



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

En la rata, ¿La exposición intrauterina del
feto al valerato de estradiol induce el
desarrollo del Síndrome del Ovario
Poliquístico?

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

EVELYN MILDRED HERNÁNDEZ GARCÍA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. GABRIELA ROSAS GAVILÁN

ASESORAS:

DRA. LETICIA MORALES LEDESMA

DRA. ROSA LINARES CULEBRO

Investigación realizada gracias al programa:

UNAM-DGAPA-PAPIIT No. IN207022



CDMX a 24 de mayo de 2023.



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
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
CARRERA DE BIOLOGÍA
FORMATO F-5



OFICIO DE FECHA DE EXAMEN

QFB GRACIELA ROJAS VÁZQUEZ
JEFA DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 Presente

Le comunico que al alumno: **HERNANDEZ GARCIA EVELYN MILDRED** con número de cuenta **313138605** de la carrera **BIOLOGÍA** se le ha fijado el día **24 de Mayo de 2023** a las **11:00 hrs.**, para presentar la réplica oral de su examen profesional, que tendrá lugar en esta facultad, ante el siguiente jurado:

CARGO	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE DRA.	MORALES LEDESMA LETICIA	
VOCAL DRA.	ROSAS GAVILAN GABRIELA	
SECRETARIO DRA.	ALVAREZ BARRERA LUCILA	
SUPLENTE DRA.	LINARES CULEBRO ROSA	
SUPLENTE DRA.	CHAPARRO ORTEGA ANDREA	

El título del trabajo escrito que se presenta es:

En la Rata, ¿La Exposición Intrauterina del Feto al Valerato de Estradiol Induce el Desarrollo del Síndrome del Ovario Poliquístico?

En la modalidad de: **TESIS**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
 CDMX, a 28 de Marzo de 2023

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD
 DIRECTOR DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES ZARAGOZA

AGRADECIMIENTOS

A la Máxima Casa de Estudios, la **Universidad Nacional Autónoma de México**, porque desde que ingresé al bachillerato, me permitió acceder a un mundo de conocimiento y experiencias inolvidables; y a la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**, porque me brindó nuevos aprendizajes y porque aquí me seguí forjando como persona y profesionalista.

A cada uno de los miembros del jurado:

Dra. Leticia Morales Ledesma.

Dra. Gabriela Rosas Gavilán.

Dra. Lucila Álvarez Barrera.

Dra. Rosa Linares Culebro.

Dra. Andrea Chaparro Ortega.

Por su valioso tiempo y comentarios los cuales ayudaron al enriquecimiento de este trabajo.

Al apoyo dado por la **UNAM-DGAPA-PAPIIT No. IN207022.**

A la **Dra. Adriana, Dr. Román, Dra. Ely** y a todo el personal del bioterio, por cuidar de las ratitas.

Al **Biól. Roberto Chavira**, por su valiosa ayuda en la cuantificación de hormonas.

Gracias a todas las ratitas de la cepa CII-ZV.

A la **Dra. Leticia Morales Ledesma:**

Dra., no tengo palabras para agradecer todo lo que me ha brindado. Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio, por confiar en mí y mis capacidades, por no rendirse conmigo; por extender mi panorama y así aprender de este mundo de la investigación.

Por la *immensa paciencia*, que tuvo para conmigo, eso, en especial nunca dejaré de agradecersele. Gracias porque con su amor, experiencia y amabilidad, entre muchas otras cosas, me fue guiando en todo este proceso, pero, sobre todo, porque cuando perdí el camino y el impulso, usted representó en mí, ese empujoncito que necesité para retomar el vuelo. Espero algún día poder ser, al menos, un poco de la gran persona y profesionalista que usted es. Me llevo tantas cosas... gracias por su amistad, sus valiosos consejos y por ser el ejemplo de una mujer fuerte, capaz y trabajadora. ¡La quiero y admiro muchísimo!

A la **Dra. Gabriela Rosas Gavilán**, porque desde el día cero siempre tuvo la disposición de ayudarme cuando más perdida estaba. Por la enorme paciencia que tuvo conmigo y porque nunca me dejó de lado. No tengo ya palabras para hacerle saber cuán agradecida estoy con usted. Me ha apoyado en todas las formas posibles que ni en toda mi vida terminaría de regresar un poco de lo mucho que me ha brindado. Gracias infinitas porque con mucho amor y amabilidad siempre me explicó las cosas que no entendía y siempre me hizo saber de buena forma cuando fallaba. Asimismo, por no rendirse nunca conmigo, y porque siempre estuvo ahí, motivándome, cuidándome y echándome porras

cuando dudé de mí. En definitiva, usted me salvó la vida. Gracias por siempre ofrecernos una sonrisa a sus alumnos, su experiencia, confianza, consejos y amistad. Doy gracias a la vida por coincidir con usted. ¡La admiro como persona y profesionalista; y la quiero demasiado!

A la **Dra. Andrea Chaparro**. Porque nunca se me olvidarán las palabras que me compartió al finalizar mi primer tutorial, fue un gesto muy lindo de su parte acercarse conmigo y compartir sus consejos y experiencia. Eso me incentivó mucho a tratar de mejorar. ¡La quiero mucho Dra!.

A las **Dras., Rosa Linares, Azucena Espinoza y Elizabeth Vieyra**; por los comentarios, experiencia y consejos que compartieron conmigo durante toda mi estancia en el laboratorio, los cuales me motivaron y enriquecieron para salir adelante, y porque todas son una gran inspiración. Gracias.

A todos los compañeros y amigos de laboratorio 7, aliviaron el camino, porque muchos me ayudaron cuando en algo me atoraba, por compartir risas y experiencias que nunca olvidaré, en especial a **Mayahuel, Karina Solís, Fer Meza, Gregorio, Emanuel, Adriana Ramírez, Dianita, Mich, Litzay, Otto y Roberto**, todos son excelentes, me llevo mucho de ustedes; y también a los más chiquitos, **Dianita Guzmán, Magaly, Joaquín, Anita, Caleb, Ángeles y Titalli**, nunca se rindan chicos, los quiero mucho.

Un agradecimiento especial a **Alma Salmorán** por las risas, las experiencias, los consejos y más, quizá no lo recuerdes, pero tú fuiste quién más me orientó y despejó mis dudas cuando entré al laboratorio.

A mis amigos de toda la carrera, chicos sin duda ustedes en muchos momentos me alegraron la vida y la hicieron muchísimo más fácil, **Fedra, Andy, Abraham, Britt, Esther, Gilberto y José Bautista**.

A **Edgar Ramos**, amigo, aunque me abandonaste apenas comenzaba la carrera, fuiste alguien que me motivó y ayudó mucho cuando no entendía nada. Admiro que fuiste a perseguir tu verdadera vocación.

A **Sam y Olaf**, que, aunque ya no nos vemos por diversas razones ustedes fueron y son unos buenos amigos con los cuales tuve gratas experiencias en el CCH. En su momento me motivaron demasiado. Los quiero, espero que la vida vuelva a juntarnos.

A la **Embrióloga Magaly García**, gracias por toda la ayuda que hasta ahora me sigues brindando. Nunca olvidaré cuando me motivaste a seguir en la carrera cuando estaba dudosa, no te equivocaste al decirme que conforme pasaba el tiempo te ibas enamorando de la misma. Eres una gran mujer, me llenas de mucha inspiración.

A todos los profesores de la FES Zaragoza que contribuyeron a mi desarrollo académico como personal, en especial, quiero dar un agradecimiento postúmo al **Biól. Luis Samuel Capos Lince**, quien me enseñó a que una materia no es "sólo pasar por pasar", por motivarme a ser mejor estudiante. Su exigencia me ayudó a trabajar duro para conseguir mis metas. Un abrazo hasta el cielo.

DEDICATORIAS

Con mucho amor y, desde mi corazón dedico esta tesis a:

A **mis padres**, que sin ustedes yo no estaría ni sería lo que soy. No tengo cómo agradecer todo su amor y apoyo.

A mi mami, **Bernardina García Hernández**. Por favor recibe este trabajo como reconocimiento por todo lo que me has brindado y por los sacrificios que has hecho para que esté en este punto de mi vida. Espero que puedas sentirte orgullosa de mí, esto es tan tuyo como mío, lo sabes. Gracias por dedicar tu vida para bien de la mía. Gracias por los valores y enseñanzas que plantaste en mí. Pero, sobre todo, por nunca dejarme solita en este camino tan duro, tomar mi mano cuando me siento temerosa. Deseo que la vida te guarde muchísimos años. Te amo mamita.

A **Isidro Hernández Hernández**. Pa', espero que esta meta alcanzada pueda llenarte también de orgullo. Agradezco mucho todos los sacrificios que has hecho por la familia, por mí, y porque a pesar de todo, siempre apoyaste y sostuviste mis estudios. No fue en vano. Este logro también es tuyo. Por enseñarme a nunca rendirme, no dar paso hacia atrás, no dejar nada a medias, ser fuerte ante las adversidades, y por recordarme que el miedo no debe paralizarme, al contrario. Te amo apá.

A **Víctor García**. Padrino, te agradezco con mucho cariño todo lo que has hecho por nosotras, por llenarnos de amor, de experiencia, conocimiento y más. Por siempre alentarme a estudiar y apoyarme de mil maneras a lo largo de los años para que finalmente hoy pueda concluir esta meta. Nunca olvidaré todo lo que nos has enseñado, lo atesoro mucho. Te quiero muchísimo.

A **Maggie**. Querida hermana mayor. ¿Por dónde comienzo?, no sabes lo mucho que me llena de felicidad poder escribir estas líneas y expresarte que fuiste un pilar en todo este proceso. Nadie mejor que tú sabe lo mucho que me costó estar hasta acá. Gracias porque con tus ocurrencias, alegría y ánimo me aligeraste el camino y además secaste mis lágrimas cuando creí que no podía más. Tu ternura y cariño son y serán siempre mi refugio. Te amo mucho mucho, para toda la vida.

A **Luisito**. Corazón, estuviste conmigo desde que inicié esta travesía. No tengo palabras... sólo sé que me siento muy afortunada porque nos acompañamos, porque me has apoyado en todas y cada una de mis decisiones y no sólo eso, por alentarme a ser mejor persona cada día. Y cuando todo va mal, nunca me dejas a la deriva, representas en mí ese lugarcito en el cual puedo estar en calma y feliz. Gracias por ese ánimo con el que me recuerdas que puedo lograr mis objetivos, por amarme, cuidarme, y ser paciente conmigo. Que la vida nos mantenga más tiempo así, porfi. Te amo ahora y siempre.

A **Frida**, por siempre estar para mí en todos los momentos, ya sean buenos o malos. Gracias porque al ser la mayor, siempre has sido referente en mi vida. Por cuidarnos y siempre velar por nosotros y porque siempre has creído en mí y me has ayudado de mil formas. Gracias por sostenerme cuando todo se me vino encima. Te amito.

A toda la familia García, quien siempre me ha arropado, me ha apoyado y echado porras, en especial a **Angy, Betty y Yaya**.

Con toda la humildad, me dedico este trabajo. **Mily**, este es un pequeño recordatorio de que, si te lo propones puedes lograr cualquier cosa, no importa el tiempo ni nada. Gracias por ser resiliente y persistente en estos años, y no saber rendirte ante la tempestad, no sabes lo orgullosa que estoy de ti. Cuando te sientas triste, sólo lee estas palabras, que seguro, te motivaran cuando quizá las cosas no marchen bien, recuerda que no todo es malo, y esas experiencias no te definen, al contrario, te forjan. Quiero agradecerte por las decisiones que has tomado, los consejos y las ganas con las que te levantas cada que caes. Estoy orgullosa de la mujer en la que te estás convirtiendo, sólo no pierdas de vista tus objetivos. Recuerda...

"Eres agua, no te agites.

Eres tierra, no te seques.

Eres cielo, no te nubles.

Eres fuego, no te apagues".

"Tienes razón, todo el esfuerzo es inútil, si no crees en ti mismo..."

-Guy Sensei

Índice de Contenido

PÁGINAS

ABREVIATURAS	i
RESUMEN	iii
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
Morfología del Ovario	3
Ovogénesis y Desarrollo Folicular	5
Atresia Folicular	13
Ovulación y Formación del Cuerpo Lúteo	17
Esteroidogénesis	20
Eje Hipotálamo Hipófisis Ovarios y su Participación en la Regulación de las Funciones Ováricas	24
Ciclo Estral	28
Inervación Ovárica	32
Desarrollo Embrionario de la Rata	34
Hormonas de la Gestación	40
Etapas del Desarrollo Posnatal de la Rata	49
Pubertad en la Rata	51
Síndrome del Ovario Poliquístico	52
Modelos de Exposición Prenatal a Esteroides	62
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	64
HIPÓTESIS	65
OBJETIVO GENERAL	65
OBJETIVOS PARTICULARES	65
MATERIAL Y MÉTODOS	66
Diseño Experimental	66
Apareamiento	66
Hembras Gestantes	67
Crías	67
Apertura Vaginal y Frotis	68
Procedimiento de Autopsia	69
Valoración de la Dinámica del Desarrollo Folicular	69
Cuantificación de Hormonas Esteroideas en Suero	71

ANÁLISIS ESTADÍSTICO	73
RESULTADOS	74
Efectos de la exposición intrauterina al VE en el día 16 de Gestación	74
Curso de la Preñez y Crías al Nacimiento	74
Peso Corporal y Peso Relativo de los Órganos.....	77
Inicio de la Pubertad y Ciclo Estral	78
Respuesta Ovulatoria	79
Histología Ovárica	80
Hormonas Esteroideas	82
Resumen de Resultados	83
Efectos de la exposición intrauterina al VE en el día 18 de Gestación	84
Curso de la Preñez y Crías al Nacimiento	84
Peso Corporal y Peso Relativo de los Órganos.....	87
Inicio de la Pubertad y Ciclo Estral	88
Respuesta Ovulatoria	89
Histología Ovárica y Dinámica del Desarrollo Folicular.....	91
Hormonas Esteroideas	96
Resumen de Resultados	97
DISCUSIÓN	99
MODELO 1	109
MODELO 2	110
CONCLUSIONES	112
PERSPECTIVAS	113
REFERENCIAS	114

ABREVIATURAS

17 α -OH	17 α -hidroxilasa
20 α -HSD	20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa
20 α -OH-P	20 α -hidroxiprogesterona
3 β -HSD	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
ACh	Acetilcolina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CGP	Células germinales primordiales
CL	Cuerpo lúteo
CO ₂	Dióxido de carbono
DES	Dietilestilbestrol
DG	Día de gestación/gestacional
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
D1	Diestro 1 o metaestro
D2	Diestro 2
dPRL	Prolactina decidual
E ₂	Estradiol
EDC	Disruptores endocrinos
eem	Error estándar de la media
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FR	Fetos retenidos
FSH	Hormona estimulante del folículo
GCMS	Ganglio celíaco-mesentérico superior
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HHO	Eje hipotálamo hipófisis ovario
IGF-I	Factor similar a la insulina I
Kiss	Kisspeptina

LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LH	Hormona luteinizante
NA	Noradrenalina
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NOS	Nervio ovárico superior
NPO	Nervio del Plexo ovárico
NPY	Neuropéptido Y
NV	Nervio vago
P ₄	Progesterona
P450arom	Aromatasas
P450c17 α	Complejo enzimático que incluye la 17 α -hidroxilasa y 17, 20 liasa
P450scc	Enzima que escinde la cadena lateral del colesterol
p-75	Receptor de baja afinidad a noradrenalina
PEV	Primer estro vaginal
PQ	Prequiste
PRL	Prolactina
PT	Propionato de testosterona
Q	Quiste
REL	Retículo endoplasmático liso
rPL-I	Lactógeno placentario de rata I
rPL-II	Lactógeno placentario de rata II
SHBG	Globulina fijadora de hormonas sexuales
SOPQ	Síndrome del ovario poliquístico
SP	Sustancia P
VE	Valerato de estradiol
Vh	Vehículo
VIP	Péptido intestinal vasoactivo

RESUMEN

El *Síndrome del Ovario Poliquístico (SOPQ)* es la endocrinopatía más frecuente que afecta la fertilidad de las mujeres en edad reproductiva. Se caracteriza por hiperandrogenismo, oligo-anovulación y quistes ováricos. Dada su complejidad, su etiología aún es desconocida. Recientemente se ha postulado que el SOPQ podría tener su origen desde la vida intrauterina. La exposición *in útero* de los fetos hembra a un ambiente androgenizado resulta en una *reprogramación fetal*, que desencadena alteraciones estructurales y funcionales en los órganos de la descendencia, lo que resulta en trastornos endócrinos y reproductivos en su vida posnatal semejantes a los descritos en mujeres con SOPQ. Tales estudios hacen evidente que un ambiente hormonal fetal alterado desempeña un papel importante en el desarrollo de la patología.

Uno de modelos experimentales para inducir el SOPQ es el de la rata tratada con *valerato de estradiol (VE)*, un estrógeno de larga actividad, que promueve el desarrollo de las características de la fisiopatología.

Actualmente, se desconoce si la exposición del feto al VE altera la función reproductiva en la vida posnatal. Por lo que en el presente estudio se analizó si la exposición al VE en distintos días del desarrollo gestacional resulta en las crías hembra púberes o adultas, en alteraciones reproductivas similares a las descritas en el SOPQ. Para ello se utilizaron ratas que en el día de gestación (DG) 16 o 18 fueron inyectadas por vía subcutánea (sc) con 0.1 mL de aceite de sésamo (Vehículo/Vh) o con 2.0 mg de VE disuelto en 0.1 mL del Vh. Posteriormente, las crías hembra fueron monitoreadas para verificar la canalización de la vagina, momento a partir del cual se realizó la toma del frotis vaginal diario durante dos ciclos estrales. Algunos animales fueron sacrificados al presentar su primer estro vaginal y otros en la etapa adulta (aproximadamente a los 70 días de edad), en estro.

En comparación a su respectivo grupo Vh, las **hembras estrogenizadas en el DG 16 y sacrificadas al primer estro vaginal (PEV)** presentaron una disminución en el peso del útero y de la masa adrenal, adelanto de la edad de apertura vaginal, la

concentración de progesterona aumentó y presentaron días continuos de diestro; mientras que aquellas autopsiadas en la **etapa adulta** mostraron un patrón normal del ciclo estral, aumento en el peso corporal y el número de ovocitos liberados disminuyó por parte del ovario derecho. En ambas edades, la histología ovárica reveló la presencia de varios folículos atrésicos y prequistes, con pocos quistes.

