefálico, en los pares craneales III (oculomotor), VII (facial), IX (glossofaríngeo) y X (vago) así como en la región sacra, en el II y III nervio sacro. Las funciones del sistema parasimpático se encuentran controladas por núcleos del hipotálamo medial y anterior. El nervio vago es el de distribución más amplia, con el 75 % de la actividad parasimpática (Gomes, 2005).

El nervio vago está formado por fibras de naturaleza parasimpática (Burden y Lawrence, 1977) por donde transcurren neurotransmisores como SP, CGRP, VIP, gastrina, somatostatina y acetilcolina (Ach) (Klein y Burden, 1988). El soma de las neuronas que inervan los ovarios proviene del ganglio nodoso, e inerva la vasculatura ovárica (Dissen y Ojeda, 1999).

El ovario también presenta inervación intrínseca. Burden (1978) describieron la presencia de células en el interior del ovario a las que denominaron células ganglionares, las cuales se encuentran formando el plexo ganglionar.

Winterhalter (1986) describió en la mujer, un grupo de neuronas que se encontraban formando ganglios en la médula del ovario. En los ovarios de ratas de la cepa Wistar se observó la presencia de neuronas intrínsecas, sin embargo, en las cepas Sprague- Dawley y Long Evans no fueron identificadas (D´Albora y col, 2000), por lo que se sugiere que la presencia de estas neuronas es dependiente de la cepa. Dees y colaboradores (1995) reportaron que las neuronas encontradas en los ovarios de monos son inmunoreactivas a la tirosina hidroxilasa (TH), lo que indica que son fibras de naturaleza catecolaminérgica.

REGULACIÓN NEUROENDÓCRINA DEL EJE HIPOTÁLAMO HIPÓFISIS OVARIO

Las funciones del ovario son reguladas por el sistema endocrino y el sistema nervioso. El componente endócrino esta dado por el eje H-H-O (Hafez y Hafez, 2000) donde en el hipotálamo de la mujer existen alrededor de 1000 neuronas secretoras de GnRH, las cuales son el medio por el cual el sistema nervioso central (SNC) controla la secreción de las gonadotropinas (Trujillo y col., 2015).

La GnRH es un decapeptido con una vida media de 10 minutos con un patrón de secreción pulsátil intrínseco (Yen, 2001) producido por un grupo de neuronas hipotalámicas que se originan en la placa olfatoria, donde migran hacia las áreas rostrales del diencefalo incluyendo el órgano vasculoso de la lámina terminal, el área preóptica hipotalámica anterior (POA-AHA) y los núcleos ventromedial y arcuato del hipotálamo (Trujillo y col., 2015).

La GnRH se libera en las terminales axónicas de las neuronas GnRHérgicas, localizadas en la eminencia media, hacia el sistema porta hipotalámico hipofisario, donde se une a receptores específicos de alta afinidad localizados en la membrana plasmática de los gonadotropos y favorece la secreción de LH y FSH (Trujillo y col., 2015).

La secreción de FSH y LH se encuentra regulada por mecanismos de retroalimentación tanto positivos como negativos ejercidos a nivel del eje H-H-O (Tresguerres y Castillo, 2005).

En los folículos, la FSH estimula a las células de la granulosa para inducir la secreción de inhibina, la cual aumenta en la fase folicular, alcanzando su máximo junto con la LH, evento que como consecuencia frena la producción de FSH (Trujillo y col., 2015).

Después de culminar la ovulación, la secreción de inhibina alcanza concentraciones más altas que en la fase folicular, lo cual hace que en el ovario se suprima la síntesis de andrógenos dependientes de gonadotropinas, sin embargo, la activina actúa como antagonista de la inhibina y en los folículos incrementa la unión de FSH a las células de la granulosa y el estímulo para la aromatización y secreción de inhibina (Trujillo y col., 2015).

En células tecales la activina e inhibina regulan la síntesis de andrógenos, así, inhibina aumenta el poder estimulante de LH mientras que activina lo inhibe (Trujillo y col., 2015). Activina suprime la producción de progesterona en células de la granulosa e inhibe así su luteinización, además también incrementa la acción de FSH al inducir la formación de los receptores a LH en las células de la granulosa, y tiene una acción similar a la de inhibina, ya que frena la liberación de FSH hipofisiaria (Trujillo y col., 2015).

SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO

Desde la época de Hipócrates, Soranus y Efesus se han descrito a varias mujeres de aspecto masculino y robusto, las cuales no menstruaban y no podían quedar embarazadas (Ciotta y Stracquadio, 2015). En 1844 Chéreau describe la existencia de cambios escleroquisticos en el ovario (Gasol, 2005). En 1935 Stein- Leventhal describen en siete mujeres la presencia de amenorrea, hirsutismo, obesidad, y la característica de quistes en los ovarios, hoy en día esta caracterización es conocida como SOPQ.

Este síndrome se presenta en mujeres en edad reproductiva y debido a lo complejo de su fisiopatología se han realizado diversos consensos con el fin de definir su diagnóstico. Para 1990, el primer intento por consolidar una definición clínica del síndrome fue hecha por el Instituto Nacional de la Salud (NIH), donde por principio define al SOPQ como la presencia

simultánea de hiperandrogenismo (clínico o bioquímico) y disfunción menstrual, así como la exclusión de otras causas de hiperandrogenismo como las disfunciones tiroideas, la hiperplasia adrenal congénita, la hiperprolactinemia, tumores secretores de andrógenos y el Síndrome de Cushing (Gasol, 2005; Luján y col., 2006; Bremer, 2010).

El siguiente consenso fue en Rotterdam en el año 2003, donde se establece que se requiere la presencia de dos de los siguientes tres criterios: 1) hiperandrogenismo clínico o bioquímico, 2) disfunción ovulatoria (oligo o anovulación) y 3) evidencia ultrasonográfica de ovarios poliquísticos (Gasol, 2005; Bremer, 2010) generando controversia porque permite diagnosticarlo en usencia del exceso de andrógenos o de las irregularidades menstruales (Luján y col., 2006).

La Sociedad del exceso de andrógenos y Síndrome de ovario poliquístico (AES-PCOS) en el 2009 propone un nuevo esquema para la caracterización del síndrome donde se establece como factor principal el hiperandrogenismo clínico o bioquímico, el cual ahora puede estar acompañado de oligomenorrea u ovarios poliquísticos (Azziz y col., 2009; Luján y col., 2006).

Es muy difícil establecer la prevalencia del SOPQ ya que depende mucho de los criterios utilizados, si se toman en cuenta los criterios del 2003 se tendría un número mayor de mujeres diagnosticadas con el SOPQ (Gasol, 2005). El criterio hoy en día utilizado es el dictaminado por la AES-PCOS, donde de acuerdo a esto la incidencia en diferentes poblaciones se encuentra entre el 3 y 7% de mujeres en edad reproductiva, de la cuales del 60 al 80 % presenta el hiperandrogenismo, mientras que para México la prevalencia se estima en un 6% (Moran, 1994; Azziz, 2009; Morán, 2010).

El síndrome es una fisiopatología multifactorial y poligenética (Figura 15), con una heredabilidad aproximada del 70%, ya que el 35% de las madres y el 40% de las hermanas que presentan SOPQ lo heredaran a sus hijas (Ciotta y Stracquadanio, 2015).

Estudios recientes, han demostrado que existe una mayor prevalencia en mujeres homosexuales que en heterosexuales, lo cual podría sugerir que el hiperandrogenismo de estas pacientes podría determinar su orientación sexual (Agrawal y col, 2004).

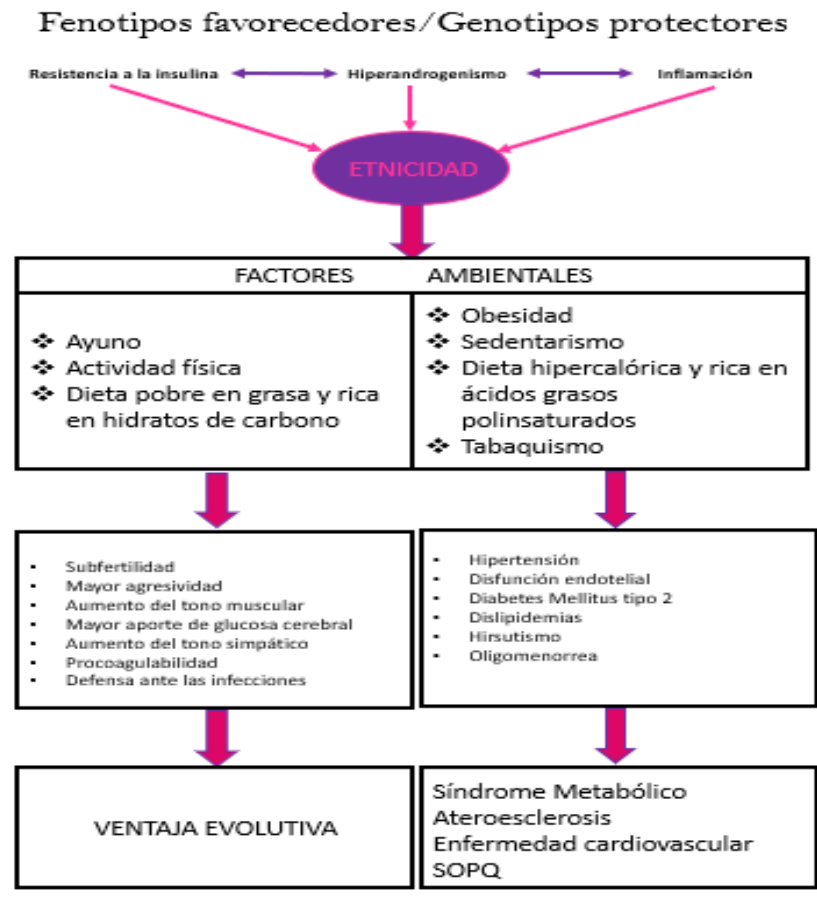


Figura 15. Esquema que muestra el carácter multifactorial y genético del SOPQ (Tomado y modificado de Gasol, 2015).

HIPÓTESIS SOBRE EL ORIGEN DEL SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO

A pesar de que se han descrito los criterios de diagnóstico que caracteriza al SOPQ y que se han aplicado diversas técnicas terapéuticas para su tratamiento, hasta el momento se desconoce su etiología.

Diversos autores han planteado distintas hipótesis para poder explicar su origen, dentro de las cuales las más aceptadas son las siguientes:

Disfunción Neuroendócrina: En esta hipótesis se plantea el aumento en los pulsos de secreción de GnRH, lo que favorece el incremento en la secreción de LH, que resulta en la estimulación de la secreción de andrógenos por las células tecales del ovario, llevando a una condición de hiperandrogenismo. Por otro lado, la concentración de FSH no se modifica o tiende a disminuir (Yen y col, 1970; Morales y col., 1996; Gasol, 2005; Matalliotakis y col., 2006).

Insulinorresistencia: En las mujeres que presentan el SOPQ, se da una resistencia a la insulina, mecanismo que es único en el síndrome ya que es independiente de la intolerancia a la glucosa, así como de las concentraciones de insulina presentes en el organismo y de la cantidad de la grasa corporal (parámetros que si están reportados en los desórdenes metabólicos) (Dunaif y col, 1995).

El origen de esta insulinorresistencia no se encuentra en un defecto congénito del receptor de la insulina, si no en un evento post-receptor, lo que conlleva a una fosforilación de la serina, que resulta en la disminución en la actividad de la tirosina cinasa, por lo tanto, la señal de la insulina no es reconocida por los órganos diana y la glucosa no puede ser internalizada (Dunaif y col, 1995).

En el ovario la insulina actúa por diferentes vías **1)** actúa de manera sinérgica con la LH, **2)** estimula a su receptor en las células tecales y del estroma ovárico, **3)** incrementa la síntesis del Factor de Crecimiento semejante a la insulina I (IGF-1) **4)** utilizan receptores híbridos IGF-1. La insulina induce incremento en la síntesis ovárica de andrógenos, ya que aumenta la actividad de la enzima P450 17 α , que incrementa la acción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en la adrenal, produciendo la síntesis elevada de andrógenos por la zona reticular. Por otra parte, esta insulinorresistencia bloquea la síntesis hepática de la proteína transportadora de hormonas sexuales (SHBG) y ello incrementa la concentración de andrógenos libres (Caro y col, 2002).

Ovárica: Se postula que incrementan las concentraciones de andrógenos en respuesta a la mayor actividad del complejo enzimático P450_{scc}, así como de la enzima 3 β -HSD en las células tecales, las cuales están hipertrofiadas. Aumenta el número de folículos primarios mientras que los primordiales se encuentran en poca cantidad y se observa incremento en la tasa de atresia folicular (Salehi y col., 2004, Matalliotakis y col., 2006, Dumesic y col., 2007; Bremer, 2010).

Inervación: En roedores la inducción del SOPQ por la inyección de valerato de estradiol (VE), un estrógeno de larga actividad, incrementa en el ovario la expresión del Factor de Crecimiento Neural (NGF) y su receptor de baja afinidad p-75 (Sotomayor- Zárate y col., 2008), este receptor al unirse al NGF en la terminal simpática del NOS produce una cascada de señalización que al llegar al ganglio celiaco mesentérico superior (GCMS), provoca un aumento en la actividad de la TH, enzima limitante en la síntesis de catecolaminas, lo que resulta en el incremento en la concentración de NA, la cual viaja por el NOS hacia el ovario (Lara y col., 2000).

Las estructuras productoras de andrógenos en el ovario (las células de la teca y la glándula intersticial) se encuentran inervadas por el NOS, por el cual transcurren altas concentraciones de NA (6 veces la concentración normal). La NA tiene efecto mitogénico que culminará con una sobreproducción de andrógenos (Seya y col., 2006; Li y col., 2007) y la consecuente formación de quistes foliculares y anovulación (Barria y col., 1993; Lara y col., 1993; Paredes y col., 1998).

Stener Victorin y colaboradores (2000, 2003), mostraron que en ratas con SOPQ (inducido con VE) la electroacupuntura de baja frecuencia (2 hertz) disminuye la expresión del NGF y restablece la morfología ovárica, donde se observan cuerpos lúteos, indicativos de nuevas ovulaciones. Mannerás y colaboradores (2009) mostraron que en ratas con SOPQ inducido con dihidrotestosterona (DHT) y sometidas a sesiones de electroacupuntura de baja frecuencia (2 hertz), reduce la expresión de los genes que codifican para el NGF lo que se traduce en una morfología ovárica normal y recuperación de la ovulación.

Estas evidencias indican que la hiperactividad de las fibras simpáticas son participes en el desarrollo del SOPQ.

En ratas con el SOPQ la disminución del tono simpático por la sección bilateral del NOS restablece la ovulación, mientras que la sección unilateral lo hace solo en el ovario inervado. Evidencias que permiten sugerir que el síndrome no sólo es el resultado de un mayor actividad de las fibras simpáticas (Morales- Ledesma y col., 2010). Por otro lado, la vagotomía unilateral o bilateral restablece la ovulación en ambos ovarios (Linares y col., 2013).

MODELOS DE INDUCCIÓN DEL SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO

Con el fin de entender la fisiopatología de SOPQ se han utilizado diversos modelos animales, entre los que se incluyen roedores, ovejas y primates. Sin embargo, los roedores ofrecen una alternativa efectiva debido a su constante reproducción y a su corto ciclo de vida, además permiten la posibilidad de controlar los factores ambientales en los que permanecen (Franks, 2009).

La capacidad reproductiva de los roedores es similar a la de la mujer, en cuanto a los procesos que involucran al eje H-H-O y aquellos que regulan el desarrollo de los folículos y la ovulación (Walters y col, 2012).

Dentro de los modelos hormonales que se utilizan para inducir el SOPQ se tiene la exposición a diferentes andrógenos como la testosterona, la androstenediona, la dihidrotestosterona, dehidroepiandrosterona y los tratamientos con propionato de testosterona (Walters y col, 2012), sin embargo, estos modelos provocan alteraciones metabólicas más que reproductivas. Los estrógenos utilizados como inductores del SOPQ son el benzoato de estradiol y el VE. También se han usado para inducir el síndrome inhibidores de las aromatasas o las antiprogestinas (Walters y col, 2012).

Por otro lado, los cambios en la etología de los roedores también pueden ser utilizados como modelos de inducción del SOPQ y entre ellos se encuentran el cambio en el fotoperiodo (Walters y col, 2012), el estrés por frío o por restricción de movimiento (Paredes y col, 1998).

Cada uno de los modelos presenta ventajas y desventajas, sin embargo ninguno ofrece un panorama clínico idéntico al que presenta una mujer con la patología. De todos los modelos utilizados, el que mejor reproduce las características observadas en mujeres con SOPQ, es la inyección de VE que en roedores resulta en el desarrollo de hiperandrogenismo, incremento de LH, alteraciones del ciclo estral y presencia de quistes foliculares en los ovarios (Walters y col, 2012).

VALERATO DE ESTRADIOL

La salud reproductiva de los animales se puede ver comprometida en su estadio adulto por diferentes factores ambientales (como el estrés, los cambios en la exposición a los periodos de luz/obscuridad) los cuales se pueden activar en diferentes estadios del desarrollo animal, cambios que están regulados por el eje H-H-O. La exposición de estrógenos ocasiona desajustes en la función endócrina, lo que conlleva a una disminución en la fertilidad en los animales (Davies y Norman, 2002).

La inyección de una dosis de 2mg de VE, incrementa en el ovario la expresión del NGF y su receptor de baja afinidad p-75 (Lara y col., 2000; Sotomayor-Zárate y col., 2008) lo que ocasiona pérdida de la ciclicidad estral, cornificación vaginal persistente, cambios en la morfología de los ovarios haciéndolos más pequeños, sin presencia de cuerpos lúteos nuevos, además de encontrarse una población reducida de folículos secundarios también se encuentra la presencia de quistes foliculares, en los cuales se distingue un adelgazamiento de las capas de células de la granulosa y un engrosamiento en las células de la teca (Brawer y col., 1986).

SÍNTESIS Y LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA

La ACh fue el primer neurotransmisor caracterizado en el sistema nervioso de los mamíferos. Este neurotransmisor participa en la regulación de las funciones de activación cortical, el paso de sueño a vigilia y en los procesos de memoria y asociación. En el cerebro de los mamíferos, el efecto más importante de la ACh es una reducción de la permeabilidad del K^+ de tal forma que las neuronas son más susceptibles a las influencias excitatorias (Flores y Segura, 2005).

Síntesis: La síntesis implica la unión de la colina (Figura 16) con la acetilcoenzima A, en una reacción que es catalizada por la acción de la enzima acetil-colintransferasa (ChAT), esta enzima se encuentra fijada laxamente a las vesículas sinápticas y en presencia de sales en concentraciones fisiológicas, la mayor parte de la enzima se solubiliza y permanece en el citoplasma. Ésta enzima es sintetizada en el soma de las neuronas colinérgicas y migra a las terminaciones nerviosas por transporte axonal anterógrado (Rothlin, 2003).

La colina, es proveniente de fuentes exógenas, su producción proviene de la captación presináptica, obtenida de la propia hidrólisis del transmisor y una fuente menor es la que se obtiene a través de los fosfolípidos, en concreto de la fosfatidilcolina. Esta colina será incorporada a los botones terminales presinápticos, por un sistema de transporte de sodio-ATP. En la recaptura del neurotransmisor también es liberada colina, que será usada de nuevo para la síntesis de ACh, por lo que la recaptura de colina se considera que es el paso limitante en la síntesis de ACh (Rothlin, 2003; Goodman y Gilman, 2012).

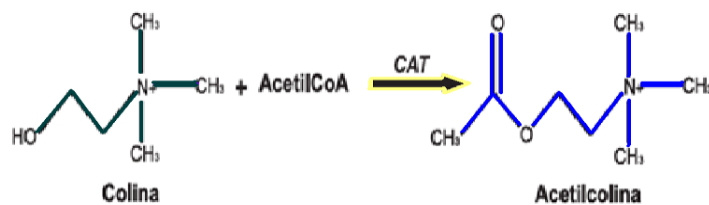


Figura 16. Muestra la síntesis de la ACh a partir de colina (Tomado y modificado de Flores y Segura, 2005).

Almacenamiento: La ACh se almacena en las vesículas sinápticas de las terminales nerviosas que contienen proteínas ácidas (vesiculina) y ATP, aunque también se encuentra laxamente unida en la cara externa de la vesícula (Rothlin, 2003).

Liberación: En las terminales colinérgicas el neurotransmisor es sintetizado en el citoplasma (Figura 17), de donde puede ser liberado directamente en la hendidura sináptica, o bien ser transportada al interior de las vesículas sinápticas para ser liberada por exocitosis. En este proceso la ACh contenida en las vesículas es liberada al exterior al fusionarse con la membrana de la terminal presináptica. Esto permite la inducción de cambios bioquímicos y eléctricos en la célula postsináptica, que dependen del tipo de receptor y de la forma en la que este se encuentre sincronizado con los sistemas de transducción (Flores y Segura, 2005)

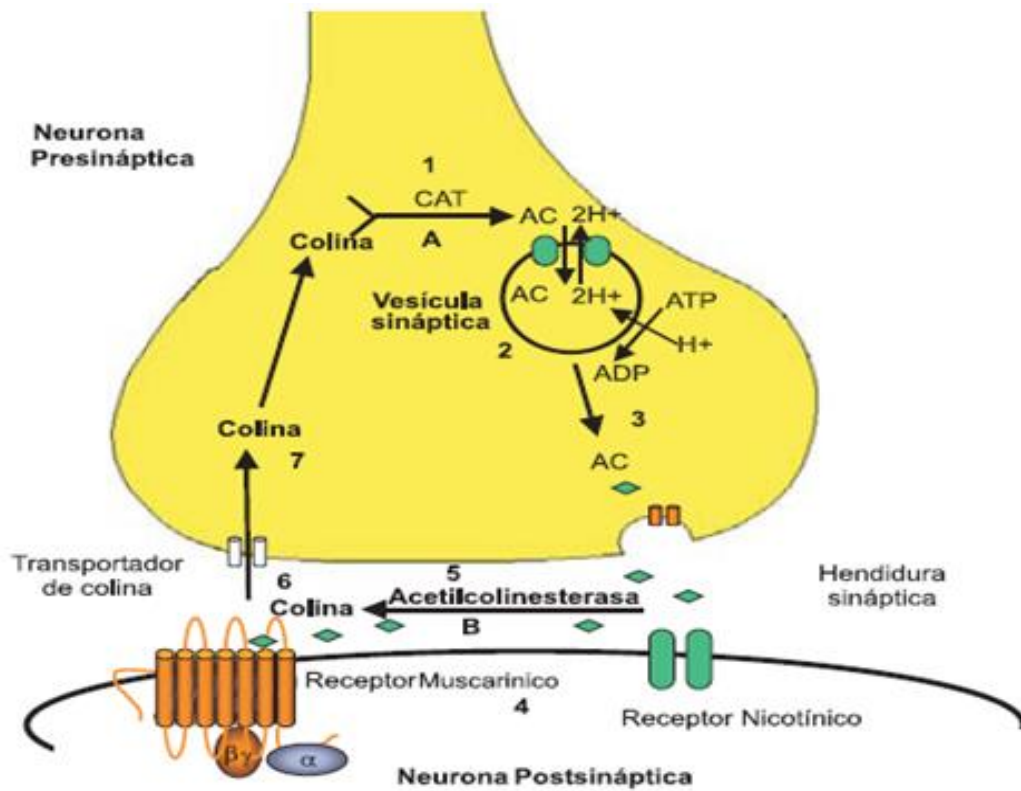


Figura 17. Esquema que representa la sinápsis colinérgica (Tomado y modificado de Flores y Segura, 2005).

RECEPTORES A ACETILCOLINA

Los efectos de la ACh son mediados por dos tipos de receptores 1) nicotínicos que permiten la apertura de canales iónicos 2) muscarínicos que se encuentran acoplados a proteínas G (Flores y Segura, 2005).

Los receptores nicotínicos son sensibles a la activación por nicotina y su actividad es inducida en microsegundos, poseen un sitio de unión para el neurotransmisor y transmiten la señal hacia el interior de la célula. Estos receptores pueden dividirse en dos grupos:

- 1) **Neuromusculares o Periféricos:** Estos se encuentran constituidos por dos subunidades $\alpha 1$, una $\beta 1$ y una subunidad δ , donde los sitios de unión a la acetilcolina se encuentran en la subunidad α , la cual contiene residuos de cisteína próximos entre sí y son necesarios para el reconocimiento del agonista.
- 2) **Neurales o Centrales:** Se encuentran constituidos solamente por subunidades α y β , las subunidades neurales más abundantes son la $\alpha 2$, $\beta 2$ y $\alpha 7$, donde el subtipo de receptor heteromérico $\alpha 4\beta 2$ comprende más del 90% de todos los receptores neurales nicotínicos (Picciotto y col., 2001).

En los receptores nicotínicos las cinco subunidades forman un poro, el cual al unirse con la ACh provoca la apertura del canal, permitiendo así la entrada de Na^+ y K^+ , a favor del gradiente de concentración, trayendo como resultado la despolarización de la membrana (Albuquerque y col, 2009),

Los receptores muscarínicos están presentes en diversos órganos (Figura 18) y tejidos periféricos, así como dentro del SNC, en el cerebro estos receptores tienen una localización somatodendrítica (Flores y Segura, 2005).

Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, con siete dominios transmembranales (Figura 19) con los extremos amino y carboxilo terminales, dentro y fuera de la neurona respectivamente, se subdividen en cinco tipos (M1-M5) y la mayor parte de las células poseen al menos dos de los subtipos de receptores.

Número de aminoácidos y porcentaje de identidad con la secuencia en humanos y rata, así como la distribución de las subunidades del receptor ACh de tipo muscarínico.

Especie	M1	M2	M3	M4	M5
Humano	460	466	590	479	532
Rata	458 (99%)	466 (95%)	589 (92%)	478 (95%)	531 (89%)
Distribución	Corteza cerebral, Ganglios basales, Tubérculo Olfativo, Cerebro medio e Hipocampo	Cerebro, Tronco del encéfalo, Hipocampo, Tubérculo Olfativo, Cerebro medio, Hipocampo, Corazón y Músculo Liso	Hipocampo, Corteza cerebral, Estriado y Estructuras Talámicas	Encéfalo, Tubérculo Olfativo, Corteza Cerebral e Hipocampo y Pulmón	Cuerpo Estriado, Hipocampo y Corteza Cerebral

Figura 18. Muestra las proporciones de los diferentes tipos de receptores muscarínicos, así como su distribución y semejanza en el humano y la rata (Tomado y modificado de Flores y Segura, 2005).

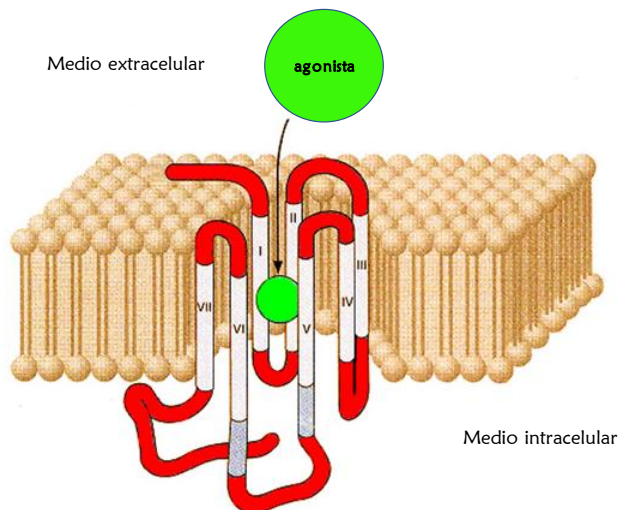


Figura 19. Esquema que muestra la conformación de un receptor muscarínico y sus siete dominios transmembranales (Tomado y modificado de www.iqb.es).

En la mujer y la rata las células de la granulosa sintetizan ACh, además los folículos con cierto grado de apoptosis también presentan ACh. Los receptores muscarínicos que se han encontrado en la mujer y en la rata corresponden a los subtipos M1, M3 y M5, los cuales estas ligados a la activación de la fosfolipasa C y de la proteína C cinasa por medio de canales de Ca^{2+} que se libera desde el espacio intracelular. El receptor M3 se localiza en los ovocitos, mientras que el M1 y el M5 se encuentra en las células de la granulosa, que conforman a los cuerpos lúteos (Mayerhofer y Fritz, 2002).

ATROPINA

La atropina es un antagonista no específico de los receptores muscarínicos, carece de selectividad por alguno de los diferentes subtipos de receptores. Su función es inhibir los efectos de la ACh al bloquear su unión con los receptores muscarínicos que se encuentran en las células efectoras, en las uniones neuroefectoras parasimpáticas, ganglios periféricos y en el SNC. La atropina tiene una baja afinidad por los receptores nicotínicos, por lo que sus efectos son mínimos (Goodman y Gilman,2012).

Los agonistas muscarínicos naturales son alcaloides de la belladona (*Solanaceae*), aunque también se puede encontrar en *Datura stramonium*. Atropina fue aislada por primera vez en 1831 en forma pura por Mein, haciendo énfasis que los efectos de esta consistían en un bloqueo de la estimulación vagal hacia el músculo cardiaco y años después se descubrió que inhibían la secreción salival producida por la estimulación del tímpano (Goodman y Gilman,2012).

Químicamente la atropina es una combinación de un éster, un ácido aromático (ácido trópico) y bases orgánicas complejas (tropina) (Figura 20), su acción antimuscarínica se debe a la interacción entre el ácido trópico y la tropina, así como con el grupo hidroxilo que le confiere parte de esta actividad.

Compite con la ACh por un sitio de fijación común en el receptor muscarínico, su efecto puede ser inhibido si se encuentra una concentración suficiente de ACh (Goodman y Gilman, 2012).

Al ser una amina terciaria liposoluble, es capaz de atravesar la barrera hematocefálica, cuenta con una vida media de 2.3 horas, con una unión a las proteínas del 50% y tasa de excreción del 18%. La atropina tiene una vida media de 2.5 a 3 horas, cuando es administrada por vía subcutánea o intramuscular los efectos pueden verse reflejados entre los 45 y 60 minutos, mientras que si se administra por vía intravenosa éstos son más rápidos (Stoelting, 1991).

La atropina ejerce un bloqueo parcial o total de la motilidad ovárica por mecanismos que aún no han sido comprendidos, pero que apuntan a que la contracción y retracción en las fibras musculares que rodean al ovario, son indispensables para completar el proceso de ovulación (Villalobos y Zurich, 1979).

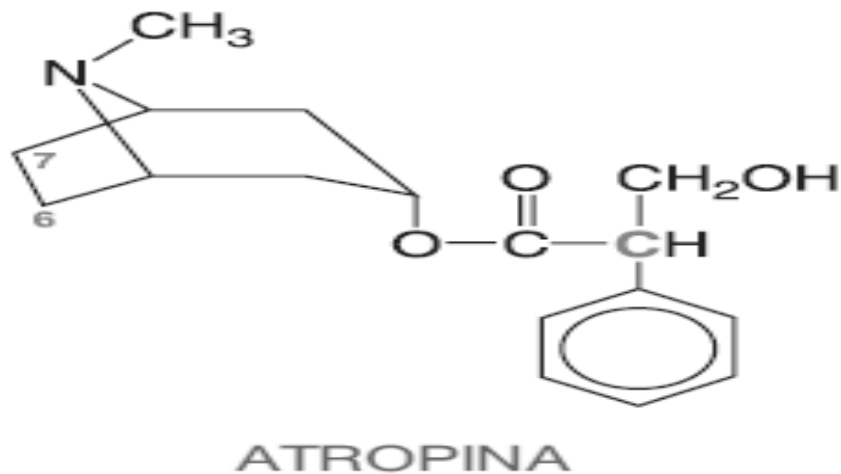


Figura 20. Fórmula química de la atropina (Tomada y modificada de Goodman y Gilman, 2012).

SISTEMA COLINÉRGICO EN LA REPRODUCCIÓN

La ovulación en la rata cíclica comienza en el día del proestro, donde la secreción de GnRH secretada por las neuronas del área preóptica (POA) del hipotálamo, desencadenan el pico de LH. Varios son los factores involucrados en la secreción de GnRH entre ellos los mecanismos de retroalimentación positivos y negativos, así como los mecanismos neurales y los estímulos ambientales (Yaakov-Egozi y col., 1986).

Everett y colaboradores (1949), demostró que la liberación de las gonadotropinas necesarias para la ovulación de la rata en el día del proestro, se encuentra ligado al sistema colinérgico, dado que en ratas adultas una inyección de sulfato de atropina en la tarde del proestro, bloquea la ovulación de los animales en el estro esperado.

Los receptores muscarínicos que se encuentran en POA-AHA, regulan de manera asimétrica la secreción de GnRH y la ovulación, ya que en el día del estro el implante de atropina en POA-AHA derecha bloquea la ovulación, mientras que en el día del diestro 2 el bloqueo se produce si el implante es colocado en el lado izquierdo (Cruz y col., 1989; Cruz y col., 1992).

En ratas adultas en DI una dosis de 100 mg/kg/pc de atropina inyectada de manera subcutánea bloquea la ovulación en el 100% de los animales, mientras que en el día del diestro II una dosis de 300 mg/kg/pc bloquea la ovulación en el 75% de los animales, con lo cual los autores sugieren una relación entre la secreción de gonadotropinas durante el ciclo estral y el sistema colinérgico (Domínguez y col., 1982).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La GnRH sintetizada por el hipotálamo regula la liberación de gonadotropinas hipofisarias. La neurona GnRHérgica es regulada por varios sistemas de neurotransmision, entre ellos el sistema colinérgico.

El ovario de la rata, de primate o de humano no presenta fibras nerviosas inmunoreactivas para ChAT, sin embargo en células de la granulosa de rata y humano esta presente el transportados vesicular de ACh (VAChT), lo que indica que en este órgano, ACh tiene un origen no neural.