Por otra parte, en comparación a su respectivo grupo Vh, las **crías expuestas al VE en el DG 18** y autopsiadas al PEV mostraron disminución del peso corporal y uterino, con aumento del peso del bazo; adelanto en la edad de apertura vaginal, una menor concentración de testosterona y de la respuesta ovulatoria total, además el ciclo estral se caracterizó por días continuos de diestro, y la histología ovárica reveló menor número de folículos sanos acompañado de un aumento en el número de folículos atrésicos y de prequistes. Aquellas **crías sacrificadas en la etapa adulta** presentaron aumento del peso corporal, disminución del peso del útero, de la masa adrenal y del timo, la concentración de la progesterona disminuyó, el ciclo estral permaneció alterado, con más días en diestro, se presentó bloqueo de la ovulación por el ovario izquierdo y en la histología ovárica se observó que el número de folículos sanos se redujo, el número de prequistes aumentó aún más que en la pubertad, sin embargo, el número de quistes fue bajo.

Los resultados del presente estudio muestran que los efectos del VE durante el desarrollo fetal dependen del día gestacional en que se administra el estrógeno. En el DG 16, el VE actúa como un teratógeno* y/o disruptor endócrino* que sólo conduce a alteraciones en la pubertad de la descendencia; mientras que en el DG 18 ocasiona repercusiones más drásticas en la función reproductiva conforme avanza la edad de los animales. Lo que nos permite suponer que si dejamos transcurrir más tiempo, se podría desarrollar las características que definen al SOPQ.

***Teratógeno**: agente que puede causar el desarrollo anormal de un embrión o feto (Bolon y Rousseaux, 2015).

***Disruptores endocrinos**: son compuestos sintéticos o naturales presentes en el medio ambiente que interfieren, es decir que imitan y/o antagonizan, las acciones de las hormonas endógenas y alteran las funciones del sistema endocrino (Zama y Uzumcu, 2010).

INTRODUCCIÓN

El SOPQ es el trastorno endocrino-metabólico más frecuente que afecta la fertilidad de las mujeres, con una prevalencia de aproximadamente el 15% (Stener-Victorin y Deng, 2021). Se caracteriza por hiperandrogenismo, ausencia de ovulación y ovarios poliquísticos diagnosticados mediante ecografía; también se acompaña de manifestaciones como hirsutismo, acné, obesidad e irregularidades menstruales. Los signos de la fisiopatología pueden aparecer desde la pubertad (Witchel y col., 2019).

El SOPQ es una patología compleja, heterogénea y multifactorial cuya etiología aún es desconocida (Abbott y col., 2007; Pérez y Maroto, 2018). Recientemente se ha postulado la hipótesis de que la fisiopatología podría tener su origen desde la vida intrauterina como resultado de una reprogramación fetal (Sir-Petermann y col., 2002; Gur y col., 2015; Barber y Franks, 2019). Esto supone que la exposición del feto a un ambiente hormonal intrauterino alterado puede predisponerlo al desarrollo del fenotipo de la patología del SOPQ en la vida posnatal (Goodarzi y col., 2014; Raperport y Homburg, 2019; Stener-Victorin y Deng, 2021).

El hiperandrogenismo es el principal signo del SOPQ. Se ha reportado que la concentración de andrógenos en mujeres con SOPQ y embarazadas es mayor que en aquellas que no presentan la fisiopatología, por lo que podría representar una fuente potencial de exceso de andrógenos que re programe en la descendencia el desarrollo de la fisiopatología después del nacimiento (Sir-Petermann y col., 2002). Dicha hipótesis está respaldada por diversos reportes experimentales. Los estudios que imitan este ambiente prenatal hiperandrogénico en diversas especies de animales tras la administración de algunos andrógenos a hembras gestantes, resulta en su descendencia en el desarrollo de algunas de las características de la fisiopatología en la etapa adulta (Eisner y col., 2002; Wu y col., 2010; Tehrani y col., 2014).

El papel de los estrógenos en ratas neonatas sobre el desarrollo de las características del SOPQ en la etapa adulta también se ha puesto de manifiesto (Fernández y col., 2010), por lo cual, es de interés el estudio del impacto que pueden generar estas hormonas desde la etapa fetal hasta la vida posnatal, sobre las alteraciones reproductivas.

El VE es un estrógeno de larga actividad que ha sido utilizado en ratas neonatas, prepúberes o adultas para inducir el SOPQ (Brawer y col., 1986; Lara y col., 2000; Rosa-E-Silva y col., 2003; Rosas, 2006; Cruz y col., 2012). No obstante, actualmente se desconoce la influencia que pueden tener los estrógenos exógenos en la reprogramación fetal y en el posterior desarrollo de la fisiopatología. Por lo que, en el presente estudio se evaluó si la administración de VE a ratas en distintos días de gestación induce las características del SOPQ en las crías a la pubertad o en la etapa adulta.

MARCO TEÓRICO

Morfología del Ovario

Los ovarios son estructuras pares, blanco-rosadas, de forma ovalada, que, junto con las trompas de Falopio, el útero, el cérvix, la vagina y la vulva, constituyen el aparato reproductor femenino (Koeppen y Stanton, 2009; Ross y Pawlina, 2015; Holesh y col., 2022).

Los ovarios se encuentran alojados en la pelvis, suspendidos lateralmente al útero a través del ligamento útero-ovárico, fijados a la superficie posterior del *ligamento ancho* por medio de un pliegue peritoneal denominado *mesoovario* (Fernández-Tresguerres, 2010; Ross y Pawlina, 2015; Mobeen y Apostol, 2022), y conectados a la pared lateral pélvica a través del *ligamento suspensorio del ovario*, que conduce los vasos sanguíneos y los nervios hacia la gónada (Ross y Pawlina, 2015; Mobeen y Apostol, 2022).

El suministro de sangre hacia los ovarios consta de una arteria que proviene de una rama directa de la aorta. Por otro lado, la vena ovárica izquierda drena en la vena renal izquierda, la cual junto con la vena ovárica derecha desembocan en la vena cava inferior (Mobeen y Apostol, 2022).

Los ovarios están recubiertos por una capa de células cúbicas llamada *epitelio superficial o celómico*, y por la *túnica albugínea*, que es una capa de tejido conjuntivo denso irregular, poco vascularizada, localizada entre el epitelio superficial y la corteza subyacente (Gartner y Hiatt, 2008; Ross y Pawlina, 2015).

Histológicamente, el ovario está formado por tres regiones (Figura 1):

1. **La Corteza.** Se encuentra en la periferia del ovario y está constituida por células del estroma (tejido conjuntivo), células intersticiales, folículos en

diferentes etapas de desarrollo, así como cuerpos lúteos (Caravaca y col., 2005; Ross y Pawlina, 2015).

2. **La Médula.** Está ubicada en la porción central del ovario y contiene tejido conectivo laxo, vasos sanguíneos, linfáticos y nervios (Ross y Pawlina, 2015).
3. **El Hilium.** Se encuentra alrededor de la zona de unión del ovario al mesoovario. A través del hilio llegan a la gónada fibras nerviosas, vasos sanguíneos y linfáticos (Fernández-Tresguerres y Castillo, 2005; Sun y col., 2017).

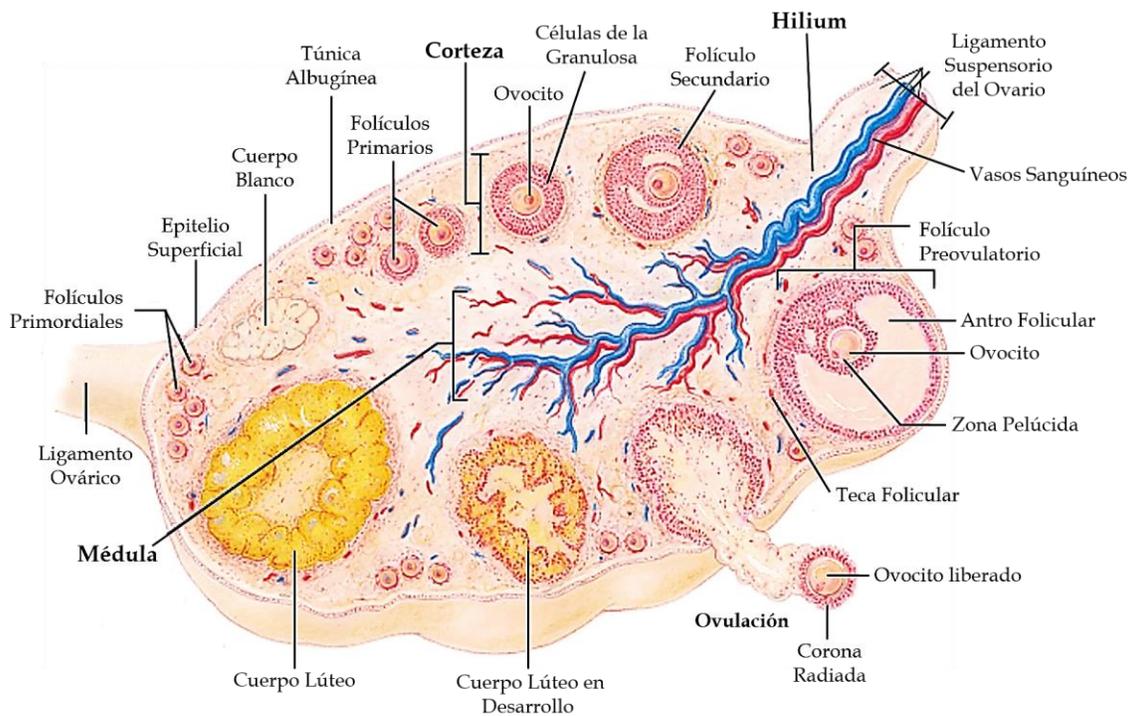


Figura 1. Estructura del ovario donde se observa su organización, el desarrollo folicular y la formación del cuerpo lúteo (Tomado y modificado de Vantman y Vega, 2010).

Los ovarios realizan dos funciones interrelacionadas, la producción de gametos femeninos maduros (óvulos) y la síntesis de hormonas esteroideas (progestágenos, andrógenos y estrógenos) y peptídicas (inhibina, activina y folistatina); ambas

funciones dependen del crecimiento y maduración folicular (Domínguez y Cruz-Morales, 2011; Ross y Pawlina, 2015).

Ovogénesis y Desarrollo Folicular

La *ovogénesis* se define como la secuencia de acontecimientos que permiten que las *ovogonias* se transformen en ovocitos maduros (Moore y col., 2013).

En el humano, la ovogénesis inicia durante la etapa embrionaria, cuando las *células germinales primordiales* (CGP) migran por movimiento ameboide desde el saco vitelino hacia la gónada; en la rata, este proceso inicia entre el día 10-11 de gestación, una vez allí, proliferan mediante mitosis, denominándose ahora como *ovogonias* (Beaudoin, 1980; Sadler, 2012; Carlson, 2014a). En la mujer, para el quinto mes de la vida intrauterina hay aproximadamente siete millones de ovogonias distribuidas en ambos ovarios (Arteaga y García, 2017). En la rata, después de la determinación del sexo genético (días 12-14 de gestación), las CGP proliferan y posteriormente forman "nidos" de CGP agregadas y rodeadas por células epiteliales escamosas. Los nidos ovogoniales experimentan mitosis sincrónicamente y para el día 14.5 de gestación se distribuyen aleatoriamente por todo el ovario (Beaumont y Mandl, 1962; Ojeda y Skinner, 2006; Hummitzsch y col., 2019).

Una gran cantidad de *ovogonias* experimenta *atresia*. En la rata, este proceso ocurre mientras los ovocitos todavía están dentro de los nidos, y continúa durante toda la vida reproductiva (Ojeda y Skinner, 2006; Carlson, 2014a).

En el humano, al nacimiento, la mayoría de las ovogonias comienzan la primera división meiótica, momento a partir del cual reciben el nombre de ovocitos primarios, los cuales quedan detenidos en la etapa de diploteno (esta etapa de reposo se denomina *dictioteno* en roedores) de la profase I (Borum, 1961; Erickson, 1986; Domínguez y col., 1991; Rosales, 1998; Carlson, 2014a). De acuerdo con

Beaumont y Mandl (1962), en la rata, los “nidos” comienzan la profase meiótica en el día 17.5 de gestación. Para el día 18.5 casi todos los ovocitos entran en la fase de leptoteno y del día 19.5 al 21.5 de gestación, la mayoría se encuentra en paquiteno. Del día 22.5 de gestación a las primeras horas del nacimiento, algunos ovocitos han entrado en la fase de diploteno. En el día 2 de vida, al menos dos tercios de los ovocitos están en diploteno, mientras que algunos otros continúan en paquiteno.

Al nacimiento, los ovarios de la mujer contienen aproximadamente dos millones de ovocitos, los cuales disminuyen progresivamente, de manera que al llegar a la pubertad las gónadas poseen alrededor de 400,000 folículos, de los cuales sólo 400 serán ovulados durante la vida reproductiva de la mujer, el resto degeneran por atresia (Moore y col., 2013; Carlson, 2014a).

El bloqueo meiótico permanece hasta la pubertad debido a que las células foliculares que rodean al ovocito secretan una sustancia denominada *inhibidor de la maduración del ovocito* (Moore y col., 2013; Arteaga y García, 2017).

La maduración del ovocito está íntimamente ligada a la formación del folículo (Carlson, 2014a). El **folículo** es la unidad anatómico-funcional del ovario encargado de nutrir, madurar y liberar a un ovocito viable (ovulación) para su posible fertilización (Domínguez y col., 1991).

El *desarrollo folicular* es un proceso secuencial y complejo que se lleva a cabo en la corteza ovárica e involucra la formación del folículo ovárico y con ello, los cambios morfológicos y funcionales de las células que lo constituyen (Domínguez y col., 1991; Irusta, 2008).

El ensamblaje folicular e inicio del desarrollo del folículo depende de la especie. En los grandes mamíferos como las ovejas, monos o humanos comienza durante la vida fetal; mientras que, en mamíferos pequeños como la rata, comienza en la etapa

perinatal (Richards, 1980; Hirshfield y DeSanti, 1995), momento en el que se inicia la transformación de los “nidios” de ovocitos, a folículos (Rosales, 1998).

De acuerdo con su estado de maduración, en el ovario se pueden identificar cuatro tipos de *folículos* (Ross y Pawlina, 2015):

1) Folículos Primordiales:

En la rata, en las primeras 24 a 72 hrs de vida, los ovocitos que estaban juntos formando “nidios” se rompen, de esta manera, cada ovocito es rodeado por células pregranulosas dando lugar a la formación de *folículos primordiales* (Hirshfield, 1991; Rajah y col., 1992; Rosales, 1998; McGee y Hsueh, 2000; Ojeda y Skinner, 2006).

Los folículos primordiales (Figura 2) se encuentran en el estroma de la corteza por debajo de la túnica albugínea (Ross y Pawlina, 2015).

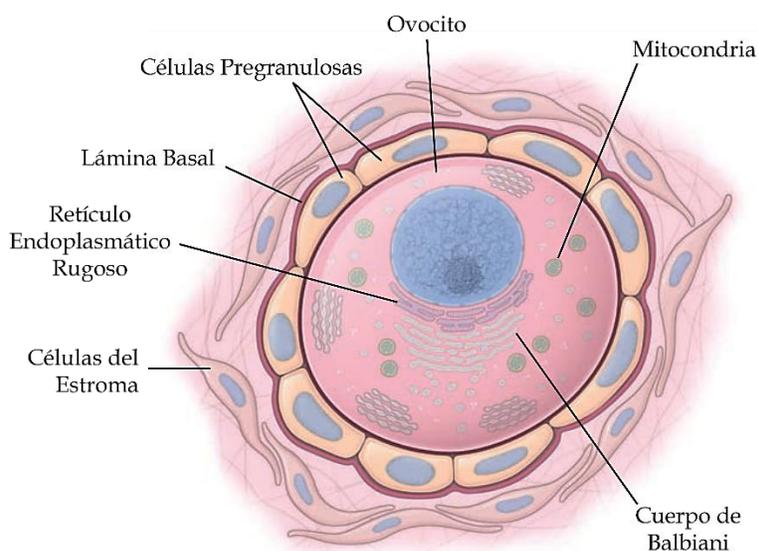


Figura 2. Estructura de un folículo primordial (Tomado de Ross y Pawlina, 2015).

El ovocito posee un núcleo excéntrico voluminoso que contiene cromatina dispersa (Ross y Pawlina, 2015). En el *ovoplasma* del ovocito se encuentra un *Cuerpo de Balbiani* el cual contiene ácido ribonucleico, proteínas y numerosas vesículas y membranas de Golgi, retículo endoplásmico, centriolos, mitocondrias y lisosomas (Ross y

Pawlina, 2015; Woodruff y col., 2017). Se ha postulado que los Cuerpos de Balbiani mantienen los organelos en un estado de baja actividad, lo que permite que sobrevivan al letargo y se mantengan sanos hasta que el ovocito reciba señales de maduración (Woodruff y col., 2017).

En esta etapa, los ovocitos son rodeados por células de tejido conjuntivo del ovario que forman una monocapa de células foliculares aplanadas no diferenciadas llamadas células pregranulosas. En la superficie externa de las células pregranulosas está la *lámina basal*, la cual establece un límite bien definido entre las pregranulosas y el estroma folicular. En esta etapa, el ovocito y las células pregranulosas que lo rodean están estrechamente adosados entre sí (Chedrese, 2003; Moore y col., 2013).

Las células pregranulosas de los folículos primordiales carecen de receptores a la *hormona estimulante del folículo (FSH)* y de la *hormona luteinizante (LH)*, lo que indica que el inicio del crecimiento folicular es independiente de las gonadotropinas (Ojeda y Skinner, 2006).

2) Folículos Primarios:

Una vez que los folículos primordiales son reclutados para iniciar su crecimiento, las células pregranulosas que rodean al ovocito adquieren un aspecto cúbico-cilíndrico, momento a partir del cual se les denomina células de la granulosa. Entre el ovocito y las células de la granulosa se forman microvellosidades y uniones nexo que comunican a ambos tipos de células (Figura 3). Las uniones nexo permiten el intercambio de aminoácidos y metabolitos de la glucosa necesarios para el crecimiento del ovocito (Carlson, 2014a; Ross y Pawlina, 2015).

Los folículos primarios se pueden clasificar como unilaminares, con la presencia de una capa de células de la granulosa, o multilaminares con dos a tres capas (Figura 3). Algunas células del estroma circundante se agrupan alrededor de las células de la granulosa, dando origen a la *teca* (Barrios de Tomasi y col., 2012). La *lámina basal*

se mantiene entre la capa más externa de las células de la granulosa y la teca folicular, su función es separar los capilares de la teca de la capa de células de la granulosa, la cual es avascular durante todo el desarrollo folicular (Ross y Pawlina, 2015).

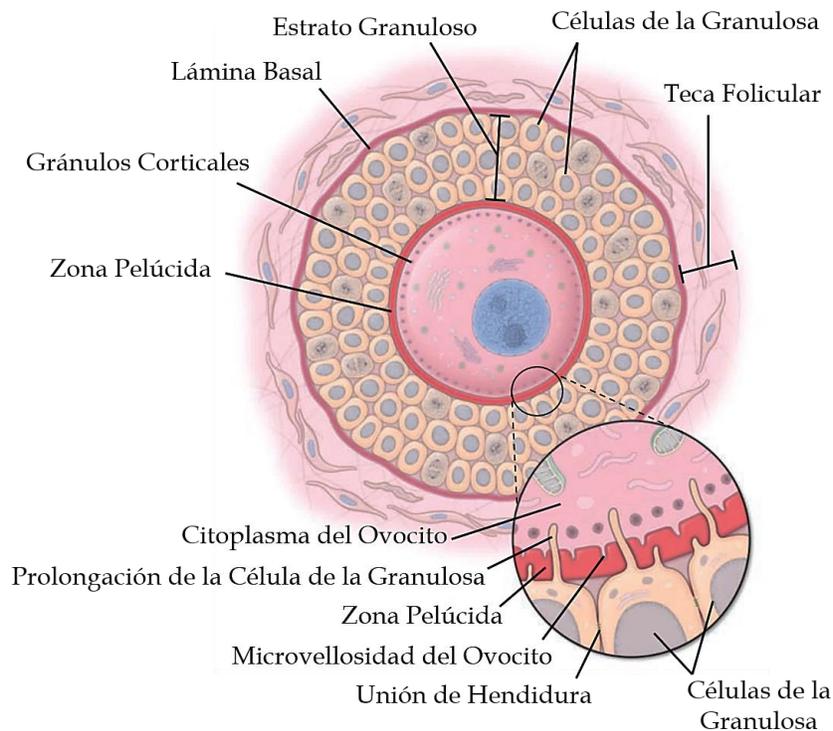


Figura 3. Estructura de un folículo primario multilaminar (Tomado de Ross y Pawlina, 2015).

Durante esta etapa aparece una membrana prominente, translúcida y acelular compuesta por glucoproteínas llamada *zona pelúcida*, que rodea al ovocito y lo separa de las células de la granulosa, la cual funciona como una barrera protectora del ovocito y contiene receptores para los espermatozoides que son importantes para la fecundación (Figura 3) (Gartner y Hiatt, 2008; Rosen y Cedars, 2012; Carlson, 2014a). En la rata, los folículos primarios se observan al quinto día después del nacimiento (Mangoushi, 1974).

3) Folículos Secundarios:

El folículo continúa su desarrollo y aumenta de tamaño. El estrato granuloso sigue proliferando y se aprecian hasta doce capas (Ross y Pawlina, 2015).

Durante el crecimiento del folículo comienzan a formarse pequeñas cavidades que contienen *fluido folicular*, denominadas *Cuerpos de Call-Exner* (Figura 4). Este líquido se forma a partir de las secreciones de las células foliculares, aporta nutrientes al ovocito y contiene principalmente proteínas, hormonas como la FSH, la LH, la hormona del crecimiento (GH), progesterona (P_4) y estradiol (E_2); además de enzimas, anticoagulantes, citocinas, electrolitos, especies reactivas de oxígeno, vitamina E, factor de crecimiento epidérmico, aminoácidos, lípidos y ácidos grasos (Gartner y Hiatt, 2008; Basuino y Silveira, 2016).

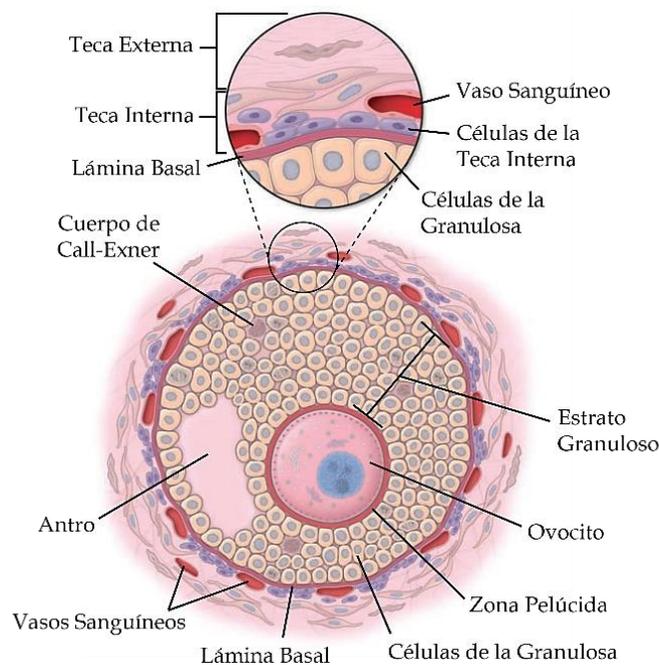


Figura 4. Estructura del folículo secundario (Tomado de Ross y Pawlina, 2015).

La teca folicular se diferencia en dos capas: la *teca interna*, cuyas células poseen receptores a la LH y secretan hormonas esteroideas (Espey y Richards, 2006), además contienen abundantes vasos sanguíneos y se localiza por fuera de la lámina basal; y

la *teca externa*, integrada por tejido conjuntivo, células de músculo liso y haces de fibras de colágeno (Figura 4). Con el desarrollo de estas capas los folículos adquieren irrigación sanguínea independiente, aunque el estrato granuloso sigue siendo avascular, por ello, estas células y el ovocito dependen de la difusión de oxígeno y nutrientes a través de la lámina basal para su desarrollo y supervivencia (Gartner y Hiatt, 2008; Carlson, 2014a).

En la rata, los folículos secundarios se observan para el día 7 después del nacimiento (McGee y Hsueh, 2000).

4) Folículos Terciarios, Maduros, Preovulatorios o de De Graaf:

El ovocito que al inicio del desarrollo folicular se encontraba en el centro del folículo, se vuelve excéntrico. El folículo maduro se extiende a través de la corteza ovárica y sobresale del ovario (Ross y Pawlina, 2015). Los cuerpos de Call-Exner se fusionan y forman una cavidad en forma de semiluna, denominada *antro folicular* (Hall, 2011).

Las células de la granulosa que rodean en forma inmediata al ovocito, y permanecen con él en la ovulación, forman la *corona radiada*, cuya función es proporcionar nutrientes y factores necesarios para el crecimiento del ovocito (Figura 5) (Moore y col., 2013; Ross y Pawlina, 2015). El complejo ovocito-corona radiada queda unido a la pared del folículo mediante un conjunto de células de la granulosa que forman un montículo abultado denominado cúmulo oóforo (Carlson, 2014a; Ross y Pawlina, 2015).

Durante el desarrollo folicular, el ovocito se mantiene detenido en la meiosis I (Arteaga y García, 2017). Doce horas antes de que ocurra la ovulación, y por efecto del estímulo de la LH, se reinicia y concluye la primera división meiótica, e inicia la segunda meiosis, momento a partir del cual, el ovocito se denomina como secundario, el cual queda detenido en la etapa de la metafase II (Fernández-

Tresguerres, 2010; Carlson, 2014a; Ross y Pawlina, 2015). Al momento de la ovulación, el complejo ovocito secundario-corona radiada-cúmulo oóforo es expulsado de la cavidad folicular (Sánchez Criado, 1999; Robker y col., 2018), captado por las fimbrias de las trompas de Falopio y transportado al interior del útero (Fernández-Tresguerres, 2010).

La segunda división meiótica del ovocito secundario sólo se completa si éste es fertilizado por el espermatozoide produciendo así un ovocito y un cuerpo polar, cada uno con 23 cromosomas; en caso de no ocurrir la fertilización, el ovocito secundario degenera (Constanzo, 2011; Carlson, 2014a; Arteaga y García, 2017).

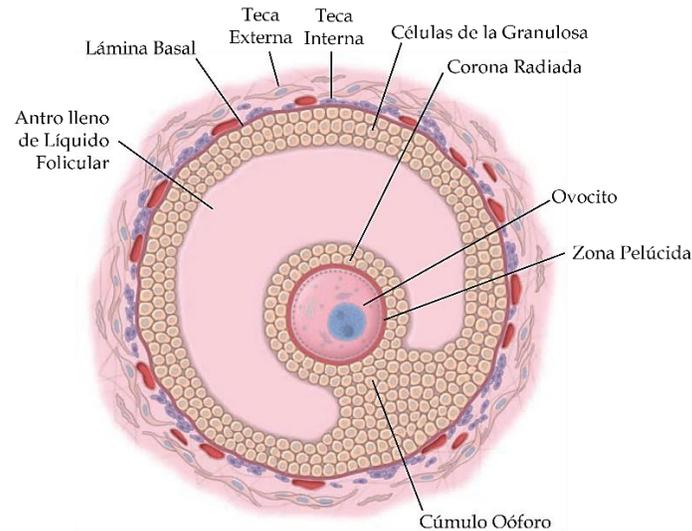


Figura 5. Estructura del folículo preovulatorio (Tomado de Ross y Pawlina, 2015).

En cada estadio del desarrollo algunos folículos presentan atresia, por lo que sólo unos pocos llegan al estadio final de maduración. En el caso de los animales mono ovulantes sólo un folículo dominante se desarrolla hasta la ovulación (Elliot y Agonistes, 2008), mientras que en los animales poli ovulantes como la rata, ambos ovarios expulsan ovocitos, pero el izquierdo lo hace en mayor cantidad que el derecho (Domínguez, 2015).

Atresia Folicular

Las hembras de mamíferos nacen con un número finito de ovocitos, y durante su vida reproductiva algunos folículos comienzan a crecer, pero no todos son seleccionados para la ovulación. Aquellos que no se eligen, se eliminan mediante un proceso conocido como *atresia folicular* (Flores-Pérez y col., 2005; Irusta, 2008; Torres-Ramírez y col., 2016). La atresia es un evento normal que ocurre en cualquier etapa del desarrollo folicular, desde la vida prenatal hasta la etapa adulta, presentándose principalmente en folículos antrales (Domínguez y col., 1991; Hirshfield, 1991; Rosales, 1998; Escobar y col., 2019). Durante el proceso de atresia folicular, ocurre la muerte de la mayoría de las células de la granulosa y del ovocito. En tanto que las células tecales de los folículos que experimentan atresia se hipertrofian, y van a formar parte de la glándula intersticial y continúan respondiendo a la LH con la síntesis de androstenediona (Erickson, 1986).

De acuerdo con Rosales (1998), los signos que denotan que un folículo se encuentra en proceso de atresia son (Figura 6):

- ∞ Fragmentación del ovocito.
- ∞ Picnosis de las células de la granulosa debido a la fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN).
- ∞ Descamación de las células de la granulosa hacia el antro folicular (por pérdida de la matriz intercelular) que posteriormente involucra el desprendimiento del complejo cúmulo-ovocito.
- ∞ Hipertrofia de las células tecales.

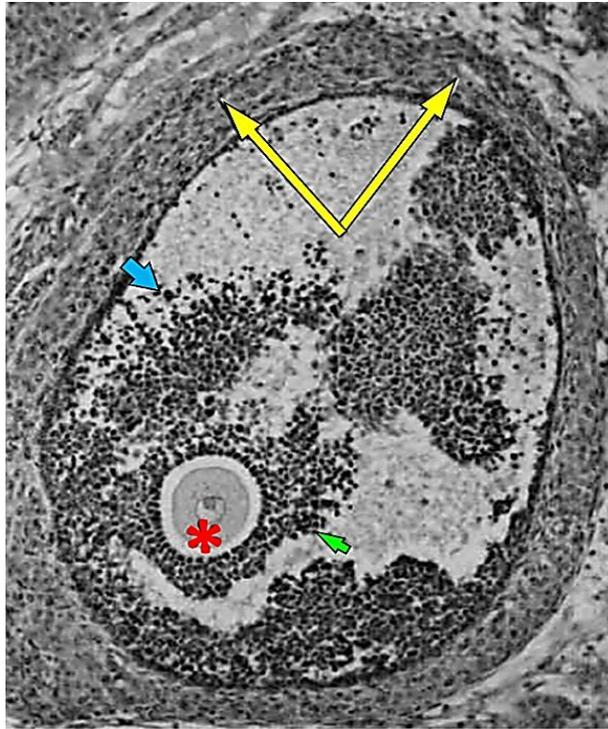


Figura 6. Folículo De Graff con signos de atresia. Se observa descamación de las células de la granulosa en el antro folicular (flecha azul), picnosis celular (flecha verde), desprendimiento del complejo ovocito-corona radiada-cúmulo oóforo (asterisco) e hipertrofia de las células tecaes (señalado con flechas amarillas) (Erickson, 1986).

Las alteraciones morfológicas del folículo dependen del grado de atresia alcanzado (Rosales, 1998). Desde el punto de vista morfológico e histológico se ha propuesto la siguiente clasificación para la atresia (Figura 7) (Hsueh y col., 1994):

- **Grado I:** Presencia de pocas células de la granulosa con núcleos picnóticos.
- **Grado II:** Las células de la granulosa presentan núcleos picnóticos y en el antro folicular hay descamación celular.
- **Grado III:** El ovocito se observa fragmentado, disminuye el número de células de la granulosa y la teca interna presenta hipertrofia.

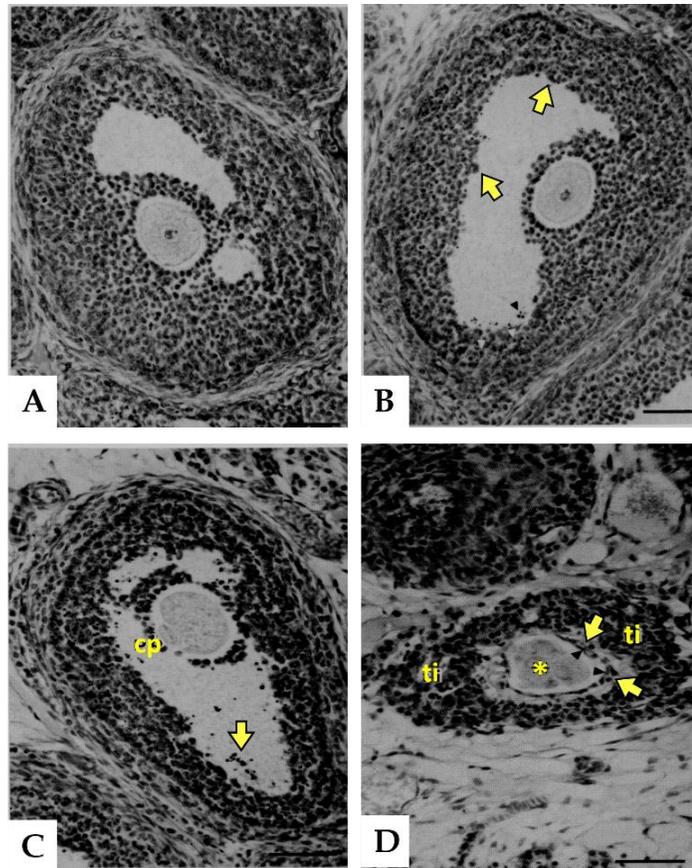


Figura 7. Folículos del ovario de la rata con diferentes grados de atresia. (A) folículo antral sano; (B) folículo con grado de atresia I, donde se observan células de la granulosa con núcleos picnóticos (flechas); (C) folículo con grado de atresia II, en el fluido folicular se observa la descamación de las células de la granulosa (señalado con flecha) y en el ovocito se han producido cambios de tipo meiótico, como se puede observar por la presencia del cuerpo polar (cp); (D) folículo con grado de atresia III donde se observa fragmentación del ovocito (señalado con un asterisco), pocas células de la granulosa (flechas) y la teca interna (ti) presenta hipertrofia (Tomado y modificado de Hsueh y col., 1994).

De acuerdo con diversos autores, el mecanismo implicado en la atresia folicular es la *apoptosis* o *muerte celular programada* (Hsueh y col., 1994; Rosales, 1998; Yen, 2001; Escobar y col., 2019). El término *apoptosis* fue acuñado por Kerr y colaboradores en 1972. La apoptosis se caracteriza por afectar a células individuales y morfológicamente involucra la pérdida de tamaño celular, condensación citoplasmática y de la cromatina, la cual presenta un patrón de “media luna” o “herradura”, además se encuentran *cuerpos apoptóticos*, formados por pequeños

pedazos esféricos de membrana que contienen fragmentos nucleares (Rosales, 1998; Yen, 2001; Flores-Pérez y col., 2005; Torres-Ramírez y col., 2016).

Asimismo, durante el proceso de apoptosis se activan endonucleasas dependientes de calcio y magnesio, que degradan al ADN de manera específica produciendo fragmentos de 180 a 200 pares de bases o sus múltiplos, tales fragmentos se observan en un gel de agarosa como bandas en forma de escalera (Rosales, 1998; Asselin y col., 2000; Flores-Pérez y col., 2005). Los cuerpos apoptóticos producidos por la muerte celular son fagocitados por células vecinas, ya que la fagocitosis ocurre antes de que se pierda la integridad de la membrana plasmática, de esta manera no hay pérdida de componentes citoplasmáticos y se evita una reacción inflamatoria (Hsueh y col., 1994; Irusta, 2008).

Las células en apoptosis se caracterizan bioquímicamente por la activación de las caspasas, enzimas con actividad proteolítica, que se clasifican en dos tipos: *iniciadoras* (caspasas-2, -8, -9 y -10) y *ejecutoras* (caspasas-3, -6 y -7) (Torres-Ramírez y col., 2016; Escobar y col., 2019).

La apoptosis es un proceso activo que está regulado por un complejo programa genético intrínseco de muerte (Rosales, 1998; Flores-Pérez y col., 2005). Una vez iniciado este proceso, la ejecución dependerá en gran medida de la activación de miembros de la familia de genes de la leucemia/linfoma-2 de células B (Bcl-2), que incluyen *genes inductores de apoptosis* (proapoptóticos como Bim, Bik, Bak, Bax, Bad, Bcl-Xs, Noxa y Puma), así como *inhibidores* (antiapoptóticos: Bcl-XL, Bcl-2, Bcl-W, A1 y Mcl-1) (Flores-Pérez y col., 2005; Escobar y col., 2019).