En el ovario ACh ejerce sus efectos mediante tres tipos de receptores muscarínicos, el M3 que esta presente en el ovocito, y los receptores M1 y M5 presentes en las células de la granulosa.

El aporte de ACh al ovario ha sido atribuido al nervio vago. Hasta el día de hoy se desconocen las estructuras ováricas que reciben inervación directa de este nervio, sin embargo, hay evidencias que en el animal cíclico, la información neural que transporta el nervio vago participa en la regulación de las funciones ováricas.

En el modelo de la rata con SOPQ, inducido por la inyección de VE, la sección uni o bilateral del nervio vago restablece la respuesta ovulatoria, resultados que llevan a sugerir que la ACh esta implicada en el establecimiento del síndrome.

Con base en los antecedentes mencionados, en el presente estudio se analizó en la rata cíclica y en la rata con SOPQ inducido por la inyección de VE, el papel de la ACh sobre la regulación de la ovulación, el desarrollo de los folículos y la capacidad esteroidogénica del ovario.

HIPÓTESIS

Si la información colinérgica de los ovarios estimula la respuesta ovulatoria en animales cíclicos y en el establecimiento del SOPQ, entonces el bloqueo de los receptores muscarínicos del ovario disminuirá la ovulación en el animal cíclico y restablecerá las funciones ováricas en el animal con SOPQ.

OBJETIVO GENERAL

Analizar en el animal cíclico o con el SOPQ, el efecto del bloqueo de los receptores muscarínicos por la microinyección de atropina en la bursa del ovario, sobre la función ovárica.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Evaluar en el modelo del animal cíclico los efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos, por la microinyección de atropina en la bursa ovárica izquierda o derecha, sobre la respuesta ovulatoria y la concentración de progesterona y testosterona.
- 2.- Evaluar en el modelo del animal con SOPQ inducido por la inyección de VE, los efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos por la microinyección de atropina en la bursa ovárica izquierda o derecha, sobre la respuesta ovulatoria y la concentración de progesterona y testosterona.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras de la cepa CII-ZV mantenidas en condiciones controladas de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e iluminación, con 14 horas de luz y 10 de oscuridad, con alimento y agua *ad libitum*. Durante el desarrollo experimental, estuvieron sujetas a la normatividad aplicable para el uso de animales de experimentación (NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

Los animales fueron divididos al azar en los siguientes grupos experimentales, cada grupo estuvo formado por 10 animales. Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo anestesia con éter, a las 13:00 horas del DI y fueron sacrificados al estro vaginal inmediato a la cirugía.

☼ ***Animales cíclicos inyectados con solución salina (SS) o Atropina (ATR) en la bursa del ovario izquierdo o derecho:*** Se utilizaron ratas hembras cíclicas de 60 días de edad a las cuales se les realizó frotis vaginal diario durante 2 ciclos consecutivos. En el día del DI, los animales fueron anestesiados y sometidos a una insición dorso lateral de piel, músculo y peritoneo, se exteriorizó uno de los ovarios (izquierdo o derecho) y se realizó la microinyección de 20 μl de atropina (Sigma Chemical Co. St Louis Mo. USA) en la bursa ovárica en una dosis de 100 mg/kg/pc. La dosis fue ajustada conforme a la media del peso de los ovarios (100 mg/kg/po), ya que la dosis de 100 mg corresponde a una dosis usada de manera subdérmica en un animal adulto.

La dosis de 100 mg corresponde a una dosis usada de manera subdérmica en un animal adulto, por lo que en el presente estudio se ajustó la dosis en función del peso del ovario.

La aguja se mantuvo dentro de la bursa ovárica durante un minuto, para asegurar la correcta difusión al tejido ovárico de la atropina y evitar fugas, después de realizada la microinyección se colocó una gota de cianoacrilato.

A cada una de las ratas sometidas a cirugía se le colocó un antiséptico para evitar la posterior infección de la herida. Como grupo de comparación se utilizaron animales en DI, los cuales fueron inyectados con 20 μ l de solución salina en la bursa del ovario izquierdo o derecho (Figura 21).



Figura 21. Grupo experimental utilizado para evaluar los efectos de atropina en el animal cíclico. Atropina (ATR); Solución Salina (SS).

🔍 **Efecto de la microinyección de ATR en la bursa ovárica de animales inyectados con vehículo (Vh) o VE:** Se utilizaron ratas hembras neonatas colocadas en camadas de cinco hembras y un macho. Las hembras al cumplir los 10 días de vida fueron inyectadas vía intraperitoneal con una dosis de 2 mg de VE (Sigma Chemical Co. St Louis Mo. USA) en 0.1 ml de aceite de sésamo que fungió como Vh (Sigma Chemical Co. St Louis Mo. USA). Como grupos de comparación se utilizaron animales inyectados intraperitonealmente a los 10 días de vida, con 0.1 ml de Vh.

Las crías tuvieron libre acceso a la madre hasta los 24 días de vida (día del destete) y posteriormente al agua y al alimento, hasta el día que fueron autopsiadas. En los animales inyectados con VE, se inició el monitoreo vaginal un día después de la fecha de inyección del estrógeno. En el caso de las hembras inyectadas con Vh el monitoreo de la vagina se realizó a partir del día 30 de vida. Una vez que ocurrió la canalización de la vagina, se procedió con la toma de frotis vaginales diarios por un periodo de ocho días. Los frotis se retomaron al cumplir los 45 días de vida y dado que estos animales pierden el ciclo estral, se tomó como criterio para realizar la microinyección el que las ratas tuvieran el día del diestro antecedido de un estro y se procedió a realizar la microinyección de atropina en la bursa ovárica como se describió en los animales cíclicos (Figura 22).

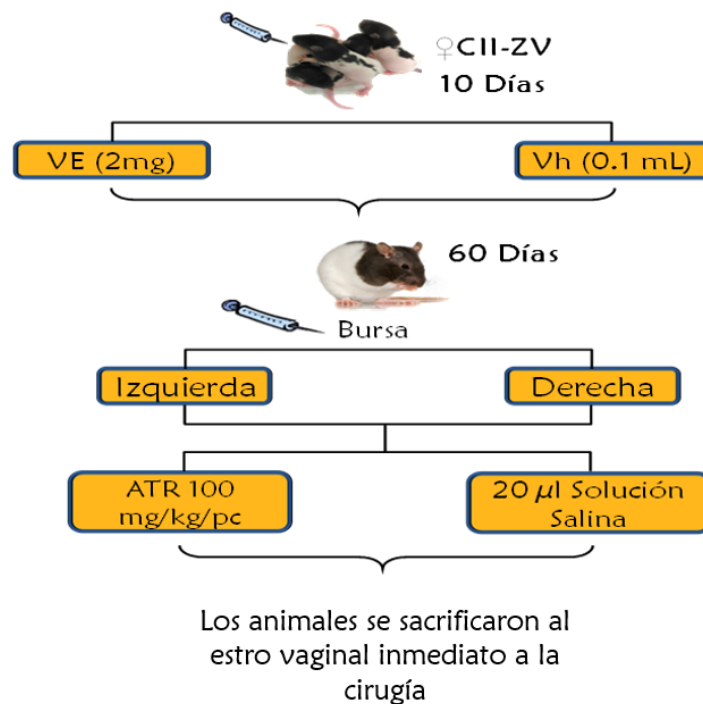


Figura 22. Grupo experimental usado para evaluar los efectos de la microinyección de atropina en animales inyectados con VE o Vh.

PROCEDIMIENTO DE AUTOPSIA

Los animales de los diferentes grupos experimentales fueron pesados y sacrificados por decapitación, al estro vaginal inmediato a la cirugía. Se colectó la sangre del tronco y se dejó coagular a temperatura ambiente por 30 minutos, después fue centrifugada a 3500 rpm por 15 minutos. Los sueros obtenidos se dividieron en tubos de 1.5 ml y se congelaron a -20°C hasta el momento de su análisis. Al momento de la autopsia, se diseccionaron y pesaron las glándulas adrenales, útero y ovarios. De los ovarios se removieron los oviductos para buscar en ellos la presencia de ovocitos *in situ* con ayuda de un microscopio estereoscópico (Nikon, modelo SMZ800, Japón).

HISTOLOGÍA OVÁRICA

Los ovarios de todos los grupos experimentales fueron fijados en una solución de Bouin por 24 horas, después de este tiempo los ovarios fueron deshidratados por medio de alcoholes a diferentes concentraciones (70, 80, 96% y absoluto) y cloroformo, posteriormente fueron incluidos en paraplast (Leica Biosystems Richmon Inc.USA). Los cortes histológicos se llevaron a cabo de manera seriada con un grosor de 10 μ m y se tiñeron con la técnica de Hematoxilina- Eosina (H-E).

Se analizaron los cortes histológicos de dos animales por grupo y se buscó la presencia de cuerpos lúteos, folículos atrésicos, prequistes y quistes foliculares. Los folículos atrésicos fueron aquellos que presentaron picnosis nuclear de las células de la granulosa, descamación de la granulosa con células en la cavidad antral, e hiperplasia de las células tecales.

De acuerdo a Lara y colaboradores (2000) fueron considerados como quistes aquellos folículos que tuvieron una cavidad antral amplia, disminución de las capas de células de la granulosa y aumento en las células de la teca, así como la ausencia del ovocito.

Los folículos prequísticos presentan una amplia cavidad con o sin ovocito, cuatro o cinco capas de células de la granulosa, teca de apariencia normal e invaginaciones y evaginaciones de la pared folicular.

CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES

La cuantificación de progesterona y testosterona se realizó en el Laboratorio de Hormonas Esteroides del departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” por medio de un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) en fase sólida, basado en el principio de unión competitiva (DRG Instruments GmbH, Germany).

La concentración de progesterona fue expresada en ng/ml, y la de testosterona en pg/ml de suero. Los coeficientes de variación intra e interespecíficos para la progesterona fueron de 7.52 y 8.41 % y para la testosterona 6.42 y 7.32 %.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de los pesos relativos de los órganos, y de las concentraciones de progesterona y testosterona se analizaron por medio de un análisis de varianza multifactorial (ANDEVA), seguido por una prueba de Tukey-Kramer. Cuando se requirió comprar dos grupos se utilizó una prueba “t” de Student. El número de ovocitos liberados se analizó por medio de una prueba de U de Mann-Whitney.

La tasa de animales ovulantes (número de animales que ovulan/ número total de animales) se analizó por la prueba exacta de Fisher para proporciones. Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias que fueron iguales o menores a 0.05.

RESULTADOS

“EFECTO DE LA MICROINYECCIÓN DE SOLUCIÓN SALINA EN LA BURSA OVÁRICA SOBRE LA TASA DE ANIMALES OVULANTES, NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS Y PESO DE ÓRGANOS ”

Con respecto al grupo de animales testigo absoluto, la tasa de animales ovulantes no se modificó por la microinyección de solución salina (SS) en la bursa ovárica izquierda o derecha. El número de ovocitos liberados fue menor cuando la microinyección se realizó en la bursa del ovario izquierdo (10 ± 0.87 vs. 13.61 ± 1.1 $p < 0.05$) y no se modificó cuando se microinyectó en la bursa derecha (13.61 ± 1.1 vs. 11.44 ± 1.81 . NS)

La microinyección de solución salina en la bursa izquierda o derecha no modificó el peso del útero, ni de las adrenales, mientras que la masa ovárica disminuyó (SS izq= 22.68 ± 1.43 ; 19.0 ± 0.61 vs 27.49 , $p < 0.05$).

EFFECTO DE LA MICROINYECCIÓN DE ATROPINA EN LA BURSA OVÁRICA DE ANIMALES CÍCLICOS, SOBRE LA FUNCIÓN OVÁRICA

RESPUESTA OVULATORIA

Alrededor del 75% de los animales microinyectados con solución salina en la bursa del ovario izquierdo o derecho ovuló al estro vaginal. La microinyección de atropina en la bursa del ovario izquierdo o derecho resultó en la disminución de la tasa de animales ovulantes, respecto al grupo con solución salina (Figura 23).

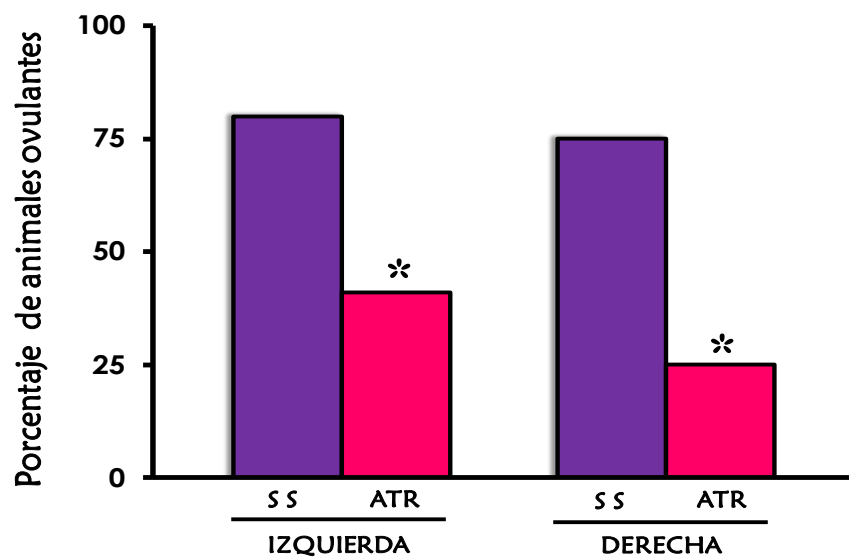


Figura 23. Porcentaje de animales ovulantes de ratas con microinyección de solución salina (SS) o atropina (ATR) en la bursa del ovario izquierdo o derecho, en el día del DI a los 60 días de edad y sacrificadas al estro vaginal inmediato a la cirugía * $p < 0.05$ vs. SS (prueba exacta de Fisher).

NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS

La microinyección de atropina en la bursa del ovario izquierdo o derecho de ratas cíclicas, no modificó el número de ovocitos liberados, en comparación con su grupo con solución salina (SS) (Figura 24).

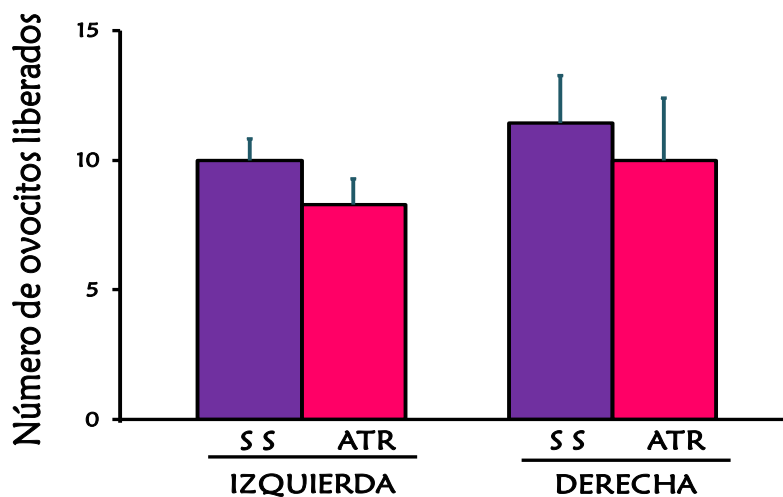


Figura 24. Media \pm eem del número total de ovocitos liberados por ambos ovarios de animales con microinyección de solución salina (SS) o atropina (ATR) en la bursa del ovario izquierdo o derecho, en el día del DI a los 60 días de edad y sacrificadas al estro vaginal inmediato a la cirugía.

PESO RELATIVO DE LA MASA OVÁRICA, ÚTERO Y MASA ADRENAL

La microinyección de atropina no modificó el peso de la masa ovárica, respecto al grupo con SS, mientras que, si se comparan los dos grupos con atropina, los animales inyectados en la bursa derecha mostraron una menor masa ovárica, esta misma respuesta se observó en la masa adrenal. El peso del útero en los animales inyectados con atropina en la bursa izquierda fue mayor que el grupo con SS (Cuadro 1).

Cuadro 1. Media \pm eem del peso relativo (mg/100g de peso corporal) de la masa ovárica, masa adrenal y útero de ratas con microinyección de solución salina (SS) o atropina (ATR) en la bursa del ovario izquierdo o derecho en el día del DI a los 60 días de edad y sacrificadas al estro vaginal inmediato a la cirugía.

Grupo	n	Masa Ovárica	Masa Adrenal	Útero
SS Izquierda	10	22.7 \pm 1.4	19.0 \pm 0.9	131.2 \pm 10.8
ATR Izquierda	17	23.8 \pm 1.2	21.7 \pm 0.6	181.4 \pm 19.4 •
SS Derecha	12	19.0 \pm 0.6	19.0 \pm 0.9	137.7 \pm 11.9
ATR Derecha	16	19.7 \pm 0.6 *	17.8 \pm 0.6 *	144.0 \pm 9.2

* $p < 0.05$ vs. ATR izquierda ; • vs. SS Izquierda (Prueba "t" de Student).