Además, el desarrollo folicular está regulado por señales de supervivencia y muerte celular (Craig y col., 2007). Dentro de las señales de supervivencia que rescatan a los folículos de la atresia se incluyen a las gonadotropinas (FSH y LH), estrógenos, P₄, factores de crecimiento como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor similar a la insulina I (IGF-I), factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de

crecimiento transformante α (TGF- α), factor de crecimiento de fibroblasto básico y citocinas como la interleucina 1 (Hsueh y col., 1994; Kaipia y Hsueh, 1997; Asselin y col., 2000; Rolaki y col., 2005). Los factores que promueven la atresia folicular se denominan atretogénicos, entre los cuales están los andrógenos, el ligando Fas, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), las sustancias similares a la GnRH (GnRH-like) y la interleucina 6 (IL-6) (Hsueh y col., 1994; Kaipia y Hsueh, 1997). Estas diversas señales probablemente convergen en vías intracelulares selectivas (incluidos genes de las familias Bcl-2) para regular la apoptosis (Kaipia y Hsueh, 1997). Tilly y colaboradores (1995) mostraron que la administración exógena de gonadotropinas inhibe la apoptosis en células de la granulosa de rata lo cual fue atribuido a la disminución de la expresión de Bax y al aumento de la expresión de los genes Bcl-2 y Bcl-XL, que inducen la supervivencia celular.

Ovulación y Formación del Cuerpo Lúteo

La *ovulación* es el proceso por el cual el folículo maduro se rompe y libera un ovocito secundario haploide en respuesta al incremento brusco (“pico preovulatorio”) de las concentraciones de gonadotropinas secretadas por la adenohipófisis (Domínguez y col., 1991; Russell y Robker, 2007; Morales-Ledesma, 2015).

Ante el pico preovulatorio de LH y FSH se inicia una cascada de eventos que culminan con la ovulación:

- El ovocito primario reanuda y culmina la meiosis I, de manera que el ovocito progresa y detiene su maduración en la etapa de metafase de la meiosis II (Dissen y col., 2004; Gartner y Hiatt, 2008; Hall, 2011).
- En las células de la granulosa del folículo preovulatorio, la FSH estimula la producción del *activador del plasminógeno*, una proteasa sérica que cataliza la

conversión de plasminógeno en *plasmina*, enzima que degrada la pared folicular, facilitando su ruptura (Erickson, 1986; Yeh y Adashi, 2001).

- Incrementa la presión intrafolicular por la acumulación del líquido folicular. El flujo sanguíneo cesa en una pequeña región de la superficie ovárica (Ross y Pawlina, 2015) formándose una protuberancia denominada *estigma* (Hall, 2011; Arteaga y García, 2017).
- Las células de la granulosa y de la teca secretan principalmente P_4 , mientras que disminuye la síntesis de E_2 (Hall, 2011; Arteaga y García, 2017). Ante la menor concentración de E_2 , desaparecen los desmosomas y los nexos entre las células de la granulosa, esto ocasiona la expansión del complejo ovocito-corona radiada-cúmulo oóforo y su desprendimiento de la pared folicular (Domínguez y col., 1991; Vantman y Vega, 2010; Arteaga y García, 2017).
- Las fibras de músculo liso de la teca externa están inervadas por fibras simpáticas y parasimpáticas, y poseen receptores β -adrenérgicos y muscarínicos que, al ser activados por la noradrenalina (NA) y acetilcolina (ACh) respectivamente, se contraen, generando mayor presión hacia el interior del folículo y permitiendo la ruptura folicular y la liberación del ovocito. Esta contracción es también favorecida por las prostaglandinas (Erickson, 1986; Moore y col., 2013; Arteaga y García, 2017).
- Finalmente, por acción de la colagenasa producida por las células de la teca externa, se rompe el estigma. Con ello se libera fluido folicular que lleva consigo al complejo ovocito secundario-corona radiada-cúmulo oóforo (Erickson, 1986; Moore y col., 2013; Arteaga y García, 2017).

Al momento de la ruptura del folículo preovulatorio, la lámina basal que rodea el estrato granuloso es degradada, lo que permite el paso y crecimiento de los vasos sanguíneos, y favorece que la luz del folículo roto se llene de sangre que empieza a coagularse, originándose así el *folículo o cuerpo hemorrágico*. Posteriormente, los hematíes y restos celulares son eliminados por macrófagos y la cavidad antral se

llena de fibroblastos con una matriz de aspecto hialino (Koeppen y Stanton, 2009; Arteaga y García, 2017).

Las células de la teca interna y la granulosa que revisten al folículo que liberó al ovocito, proliferan y se diferencian en células lúteas, proceso denominado *luteinización*, que permite la formación del *corpus lúteo* (CL). Sus células contienen lipocromo, un pigmento liposoluble que les confiere un aspecto amarillento (Fernández-Tresguerres, 2010; Ross y Pawlina, 2015).

Es en este momento que comienza la *fase lútea*, que en la mujer tiene una duración de 14 días, del día 14 al 28 de un ciclo menstrual (Holesh y col., 2022). La rata carece de una "*verdadera fase lútea*" ya que, una vez ocurrida la ovulación (De la Cruz, 1998; Bazer, 1999), los cuerpos lúteos recién formados secretan poca P_4 sólo durante dos días (diestro 1 y 2) (Smith y col., 1975; Spencer, 1999) y no son capaces de desencadenar una reacción decidua en el útero, razón por la cual se les denomina "*cuerpos lúteos no funcionales*" (Spencer, 1999).

En la mujer, durante esta fase, las células lúteas secretan P_4 y estrógenos, que estimulan la proliferación del revestimiento uterino, preparándolo ante la posible implantación, en cuyo caso el CL aumenta de tamaño y permanece por cierto tiempo para proporcionar el aporte hormonal y así mantener el embarazo hasta que la placenta reemplace su función. Cuando el ovocito liberado no es fecundado, el CL degenera e involuciona, las células se llenan de lípidos, reducen su tamaño y el material hialino se acumula entre las células, quedando reducido a una cicatriz blanquecina denominada *corpus albicans* (*corpus blanco*), estructura que es esteroideogénicamente inactiva. Por lo tanto, las concentraciones hormonales decrecientes de E_2 y P_4 ocasionan una mayor secreción de la LH y FSH, la cual es responsable del reclutamiento de nuevos folículos para el siguiente ciclo (Elliot y Agonistes, 2008; Fernández-Tresguerres, 2010; Carlson, 2014b; Ross y Pawlina, 2015; Holesh y col., 2022).

En la rata, en ausencia de implantación y apoyo luteotrófico, los cuerpos lúteos transforman a la P_4 en 20α -hidroxiprogesterona (20α -OH-P) un metabolito inactivo de la P_4 , por acción de la 20α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (20α -HSD) (De la Cruz, 1998; Bazer, 1999; Maeda, 2000; Freeman, 2006; Lohmiller y col., 2020). Los cuerpos lúteos alcanzan su tamaño máximo en el diestro 2 y se mantienen así hasta el diestro 1 del siguiente ciclo, tras lo cual, involucionan en el diestro 2 (Bazer, 1999; Freeman, 2006; Ojeda y Skinner, 2006).

Esteroidogénesis

La esteroidogénesis es el proceso de síntesis de hormonas esteroides a partir de colesterol (Miller y Auchus, 2011).

Existen cinco clases de hormonas esteroides: progestágenos (pregnenolona, 17α -hidroxiprogesterona, P_4), andrógenos (androstenediona, dehidroepiandrosterona DHEA y testosterona), estrógenos (estrone, E_2 , estriol), glucocorticoides (cortisol/corticosterona) y mineralocorticoides (aldosterona), de los cuales, los primeros tres son denominados *esteroides sexuales* (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Hu y col., 2010).

Los ovarios secretan esteroides sexuales, principalmente P_4 , andrógenos y estrógenos, necesarios para la reproducción y el desarrollo de las características sexuales secundarias (Rosen y Cedars, 2012). Los esteroides sexuales además de actuar en el aparato reproductivo tienen efectos en tejidos y órganos diana, incluyendo el hígado, el músculo esquelético, el sistema nervioso central, cardiovascular, inmunológico, así como el tejido adiposo y cutáneo (Gore-Langton y Armstrong, 1994).

El proceso por el cual los folículos ováricos sintetizan hormonas esteroides sexuales es complejo y requiere la acción de varias enzimas (Damdimopoulou y col., 2019). Los principales estratos celulares del ovario que producen hormonas esteroides son las células la teca, de la granulosa y del CL, ya que poseen el sistema enzimático requerido para la formación de hormonas esteroides (Fernández-Tresguerres, 2010). Las hormonas esteroides ováricas derivan de un precursor común: *el colesterol* (Dissen y col., 2004), el cual desempeña funciones estructurales y metabólicas en el organismo (Maldonado y col., 2012). En el ovario, el colesterol proviene de cuatro fuentes:

1. Del flujo sanguíneo, principalmente en forma de lipoproteínas circulantes (LDL, lipoproteína de baja densidad, y HDL, lipoproteínas de alta densidad) (Barrios de Tomasi y col., y col., 2012).
2. Colesterol libre, concentrado principalmente en la membrana celular plasmática (Hu y col., 2010).
3. Ésteres de colesterol, almacenados en forma de gotas lipídicas citoplasmáticas y partículas de lipoproteínas (Hu y col., 2010).
4. De la síntesis celular *de novo*, a partir de acetato (Grummer y Carroll, 1988).

En el folículo, las células de la teca interna expresan receptores a LH y las células de la granulosa receptores a FSH o LH. La estimulación de las células de la pared folicular por acción de las gonadotropinas facilita la captación de colesterol al incrementar el número de receptores de LDL sobre la superficie celular (Bulun y Adashi, 2009).

Estructuralmente, las LDL presentan un núcleo que contiene ésteres de colesterol y están rodeadas por una cubierta proteica, las cuales se unen a receptores específicos de membrana, así el complejo LDL-receptor es internalizado a la célula por

endocitosis. Posteriormente este complejo se fusiona con los lisosomas donde el éster de colesterol es hidrolizado para originar *colesterol libre* y la cubierta proteica de la LDL deriva en aminoácidos (Yeh y Adashi, 2001; Hu y col., 2010; Maldonado y col., 2012).

Posteriormente, la *proteína reguladora aguda esteroideogénica (StAR)*, la cual es sintetizada en el citoplasma de las células y posteriormente importada a las mitocondrias, cumple con la función de internalizar el colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la interna, iniciando así la biosíntesis de hormonas esteroides (Díaz, 2004; Hu y col., 2010; Strauss, 2019).

La síntesis de hormonas esteroides (Figura 8) comienza con la escisión de seis carbonos de la cadena lateral del colesterol, reacción catalizada por la enzima citocromo P450_{ssc}, localizada en la membrana interna de la mitocondria de las células de la teca (Gómez-Chang y col., 2012), que convierte el colesterol en *pregnenolona* y una molécula de aldehído isocaproico (Rosen y Cedars, 2012).

La pregnenolona sale de la mitocondria e ingresa al *retículo endoplasmático liso (REL)*, donde puede seguir una de las siguientes rutas (Figura 8) (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Rosen y Cedars, 2012):

- § **Vía $\Delta 4$:** la pregnenolona es transformada a P₄ por acción de las enzimas 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD)/ Δ^{5-4} isomerasa, las cuales se localizan en el REL de las células tecales, granulosa y luteales. Esta ruta se lleva a cabo principalmente en el CL (Fernández-Tresguerres, 2010; Gómez-Chang y col., 2012; Strauss, 2019).
- § **Vía $\Delta 5$:** se lleva a cabo en las células de la teca del folículo, donde las enzimas 17 α -hidroxilasa (17 α -OH) y la 17,20 liasa convierten la pregnenolona a DHEA y que a su vez, por actividad de las enzimas 3 β -HSD/ Δ^{5-4} isomerasa, es biotransformada en androstenediona. La 17 β hidroxiesteroide-

deshidrogenasa tipo 1 (17β -HSD 1) transforma la androstenediona a testosterona (Sánchez Criado, 1999; Fernández-Tresguerres, 2010; Strauss, 2019).

La androstenediona y en menor proporción, la testosterona, son liberadas hacia los vasos sanguíneos, pero también se difunden a las células de la granulosa, donde, la unión de la FSH a su receptor activa el sistema de la adenilato ciclasa lo que provoca la conversión del adenosín trifosfato (ATP) en adenosín monofosfato cíclico (AMPc), un segundo mensajero que estimula la síntesis y actividad de las *aromatasa*s (*P450arom*), las cuales convierten la androstenediona en *estrón*a y la testosterona en E_2 (Figura 8) (Domínguez y col., 1991; Koeppen y Stanton, 2009, Trujillo y col., 2015).

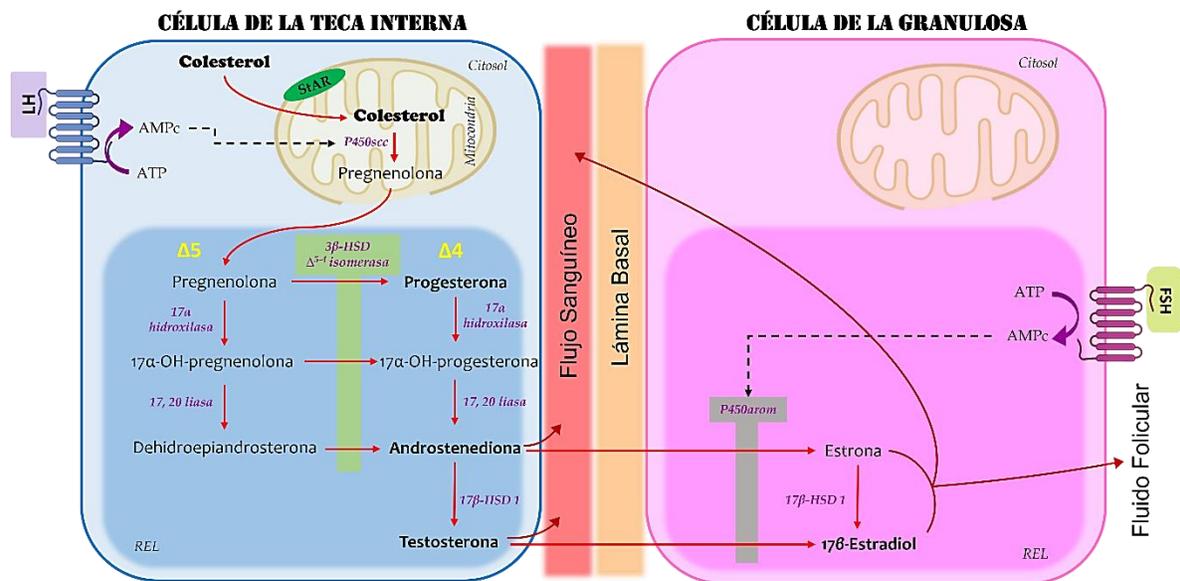


Figura 8. Esteroidogénesis Ovárica. La biosíntesis de estrógenos requiere de la participación conjunta de dos células, las tecales, que sintetizan progesterona y andrógenos, y las células de la granulosa, que producen estrógenos. La vía Δ^4 ocurre preferencialmente en las células luteales, mientras que la Δ^5 en células tecales. LH: Hormona luteinizante; AMPc: adenosín monofosfato cíclico; ATP: adenosín trifosfato; StAR: proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda; P450ssc: enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol; 3 β -HSD/ Δ^{5-4} isomerasa: enzimas 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y Δ^{5-4} isomerasa; 17 α -OH-pregnenolona: 17 α -hidroxi-pregnenolona; 17 α -OH-progesterona: 17 α -hidroxi-progesterona; 17 β -HSD 1: enzima 17 β hidroxiesteroide-deshidrogenasa tipo 1; REL: retículo endoplasmático liso; P450arom: aromatasa; FSH: hormona estimulante del foliculo (Basado en Duffy y col., 2019).

Eje Hipotálamo Hipófisis Ovarios y su Participación en la Regulación de las Funciones Ováricas

La función reproductiva de los mamíferos está regulada por el *eje hipotálamo-hipófisis-ovario (HHO)* a través de mecanismos de retroalimentación (Chaudhari y col., 2018; Stamatiades y col., 2019; Whitlock y col., 2019).

La *hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)* es un decapeptido. Durante el desarrollo fetal de humanos y ratas, las neuronas GnRHérgicas derivan de la placoda olfatoria y migran caudalmente al hipotálamo. En ratas, dichas neuronas se encuentran en la placoda olfatoria en el *DG 13.5* y migran al tabique/área preóptica el *DG 17* (Maeda, 2000; Ojeda y Skinner, 2006). La GnRH se detecta en el *DG 12* en el cerebro fetal de la rata; y su concentración hipotalámica es baja hasta los 17-18 días de gestación, momento a partir del cual aumenta su concentración siendo más alta el día del nacimiento (Ojeda y Skinner, 2006).

En el humano, la GnRH es producida y almacenada por neuronas peptidérgicas que se localizan en áreas rostrales del diencéfalo, que incluye el órgano vasculoso de la lámina terminal, los núcleos ventromedial y arcuato (ARC) del hipotálamo mediobasal, y en el área preóptica hipotalámica anterior (Barrios de Tomasi y col., 2012; McArdle y Roberson, 2015; Trujillo y col., 2015). En la rata, la GnRH es producida por neuronas que se encuentran principalmente en el tabique medial y la banda diagonal de Broca, el ganglio terminal y, en menor medida, en el área preóptica y el hipotálamo ventrolateral (Jennes, 1989; Smith y Jennes, 2001).

La GnRH es liberada desde las terminales axónicas de las neuronas GnRHérgicas, localizadas en la eminencia media, hacia la circulación portal-hipotálamo-hipofisaria, donde se dirige hacia las células gonadotropas de la hipófisis anterior (adenohipófisis), las cuales poseen receptores específicos (Leung y Cheng, 2004; Magendzo, 2010; Trujillo y col., 2015; Stamatiades y col., 2019). En respuesta a la

GnRH, las células gonadotropas secretan las gonadotropinas, LH y FSH, estas hormonas viajan por el torrente sanguíneo y actúan en los ovarios, donde regulan procesos como el desarrollo folicular, la esteroidogénesis y la ovulación (Baskind y Balen, 2016; Stamatiades y col., 2019; Whitlock y col., 2019).

En la hipófisis fetal de la rata, la liberación de la LH en respuesta a la GnRH se detecta alrededor del DG 17, mientras que la FSH se detecta entre los 19-21 días de gestación (Maeda, 2000; Ojeda y Skinner, 2006). La liberación de las gonadotropinas ocurre de manera pulsátil, esto quiere decir que varía tanto en frecuencia (número de pulsos por hora) como en amplitud (concentración) en las diferentes fases del ciclo ovárico (Williams y Stancel, 1996; Trujillo y col., 2015). En la mujer adulta, se libera un pulso de GnRH cada 90 a 100 minutos en la fase folicular, mientras que en la fase ovulatoria el pulso ocurre cada 60 minutos (Trujillo y col., 2015; Baskind y Balen, 2016; Stamatiades y col., 2019). Un aumento en la frecuencia de pulsos de GnRH favorece la secreción de la LH, mientras que una disminución de la pulsatilidad de la GnRH resulta en la secreción de la FSH (Trujillo y col., 2015; Stamatiades y col., 2019).