HORMONAS ESTEROIDES

La microinyección de atropina en la bursa del ovario derecho resultó en el incremento de la concentración de progesterona, respecto al grupo tratado con solución salina y al microinyectado en la bursa del ovario izquierdo con atropina.

La concentración sérica de testosterona en los animales microinyectados con atropina en la bursa del ovario izquierdo o derecho fue menor en comparación con su grupo tratado con solución salina (Figura 25).

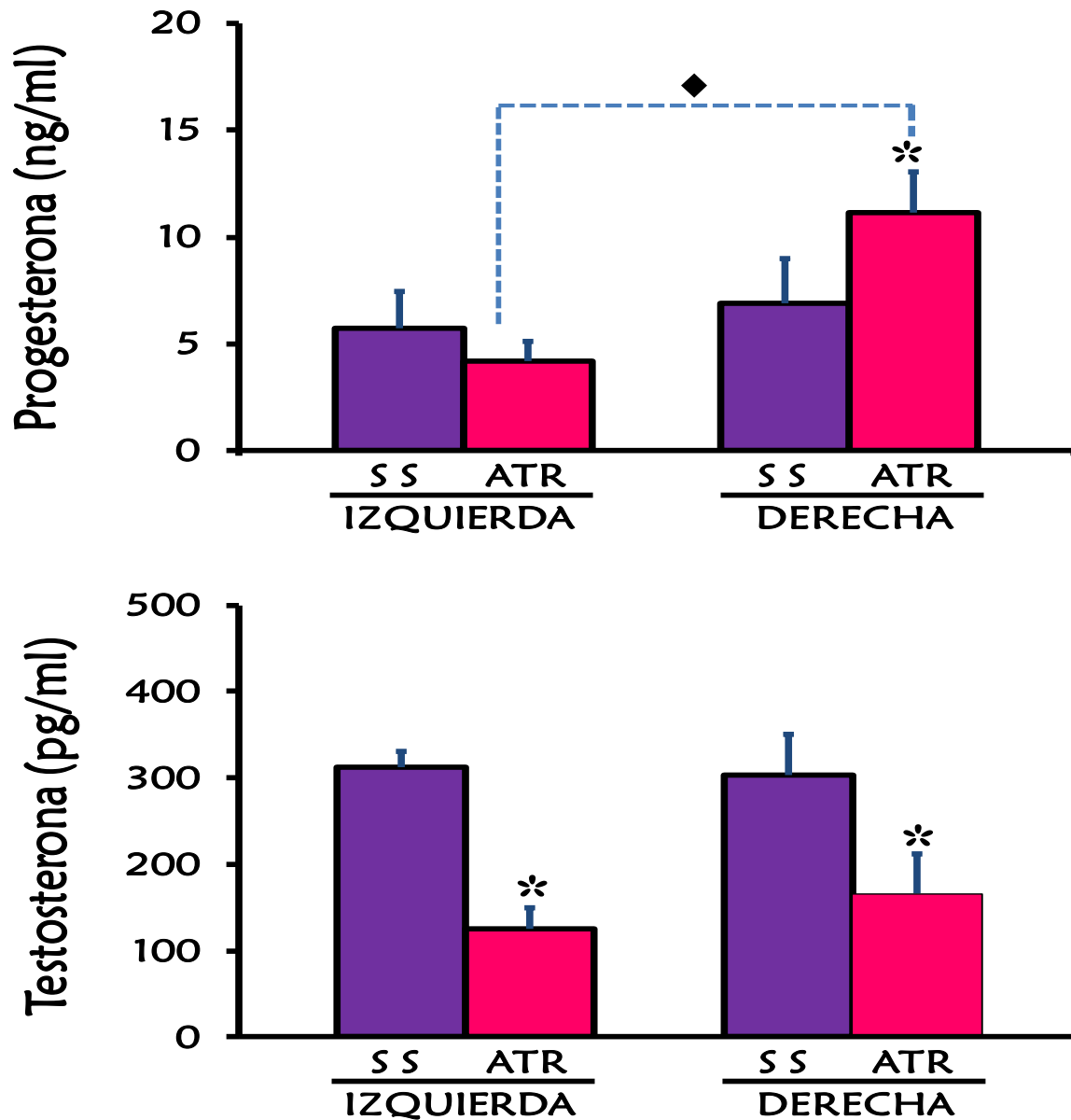


Figura 25 Media \pm eem de la concentración sérica de progesterona y testosterona de animales con microinyección de solución salina (SS) o atropina (ATR) en la bursa del ovario izquierdo o derecho en el día del DI a los 60 días de edad y sacrificadas al estro vaginal inmediato a la cirugía.* $p < 0.05$ vs. su grupo con SS (Prueba “t” de Student); \blacklozenge $p < 0.05$ vs. ATR izquierda (Prueba de ANDEVA seguida por la prueba de Tukey-Kramer).

MORFOLOGÍA OVÁRICA

Ovarios microinyectados con solución salina

Tanto el ovario izquierdo (Figura 26) o derecho que fueron microinyectados en la bursa ovárica presentan cuerpos lúteos viejos procedentes de ovulaciones anteriores y recién formados procedentes del ciclo estral anterior a la cirugía, así como folículos preovulatorios y folículos secundarios. Resultados similares se encuentran en el ovario derecho cuando este recibe la microinyección de solución salina (resultados no mostrados).

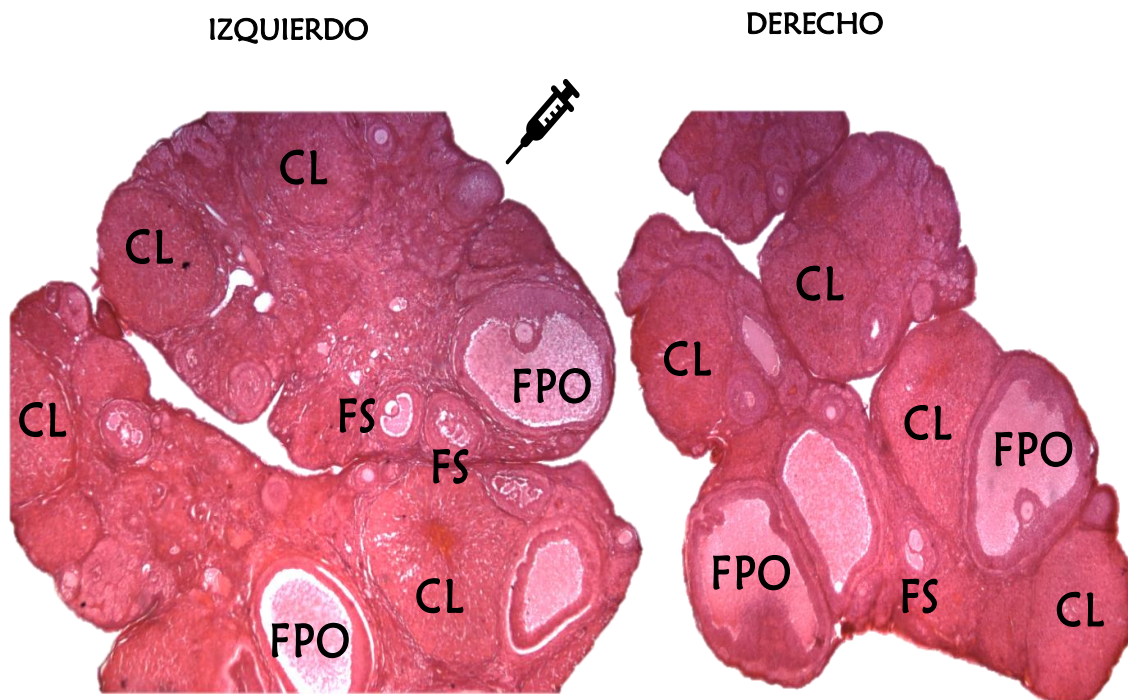


Figura 26. Fotomicrografía a un aumento de 40x que muestra el corte de ovario izquierdo microinyectado a los 60 días en la bursa izquierda con SS y su ovario contralateral, teñido con H-E, donde CL: cuerpos lúteos; FPO: folículo preovulatorio; FS: folículo secundario. La morfología del ovario derecho microinyectado con SS y su contralateral fue similar (resultados no mostrados).

Ovarios microinyectados con atropina

El ovario izquierdo o derecho (Figura 27 A y D) microinyectados con atropina en la bursa ovárica muestra la presencia de folículos preovulatorios con signos de atresia folicular como lo es la descamación de las células de la granulosa y la pérdida del *cumulus ophorus*, así como folículos secundarios. El ovario contralateral izquierdo (Figura 27 B) y derecho (Figura 27 C) muestran folículos en crecimiento, secundarios y preovulatorios atrésicos.

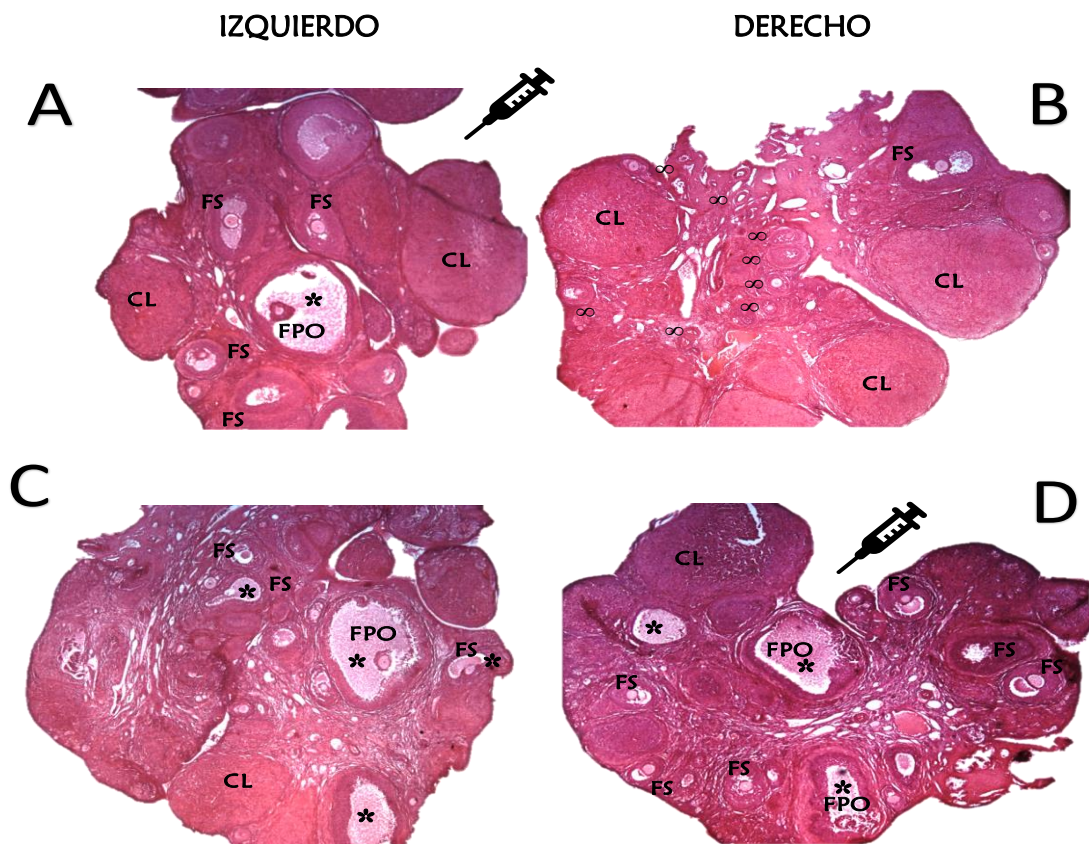


Figura 27. Fotomicrografías a un aumento de 40x de ovario de rata de 60 días microinyectadas en la bursa ovárica izquierda (A) o derecha (D) con atropina y su respectivo ovario contralateral (B y C) teñidos con H-E, donde CL: cuerpos lúteos; FPO: folículo preovulatorio; FS: folículo secundario. El * indica los folículos con atresia y ∞ indica los folículos en desarrollo.

“EFECTO DE LA MICROINYECCIÓN DE ATROPINA EN LA BURSA OVÁRICA DE ANIMALES INYECTADOS CON VH O VE, SOBRE LA FUNCIÓN OVÁRICA Y EL PESO DE ÓRGANOS”

RESPUESTA OVULATORIA Y NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS

En el grupo con Vh la microinyección de atropina en la bursa del ovario izquierdo o derecho, resultó en una disminución en el número de ovocitos liberados en comparación con las hembras que solo fueron tratadas con el Vh. La inyección de VE resultó en el bloqueo de la ovulación, efecto que no se revierte por la microinyección del antagonista colinérgico en la bursa del ovario izquierdo o derecho (Cuadro 2).

Cuadro 2 Porcentaje de animales ovulantes (TAO) y la media \pm eem del número de ovocitos liberados por ambos ovarios de ratas tratadas con Vh o VE, y que a los 60 días de edad fueron microinyectadas con atropina en la bursa del ovario izquierdo (ATR izq.) o derecho (ATR der.) en el día del diestro y sacrificadas al estro vaginal inmediato a la cirugía.

Grupo	n	TAO	No. Ovocitos Liberados
Vh	10	10/10	14.4 \pm 0.7
Vh + ATR izq.	10	7/10	8.4 \pm 1.8 *
Vh + ATR der.	10	8/10	7.0 \pm 1.8 *
VE	10	0/10	-----
VE + ATR izq.	10	1/10	(5)
VE + ATR der.	6	1/6	(2)

* $p < 0.05$ vs su grupo con Vh (prueba “U” de Mann-Whitney). Entre paréntesis se muestra el número total de ovocitos liberados, en ambos casos sólo lo hizo el ovario derecho.

PESO RELATIVO DE LA MASA OVÁRICA, ÚTERO Y MASA ADRENAL

Las hembras tratadas con Vh o con VE más la microinyección de atropina en la bursa del ovario izquierdo o derecho, disminuyó la masa ovárica cuando son comparadas con su grupo Vh o VE respectivamente. El peso del útero este parámetro no se modificó en ninguno de los grupos experimentales. La masa adrenal disminuyó en el grupo Vh tratado con atropina en la bursa del ovario izquierdo o derecho, efecto que no se presenta en los animales tratados con VE (Cuadro 3).

Cuadro 3. Media \pm eem del peso relativo (mg/100 g pc) de la masa ovárica, útero y masa adrenal de animales tratados con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), y que a los 60 días de edad fueron microinyectados con atropina (ATR) en la bursa del ovario izquierdo (ATR izq.) o derecho (ATR der.) en el día del diestro y sacrificadas al estro vaginal inmediato a la cirugía.

Grupo	Masa Ovárica	Útero	Masa Adrenal
Vh	24.0 \pm 1.0	130.0 \pm 3.0	23.0 \pm 1.0
Vh + ATR izq.	21.0 \pm 1.0 *	126.0 \pm 9.0	17.0 \pm 1.0 *
Vh + ATR der.	16.0 \pm 1.0 *	122.0 \pm 7.0	16.0 \pm 1.0 *
VE	23.0 \pm 1.0	122.0 \pm 4.0	21.0 \pm 1.0
VE + ATR izq.	15.0 \pm 1.0 \blacklozenge	126.0 \pm 9.0	21.0 \pm 1.0
VE + ATR der.	15.0 \pm 1.0 \blacklozenge	115.0 \pm 17.0	20.0 \pm 1.0

* $p < 0.05$ vs su grupo con Vh; \blacklozenge $p < 0.05$ vs su grupo con VE (prueba de ANDEVA seguida por prueba de Tukey).

HORMONAS ESTEROIDEAS

La concentración de testosterona fue mayor en animales tratados con VE, respecto a aquellos que fueron tratados con Vh. La concentración de progesterona y testosterona disminuyó en los animales tratados con Vh y VE que recibieron la microinyección de atropina en la bursa ovárica izquierda o derecha (Figura 28).