La regulación de la secreción de la GnRH es compleja e involucra la participación de varios neuropéptidos y neurotransmisores (Smith y Jennes, 2001; Chaudhari y col., 2018) tales como: el factor liberador de corticotropina, el péptido arginina-vasopresina, la serotonina, la NA, la adrenalina, la dopamina, el neuropéptido Y (NPY), los opioides endógenos como la β -endorfina, las neurotensinas, la kisspeptina (kiss), el péptido intestinal vasoactivo (VIP), el ácido gamma-aminobutírico (GABA), y el glutamato (Smith y Jennes, 2001; Trujillo y col., 2015; Chaudhari y col., 2018).

Además, durante el ciclo menstrual de la mujer, el eje HHO también es regulado por un sistema de retroalimentación positiva o negativa entre las hormonas ováricas y las neuronas GnRHérgicas (Magendzo, 2010; Baskind y Balen., 2016).

Durante la *fase folicular temprana* (día 1 a 4 del ciclo), las concentraciones de FSH van en aumento, con lo que se recluta un nuevo grupo de folículos que comienzan a madurar bajo la influencia de esta hormona. La concentración de E₂ es baja, aunque el número de folículos en desarrollo es elevado (Fernández-Tresguerres, 2010; Hall, 2019).

En la *fase folicular media* (días 5 a 7 del ciclo), conforme avanza el desarrollo folicular, las células de la granulosa comienzan a secretar activina, la cual aumenta la expresión de receptores a FSH. A su vez, la FSH induce la proliferación del estrato granuloso, así como el aumento en la actividad de las aromatasas y de la concentración de E₂ (Rajkovic y col., 2006; Welt y Schneyer, 2019). Las células de la granulosa posteriormente secretan inhibina (Domínguez y col., 1991; Elliot y Agonistes, 2008; Fernández-Tresguerres, 2010; Trujillo y col., 2015). En ese momento, el E₂ y la inhibina ejercen una *retroalimentación negativa* (Figura 9) sobre la secreción hipofisiaria de la FSH, con ello, se favorece el crecimiento de un folículo dominante y se impide el desarrollo de más folículos en el mismo ciclo (Elliot y Agonistes, 2008; Fernández-Tresguerres, 2010; Hall, 2019).

En la *fase folicular tardía* (días 8 a 12 del ciclo), el folículo dominante madura totalmente y se presenta un aumento exponencial de E₂ (Fernández-Tresguerres, 2010; Hall, 2019). Al final de esta etapa, la concentración de la LH, FSH y P₄ comienzan a elevarse (Fernández-Tresguerres, 2010).

Finalmente, en la *fase periovulatoria* (día 13 a 14 del ciclo), se alcanza la mayor concentración de E₂ (Fernández-Tresguerres, 2010). En este período, el aumento sostenido de E₂ ya no inhibe la liberación de GnRH, sino que comienzan a ejercer una breve *retroalimentación positiva* (Figura 9) sobre la hipófisis para que, en respuesta a la GnRH se desencadene *el pico preovulatorio de LH* que permitirá la ovulación. También se alcanza un pico de FSH, pero más bajo, debido a que está bajo

el efecto de la inhibina y el E₂ (Williams y Stancel, 1996; Elliot y Agonistes, 2008; Duffy y col., 2019).

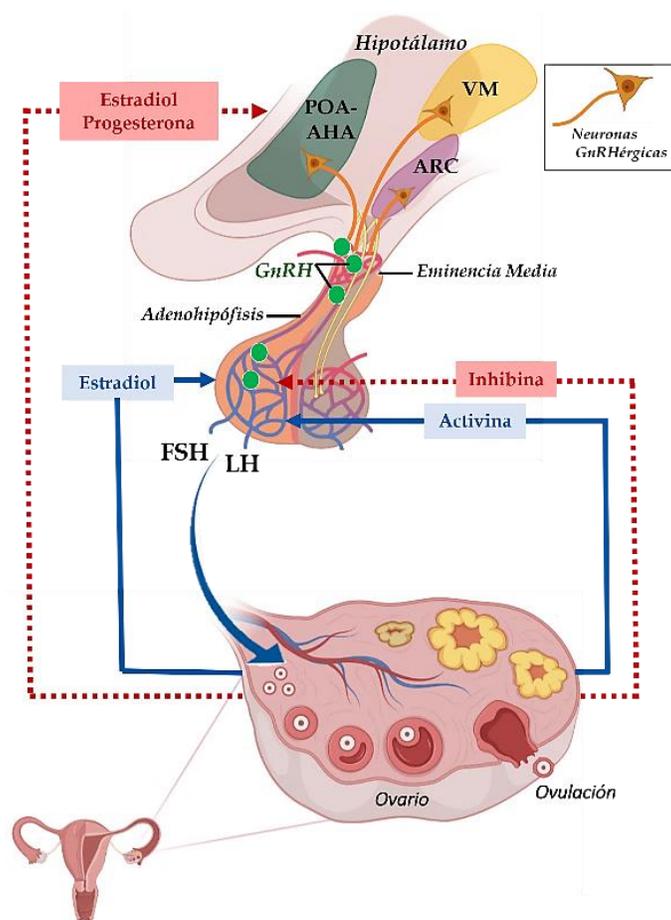


Figura 9. Esquema de la retroalimentación positiva (flechas continuas azules) y negativa (flechas punteadas rojas) del eje hipotálamo hipofisiario ovario. POA-AHA: Área preóptica hipotalámica anterior; VM: Núcleo Ventromedial; ARC: Núcleo arcuato; GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas; FSH: Hormona estimulante del folículo; LH: Hormona Luteinizante (Basada en Baskind y Balen, 2016).

Una vez ocurrida la ovulación, la concentración de E₂ disminuye mientras que la de P₄ comienza a elevarse (Domínguez y col., 1991; Fernández-Tresguerres, 2010).

La amplitud y frecuencia de los pulsos de GnRH son críticos para el funcionamiento normal del eje HHO, pues su alteración puede culminar en anomalías endocrinas reproductivas como el SOPQ (Williams y Stancel, 1996; Bremer, 2010; Magendzo, 2010).

Ciclo Estral

La rata es un mamífero poliestro que ovula de forma espontánea (Bazer, 1999; Freeman, 2006). Su ciclo estral dura de 4 a 5 días en promedio (De la Cruz, 1998; Maeda, 2000). Ocurre de forma continua durante todo el año y sin influencia estacional, desde la pubertad hasta la senescencia; la cual ocurre entre los 7-9 meses de edad (Mattheij y Swarts, 1991; Lohmiller y col., 2020).

El ciclo estral es el resultado de una orquestación de eventos endocrinos que ocurren entre el hipotálamo, la adenohipófisis y los ovarios (Smith y Jennes, 2001).

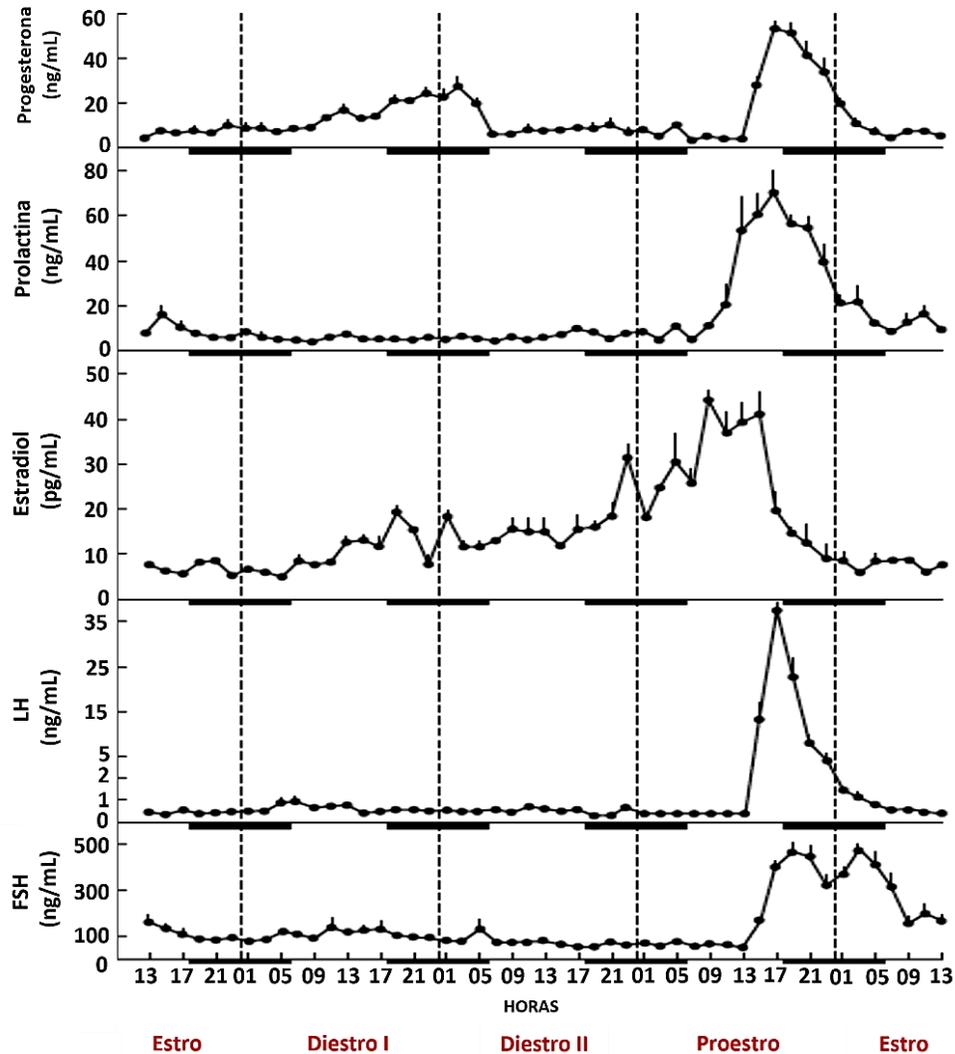
Las fluctuaciones hormonales reguladas por las gonadotropinas producen cambios en el ovario, el útero y en el epitelio vaginal. Los cambios del epitelio vaginal pueden detectarse a través de un frotis vaginal que permite identificar la fase del ciclo estral (De la Cruz, 1998; Maeda, 2000; Lohmiller y col., 2020).

El ciclo estral consta de cuatro fases:

- **Diestro 1 (D1) o Metaestro:** dura aproximadamente de 6 a 8 horas (De la Cruz, 1998; Freeman, 2006). La citología vaginal se caracteriza por la presencia de algunos leucocitos junto con células nucleadas. Los leucocitos se caracterizan por ser células pequeñas, con citoplasma granular y un núcleo vesiculado que aparece fuertemente teñido (De la Cruz, 1998; Freeman, 2006; Lohmiller y col., 2020).

Durante el ciclo estral se presentan dos picos de las hormonas $20\alpha\text{-OH-P}$ y P_4 , donde *el primer pico* ocurre en la tarde del D1 (Figura 10). Ambos esteroides provienen de los cuerpos lúteos recién formados y se ha descrito que en esta fase, la P_4 induce la mucificación del epitelio vaginal e inhibe la secreción de las gonadotropinas (De la Cruz, 1998; Freeman, 2006).

Al final de esta fase y a principios del diestro 2 la concentración de estrógenos comienza a elevarse (Figura 10) (Freeman, 2006). A nivel uterino, comienza la degeneración epitelial al no ocurrir la fertilización de los óvulos (De la Cruz, 1998).



- **Diestro 2 (D2):** es la fase más larga, dura aproximadamente de 2 a 3 días (Freeman, 2006). Los cuerpos lúteos alcanzan su tamaño máximo. Los leucocitos invaden el epitelio vaginal y son las células que predominan en los frotis (De la Cruz, 1998; Lohmiller y col., 2020). La concentración de estrógenos continúa elevándose, mientras que la de LH, FSH, P₄ y prolactina (PRL) mantienen concentraciones basales (Freeman, 2006). Al final de esta fase comienza la maduración de folículos y la regeneración de los epitelios vaginal y uterino (De la Cruz, 1998).
- **Proestro:** Tiene una duración de 12 a 14 horas (Freeman, 2006). Las células redondas nucleadas son la población principal en el frotis; sin embargo, al final de la tarde del proestro, algunas células nucleadas se convierten en células cornificadas, con aspecto escamoso, anucleadas y transparentes (Maeda, 2000; De la Cruz, 1998).

En esta fase, el crecimiento folicular ocurre por acción de la FSH, los folículos a su vez secretan estrógenos; donde su concentración comienza a elevarse en la mañana del proestro y desciende al final de la tarde (Figura 10) (Maeda, 2000; De la Cruz, 1998). Los estrógenos estimulan el epitelio vaginal y la queratinización de este. El útero está distendido con fluido que aumenta su tamaño (De la Cruz, 1998).

Los estrógenos tienen un efecto de retroalimentación positiva sobre el hipotálamo, donde estimulan la liberación de GnRH, la cual actúa en los gonadotropos de la adenohipófisis para que secreten gonadotropinas (Ojeda y Skinner, 2006). Alrededor de las 14:00 a las 15:00 horas, las concentraciones de FSH y LH comienzan a aumentar rápidamente, y entre las 17:00 y 19:00 horas se alcanzan las concentraciones máximas de FSH y LH, que desencadenan los eventos previos que culminan con la *ovulación (en el día del estro)*. Al final de esta

fase las concentraciones de ambas gonadotropinas comienzan a descender (Figura 10) (Maeda, 2000; Freeman, 2006; Lohmiller y col., 2020).

Durante la tarde del proestro ocurre *el segundo pico de progestinas* (Figura 10); es probable que la 20α -OH-P provenga de los cuerpos lúteos, mientras que la P_4 es sintetizada por las células de la granulosa de los folículos preovulatorios. Al mismo tiempo se presenta un “aumento” de PRL, similar al de LH (Figura 10) (Freeman, 2006).

- **Estro:** tiene una duración de 25 a 27 horas (Freeman, 2006). En el frotis vaginal se observan abundantes células anucleadas escamosas procedentes de la descamación del epitelio superficial de la vagina (De la Cruz, 1998; Lohmiller y col., 2020).

En la madrugada del estro comienza un segundo pico de FSH, el cual comienza a disminuir alcanzando concentraciones basales en la noche del estro. Este segundo pico de FSH permite el reclutamiento y crecimiento del siguiente grupo de folículos. Por otra parte, en la mañana de este día, se alcanzan concentraciones basales de LH y E_2 (Figura 10) (Freeman, 2006; Fernández-Tresguerres, 2010; Ross y Pawlina, 2015).

En este período la hembra realiza una conducta denominada como *lordosis*, la cual consiste en cambios posturales que indican su máxima receptividad al macho y permite la cópula (De la Cruz, 1998; Lohmiller y col., 2020).

En el ciclo estral de 5 días, el día adicional puede caracterizarse por la presencia de cornificación vaginal (estro) o infiltración de leucocitos (diestro) (Freeman, 2006).

Inervación Ovárica

El desarrollo folicular, la ovulación y la secreción de hormonas esteroideas son procesos regulados por señales hormonales y nerviosas (Domínguez, 2015).

El ovario posee *inervación intrínseca y extrínseca*. La *inervación intrínseca* está representada por microganglios de naturaleza catecolaminérgica, además de que se expresan otros neurotransmisores como el NPY y el óxido nítrico. La presencia o no de la *inervación intrínseca* depende de la especie ya que se ha identificado en la cepa Wistar, pero no en la Long-Evans o Sprague-Dawley (Gioia, 1996; D'Albora y col., 2000; D'Albora y col., 2002; Morales-Ledesma, 2015). Las funciones de este tipo de *inervación* se desconocen, pero se ha propuesto que actúa junto a la *inervación extrínseca* estimulando la secreción de hormonas esteroides (D'Albora y col., 2002).

La *inervación extrínseca* está compuesta por fibras de naturaleza *simpática, sensorial* y una pequeña cantidad de *fibras parasimpáticas* que ingresan al ovario a través del hilio (Gioia, 1996; Dissen y Ojeda, 1999), mediante tres paquetes nerviosos:

- 1) **El Nervio Ovárico Superior (NOS):** Es un nervio de naturaleza simpática. La *inervación simpática* se origina en los segmentos T₁₁ al L₄ de la médula espinal y hace sinapsis en el GCMS, donde se localizan los somas de las neuronas del NOS (Dissen y Ojeda, 1999; Morales-Ledesma, 2015). Este nervio está asociado con el ligamento suspensorio. Inerva a la glándula intersticial y las paredes foliculares (Aguado y Ojeda, 1984). Está compuesto por fibras que transportan NA, VIP y NPY (Lawrence y Burden; 1980; Dissen y Ojeda, 1999; Greiner y col., 2005).
- 2) **Nervio del Plexo Ovárico (NPO):** Es un nervio mixto que está compuesto por fibras simpáticas que transportan NPY y NA; y fibras sensoriales que llevan sustancia P (SP) y péptido relacionado con el gen que codifica a la calcitonina (Lawrence y Burden, 1980; Aguado y Ojeda, 1984; Dissen y Ojeda, 1999). La

inervación sensorial del ovario se origina tanto en los ganglios nodosos como en los ganglios de la raíz dorsal, ubicados entre el segmento torácico caudal (T₉-T₁₁) y el segmento lumbar craneal de la médula espinal (L₂-L₄). Los somas de las neuronas del NPO se localizan en el ganglio celíaco-mesentérico superior (GCMS); corren junto con la arteria y vena ováricas. Inerva principalmente la vasculatura de la gónada (Dissen y Ojeda, 1999).

- 3) **El Nervio Vago (NV):** El soma de las neuronas que provienen del NV e inervan a la gónada, se localizan tanto en el ganglio nodoso como en los ganglios de la raíz dorsal de los segmentos T₁₀-L₂ de la médula espinal. Es un nervio mixto por el que viajan fibras sensoriales y parasimpáticas por el cual transcurren péptidos como la SP, el péptido activador del adenilato ciclasa (PACAP), Ach y VIP. Sus fibras inervan la vasculatura ovárica (Burden y col., 1983; Klein y Burden, 1988; Dissen y Ojeda, 1999; Pastelín y col., 2017).

Actualmente se desconoce el momento en que se desarrolla la inervación de la gónada durante el desarrollo intrauterino de la rata, sin embargo, se acepta que este proceso precede al inicio de la foliculogénesis (Gioia, 1996). La expresión de neurotrofinas en humanos y roedores comienza durante la vida fetal, las cuales participan en el desarrollo de la inervación ovárica. En ovarios de ratas fetales el receptor p75 ya se expresa, y se ha observado que su ARNm aumenta después del nacimiento y durante el desarrollo folicular (Lara y col., 1990; Dissen y col., 1995; Dissen y col., 2004; Domínguez y col., 2011). Malamed y col., (1992), mostraron que los ovarios de ratas de 19 días de gestación presentan algunas fibras catecolaminérgicas, lo cual fue determinado por la presencia de la tirosina hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de catecolaminas; el grupo de McKey (2019) obtuvo resultados similares en ovarios de ratones de 17 días de gestación.

Desarrollo Embrionario de la Rata

Una vez que los ovocitos son liberados, pasan a través del infundíbulo ciliado y fimbriado del oviducto hacia la porción ampular, donde posteriormente ocurre la *fertilización* (Morales y Álvarez, 2010; Sebastian y Borjeson, 2020), que es el proceso mediante el cual dos gametos se fusionan y crean un nuevo individuo (Erb, 2006). La fertilización permite que los genes se transfieran de progenitores a la descendencia y comience una serie de eventos que permiten el desarrollo de un feto a término (Vaticón, 2010; Hall, 2011; Sebastian y Borjeson, 2020).

De acuerdo con Morales y Álvarez (2010), el desarrollo intrauterino de la rata se divide en tres fases:

1) Período de Preimplantación (De la fertilización al 4° DG).

Durante este período ocurre el transporte del cigoto. Después de 20-25 horas de la fertilización, los cigotos comienzan la primera segmentación y han viajado aproximadamente un cuarto de la longitud del oviducto. Al final del 2° DG, el embrión de dos células ha atravesado más de la mitad de la longitud del oviducto. En el DG 3, se encuentran embriones de 4 células en el oviducto. El estadio de 8 células puede encontrarse a las 90 horas después del apareamiento (DG 3.5). Continúa la segmentación y las mórulas tardías (16 células) se dirigen al útero (Maeda, 2000; Morales y Álvarez, 2010; Sebastian y Borjeson, 2020).

Para favorecer la implantación se requiere la preparación continua del endometrio en el DG 4, con una cantidad mínima de estrógenos, que estimulan la proliferación epitelial, y de P₄, que además de favorecer la proliferación celular del estroma, asegura la supervivencia del embrión (Maeda, 2000; Sebastian y Borjeson, 2020).

Durante el período de preimplantación, la agresión tóxica generalmente ocasiona la muerte del embrión (Sebastian y Borjeson, 2020).

2) Período de Implantación (DG 5 al 7).

En la mañana del DG 5, las mórulas (24 a 32 células) están en la cavidad uterina, se encuentran libres y espaciadas de manera similar a como se implantarán (Krehbiel y Plagge, 1962; Sebastian y Borjeson, 2020). La formación del blastocele comienza al mediodía del DG 5. En la tarde del 5° DG, los *blastocistos* se desprenden de su zona pelúcida, evento que precede al comienzo de la implantación (Sebastian y Borjeson, 2020).

En la noche del 5° DG comienza el proceso de implantación (Sebastian y Borjeson, 2020), donde los blastocistos ingresan en una cripta decidual, dándose el primer contacto del trofoblasto con el epitelio del endometrio. Las células del epitelio uterino se separan de su membrana basal y de sus células vecinas, degeneran y son fagocitadas por el trofoblasto. La interacción entre el trofoblasto y el epitelio uterino se inicia únicamente si ambos se encuentran en un estado sincrónico, es decir, en *estado invasivo*, para el caso del trofoblasto, y en *estado receptivo*, para el caso del endometrio. Esta receptividad del endometrio sólo se mantiene por un tiempo corto y se denomina “ventana de implantación” (Dey y Lim, 2006; Morales y Álvarez, 2010).

La implantación de los embriones se completa en el 7° DG y ocurre normalmente en el lado anti-mesometrial del útero (Figura 11) (De Rijk y col., 2002; Morales y Álvarez, 2010; Sebastian y Borjeson, 2020).

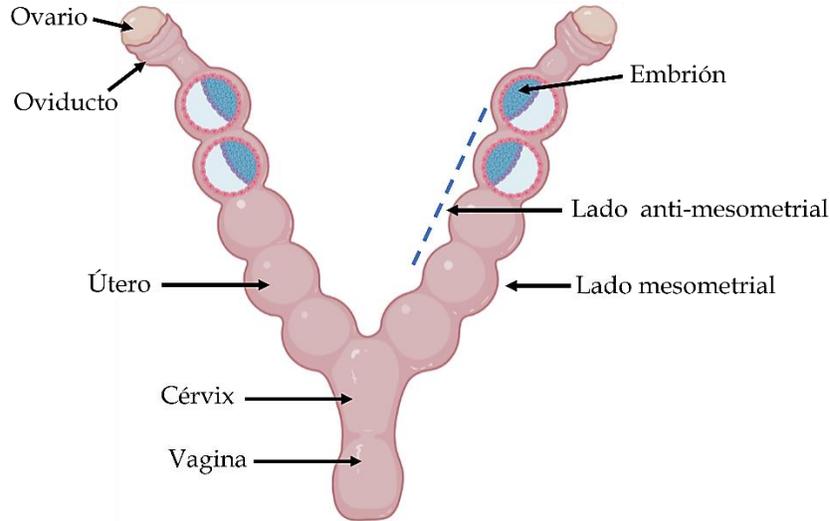


Figura 11. Esquema de la orientación en que ocurre la implantación del embrión en el endometrio del útero de la rata (Basado y modificado de De Rijk y col., 2002).

Fisiológicamente, la rata tiene dos placentas que sirven para el intercambio materno-embriionario (Sebastian y Borjeson, 2020): la *placenta del saco vitelino o placenta coriovitelina*, y la *placenta corioalantoidea* (Figura 12a y b) cada una de las cuales se desarrolla en momentos diferentes de la gestación (Jollie, 1990; Maeda, 2000; Sebastian y Borjeson, 2020).

La formación de la **placenta coriovitelina** comienza en el 7° DG, la cual degenera y desaparece hacia el DG 14 (Jollie, 1990; Maeda, 2000). El saco vitelino parietal está revestido con la *membrana de Reichert (RM, por sus siglas en inglés)* (específica para roedores), la cual está bañada por sangre materna circulante que permite la difusión de materiales hacia la cavidad del saco vitelino, desde donde el embrión los absorbe (Everett, 1935, Inoué y col., 1983; Furukawa y col., 2011; Furukawa y col., 2019).

3) Período de Post-implantación (DG 9 al nacimiento)

En este período ocurre la *gastrulación* (DG 8.5 - 9.5), donde el disco bilaminar se transforma en el disco trilaminar conformado por las tres hojas germinativas:

ectodermo, mesodermo y endodermo, a partir de las cuales derivarán los tejidos y órganos (Erb, 2006; Arteaga y García, 2017).

Así mismo, se lleva a cabo la *formación y maduración* de los órganos. La formación de los órganos denominada *organogénesis*, comienza con la aparición de la línea primitiva en el DG 9 y termina de 8-9 días después (DG 17-18) (Morales y Álvarez, 2010; Sebastian y Borjeson, 2020).

Se forman la notocorda (DG 8.5-9) y la placa neural (DG 9.5), precursora del tubo neural, que a su vez dará lugar a la formación del cerebro y parte de la médula espinal (Sebastian y Borjeson, 2020).

Del DG 11.5-12.5, se forma en el lado mesometrial del útero, la *placenta corioalantoidea*, con forma discoide y de tipo hemocorial (Figura 12a). Histológicamente, la placenta de la rata se divide en dos partes, la fetal y la materna. La parte fetal de la placenta está compuesta por el saco vitelino, la zona laberíntica y la zona basal o de unión; mientras que la parte materna está formada por la decidua basal y la glándula metrial, dichas capas placentarias estarán desde el 12° DG hasta el final del período gestacional (Figura 12b) (Jollie, 1990; De Rijk y col., 2002; Furukawa y col., 2019; Sebastian y Borjeson, 2020).

Los primordios de los órganos se diferencian y durante su *maduración*, se lleva a cabo su crecimiento junto con los cambios histológicos, fisiológicos y bioquímicos correspondientes. Esta es la etapa de mayor susceptibilidad a la acción de los teratógenos, sin embargo, cada órgano pasa por más períodos críticos (Morales y Álvarez, 2010).

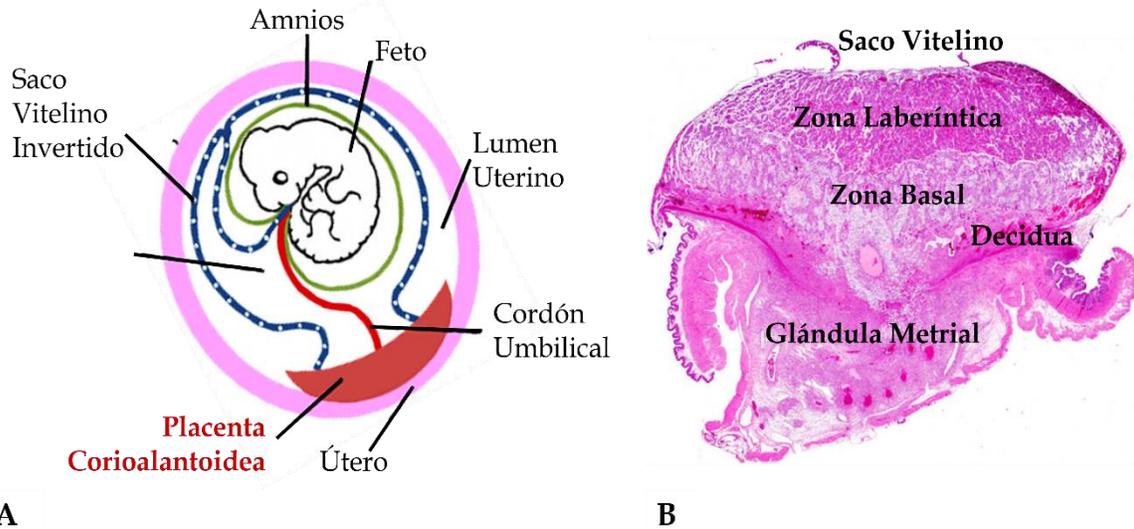


Figura 12. Esquema del feto de rata en la etapa media a tardía donde se observa la placenta corioalantoidea (A), y corte histológico de la placenta corioalantoidea de la rata en el DG 15 (B), que muestra las capas fetales y maternas (Tomado y modificado de Furukawa y col., 2019).

En la rata, el período fetal abarca desde el 12° DG hasta el momento del nacimiento (DG 21 o 22), mientras que en el humano comprende de la semana 9-38 de gestación (Morales y Álvarez, 2010; Sadler, 2012). En el cuadro 1 se detalla el desarrollo del *sistema urogenital de la rata* durante las etapas de *organogénesis y maduración* de los órganos (Maeda, 2000; Morales y Álvarez, 2010; Sebastian y Borjeson, 2020):

Cuadro 1. Desarrollo del sistema urogenital en la etapa embrionaria y fetal de la rata.

Día de Gestación	Eventos ocurridos durante el desarrollo
8-9	Se forma el mesodermo intermedio, precursor del sistema urinario y genital.
9-10	Identificación de las CGP en epitelio del saco vitelino. La migración de CGP hacia la cresta gonadal comienza entre el DG 10 u 11.
11-12	Se desarrollan los conductos mesonéfricos o de Wolff*, el pliegue gonadal parece medial al pliegue nefrogénico. Para el DG 12 a 13, las CGP han finalizado su migración a la gónada indiferenciada.

12-13	Están presentes los primordios del metanefros: divertículo uretral y blastema metanéfrico, empieza la degeneración del mesonefros.
13-14	Se empiezan a formar los conductos paramesonéfricos o de Müller♫ y el tubérculo genital.
14-15	Las gónadas son identificables como ovarios o testículos. En los machos, comienza la secreción testicular de testosterona. Los riñones inician su ascenso y para el día 18 éstos alcanzan su posición definitiva.
15-16	La cloaca se ha dividido en seno urogenital y recto. Los conductos paramesonéfricos alcanzan el seno urogenital; los testículos inician su descenso. Los genitales externos aún están indiferenciados.
17-18	En el macho aumenta la longitud anogenital. El surco urogenital está cerrado por la membrana urogenital. En las hembras, los conductos de Wolff degeneran y los conductos paramesonéfricos se fusionan para formar el canal útero-vaginal. La pelvis renal y los cálices se encuentran dilatados por fluido renal.
18-19	Todo el mesonefros ha desaparecido, excepto la porción que se integra a la gónada masculina. En el ovario de rata de 19 DG ya hay presencia de fibras de naturaleza catecolaminérgica.
19-20	En los machos, desaparecen los conductos paramesonéfricos. Los testículos yacen laterales a la vejiga y cerca del suelo de la pelvis. Aparecen las vesículas seminales sobre las paredes laterales de los conductos deferentes, así como los brotes prostáticos.

* En los machos, los conductos mesonéfricos o de Wolff darán origen al epidídimo, conductos deferentes, vesícula seminal y conductos eyaculantes. ♫En las hembras, los conductos paramesonéfricos o de Müller formarán al oviducto, útero y el extremo superior de la vagina (Sebastian y Borjeson, 2020).

Hormonas de la Gestación

En el humano, el período de gestación dura de 38 a 40 semanas después del último ciclo menstrual (Derrickson, 2018); mientras que en la rata, en promedio dura de 21 a 22 días desde la cópula hasta el momento del parto (Weizenbaum y col., 1979; Ojeda y Skinner, 2006).

Durante los dos primeros meses de gestación en la mujer, el CL secreta concentraciones altas de estrógenos y P_4 , que permiten el mantenimiento del embarazo, sin embargo, al tercer mes de gestación la producción placentaria de esteroides hace innecesaria la presencia del CL (Bowen-Shauver y Gibori, 2004; Fernández-Tresguerres, 2010; Derrickson, 2018). En el caso de la rata, el CL es requerido durante casi todo el período gestacional (hasta los días 17-18 de gestación) ya que es el principal sintetizador de estrógenos y P_4 (Uchida y col., 1970; Bazer, 1999; Bowen-Shauver y Gibori, 2004). La capacidad del CL para secretar P_4 y así mantener la gestación, está regulada por hormonas producidas por la adenohipófisis, la placenta y por sí mismo (Gibori y col., 1988); entre estas hormonas se encuentran: *las proteicas* como la PRL, las hormonas similares a la PRL, la LH y los lactógenos placentarios de rata I y II; y *las esteroideas* como la P_4 , andrógenos y estrógenos (Bowen-Shauver y Gibori, 2004; Stouffer y Hennebold, 2015).

La fuente de síntesis de algunas de estas hormonas cambia en la primera mitad de la gestación (DG 0-11) y la segunda (DG 12-parto) (Gibori y col., 1988; Bowen-Shauver y Gibori, 2004).

1) HORMONAS PROTEICAS

∅ Prolactina y hormonas similares a la prolactina

En la rata, la PRL es una hormona luteotrópica esencial, ya que ayuda al mantenimiento del CL en la gestación temprana (Bowen-Shauver y Gibori, 2004). Es

sintetizada por la adenohipófisis en dos oleadas, una diurna y una nocturna durante 10-12 días, como producto de la estimulación cervical durante el apareamiento (Figura 13a) (Gibori y col., 1988; Bazer, 1999; Hughes y Pate, 2019). La PRL inhibe la actividad de la 20α -HSD enzima que durante la regresión lútea transforma a la P_4 en 20α -OH- P , un metabolito gestacionalmente inactivo, de este modo, la PRL evita la metabolización de la P_4 y mantiene su concentración alta (Gibori y col., 1988; Bowen-Shauver y Gibori, 2004).

También tiene un papel clave en la producción y acción del E_2 , ya que estimula la expresión de los receptores a estrógenos en el ovario (Gibori y col., 1979; Sridaran y Mahesh, 1989; Bowen-Shauver y Gibori, 2004).

El sitio de secreción de la PRL cambia de la adenohipófisis a la decidua (Gibori y col., 1988). Aunque la PRL hipofisaria se secreta hasta la mitad de la gestación (DG 11) (Morishige y col., 1973), ésta no se requiere después del DG 6 (Gibori y col., 1988; Bowen-Shauver y Gibori, 2004; Hughes y Pate, 2019), ya que desde el DG 7 al 11 comienza la secreción de una hormona similar a la PRL, la *prolactina decidua* (**dPRL**), que dará el apoyo luteotrópico (Bowen-Shauver y Gibori, 2004; Stouffer y Hennebold, 2015; Hughes y Pate, 2019).

∅ **Lactógenos Placentarios**

Aunque las oleadas de PRL hipofisaria terminan y la concentración de la dPRL disminuye a la mitad de la gestación (Bowen-Shauver y Gibori, 2004), los cuerpos lúteos de la preñez aumentan en masa, vascularidad y capacidad esteroideogénica, ello, debido a la secreción de otras hormonas similares a la PRL, denominados como *lactógenos placentarios de rata I y II* (rPL-I, rPL-II) (Figura 13b) (Gibori y col., 1988; Bowen-Shauver y Gibori, 2004; Stouffer y Hennebold, 2015). El rPL-I se secreta como un complejo proteico glicosilado, su vida media es larga y actúa a través del receptor de la PRL (Bowen-Shauver y Gibori, 2004). Comienza su expresión después de la implantación en las células gigantes del trofoblasto, posteriormente se extiende a la

placenta coriovitelina y corioalantoidea, alcanza su concentración máxima entre el DG 11-12 (Figura 13b) (Gibori y col., 1988; Ogren y Talamantes, 1988; Maeda, 2000; Bowen-Shauver y Gibori, 2004).

El estímulo lactogénico del CL continúa por el rPL-II, una proteína no glicosilada, de vida media corta (Bowen-Shauver y Gibori, 2004). Es sintetizado por el trofoblasto y su concentración sérica aumenta desde la mitad de la gestación hasta el parto (Figura 13b), este es el responsable del mantenimiento del CL hasta el final de la gestación (Ogren y Talamantes, 1988; Maeda, 2000).

Los lactógenos placentarios contribuyen al desarrollo de las glándulas mamarias y a la síntesis de la P₄ en los cuerpos lúteos (Yépez y Estévez, 1981; Maeda, 2000; Vaticón, 2010).

2) HORMONAS ESTEROIDEAS

En la mujer, durante el embarazo, la placenta en conjunto con la mamá y el feto sintetizan hormonas esteroides (Hofmann, 1998); mientras que en la rata, durante la primera mitad de la gestación, la producción esteroidea ocurre en el CL y a partir de la segunda mitad de la preñez, ocurre de manera conjunta con la placenta (Gibori y col., 1988).