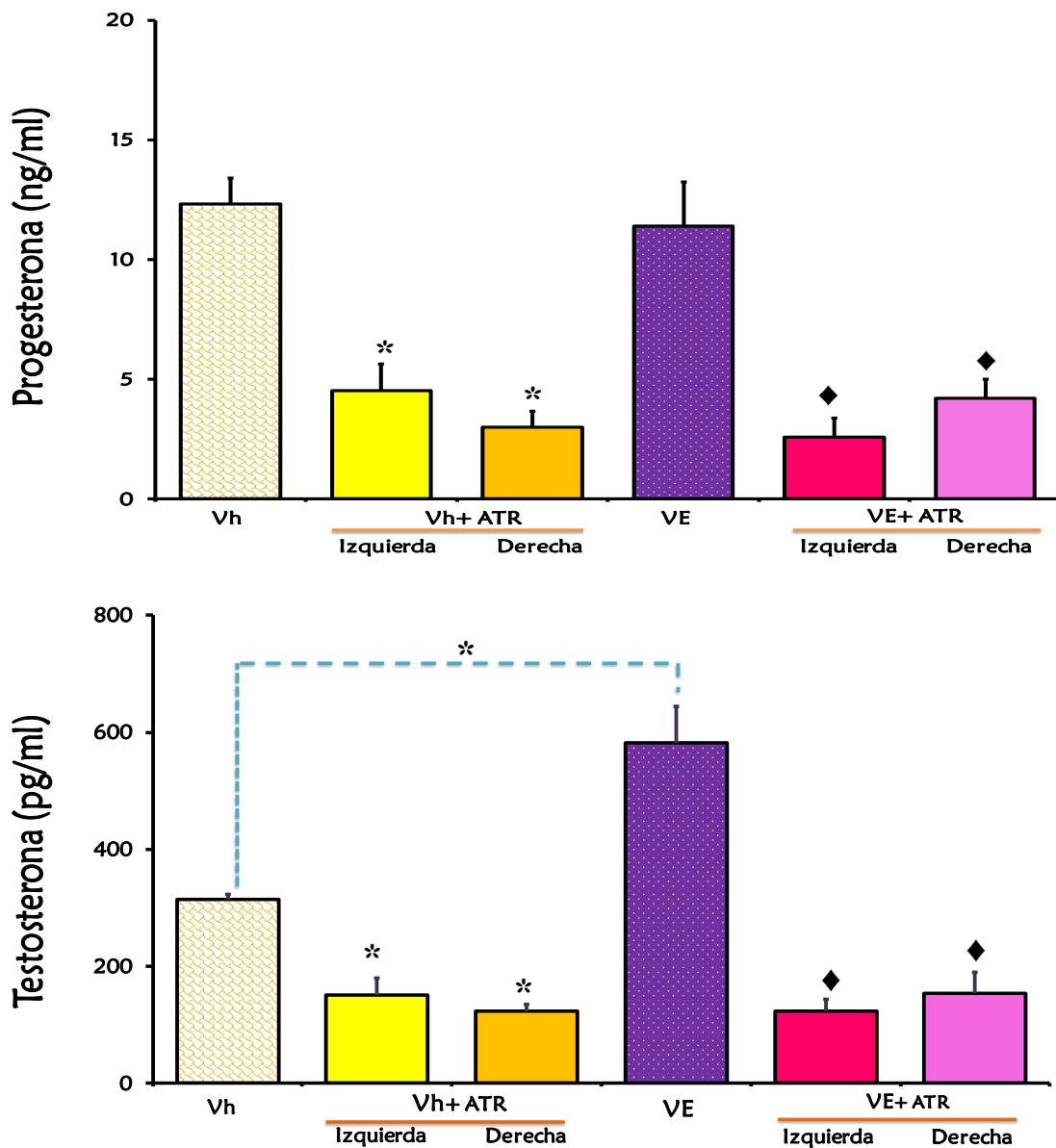


Figura 28. Media \pm eem de la concentración sérica de progesterona y testosterona de animales tratados con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) y que a los 60 días de edad fueron microinyectados con atropina en la bursa del ovario izquierdo o derecho en el día del diestro y sacrificadas al estro vaginal inmediato a la cirugía.* $p < 0.05$ vs su grupo Vh; ♦ $p < 0.05$ vs su grupo VE (Prueba de ANDEVA seguida por prueba de Tukey). La línea punteada indica la comparación entre animales inyectados con Vh y VE.

MORFOLOGIA OVÁRICA

CORTES DE OVARIOS DE HEMBRAS TRATADAS CON VALERATO DE ESTRADIOL MAS ATROPINA EN LA BURSA OVÁRICA IZQUIERDA O DERECHA

La morfología del ovario izquierdo o derecho de hembras tratadas con VE a los diez días de edad, muestra folículos prequísticos así como la presencia predominante de quistes foliculares (Figura 29).

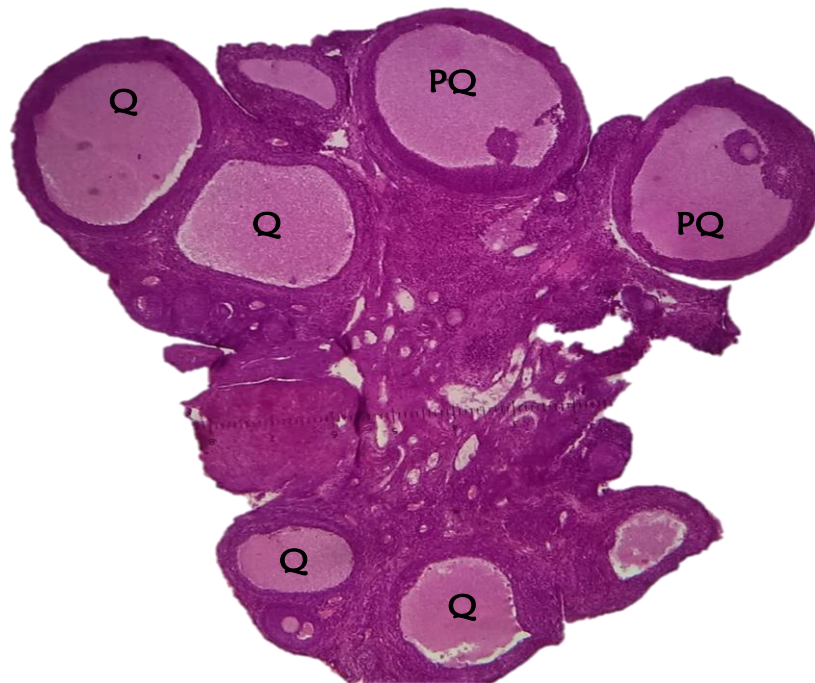


Figura 29. Microfotografía de corte de ovario izquierdo de rata a un aumento de 40x, que fue inyectada a los 10 días de edad con valerato de estradiol (VE) y que a los 60 días de edad fue sacrificada. Corte teñido con H-E, donde: Q: quiste, PQ:prequiste. La morfología del ovario derecho fue similar (resultados no mostrados).

Los ovarios de las hembras que fueron tratadas con VE a los 10 días de edad y que a los 60 días recibieron la microinyección de atropina en la bursa del ovario izquierdo mostraron la presencia de prequistes y quistes foliculares, mientras que su ovario contralateral (derecho) mostró la presencia de prequistes y folículos pequeños (Figura 30).

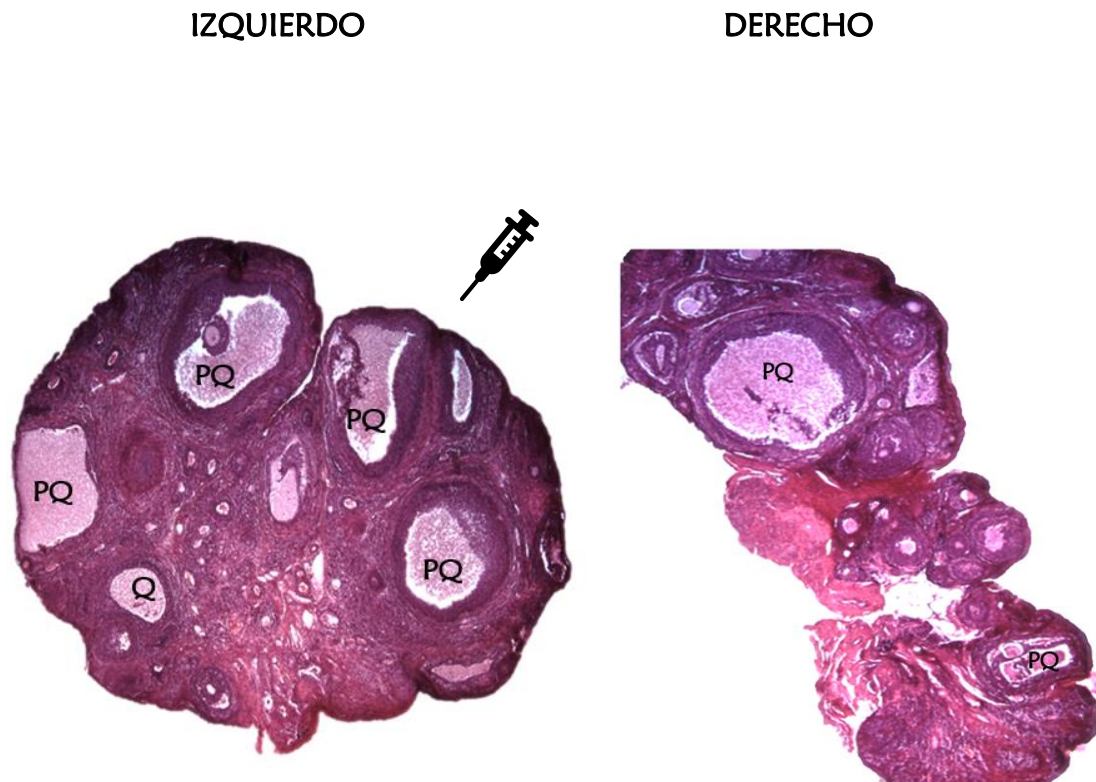


Figura 30. Fotomicrografías de cortes de ovario de rata a un aumento de 40x que a los 10 días de edad fueron inyectadas con valerato de estradiol (VE) y que a los 60 días de edad recibió la microinyección de atropina en la bursa ovárica izquierda. Corte teñido con H-E, donde PQ: prequiste, Q: quiste. Los cortes de ovario pertenecen al mismo animal experimental.

Los ovarios de las hembras que fueron tratadas con VE a los 10 días de edad y que a los 60 días recibieron la microinyección de atropina en la bursa del ovario derecho mostraron la presencia de prequistes y quistes foliculares, así como folículos secundarios, mientras que su ovario contralateral (izquierdo) mostró la presencia de folículos grandes, así como folículos en desarrollo (Figura 31).

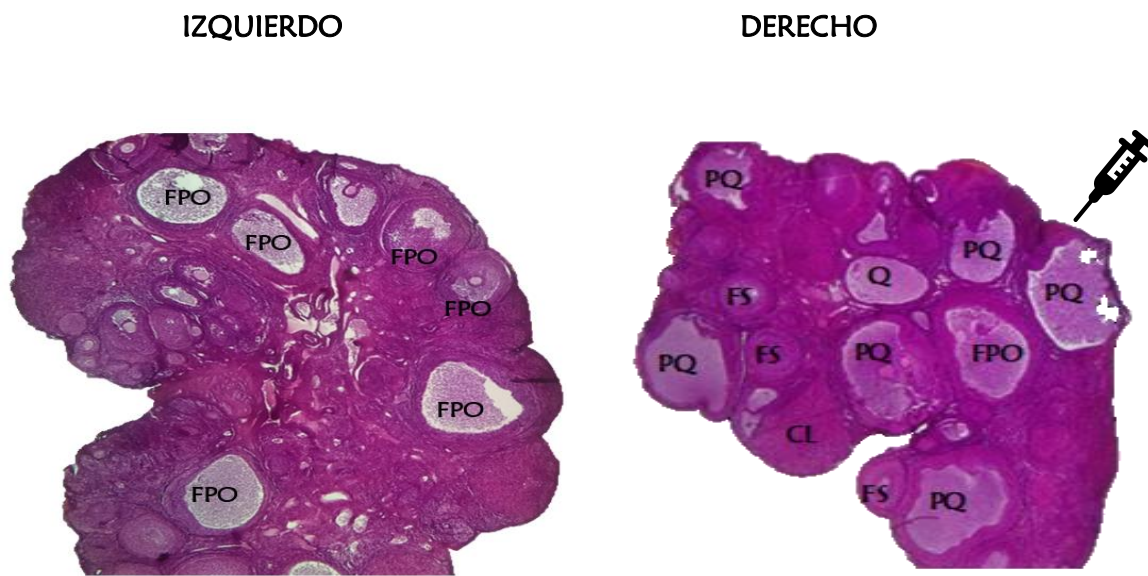


Figura 31. Fotomicrografías de cortes de ovario de rata a un aumento de 40x que a los 10 días de edad fueron inyectadas con valerato de estradiol (VE) y que a los 60 días de edad recibió la microinyección de atropina en la bursa ovárica derecha. Corte teñido con H-E, donde PQ: prequiste, Q: quiste, FPO: folículo preovulatorio, FS: folículo secundario. Los cortes de ovario pertenecen al mismo animal experimental.

DISCUSIÓN

ANIMAL CÍCLICO

Los resultados del presente estudio muestran que en el animal cíclico el sistema colinérgico del ovario regula de manera estimulante el desarrollo de los folículos en crecimiento, la tasa ovulatoria y la secreción de testosterona, mientras que la secreción de progesterona es regulada de manera inhibitoria.

La bursa ovárica esta vascularizada por la vena y la arteria ovárica (Fernandois y col.,2014; Dissen y Ojeda, 1999), donde existen diferencias entre el drenaje venoso del ovario izquierdo y derecho (Domínguez y col., 1998). En el día del proestro la microinyección con xilocaína en la bursa del ovario izquierdo disminuye la cuota ovulatoria por el ovario inyectado, efecto que no se presenta si el ovario tratado es el derecho (Domínguez y col., 1998). Esta respuesta asimétrica también se observó en el presente estudio, donde la microinyección con solución salina en la bursa del ovario izquierdo disminuyó la cantidad total de ovocitos liberados, respuesta que podría deberse a un cambio en la vasculatura de la bursa ovárica al momento de la microinyección. Rosas (2015) sugiere que la microinyección de solución salina o VIP en la bursa del ovario pudiese activar diferentes vías neurales, dando lugar a que la señal neural o que la transducción de esta sea diferente en el ovario izquierdo o derecho.

En la rata adulta el sistema colinérgico del ovario regula de manera asimétrica la respuesta ovulatoria, ya que la microinyección con pirenzepina (antagonista del receptor M1) en la bursa ovárica izquierda resulta en el bloqueo total de la ovulación, respuesta que no se produce si el ovario microinyectado es el derecho (Cruz y col., 2015).

En el presente estudio el bloqueo del sistema colinérgico por la microinyección con atropina (antagonista no selectivo) en la bursa derecha, resultó en el bloqueo de la ovulación en el 75% de los animales, mientras que cuando la microinyección fue realizada en la bursa del ovario izquierdo el porcentaje de animales con bloqueo de la ovulación fue del 59%. Domínguez y colaboradores (1982) señalan que la eficiencia de la atropina para bloquear la ovulación depende del día del ciclo estral, donde además la sensibilidad del ovario al fármaco depende de la hora del día. Es posible que el efecto observado se deba al bloqueo de los receptores M1, M3 y M5, ya que se ha descrito la presencia de receptores muscarínicos M1 y M5 en las células de la granulosa de los folículos preovulatorios y de M3 en el ovocito (Mayerhofer y Fritz, 2002).

La esteroidogénesis ovárica es regulada por diversos factores, entre ellos, las señales neurohormonales que provienen del hipotálamo y de la hipófisis, así como de la información neural que recibe la gónada (Gómez-Chang y col., 2012; Hu y col., 2012).

Rosas y colaboradores (2015) mostraron que la inyección de solución salina o de VIP en la bursa del ovario modifican la secreción de hormonas esteroideas, como resultado de la activación de diferentes vías neurales y que esta respuesta también es dependiente del estado endocrino del animal. En trabajos previos se ha sugerido que la manipulación de piel, músculo y peritoneo modifica el proceso esteroidogénico, respuesta atribuida a la propia inervación del peritoneo, ya que éste proyecta fibras hacia el ovario (Barco y col., 2003; Cruz y col., 2006),

En el presente estudio se observó que en animales en diestro 1 con microinyección de atropina en la bursa del ovario izquierdo la concentración de progesterona es normal. Delgado y colaboradores (2010), señalan que en un sistema *ex vivo* que contiene al ovario izquierdo-NOS-GCM, la estimulación del ganglio con ACh, resulta en la disminución en la concentración de progesterona ovárica a los 30 y 60 minutos y se estabiliza a los 120 minutos. Estos resultados hacen pensar que ante el bloqueo del sistema colinérgico el ovario izquierdo es capaz de mantener la secreción de progesterona.

Dado que la microinyección de atropina en la bursa del ovario derecho resultó en el incremento de la concentración de progesterona, se puede sugerir que en el ovario derecho el sistema colinérgico regula la secreción de progesterona de manera inhibitoria. La progesterona cuantificada en el día del estro corresponde a la sintetizada por los ovarios, ya que se plantea que la glándula adrenal es la principal fuente de progesterona en los días del DI, D2 y P (Flores y col., 2008). Esto apoyaría el hecho de que no se observen cambios en la masa adrenal por efecto de la atropina.

En los animales en DI con bloqueo del sistema colinérgico en la bursa ovárica, la concentración sérica de testosterona disminuyó independientemente del ovario inyectado. La inyección subcutánea de atropina a las 12:00 horas del DI, incrementa las concentraciones de testosterona a las dos horas post tratamiento (Flores y col., 2006), Barco y colaboradores (2003) han sugerido una vía neural entre el peritoneo, las adrenales y el ovario, donde la secreción de testosterona es regulada de manera inhibitoria por una vía mediada por receptores muscarínicos. Sin embargo, nuestros resultados nos permiten sugerir que el sistema colinérgico del ovario, a través de los receptores muscarínicos, se encuentra regulando de manera estimulante la secreción de testosterona. La diferencia entre los trabajos previos y el presente podría ser explicada por la vía de administración, ya que mientras en las evidencias reportadas se administró vía subdérmica (actúa en todo el sistema periférico), en el presente estudio la atropina se administró intrabursal, lo que garantiza su acción exclusiva en el ovario.