Las hormonas esteroides derivan del colesterol, el cual se transporta a las células a partir de LDL en la mujer, y HDL en la rata; o bien, puede sintetizarse colesterol localmente en las células lúteas (Gibori y col., 1988; Fernández-Tresguerres, 2010). En la mujer, las LDL son internalizadas a las células por endocitosis, mientras que en la rata este evento ocurre por transferencia a la membrana plasmática sin endocitosis o degradación de la molécula de HDL. Una vez obtenido el colesterol, queda disponible para la síntesis de hormonas esteroides (Hofmann, 1998; Bowen-Shauver y Gibori, 2004; Vaticón, 2010). La producción de hormonas esteroides

durante la gestación difiere en la rata y el humano debido a la falta de ciertos sistemas enzimáticos en los órganos esteroideos (Furukawa y col., 2019).

∅ Progesterona

En la rata gestante, la producción de hormonas esteroideas comienza con la conversión de colesterol en pregnenolona por acción de la enzima P450_{scc} en la membrana interna de la mitocondria. Posteriormente, la pregnenolona es transportada al retículo endoplasmático donde es transformada en P₄ por la enzima 3β-HSD (Bowen-Shauver y Gibori, 2004).

En la rata, la P₄ es importante para el establecimiento y mantenimiento de la gestación (Uchida y col., 1970; Bazer, 1999; Bowen-Shauver y Gibori, 2004; Hughes y Pate, 2019).

Es sintetizada principalmente por el ovario. En la mitad inicial de la preñez, la producción lútea de P₄ está bajo control hipofisiario, pero a partir de la segunda mitad, es regulada por las hormonas similares a la PRL y por los estrógenos (Uchida y col., 1970; Gibori y col., 1977; Sridaran y Mahesh, 1989; Maeda, 2000).

Además, a partir de la segunda mitad de la preñez la placenta también secreta P₄, aunque en cantidad insuficiente para mantener la gestación por sí sola (Warshaw y col., 1986; Gibori y col., 1988; Maeda, 2000).

La concentración sérica de P₄ aumenta hasta alcanzar un pico entre los días 14-15 de gestación; sin embargo, después del DG 18 la concentración comienza a disminuir (Figura13a) (Uchida y col., 1970; Morishige y col., 1973; Taya y Greenwald, 1981); debido al aumento de la enzima 20α-HSD (Uchida y col., 1970; Morishige y col., 1973; Bowen-Shauver y Gibori, 2004).

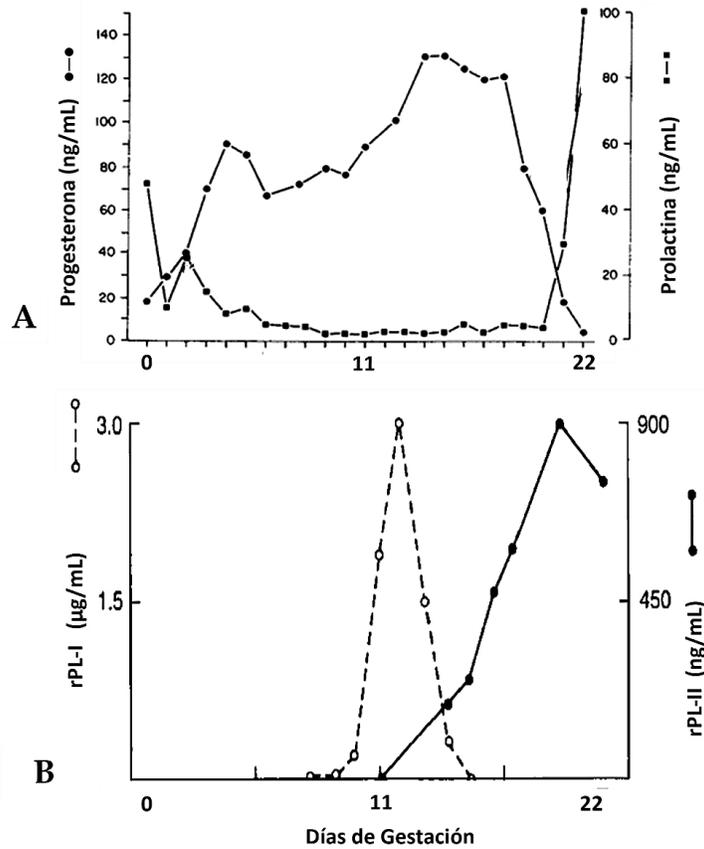


Figura 13. Concentración sérica de las hormonas prolactina y progesterona (A), y de los lactógenos placentarios de rata I y II (B) durante la gestación en la rata. PRL: prolactina; P₄: progesterona; rPL I y II; lactógeno placentario de rata I y II (Tomado y modificado de Ogren y Talamantes, 1988; Rosenblatt y col.,1988).

§ Andrógenos

La síntesis de hormonas esteroideas durante la gestación en la rata continúa con la conversión de la P₄ en andrógenos ya sea en el CL o la placenta. Se transforma la P₄ en *androstenediona* por acción del complejo enzimático P450c17 α (comprende a las enzimas 17 α -hidroxilasa y 17,20 liasa), el cual es estimulado por la LH. Es probable que ocurra la interconversión de androstenediona a *testosterona*; en humanos, esta reacción es mediada por la enzima 17 α -HSD1, presente en células foliculares y el CL, sin embargo, en el CL de roedores no se ha detectado dicha enzima (Bowen-Shauver y Gibori, 2004).

En la rata, antes del DG 11, la principal fuente de andrógenos es el ovario; su secreción está bajo control hipofisario estimulada por la LH (Gibori y Sridaran, 1981; Gibori y col., 1988; Sridaran y Mahesh, 1989; Durkee y col., 1992). Sin embargo, conforme progresa la gestación, el ovario pierde su capacidad para transformar la P_4 en androstenediona y hacia la mitad de la gestación, la placenta es la principal fuente secretora de andrógenos (Gibori y Sridaran 1981; Gibori y col., 1988; Durkee y col., 1992).

Desde el DG 11 al 18, la concentración ovárica de andrógenos cae abruptamente (Figura 14a) (Gibori y col., 1979; Gibori y Sridaran, 1981; Sridaran y col., 1981); este evento se debe a que la concentración sérica de la LH también disminuye a partir de la mitad de la gestación, de este modo se atenúa la síntesis de andrógenos ováricos (Figura 14b) (Morishige y col., 1973; Bowen-Shauver y Gibori, 2004). Sin embargo, la concentración placentaria de andrógenos aumenta considerablemente a partir de la segunda mitad de la gestación, lo cual es consistente con el aumento de la actividad de las enzimas 17α -hidroxilasa y $17,20$ liasa. De tal manera que se alcanza un pico en el DG 16 y 17 (Figura 14a) (Gibori y col., 1979; Warshaw y col., 1986; Gibori y col., 1988). La placenta produce abundante androstenediona, y en menor cantidad testosterona; y se sabe que la síntesis de andrógenos ocurre principalmente por la vía esteroidogénica Δ_4 ; un estudio mostró que el tejido placentario utiliza preferentemente a la P_4 que a la pregnenolona como sustrato precursor de andrógenos (Warshaw y col., 1986; Gibori y col., 1988; Bowen-Shauver y Gibori, 2004).

Al final de la gestación, entre el DG 18-21, la concentración de la LH y andrógenos ováricos aumenta, mientras que los andrógenos placentarios disminuyen (Figura 14 a y b) (Gibori y col., 1979; Gibori y col., 1988). Es posible que la LH controle la secreción de andrógenos ováricos y placentarios de forma inversa (Sridaran y col., 1981; Gibori y col., 1988).

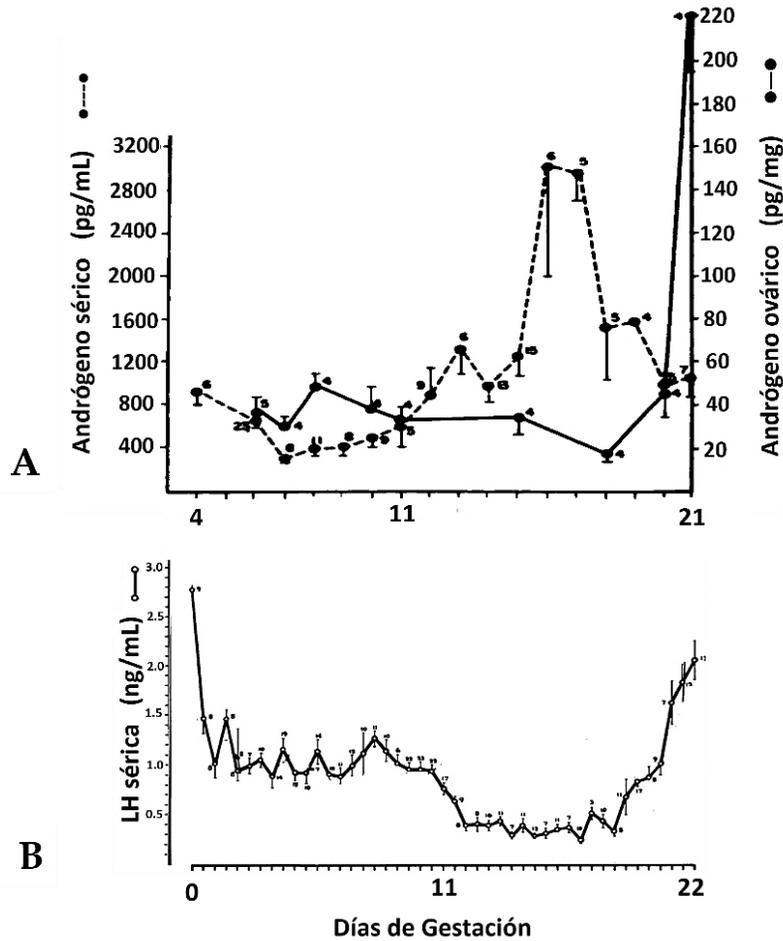


Figura 14. Concentración de andrógenos ováricos (línea negra sólida) y placentarios (línea punteada) (A); concentración sérica de la hormona luteinizante (B) (Tomado y modificado de Morishige y col., 1973; Gibori y col., 1979).

⌘ Estrógenos

La androstenediona y la testosterona son transformados por las aromatasas en *estrona* y E_2 , respectivamente. La estrona por acción de la 17β -HSD tipo 7 o también conocida como *proteína asociada al receptor de PRL (PRAP)* es transformada en E_2 (Bowen-Shauver y Gibori, 2004). A diferencia de la placenta humana que secreta estrógenos, la placenta de la rata no lo hace, ya que *no expresa aromatasas* (Taya y Greenwald, 1981; Gibori y col., 1988); de este modo, en la mitad de la gestación, los andrógenos placentarios sirven como sustrato para la síntesis de estrógeno en el CL (Figura 15) (Durkee y col., 1992).

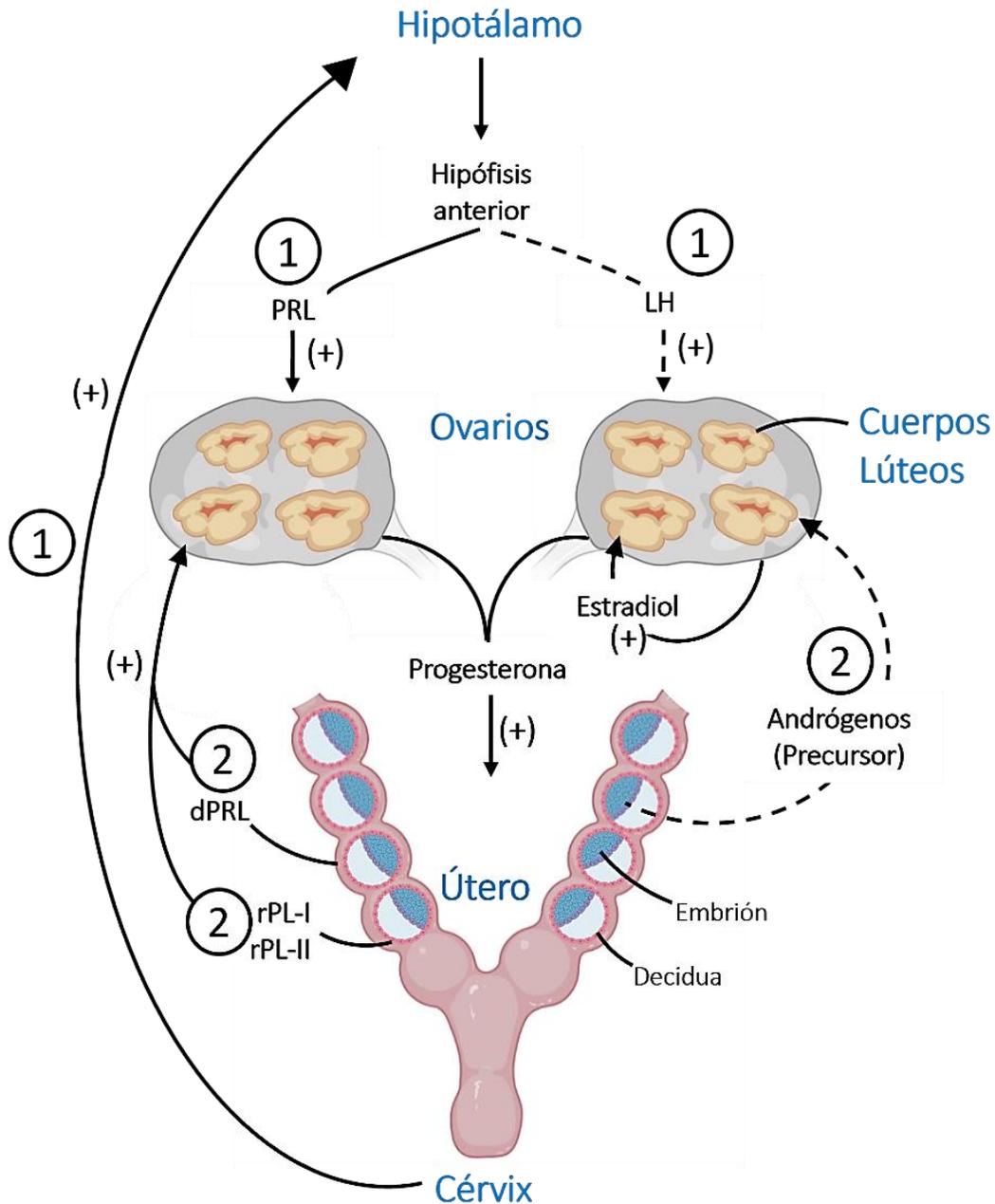


Figura 15. Esquema de los mecanismos neuroendocrinos, endocrinos y locales que mantienen al CL durante la primera (1) y segunda mitad de la gestación (2) en la ratona. Tres fuentes diferentes de hormonas brindan soporte luteotrópico a medida que avanza la gestación: un estímulo neuroendocrino activado por el apareamiento (estimulación cervical) resulta en la liberación de PRL de la adenohipófisis; en la segunda semana de preñez, la dPRL brinda el apoyo luteotrópico; y hacia mediados o finales de la preñez, el rPRL-I y rPRL-II son las luteotropinas primarias. Además, al principio de la preñez, la LH promueve la producción de una luteotropina local, el estradiol. En la gestación media o tardía, los andrógenos placentarios sirven como precursores para la síntesis de estrógenos lúteales (líneas discontinuas). PRL: prolactina; LH: hormona luteinizante; dPRL: prolactina decidual; rPRL-I y II: lactógenos placentarios de rata I y II (Tomado y Modificado de Stouffer y Hennebold, 2015).

La placenta de la rata sostiene la síntesis ovárica de estrógenos (Feng y col., 2016) a partir del sustrato placentario. A su vez, los estrógenos lúteos actúan localmente para mantener la síntesis de P_4 (Figura 15) (Durkee y col., 1992; Maeda, 2000), ya que participan en la movilización del colesterol. Además, a mediados de la gestación, los estrógenos estimulan la vascularización de los cuerpos lúteos (Gibori y col., 1988; Bowen-Shauver y Gibori, 2004).

La concentración lútea de estrógenos presenta un aumento abrupto en el DG 15, lo cual coincide con un aumento de la expresión y actividad de las P450arom. A partir de entonces, la concentración de estrógenos se eleva hasta presentar su valor máximo en el DG 21 (Figura 16 a y b) (Taya y Greenwald, 1981; Bowen-Shauver y Gibori, 2004).

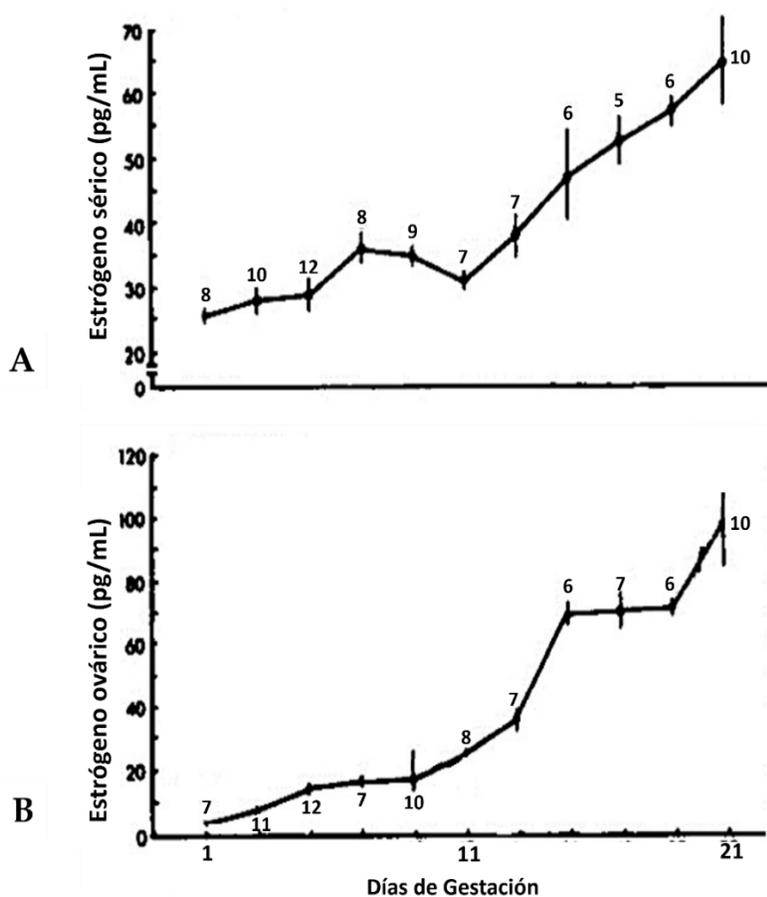


Figura 16. Concentración de los estrógenos en suero (A) y en ovario (B) durante la gestación en la rata (Tomado y modificado de Taya y Greenwald, 1981).