En la mujer el 50% de la testosterona es secretada por la suprarrenal y el otro 50% por el estroma ovárico, ya que en mujeres que han sido sometidas a ooforectomía disminuye a la mitad la concentración de la hormona (Cóppola y col., 2005). Los resultados del presente estudio indican que el bloqueo de los receptores muscarínicos por el antagonista colinérgico disminuye la capacidad de las células tecales para sintetizar el andrógeno, por lo cual se sugiere que la ACh regula de manera estimulante la secreción de la testosterona.

La histología ovárica de los animales con microinyección de atropina en la bursa del ovario izquierdo muestra un número mayor de folículos preovulatorios que su ovario contralateral. A diferencia de lo que ocurre cuando se inyecta el ovario derecho en donde se aprecia un mayor número de folículos en crecimiento. Estos resultados llevan a sugerir que el sistema colinérgico regula de manera diferente el desarrollo folicular en el ovario izquierdo y derecho. Esta respuesta asimétrica también se observa en animales en diestro 1, en los que se colocó el ímplate con atropina en el lado derecho de POA-AHA y se sacrificaron en el día del proestro, donde el ovario izquierdo mostró la presencia de folículos pequeños y medianos (90-500 μm), mientras que en el ovario derecho no se observan este tipo de folículos (Cruz y col., 2014).

Si bien existen folículos preovulatorios en los ovarios que recibieron la microinyección de atropina en la bursa del ovario izquierdo, éstos muestran algún grado de atresia folicular. Resultados similares a los reportados por el grupo de Urra (2016), quienes mostraron un incremento en el número de folículos secundarios atrésicos, cuando se inyecta en la bursa del ovario huperzina A, inhibidor específico de la AChE, enzima encargada de la degradación de ACh.

El grupo de Fritz (2002) mostró que en el cultivo de células de la granulosa el carbacol, un agonista colinérgico, daña las uniones gap debido al incremento de la fosforilación de la conexina 43 en su residuo serina, lo cual resulta en la disgregación de las células, mientras que los antagonistas como pirenzepina y atropina disminuyen la pérdida de las uniones gap, permitiendo así el crecimiento y diferenciación de la granulosa. En el presente estudio se observaron algunos folículos secundarios y preovulatorios con signos de atresia en los ovarios de los animales que fueron sometidos a la microinyección de atropina. Ya que los antagonistas colinérgicos no permiten la disgregación de las células, y dado que, la pared folicular contiene células que son muy parecidas al músculo liso, el cual posee receptores colinérgicos específicos (Wallis y col., 1976), es posible que la atresia se deba a la pérdida de la rigidez de la pared folicular.

MODELO DEL ANIMAL CÍCLICO

En la rata los receptores muscarínicos se encuentran en las células de la granulosa (M1, M5) y en el ovocito (M3).

La acetilcolina se une a los receptores muscarínicos en las células de la granulosa y del ovocito, lo que favorece el mantenimiento de las uniones celulares y el crecimiento de los folículos. De manera que el bloqueo de los receptores por ATR, podría explicar porque se observó pérdida de las uniones celulares, dando como resultado el desprendimiento del ovocito del *cumulus oophorus* y menor crecimiento folicular.

Cada ovario recibe diferente aporte sanguíneo. Los vasos sanguíneos que irrigan a las células de la teca presentan receptores muscarínicos. El bloqueo de éstos por la microinyección de ATR en la bursa del ovario derecho podría facilitar el ingreso del colesterol a las células de la teca lo que resultaría en una mayor síntesis de progesterona.

El bloqueo de los receptores muscarínicos por la microinyección de ATR en la bursa del ovario izquierdo o derecho resulta en la disminución de la concentración de testosterona, posiblemente como resultado de una menor actividad de las enzimas que participan en el paso desde progesterona hasta testosterona (Figura 32).

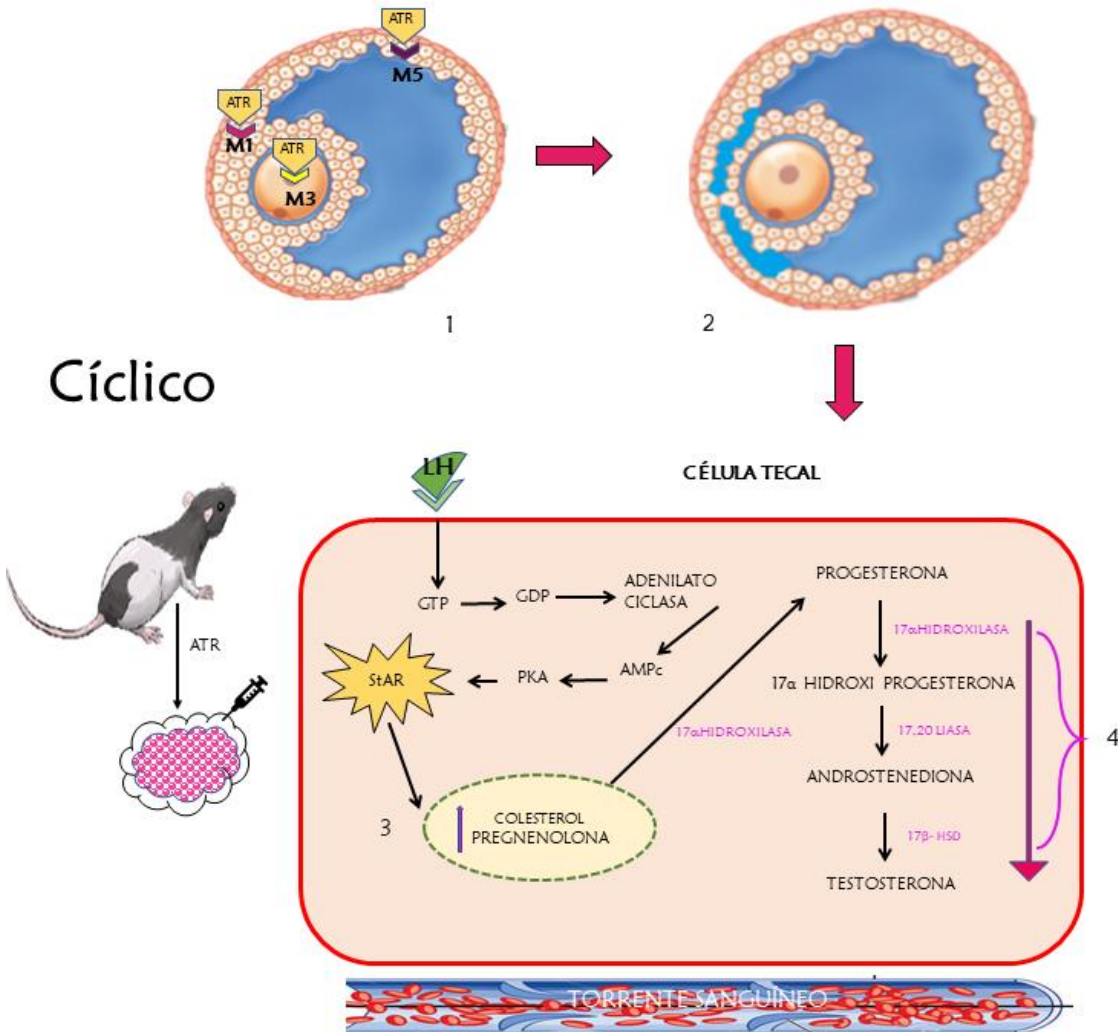


Figura 32. Esquema representativo de lo que ocurre cuando la atropina es microinyectada en la bursa ovárica izquierda o derecha de ratas cíclicas. 1.- localización de los receptores muscarínicos en células de la granulosa (M1 y M5) y del ovocito (M3). 2.- folículo con pérdida del *cumulus oophorus*. 3.- El colesterol es internalizado en las células de la teca donde será transformado en progesterona. 4.- El bloqueo de los receptores muscarínicos puede estar mediando alguna de las enzimas (↓) que participan en la biotransformación de progesterona a testosterona.

ANIMAL CON SOPQ

En el animal con SOPQ, inducido por la inyección de VE, el bloqueo del sistema colinérgico del ovario por la microinyección de atropina en la bursa ovárica fue capaz de inhibir el hiperandrogenismo que caracteriza al animal con el síndrome, sin embargo, no fue capaz de inducir la ovulación.

En la etapa infantil la administración de VE ocasiona el desarrollo del SOPQ en la etapa adulta, el cual está caracterizado por el incremento en las concentraciones de andrógenos, así como falta de ovulación (Morales- Ledesma y col., 2010; Linares y col., 2013), efectos que pudieron ser observados en los animales de experimentación utilizados.

En animales con la patología, la vagotomía realizada a los 24 días de edad y sacrificados a los 90 días, indujo la ovulación en el 75 % de los animales y mostraron el restablecimiento de la morfología ovárica. Estos resultados permitieron sugerir que la información neural que lleva el nervio vago a los ovarios participa en la regulación y en el mantenimiento del síndrome (Linares y col., 2013).

El nervio vago transporta varios neurotransmisores, entre ellos la ACh. En el perro la vagotomía disminuye la concentración de ACh a nivel de píloro a la sexta semana post-cirugía (Gonrny y col., 1983). En ratas adultas la vagotomía bilateral induce la aparición de períodos prolongados de diestro (Burden y Lawrence 1977), e inhibe la pseudopreñez inducida por la estimulación mecánica del cuello cervical (Burden y col., 1981). Tomando en cuentas estas evidencias podemos sugerir que en la rata con SOPQ, la ACh regula el mantenimiento del síndrome.

En ratas con SOPQ inducido por el VE, el bloqueo del sistema colinérgico por la microinyección con atropina en la bursa ovárica, es inefectivo para inducir la ovulación. Esta discrepancia con lo observado en los animales con la patología y sometidos a la vagotomía, podría ser atribuido al periodo en el cual los animales estuvieron privados del aporte colinérgico. Mientras en las ratas vagotomizadas transcurrieron aproximadamente 70 días sin este aporte, en el presente estudio se utilizó un bloqueador colinérgico cuya vida media es de 4 horas. Para analizar esta posibilidad se requiere de un diseño experimental, el cual permita mantener el bloqueo del sistema colinérgico del ovario por un período más largo.

La bursa ovárica recibe aporte sanguíneo por medio de la arteria y de la vena ovárica (Fernandois y col., 2014; Dissen y Ojeda, 1999). El grupo de Kozłowska (2014) menciona que bajo condiciones fisiológicas el flujo sanguíneo del ovario esta modulado vía receptores muscarínicos.

La atropina ejerce un efecto vasoconstrictor (Goodman y Guilman, 2012), de manera que la microinyección con atropina induce vasoconstricción en los vasos sanguíneos que se encuentran alrededor de la bursa ovárica, lo cual podría disminuir el flujo sanguíneo. Esta respuesta podría explicar la disminución del peso de las gónadas. La disminución del peso de los ovarios por el bloqueo del sistema colinérgico, también se presenta cuando se coloca el implante de atropina en POA- AHA (Cruz y col., 2014).

En animales con inducción del SOPQ por la inyección de VE, la vagotomía derecha o bilateral disminuye la concentración de progesterona (Linares y col., 2013). Resultados semejantes se observaron en el presente estudio, donde en el modelo del animal con SOPQ el bloqueo del sistema colinérgico resultó en la disminución de la concentración de progesterona, independientemente de la bursa ovárica microinyectada con atropina.

En nuestros animales con el síndrome los ovarios no presentaron cuerpos lúteos dado que no se produjo la ovulación. Lo que nos permite pensar que la progesterona cuantificada sea de origen adrenal, aun cuando se reporta que en el animal cíclico la progesterona es aportada por la adrenal en los días del diestro y proestro (Flores y col., 2008), mientras que en el día del estro el origen es ovárico. Estas evidencias apuntan a que la secreción de la hormona pudiera ser diferente entre un animal cíclico y uno que presenta la patología.

Tal y como ya ha sido reportado (Lara y col., 1993; Cruz y col., 2012; Sotomayor-Zárate, 2008), en el presente estudio se observó que el VE induce hiperandrogenismo. El incremento en la testosterona podría ser atribuido al incremento en la atresia folicular y a la presencia de quistes foliculares, como ha sido reportado en la literatura (Sotomayor-Zárate, 2008).

Los animales con SOPQ y sometidos a la microinyección de atropina, ya sea en la bursa izquierda o derecha, muestran un decremento en la concentración sérica de testosterona, inclusive a una concentración más baja que la de un animal sin la patología.

Una posible explicación al decremento de la testosterona en este grupo experimental podría estar relacionada con los receptores muscarínicos, dado que los receptores M1, M2 y M3 se encuentran acoplados a proteínas G, cuando son activados estos responden con la producción del segundo mensajero AMPc, sin embargo, la activación de los receptores M2 y M4 inhiben la producción de éste (Flores y Segura, 2005).

Dado que en la vía de la esteroidogénesis es indispensable la formación del AMPc para la activación de las PKA y la subsecuente fosforilación de la StAR, que va facilitar el ingreso del colesterol a las células de la teca folicular (Gómez-Chang y col., 2012), sugerimos que la microinyección de atropina en la bursa de los ovarios bloqueó preferentemente los receptores M1 y M3, lo que resultó en una menor producción tanto de progesterona como de testosterona.

La morfología de los ovarios de animales con SOPQ inducido por VE y sometidos a la microinyección de atropina en el ovario izquierdo o derecho muestra la presencia de quistes, así como de folículos terciarios y en desarrollo. La histología que se observó es similar a la que se ha mostrado en animales tratados únicamente con VE (Linares y col., 2013).

Al parecer, la respuesta de los ovarios a la microinyección con atropina depende de la gónada tratada, ya que cuando se microinyecta el ovario derecho éste presenta folículos preovulatorios y prequistes, pero no quistes foliculares, mientras que si la atropina se inyecta en el ovario izquierdo se observan además los quistes foliculares.

La diferente respuesta entre el ovario izquierdo y derecho al bloqueo del sistema colinérgico podría deberse a que el número de receptores muscarínicos es diferente, o que la afinidad de éstos cambia.

Kozłowska y colaboradores (2008) mostraron que en cerdos la inducción del SOPQ en la fase folicular, por la administración de dexametasona (DXM), induce cambios en la inervación colinérgica de los ovarios. De igual manera, cuando la DXM se administra a la mitad de la fase lutea, se observan fibras inmunoreactivas al VACHT alrededor de los quistes foliculares, de los folículos terciarios pequeños y en los secundarios (Kozłowska y col., 2014).

Aun cuando la atropina fue inyectada en uno de los ovarios, la morfología de la gónada contralateral no fue la típica de un animal con SOPQ. Cuando el ovario contralateral es el derecho, se observa folículos pequeños y folículos tipo III que presentan signos de atresia. Un patrón de desarrollo folicular diferente se observó cuando el ovario contralateral fue el izquierdo, ya que éste presentó folículos grandes. Estas evidencias sugieren que el desarrollo folicular fue diferente para el ovario izquierdo y derecho. También apuntan a una posible comunicación entre el ovario que recibió la atropina y el ovario intacto.

La respuesta diferencial entre los ovarios también se ha reportado que ocurre cuando los animales son sometidos a la vagotomía izquierda y el ovario innervado (derecho) presenta un mayor número de folículos preovulatorios que el denervado (Cruz y col., 1986).

El desarrollo de los folículos requiere que se mantengan las comunicaciones intercelulares, para ello se requiere la fosforilación de la conexina 43 lo que va a garantizar que las células de la granulosa mantengan su proliferación y su desarrollo (Mayerhofer y Kunz., 2005). En los animales con SOPQ el bloqueo del sistema colinérgico, por la microinyección de atropina en la bursa ovárica, pudo haber modificado la fosforilación de las conexinas, lo que resultó en el crecimiento de los folículos, sin embargo, éstos mostraron signos de atresia como la descamación de las células de la granulosa y la presencia de invaginaciones en las capas de las células de la granulosa.

En resumen, los resultados del presente estudio muestran que el bloqueo del sistema colinérgico por la microinyección de atropina en la bursa del ovario no fue capaz de inducir la ovulación, a pesar de haber inhibido el hiperandrogenismo característico del síndrome.

MODELO DEL ANIMAL CON SOPQ

En la vasculatura de la bursa ovárica se encuentran presentes los receptores muscarínicos M3, cuya función es la de regular el flujo sanguíneo. Es posible que el bloqueo de estos receptores por la microinyección de atropina haya modificado el aporte sanguíneo, lo que se traduce en la disminución de la masa ovárica.

Si bien en los animales con SOPQ, se observa en el folículo ovárico desprendimiento de las células de la granulosa, la proporción es menor a la que se visualiza en el animal cíclico tratado con ATR. Es posible que al unirse la ATR a sus receptores M1 y M5 se facilite la fosforilación de las conexinas 43, y así mantener las uniones celulares.

En los animales con SOPQ no se presenta la ovulación y por lo tanto no existen cuerpos lúteos que sean capaces de mantener la producción de progesterona, por ello, sugerimos que la progesterona que medimos es de origen adrenal.

En este modelo animal, la microinyección con ATR en la bursa ovárica puede estar disminuyendo la actividad de las enzimas que facilitan la biotransformación de pregnenolona a progesterona, lo que explicaría su disminución. Si la cantidad de sustrato es menor, entonces se explica porque la concentración de testosterona disminuyó (Figura 33).

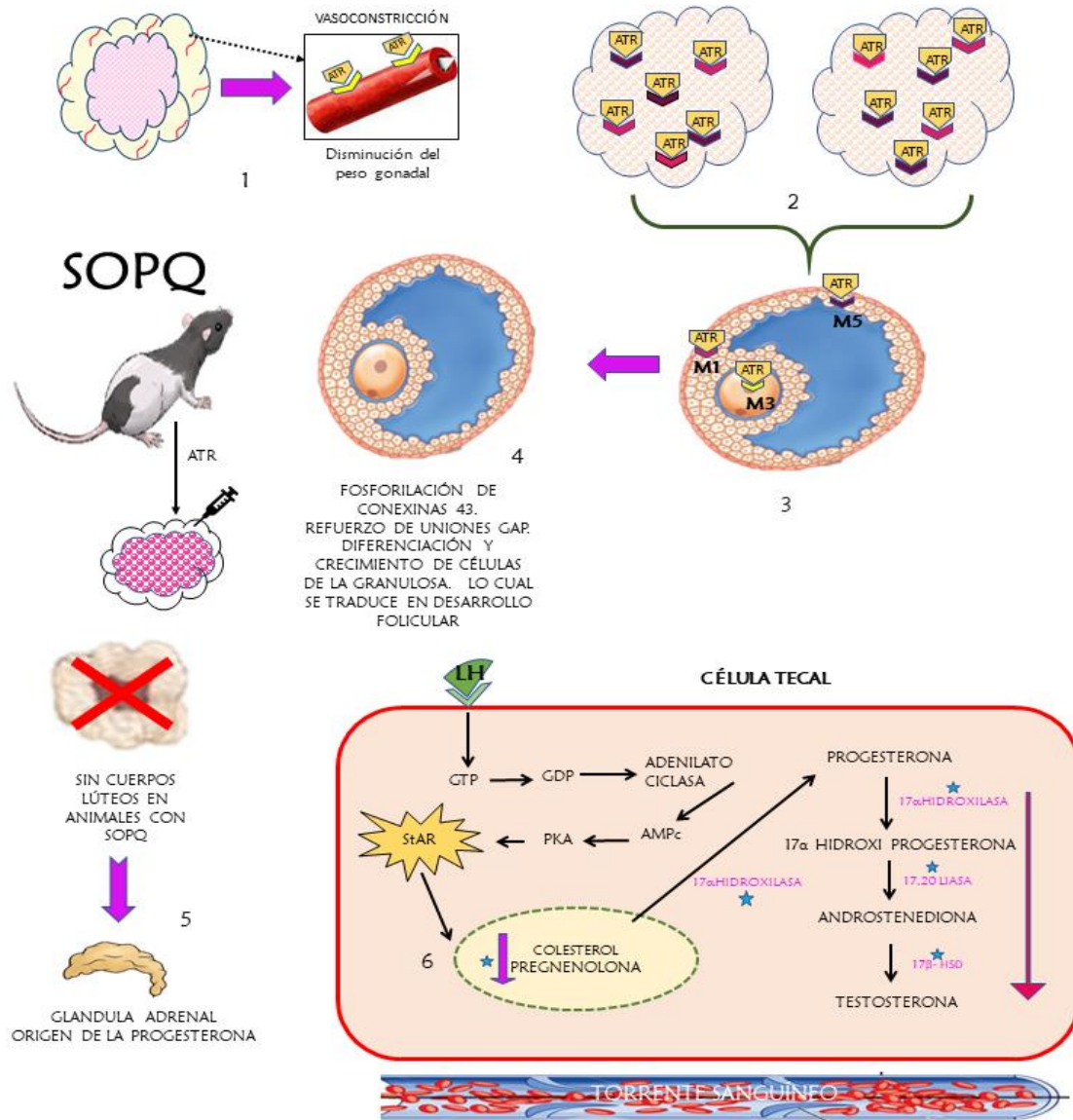


Figura 33. Esquema representativo de lo que ocurre cuando la atropina es microinyectada en la bursa ovárica izquierda o derecha de ratas con SOPQ. 1.- Vasoconstricción de los vasos que rodean la bursa ovárica 2.- Los receptores muscarínicos se encuentran ocupados por atropina (ATR) 3.-Localización de los receptores muscarínicos 4.- Crecimiento y diferenciación de las células de la granulosa 5.- Progesterona de origen adrenal 6.- La ATR puede estar regulando la actividad de las enzimas (★) que participan en la biotransformación de pregnenolona hasta testosterona.

CONCLUSIONES

☞ En el animal adulto cíclico el sistema colinérgico del ovario:

- El bloqueo de los receptores muscarínicos, por la microinyección de atropina, no modificó la cuota ovulatoria.
- En el ovario derecho, regula de manera inhibitoria la secreción de progesterona.
- Regula de manera estimulante la secreción de testosterona.

☞ En el animal con SOPQ el sistema colinérgico del ovario:

- En el animal adulto con SOPQ el bloqueo de los receptores muscarínicos del ovario es ineficiente para inducir la ovulación.
- Regula de manera estimulante la secreción de progesterona y testosterona.

BIBLIOGRAFÍA

- * **Agrawal R., Sharma S., Bekir J., Conway G., Bailey J., Balen H., Prelevic G.** (2004) "Prevalence of Polycystic Ovaries an Polycystic Ovary Syndrome in Lesbian Women Compared with Heterosexual Women" *Fertility and Sterility*. 82(5): 1352-1357.
- * **Albuquerque EX., Pereira EF., Alkondon M., Rogers SW.** (2009). "Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews*. 89(1), 73-120.
- * **Ayala-Martínez R.** (2017) Tesis de Licenciatura Expresión de los Receptores del Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) en el Ovario de la Rata" Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México.
- * **Azziz R., Carmina E., Dewailly D., Diamanti-Kandarakis E., Escobar-Morreale F., Futterweit W., Witchel F.** (2009). "The Androgen Excess and PCOS Society Criteria for the Polycystic Ovary Syndrome: The Complete Task Force Report" *Fertility and Sterility*, 91(2): 456-488.
- * **Barco AI., Flores A., Chavira F., Damián- Matzumura P., Domínguez R., Cruz ME.** (2003) "Asymmetric Effects of Acute Hemiovalectomy on Steroid Hormone Secretion by the Insitu Ovary" *Endocrine*. 21: 209-215.
- * **Barria A., Leyton V., Ojeda S., Lara HE.** (1993) "Ovarian Steroidal Response to Gonadotropins and β -Adrenergic Stimulation is Enhanced in Polycystic Ovary Syndrome: Role of Sympathetic Innervation" *Endocrinology*. 133: 2696-2703.
- * **Berne R., Levy M.** (2001) "Fisiología" 3ª ed. Editorial Elsevier- Science. Madrid.
- * **Berne R., Levy M.** (2006) "Fisiología" 4ª ed. Editorial Elsevier- Science. Madrid.
- * **Botella J.** (2005) "El ovario de los vertebrados" En: *El Ovario Fisiología y Patología*. Capítulo 1. pp.1 -22 Editorial Díaz de Santos. Madrid. España.
- * **Braw RH., Tsafiri A.** (1980) "Follicles Explanted Fron Pentobarbitoneatred Rats Provide a Model for Atresia" *Journal of Reproduction an Fertility* 59: 259-265.

- * **Brawer JR., Munoz M., Farookhi R.** (1986) "Development of the Polycystic Ovarian Condition (PCO) in the Estradiol Valerate Treated Rat" *Biology of Reproduction* 35: 647-655.
- * **Bremer A.** (2010) "Polycystic Ovary Syndrome in the Pediatric Population" *Metabolic Syndrome and Related Disorders* 8 (5): 375-394.
- * **Burden HW.** (1978) "Ovarian innervation" *The Vertebrate Ovary: Comparative Biology and Evolution*. New York, Plenum Press: 615-638.
- * **Burden HW., Lawrence IE.** (1977) "The effect of Denervation on Compensatory Ovarian Hypertrophy" *Neuroendocrinology* 23: 368-378.
- * **Burden HW., Lawrence Jr IE., Louis TM., Hodson C A.** (1981). "Effects of Abdominal Vagotomy on the Estrous Cycle of the Rat and the Induction of Pseudopregnancy" *Neuroendocrinology*. 33(4), 218-222.
- * **Byers S., Wiles M., Dun S., Taft R.** (2012). "Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images". *PLoS One*, 7(4), pp. 1-5.
- * **Caro C., Fuhrer J., Sáez R., Rubio V., Moreno L. Cumsille M.** (2002) "Efectos de la Metformina en el Síndrome de Ovario Poliquístico Asociado a Insulinresistencia" *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología* 67 (1): 34-40.
- * **Ciotta L., Stracquadanio M.** (2015) "Metabolic Aspects of Pcos: Treatment With Insulin Sensitizers". Editorial Springer ebook:1-15.
- * **Cóppola F., Nader J., Aguirre R.** (2005) "Síndrome de Insuficiencia Androgénica en la Mujer" *Revista Médica Uruguay*. 21:174-185
- * **Cora CM., Kooestra L., Travlos G.** (2015) "Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears" *Toxicologic Pathology*. 43; 776-793.
- * **Cruz G., Barra R., González D., Sotomayor-Zárate R., Lara HE.** (2012). Temporal Window in Which Exposure to Estradiol Permanently Modifies Ovarian Function Causing Polycystic Ovary Morphology in Rats. *Fertility and Sterility*, 98(5): 1283-1290.

- * **Cruz M E., Jaramillo LP., Domínguez R.** (1989). "Asymmetric Ovulatory Response Induced by a Unilateral Implant of Atropine in the Anterior Hypothalamus of the Cyclic Rat". *Journal of Endocrinology*. 123(3): 437-439.
- * **Cruz M.E., Chávez R., Domínguez R.** (1986) "Ovulation, Follicular Growth and Ovarian Reactivity to Exogenous Gonadotropins in Adult Rats with Unilateral or Bilateral Section of the Vagi Nerve" *Revista de Investigación Clínica*. 38(2):167-171.
- * **Cruz ME., Castro J., Domínguez R.** (1992) "A Comparative Analysis of the Neuroendocrine Mechanisms Regulating Ovulation, Affected by a Unilateral Implant of Atropine in the Preoptic-anterior Hypothalamic Area, in Intact and Hemiovaectomized Adult Rats" *Journal of Endocrinology* 133: 205-210.
- * **Cruz ME., Flores A., Alvarado BE.** (2015) "Ovulation Requires the Activation on Proestrous of M1 Muscarinic Receptors in the Left Ovary" *Endocrine*. 49:809-819.
- * **Cruz ME., Flores A., Domínguez R.** (2014). "The cholinergic system of the preoptic-anterior hypothalamic areas regulates the ovarian follicular population in an asymmetric way." *Endocrine*. 47(3):913-922.
- * **Cruz ME., Flores A., Palafox MT., Méendez G., Rodríguez JO., Chavira R., Domínguez R.** (2006). "The Role of the Muscarinic System in the Regulating Estradiol Secretion Varies During the Estrus Cycle: The Hemiovaectomized Rat Model" *Reproductive Biology and the Endocrinology*. 4:43.
- * **D´Albora H., Lombide P, Ojeda SR.** (2000) Intrinsic Neurons in the Rat Ovary: an Immunohistochemical Study" *Cell Tissue*. 300: 47-56.
- * **Davies MJ., Norman RJ.** (2002) "Programming and Reproductive Functioning" *Trends Endocrinol Metab*. 13:386-392.
- * **Dees WL., Hiney JK., Schultea TD., Mayerhofer A., DanilchikM., Dissen GA., Ojeda SR.,** (1995) "The Primate Ovary Contains a Population of Catecholaminergic Neuron-like Cells Expressing Nerve Growth Factor Receptors" *Endocrinology*. 136: 5760-5768.

- * **Delgado S., Escudero CG., Casais M., Gordillo M., Anzulovich AC., Sosa Z., Rastrilla AM.** (2010). "Ovaric Physiology in the First Oestral Cycle: Influence of Noradrenergic and Cholinergic Neural Stimuli From Coeliac Ganglion". *Steroids*. 75(10):685-694.
- * **Dissen G., Ojeda S.** (1999) "Ovarian Innervation" *Encyclopedia of Reproduction*. Editorial Academic Press. USA. Cap. 3 pp. 583-589.
- * **Domínguez R., Chávez R., Cruz ME.** (1991) "La Regulación del Crecimiento y del Desarrollo del Folículo Ovárico" En: *Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción*. Editorial Miguel Ángel Porrúa. México; pp. 161-192.
- * **Domínguez R., Cruz M.E., Morán C.** (1998) "Differential Effects of Ovarian Local Anaesthesia During Pro-oestrus on Ovulation by the Right or Left Ovary in Normal and Hemi-ovariectomized Adult Rats" *Journal of Reproduction and Fertility* Vol 130: 185-190.
- * **Dominguez R., Riboni L., Zipitria D., Revilla R.** (1982). Is There a Cholinergic Circadian Rhythm Throughout the Oestrous Cycle Related to Ovulation in the rat?. *Journal of Endocrinology*. 95(2), 175-180.
- * **Dumesic AD., Abbott H., Padmanabhan V.** (2007) "Polycystic Ovary Syndrome and its Developmental Origins" *Endocrinology Metabol Disorders*. 8(2): 127-141.
- * **Dunaif A.** (1995). "Hyperandrogenic Anovulation (PCOS): An Unique Disorders of Insulin Action Associated with an Increase Risk of Non-insulin-Dependent Diabetes Mellitus" *American Journal of Medicine*; 98(5): 33-39.
- * **Egozi Y., Kloog Y., Sokolovsky M.** (1986). "Acetylcholine Rhythm in the Preoptic Area of the Rat Hypothalamus is Synchronized with the Estrous Cycle". *Brain Research*. 383(1-2):310-313.
- * **Erickson G., Shimasaki S.** (2001). "The Physiology of Folliculogenesis: The Role of Novel Growth Factors" *Fertility and Sterility*. 75(5) :943-949.
- * **Espey L., Richards JA.** (2005) "Ovulation" En: *Knobil E., Neill JD (Eds). The Physiology of Reproduction*, 3ª ed. Editorial Raven Press. New York. Vol 2 Cap. 10: 425- 474.

- * **Everett JW., Sawyer Ch., Markee JE.** (1949) "A neurogenic Timing Factor in Control of the Ovulatory Discharge of Luteinizing Hormone in the Rat" *Endocrinology*. 134: 234-250.
- * **Feder HH.** (1981) "Estrous Cyclicity in Mammals" En: Adler NT (Ed.) *Neuroendocrinology of Reproduction, Physiology and Behavior*. Plenum Press. New York. Cap 10. pp 279-308.
- * **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.
- * **Flores A., Gallegos Al., Velasco J., Mendoza FD., Montiel C., Everardo PM., Domínguez R.** (2008). "The Acute Effects of Bilateral Ovariectomy or Adrenalectomy on Progesterone, Testosterone and Estradiol Serum Levels Depend on the Surgical Approach and the Day of the Estrous Cycle when they are Performed". *Reproductive Biology and Endocrinology*. 6(1):48.
- * **Flores A., Rodríguez J., Palafox M., Méndez G., Barco A., Chavira R. Cruz ME., Domínguez R.** (2006) "The Acute Asymmetric Effects of Hemiovariectomy on Testosterone Secretion Vary Along the Estrous Cycle. The Participation of the Cholinergic System" *Reproductive Biology and Endocrinology*. 4: 1-10.
- * **Flores Fl., Velasco C., Pardo MC., Pérez-Martínez M.,** (2005) "Apoptosis y Atresia Folicular: Un Binomio Esencial en el Desarrollo Ovárico" *Veterinaria México*. 36; 87-101.
- * **Flores ME., Segura JE.,** (2005); "Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico"; *Revista Mexicana de Neurociencias*; 6; 315-326.
- * **Flores-Pérez Fl., Rosas- Velasco C. Romano-Pardo M., Pérez-Martínez M.** (2005) "Apoptosis y Atresia Folicular: Un Binomio Esencial en el Desarrollo Ovárico" *Veterinaria México*. Vol. 36(1):91-103.

- * **Franks S., Webber LJ., Goh M., Valentine A., With DM., Conway GS., Wiltshire S., McCarthy MI.,** (2009) "Ovarian Morphology is a Marker of Heritable Biochemical Traits in Sisters with Polycystic Ovaries" *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93:1662-1669.
- * **Freeman ME.,** (2006) "Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat" En: *Knobil and Neil's Physiology of reproduction*, 3ª ed. Cap 43; 327-330.
- * **Fritz S., Kunz L., Dimitrijevic N., Grünert R., Heiss., Mayerhofer A.** (2002) "Muscarinic Receptors in Human Luteinized Granulosa Cells: Activation Blocks Gap Junctions and Induces the Transcription Factor Early Growth Response Factor-1" *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 87(3):1362-1367.
- * **Gasol F.** (2005) "Epidemiología y Conceptos Generales" En: *Síndrome de Ovario Poliquístico*. Editorial Panamericana. Cap 1. pp. 13-24.
- * **Gerendai I., Tóth El., Boldogkői Z., Medveczky I., Halász B.,** (2000) "CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function" *Journal of the Autonomic Nervous System*. 80: 40-45.
- * **Geva E. y Jaffe RB.** (2000) "Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Ovarian Physiology and Pathology" *Fertility and Sterility*. 74(3): 429-438.
- * **Gomes Costa ST.** (2005) "Sistema Nervioso Autónomo" Clase de Enseñanza en el Hospital Mar-Esperanza. Barcelona. España, 1-25.
- * **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.
- * **Goodman y Gilman** (2012) "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica" 12ª Ed. Editorial McGraw Hill, Cap 9; 219-238.
- * **Gorny D., Szarecki J., Jesipowicz M** (1983) "Vagotomy Effect on the Content and Synthesis of Acetylcholine in Autonomic Ganglia in Dog Stomach" *Acta Physiol Pol*. 34 (1): 155-162.

- * **Gougeon A.** (2004) “Dynamics of Human Follicular Growth: Morphologic, Dynamic, and Functional Aspects” En: *The Ovary*. 2ªed. Elsevier Academic Press. San Diego, USA. cap 2; pp 25-43.
- * **Greenwald GS., Roy SK.** (1994) “Follicular Development and its Control” En: Knobil E., Neill JD (Eds). *The Physiology of Reproduction*. 2ª ed. Editorial Raven Press. New York. Vol 2. Cap. 12. pp. 629-724.
- * **Greiner M., Paredes A., Araya V., Lara HE.** (2005) “Role of Stress and Sympathetic Inervation in Development of Polycystic Ovary Syndrome” *Endocrine*. 28 (3):319-324.
- * **Hafez ESE., Hafez B.** (2002) “Reproducción e Inseminación Artificial en Animales”, 7ª ed. Editorial McGraw Hill. Cap 2; 13-29.
- * **Hall JE.,** (2014) “Neuroendocrine Control of the Menstrual Cycle” En: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction. Physiological Control Systems and Governing Gonadal Function*. Cap 8; 141-156.
- * **Hsuesh AJW., Billig H., Tsafiriri A.** (1994) “Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process” *Endocrinology* 15: 707-724.
- * **Hu J., Zhang Z., Wen- Jun S., Salmar A.** (2010) “Cellular Cholesterol Delivery, Intracellular Processing and Utilization for Biosynthesis of Steroid Hormones” *Nutrition and Metabolism*. 7 (47): 1-25.
- * **Irusta G.** (2008) Tesis Doctoral “Mecanismos Involucrados en la Atresia del Folículo Ovárico: Relación entre Esteroidogénesis, Angiogénesis y Apoptosis” Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Buenos Aires, Argentina.
- * **Kapia A. y Hsueh A.** (1977) “Regulation of Ovarian Follicle Atresia” *Annual Review Physiology* 59: 349-363.
- * **Klein CM., Burden HW.** (1988) “Anatomical Localization of Afferent and Pstganglionic Sympathetic Neurons Innervating the Rat Ovary” *Neurociencie Letters*. 85: 217-222.
- * **Kozlowska A., Majewski M., Jana B.** (2014) “Changes in the Cholinergic Innervation Pattern of Porcine Ovaries with Cyst Induced by Dexamethasone Administration” *Journal of Molecular Neuroscience*. 54: 10-19.

- * **Kozłowska A., Wojtkiewicz J., Majewski M., Jana B.** (2008). “Cholinergic Innervation of Cystic Porcine Ovaries. *Medycyna Weterynaryjna*. 64(4B), 565-570.
- * **Lara HE., Dissen A., Leyton V., Paredes A., Fuenzalida H., Fiedler JL., Ojeda S.** (2000) “An Increased Intraovarian Synthesis of Nerve Growth Factor and its Low Affinity Receptor is a Principal Component of Steroid- Induced Polycystic Ovary in the Rat” *Endocrinology*.141 (8): 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: 2690-2695.
- * **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.
- * **Levine JE.** (2015) “Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat” En: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Physiological Control Systems and Governing Gonadal Function*. Cap 26; 1-59.
- * **Li M., Zhou T., Cao Y., Zhang N, Li J.,** (2007) “Ultrastructure and Estrogen Regulation of the Lymphatic Stomata of Ovarian Bursa in Mice” *The Anatomical Records* 290: 1195-1202.
- * **Linares R., Hernández D., Morán C., Chavira R., Cárdenas M., Domínguez R., Morales-Ledesma, L.** (2013). Unilateral or Bilateral Vagotomy Induces Ovulation in Both Ovaries of Rats with Polycystic Ovarian Syndrome. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11(1): 68.
- * **Luján E., Hernández-Marín I., Ruiz–Ayala A.** (2006) “Utilidad Actual de las Pruebas Diagnósticas de Hiperandrogenismo” *Ginecología y Obstetricia de México*. 74 (6): 327-333.
- * **Malamed S., Gibney J., Ojeda S.** (1992) “Ovarian Innervation Develops Before Initiation of Folliculogenesis in the Rat” *Cell and Tissue Research*. 270:87-93.

- * **Manneras L., Cajander S., Lönn M., Stener-Victorin E.** (2009). "Acupuncture and Exercise Restore Adipose Tissue Expression of Sympathetic Markers and Improve Ovarian Morphology in Rats with Dihydrotestosterone-Induced PCOS". *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 296(4), R1124-R1131.
- * **Martin GC., Sack M., Talbot P.** (1981) "Structure of Bursae Ovaricae Surrounding the Ovaries of Golden Hamster" *The Anatomical Record*, 201; 485-498.
- * **Matalliotakis I., Kourtis A., Koukoura O.** (2006) "Polycystic Ovary Syndrome: Etiology and Pathogenesis" *Archives of gynecology and obstetrics*.27(4): 187-197.
- * **Mayerhofer A., Fritz S.,** (2002). "Ovarian Acetylcholine and Muscarinic Receptors: Hints of a Novel Intrinsic Ovarian Regulatory System", *Microscopy Research and Technique*, 59; 503-508.
- * **Mayerhofer A., Kunz L.** (2005) "A Non- Neural Cholinergic System of the Ovarian Follicle" *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*. 187(5-6), 521-528.
- * **McCann S., Ojeda S.** (1992) "The Anterior Pituitary and Hypothalamus" En: *Endocrine Physiology*. Griffin J., Ojeda S. (Eds.). Editorial Oxford University Press. New York. pp.75-105.
- * **Morales AJ., Laughlin GA., Butzow T.** (1996) "Insulin, Somatotrophic, and Luteinizing Hormone Axes in Lean and Obese Women with Polycystic Ovary Syndrome: Common and Distinct Features" *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(8): 2854-2864.
- * **Morales-Ledesma L.** (2015). "Regulación Neuroendócrina del Ovario" En *Procesos Fisiológicos y Toxicológicos de la Reproducción*. Puebla, México. Editorial BUAP Dirección de Fomento Educativo. pp. 113-133.
- * **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*, 8:99.

- * **Morán C, Pastelín CF, Rosas NH, Morales-Ledesma L., Linares R., Domínguez R.** (2010) “Anatomical Organization and Neural Pathways of the Ovarian Plexus Nerve in Rats” *Journal of Ovarian Research* 10:18.
- * **Moran C, Tapia MC, Hernandez E, Vazquez G, Garcia Hernandez E, Bermúdez JA.** (1994) “Etiological Review of Hirsutism in 250 Patients” *Archives of Medical Research*, 25(3), 311-314
- * **Navarrete MI.** (2014) Tesis de Licenciatura “Modificación de las Funciones Ováricas en el Animal con Síndrome de Ovario Poliquístico Inducido por la Administración de Valerato de Estradiol o la Exposición de Estrés por Frío.” Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México DF.
- * **Netter FH.** (2003) “Atlas de Anatomía Humana” 3ª ed. Editorial Masson, España.
- * **Ojeda SR., Skinner MK.** (2006). “Puberty in the Rat” En: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Editorial Elsevier. pp. 2061-2126.
- * **Paredes A., Galvez A., Leyton V., Arvena G., Fiedler JL., Bustamante D., Lara HE.** (1998). “Stress Promotes Development of Ovarian Qysts in Rats: The Possible Role of Sympathetic Nerve Activation” *Endocrine*. 8: 309-315.
- * **Peluso J., Steger RW., Hafez ES.** (1976) “Development of Gonadotrophin-binding sites in the Immature Rat Ovary” *Journal of Reproduction and Fertility*. 47(1): 55-58.
- * **Picciotto MR., Caldarone BJ., Brunzell DH., Zachariou V., Stevens TR., King SL,** (2001). “Neuronal Nicotinic Aceylcholine Receptor Subunit Knockout Mice: Physiological and Behavioral Phenotypes and Possible Clinical Implications” *Pharmacology and Therapeutics*. 92(2-3):89-108.
- * **Pichardo E., Reyes F., Suárez S.** (1999). *Fundamentos Teórico Práctico de la Citología Exfoliativa. En medicina veterinaria: manual.* Universidad Autónoma Metropolitana.
- * **Rodgers I., Rodgers RJ.** (2000) “Ultraestructure of the Basal Lamina of Bovine Ovarian Follicles and its Relationship to the Membrana Granulosa” *Journal of Reproduction and Fertility*. 118: 221.228.

- * **Rosa G. Ramírez MI., Linares R., Trujillo A., Domínguez R., Morales- Ledesma L.** (2015) “Asymmetric Steroidogenic Response by the Ovaries the Vasoactive Intestinal Peptide” *Endocrine*. 48:968-977.
- * **Rothlin RP.** (2003) “Colinérgicos y Anticolinérgicos” *Farmacología I.* pp 1-33.
- * **Saavedra O., Ramírez I., García J.,Ceballos GM., Bolaina E.** (2012) “Cholesterol: Biological Function and Medical Implications” *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 43(2): 7-22.
- * **Salehi M., Baravo R., Sheikh A., Gouller A., Poretsky L.** (2004) “Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome: Whats is the role of Obesity?” *Elsevier*: 358-376.
- * **Sánchez- Criado JE.** (1999) “Fisiología del Ovario” en Tresguerres JA (Eds.) *Fisiología Humana*. 2ª Edición. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. Madrid, España. Cap. 75. Pp. 1040-1055.
- * **Seya T, Akazawa T, Tsujita T, Matsumoto M.** (2006) “Role of Toll-like Receptors in Adjuvant-augmented Immune Therapies. Evid Based Complement” *Alternative Medicine*. 3:31–38.
- * **Sotomayor-Zárate R.** (2008) Tesis Doctoral: “La Administración Neonatal de Estrógenos y Andrógenos, Afecta la Función Reproductiva de la Rata Adulta y la Neurotransmisión Monoaminérgica en el Hipotálamo Ventromedial. Estudios Neuroquímicos y Farmacológicos in vivo” Universidad de Chile. Santiago de Chile.
- * **Sotomayor-Zárate R., Dorfman M., Paredes A., Lara HE.** (2008) “Neonatal Exposure to Estradiol Valerate Programs Ovarian Sympathetic Innervation and Follicular Development in the Adult Rat” *Biology of Reproduction*. 78: 673-680.
- * **Stein IF., Levethal ML.** (1935) “Amenorrhea Associated whit Bilateral Polycystic Ovaries” *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 29(2): 181-191.
- * **Stener- Victorin E., Lundeber T., Waldenström., Mnni L., Gunnarsson S., Janson PO.** (2000) “Effects of Electro-Acupunture on Nerve Growth Factor and Ovarian Morphology in Rats with Experimentally Induced Polycystic Ovaries” *Biology of Reproduction*. 63 (5): 1497-1503.

- * **Stener-Victorin, E., Waldenström, U., Wikland, M., Nilsson, L., Hägglund, L., & Lundeberg, T.** (2003). "Electro-acupuncture as a Peroperative Analgesic Method and its Effects on Implantation Rate and Neuropeptide Y Concentrations in Follicular Fluid." *Human Reproduction*, 18(7), 1454-1460.
- * **Stoelting Rk** (1991) "Pharmacology and Physiology in Anesthetic Practice" 2ªed. Editorial JB Lippincott, Philadelphia, Pasadena.
- * **Strauss JD., Williams CJ.** (2014) "The Ovarian Life Cycle" En: Yen SSC., Jaffe´s (eds.) *Reproductive Endocrinology*. 7ª ed. Cap. 9. pp. 157-191.
- * **Tresguerres JA., Castillo C.** (2005) "Fisiología del Eje Hipotálamo- Hipófisis-Ovario" En: Tresguerres JA (Eds). *Fisiología Humana*. 3ª edición. Editorial McGraw-Hill. Madrid. España Cap. 79. pp. 107-118.
- * **Trujillo A., Gutiérrez G., Linares R., Cortés Ma. C., Eguibar J.,** (2015), "El Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovarios Un Viejo Conocido, Nuevos Hallazgos y más por Conocer". En: *Procesos Fisiológicos y Toxicológicos de la Reproducción*. Editorial BUAP, Dirección de Fomento Editorial Puebla, México. pp: 95-111.
- * **Urta J., Blohberger J., Tiszavari M., Mayerhofer A., Lara HE.,** (2016) "In Vivo Blockade of Acetylcholinesterase Increases Intraovarian Acetylcholine and Enhances Follicular Development and Fertility in the Rat" *Scientific Report*. 6: 30129.
- * **Villalobos IM., Zurich L** (1979) "Efectos de Fármacos Colinérgicos" *Archivos de Medicina Veterinaria Suplemento 1*: 12-18.
- * **Walles B., Edvinsson L., Owman Ch., Sjöberg NO., Sporrang B.** (1976) "Cholinergic Nerves and Receptor Mediating Contraction of the Graafian Follicle" *Biology of Reproduction*. 15:565-572.
- * **Walters K., Allan C., Handelsman D.** (2012). "Rodent Models for Human Polycystic Ovary Syndrome" *Biology of Reproduction*. 86(5):149,1-12.
- * **Wintherhalter EH.,** (1986) "Ein Sympathisches Ganglion in Menschlichen Ovarium" *Arch Cyniicol*. 51: 49-55.

- * **Yen SSC.** (2001) “Ciclo Menstrual Humano: Regulación Neuroendocrina”. EN: Yen SSC, Jaffe RB., Barbieri RL. (eds.) Endocrinología de la Reproducción. 4ª edición. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. Cap. 7. Pp. 212-216.
- * **Yen SSC., Vela P., Rankin J.** (1970) “Inappropriate Secretion of Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone in Polycystic Ovarian Disease” The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 30 (4): 435-442.
- * **Zore T., Joshi N. V., Lizneva D., Azziz R.** (2017). “Polycystic Ovarian Syndrome: Long-term Health Consequences. In Seminars in Reproductive Medicine. Thieme Medical Publishers. 35 (3), pp. 271-281.



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

Otorga la presente
CONSTANCIA
A

**Acuña-Escalona, Xóchitl Nallely; Linares, R. y
Morales-Ledesma, L.**

Por la presentación del trabajo

**“EFECTO DE LA MICROINYECCIÓN DE ATROPINA EN LA BURSA
OVÁRICA DE RATAS SOBRE LA RESPUESTA OVULATORIA”**

XLII Reunión Anual de la AIBIR

Hotel Plaza Diana, Guadalajara, Jalisco. Del 22 al 24 de mayo de 2017

Carmen Aceves Velasco
Dra. Carmen Aceves Velasco
Secretaria

Maricela Luna
Dra. Maricela Luna
Presidente AIBIR



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

Otorga la presente
CONSTANCIA
A

Xóchitl Nallely Acuña Escalona

Por el segundo lugar en la presentación del cartel
“EFECTO DE LA MICROINYECCIÓN DE ATROPINA EN LA
BURSA OVÁRICA DE RATAS SOBRE LA RESPUESTA
OVULATORIA” en la modalidad de pregrado

XLII Reunión Anual de la AIBIR
Hotel Plaza Diana, Guadalajara, Jalisco. Del 22 al 24 de mayo de 2017


Dra. Carmen Aceves Velasco
Secretaria


Dra. Maricela Luna
Presidente AIBIR



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA
DE MÉXICO

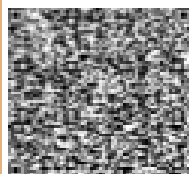
CONSTANCIA

Que otorga la
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA
a través del Departamento
de Educación Continua

a *Xóchitl Nallely Acuña Escalona, Rosa Linares
Culebro, Rocío Sarahy Ayala Martínez, Leticia
Morales Ledesma*

Por la presentación del Trabajo en Cartel: Efecto de la
Microinyección de Atropina en la Bursa Ovárica de Ratas con
SOPQ sobre las Hormonas Ováricas, dentro del 13° Congreso de
Investigación, organizado por la División de Estudios de Posgrado e
Investigación de esta Facultad el 19 de octubre del año en curso.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 20 de octubre de 2017.



Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez
Director