Etapas del Desarrollo Posnatal de la Rata

El desarrollo posnatal de la rata hembra se divide en 4 etapas con base en parámetros morfológicos y fisiológicos relacionados con los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Ojeda y col., 1980):

- **Neonatal (desde el nacimiento al día 7 de edad):**

Al inicio de esta etapa, el ovario no responde a las gonadotropinas (Ojeda y col., 1980; Ojeda y Skinner, 2006). Entre el cuarto y quinto día de vida, los receptores de la FSH comienzan a formarse y dos días después, los de la LH. A partir del quinto día, la FSH comienza a estimular la conversión de testosterona en E₂ (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990). El control negativo que ejerce el E₂ sobre la secreción gonadotrópica es ineficiente debido a la presencia de la α -fetoproteína, que al unirse a los estrógenos, los torna biológicamente inactivos (Raynaud, 1973). La concentración de FSH aumenta mientras que la de LH se mantiene baja (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

- **Infantil (día 8 al 21 de edad):**

Se caracteriza por altas concentraciones de FSH, fundamentales para el reclutamiento y crecimiento de los folículos que llegarán a ovular en la pubertad. Asimismo, hay presencia de picos esporádicos de LH. Para el día 15 de vida posnatal, la concentración de FSH disminuye, los picos de LH desaparecen y la inhibina es detectable en el suero. La disminución de la α -fetoproteína permite que el E₂ ejerza un mecanismo de retroalimentación negativa sobre las gonadotropinas (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

En el ovario de ratas de la cepa CII-ZV, a los 10 días de vida, se observa un mayor número de folículos pequeños (<350 μ m de diámetro) y para el día 18 se encuentran presentes folículos medianos (350-499 μ m de diámetro). El número de folículos

disminuye entre los 12 y 16 días de edad debido al incremento en el índice de atresia folicular. De los 14 a los 16 días de vida, la concentración de LH aumenta, aunque en la etapa subsecuente disminuye. La concentración de P₄ es baja, mientras que la de E₂ incrementa conforme el animal crece (Castro, 1999).

- **Período Juvenil (día 21 al 30 de edad):**

Al comienzo de esta etapa disminuye la concentración de FSH mientras la de LH se mantiene baja y constante. Posteriormente, el patrón de secreción de LH se vuelve pulsátil y hacia el final del período, su concentración basal y su amplitud incrementan durante la tarde, estableciéndose así un ritmo de secreción circadiano. Al final de esta etapa, incrementa el número de receptores a LH en el ovario. En este momento queda establecida la retroalimentación positiva del E₂ sobre la LH (Andrews y Ojeda, 1981; Smith-White y Ojeda, 1981; Meijis-Roelofs y col., 1983; Urbanski y Ojeda, 1983; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

En la cepa CII-ZV se ha descrito que entre los días 21 y 24 incrementa el número de folículos ováricos, y para el día 26 se observan los primeros folículos preovulatorios (>500 µm de diámetro). Las concentraciones de LH y P₄ se mantienen bajas (Castro, 1999).

- **Período Peripuberal (día 30 al momento de la primera ovulación):**

Aunado a la secreción pulsátil y circadiana de LH, aparecen en esta etapa unos “minipicos” vespertinos de LH, de dependencia esteroidea. La secreción aumentada de LH actúa sobre el ovario para una mayor producción de E₂, el cual produce retroalimentación positiva sobre las gonadotropinas. Además, incrementa el número de receptores a FSH y LH en el ovario y, en consecuencia, su actividad esteroideogénica. La concentración de P₄, testosterona y E₂ aumentan, siendo este último el responsable de la *apertura vaginal*. Las elevadas concentraciones de hormonas esteroides ocasionan que a nivel hipotalámico se libere GnRH, lo que

culmina con la liberación masiva de gonadotropinas y la consecuente primera ovulación (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Ojeda y Skinner, 2006).

En ratas de la cepa CII-ZV de 32 días de vida se observa un incremento en la población folicular del ovario. El mayor número de folículos preovulatorios se presenta en los días 32 y 38 de edad. Al final de esta etapa la concentración de la LH, P₄ y estrógenos incrementa (Castro, 1999).

Pubertad en la Rata

La pubertad es la transición fisiológica a la edad adulta, donde se alcanza la madurez sexual y con ello la capacidad de producir crías viables (Colledge, 2004; Lohmiller y col., 2020).

El inicio de la pubertad en la rata está influenciado por una multiplicidad de eventos, como la activación de las neuronas que sintetizan GnRH, hormona clave en la maduración sexual y la función reproductiva (Ma y Ojeda, 1997; Ojeda y Skinner, 2006; Lohmiller y col., 2020). Además, glándulas como las adrenales y la pineal se han relacionado como influencia moduladora del inicio de la pubertad, ya que la extirpación de las adrenales o las inyecciones diarias de melatonina ocasionan un retraso en la edad de la apertura vaginal. Los factores como el estrés o la nutrición también tienen un papel en la regulación del eje HHO, ya que la inmovilización, o el ayuno de 48 horas a partir del día del estro en la rata suprime los pulsos de LH, lo que resulta en el bloqueo de la ovulación (Maeda, 2000; Ojeda y Skinner, 2006).

En la rata, el único signo externo que indica el inicio de la pubertad es la *canalización de la vagina*. Este evento ocurre entre los 33 a 42 días de vida, dependiendo de la cepa del animal, y tiene lugar el día posterior al primer pico preovulatorio de gonadotropinas (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Maeda, 2000; Ojeda y

Skinner, 2006). El frotis vaginal muestra células cornificadas, ello indica el PEV y a partir de entonces, la rata puede ser preñada (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

Los ciclos estrales comienzan a ser regulares aproximadamente una semana después de la apertura vaginal (Maeda, 2000; Lohmiller y col., 2020).

Síndrome del Ovario Poliquístico

El SOPQ es la alteración endocrina y metabólica más común que afecta a las mujeres en edad reproductiva, con una incidencia a nivel mundial de aproximadamente el 15% (Pérez y Maroto, 2018; Stener-Victorin y Deng, 2021), mientras que en las mujeres mexicanas es del 6% (Morán y col., 2010). En los últimos años, se ha podido establecer que esta patología puede manifestarse desde la pubertad y quizá antes (Sir-Petermann y col., 2013; Azziz, 2018).

Este síndrome está asociado con una amplia gama de trastornos reproductivos y metabólicos. Incluye la presencia de hiperandrogenismo clínico o bioquímico, oligoanovulación que se asocia con oligomenorrea o amenorrea, y con la presencia de ovarios poliquísticos, lo que conlleva a la infertilidad (Yen, 2001; Cruz y col., 2012; Sir-Petermann y col., 2013). Además, las mujeres con esta patología tienen un riesgo mayor de presentar resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2, obesidad y dislipidemia. Se considera que estas anormalidades pueden ser consecuencia de una alteración en la función del eje hipotálamo-hipófisis-ovarios (Baldani y col., 2015; Morales-Ledesma, 2015).

El SOPQ es un trastorno heterogéneo, razón por la cual los criterios utilizados para su diagnóstico se han modificado a lo largo de los años. Entre 1925 y 1935, Stein y Leventhal documentaron un cuadro clínico consistente en trastornos menstruales,

esterilidad, hirsutismo y obesidad. Además, se describió que los ovarios de las pacientes presentaban características morfológicas particulares tales como: aumento de tamaño, engrosamiento de la túnica albugínea y presencia de quistes. Estas manifestaciones representaron en esa época los criterios estrictos para el diagnóstico de lo que se denominó como el *Síndrome de Stein-Leventhal* (Yen, 2001).

En 1990, en una conferencia de expertos patrocinada por el Instituto Nacional de la Salud (NIH, por sus siglas en inglés), se determinó como criterios para el diagnóstico del SOPQ: 1) hiperandrogenismo y/o hiperandrogenemia, y 2) anovulación. El diagnóstico requirió de la exclusión de otros desórdenes como la hiperplasia adrenal congénita (Bulun y Adashi, 2009; Bremer, 2010; Espinoza y col., 2011).

En una conferencia celebrada en Rotterdam en el año 2003, los criterios de diagnóstico fueron revisados y propuestos por la Sociedad Europea para la Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) y la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva, y definieron para el diagnóstico del SOPQ la presencia de dos de las siguientes tres características: 1) signos clínicos y/o bioquímicos de hiperandrogenismo, 2) oligo o anovulación y 3) morfología ovárica poliquística, y se excluyeron trastornos asociados al exceso de andrógenos (Azziz, 2006; Bremer, 2010; Espinoza y col., 2011; Pérez y Maroto, 2018).

En el año 2006, la Sociedad de Exceso de Andrógenos (AES, por sus siglas en inglés) recomendó que el SOPQ se definiera esencialmente por la presencia de hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico, acompañado o no de oligoanovulación y/o morfología ovárica poliquística (Merino y col., 2009; Goodarzi y col., 2011).

La Sociedad de Exceso de Andrógenos y Síndrome del Ovario Poliquístico en el año 2009 determinó que para el diagnóstico del SOPQ se requiere de la presencia simultánea de: 1) hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico, 2) disfunción ovárica (oligo o anovulación y/o ovarios poliquísticos) y 3) exclusión de trastornos relacionados con exceso de andrógenos (Bremer, 2010).

Manifestaciones Clínicas del SOPQ

Hiperandrogenismo

Su manifestación bioquímica, denominada como hiperandrogenemia, se caracteriza por el aumento en las concentraciones de andrógenos totales o libres, donde la testosterona es el andrógeno más elevado. Asimismo, se pueden encontrar elevadas concentraciones de andrógenos como la androstenediona y la DHEA. Se considera que los valores de corte para diagnosticar hiperandrogenemia son 50.7 ng/dL para testosterona total, 1.8 pg/mL para testosterona libre, 5.2 ng/mL para androstenediona y 19.2 ng/mL para DHEA (Morán y col., 2010). La hiperandrogenemia se presenta en el 70% de pacientes con SOPQ, por lo que el exceso de andrógenos es considerado por muchos investigadores como la principal característica del SOPQ (Goodarzi y col., 2011).

Clínicamente, el hiperandrogenismo se manifiesta con: acné, alopecia androgénica e hirsutismo, en el cual se presenta exceso de vello corporal en zonas sensibles a andrógenos. La gravedad y distribución del hirsutismo se evalúa con la escala de Ferriman-Gallwey modificada por Hatch y colaboradores en el año 1981. Esta escala comprende nueve regiones del cuerpo: bigote, mentón, tórax superior, abdomen, área genital, antebrazos, cara interna de muslos, región interescapular y lumbar. En cada región hay una puntuación máxima de 4. Según la cantidad de vello, el puntaje de cada área se suma y así se obtiene el puntaje final. El puntaje para el diagnóstico de hirsutismo debe ser mayor o igual a 8 puntos (Figura 17) (Merino y col., 2009; Tharian y Warner, 2011; López y col., 2012).

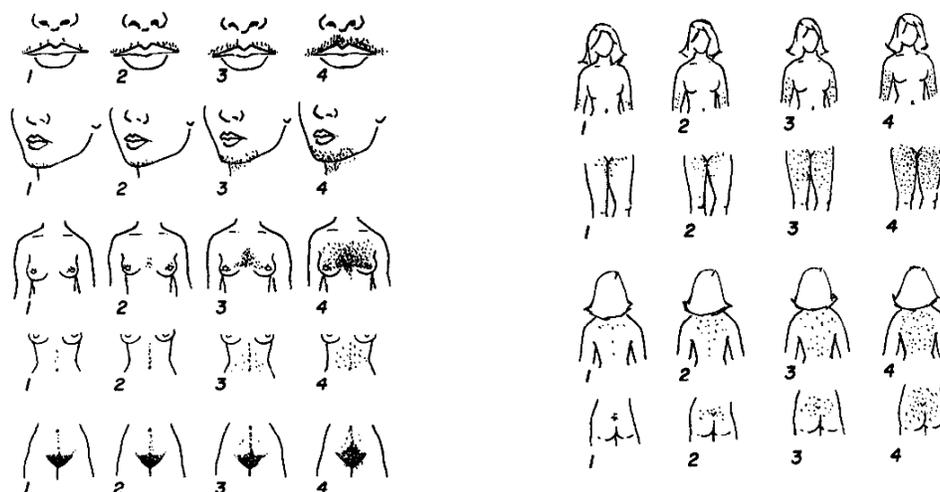


Figura 17. Escala para evaluar el grado de hirsutismo propuesta por Ferriman-Gallwey y modificada por Hatch y col., 1981 (Hatch y col., 1981).

Anovulación

Los ciclos menstruales regulares en una mujer adulta son de 24-38 días en promedio e indican que el eje hipotálamo-hipófisis-ovario funciona correctamente, lo que favorece el desarrollo de los mecanismos que culminan con la ovulación (Merino y col., 2009; Magendzo, 2010).

Las mujeres con SOPQ presentan trastornos menstruales tales como la oligomenorrea o amenorrea que se acompañan en la mayoría de los casos de ciclos anovulatorios, lo cual disminuye su capacidad reproductiva (Magendzo, 2010).

La oligomenorrea se define como la presencia de menos de 9 menstruaciones al año o 3 ciclos de más de 38 días durante el último año y como amenorrea ciclos mayores a 90 días (Merino y col., 2009).

Se ha atribuido que la anovulación se debe a las bajas concentraciones de FSH y la detención del crecimiento de folículos antrales en la fase final de la maduración (Sordia, 2014).

Ovarios Poliquísticos

Durante el desarrollo folicular ovárico, algunos folículos primordiales son reclutados para su crecimiento, de los cuales se selecciona un folículo antral que llegará a ovular. Sin embargo, en el SOPQ, el hiperandrogenismo ovárico y/o la hiperinsulinemia y la señalización paracrina intraovárica alterada pueden interrumpir el crecimiento del folículo (Goodarzi y col., 2011). Los ovarios de pacientes con SOPQ contienen muchos folículos pequeños que han comenzado a crecer, pero no llegan a la madurez (Yen, 2001; Magendzo, 2010).

Además, en el ovario de las mujeres con SOPQ se observan quistes foliculares, determinados a través de un ultrasonido. Los quistes foliculares se caracterizan por exhibir una cavidad antral amplia, disminución e hipofunción de las células de la granulosa, presencia de ovocito e hiperplasia tecal (Yen, 2001). La presencia de 12 o más folículos de 2 a 9 mm de diámetro en la periferia de uno o ambos ovarios, además de un aumento del volumen ovárico (más de 10 cm³), son determinantes para diagnosticar la poliquistosis ovárica (Morán, 2006; Tharian y Warner, 2011).

Se ha sugerido que la formación de quistes ováricos puede deberse a los cambios en la secreción de las gonadotropinas (Brawer y col., 1986), y al exceso de insulina que promueve la luteinización folicular prematura que detiene la proliferación de las células de la granulosa y el posterior crecimiento del folículo (Goodarzi y col., 2011).

Etiología del SOPQ

La etiología es aún desconocida debido a su compleja fisiopatología. Sin embargo, se han propuesto algunas hipótesis que tratan de explicar su origen (Sir-Petermann y col., 2013):

Disfunción Neuroendocrina

Las mujeres con SOPQ presentan una alteración neuroendocrina caracterizada por incremento en la frecuencia y amplitud de los pulsos de la GnRH. Esto ocasiona que se secreten elevadas concentraciones de la LH, pero bajas o normales de la FSH. Este evento favorece una mayor producción de andrógenos por parte de las células tecales, lo que ocasiona una condición de hiperandrogenismo (Sir-Petermann y col., 2013).

En mujeres que no presentan el SOPQ se ha descrito que durante la fase folicular se presenta un pulso de GnRH cada 90 a 100 minutos lo que estimula la secreción de 2 a 10 UI/mL de FSH y de 2 a 6 UI/mL de LH; mientras que en la fase ovulatoria este pulso de GnRH ocurre cada 60 minutos lo que resulta en la liberación de 8 a 20 UI/mL de FSH y de 6 a 40 UI/mL de LH (Trujillo y col., 2015). Por otra parte, las mujeres con SOPQ se caracterizan por presentar un pulso de GnRH cada 60 minutos lo que ocasiona una mayor liberación de LH (42.12 UI/mL) que de FSH (11.3 UI/mL) (Yen y col., 1970).

Disfunción Ovárica

En las mujeres con SOPQ, el hiperandrogenismo parece deberse a una desregulación de la esteroidogénesis por los ovarios, donde incrementa la actividad de P450c17 α que participa en la conversión de pregnenolona y P₄ en andrógenos, y la 3 β -HSD, lo que conduce a una mayor producción de andrógenos ováricos, alterando el desarrollo de los folículos y la ovulación (Figura 18). En el ovario, la secreción de andrógenos es estimulada por la LH y la insulina, de ahí que las elevadas concentraciones de ambas hormonas que presentan las mujeres con SOPQ ocasionen una sobreestimulación de las células tecales, favoreciendo la condición hiperandrogénica (Bremer, 2010; Sir-Petermann y col., 2013).

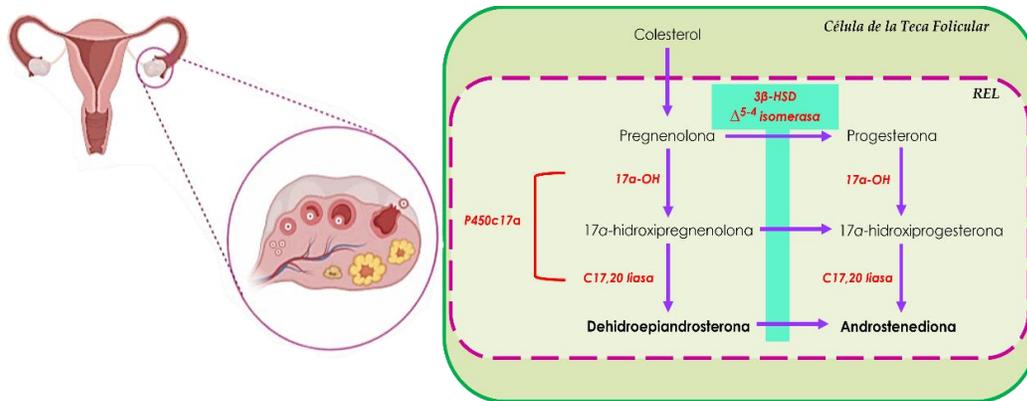


Figura 18. Teoría que explica el origen de la condición hiperandrogénica en el SOPQ. P450c17 α : complejo enzimático que comprende a las enzimas 17 α -hidroxilasa y 17,20 liasa; 17 α -OH: 17 α -hidroxilasa; 3 β -HSD: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; REL: retículo endoplasmático liso. Elaboración propia.

Origen Genético

La base genética del SOPQ fue reportada por primera vez por Cooper y colaboradores en 1968 (Khan y col., 2019). Este posible origen se fundamenta en que la patología es más frecuente entre las hermanas y mamás de las pacientes (Morán, 2006).

Aunque existen numerosos estudios donde se han evaluado múltiples genes, ningún gen en específico se ha asociado con el desarrollo de todos los fenotipos del síndrome (Bremer, 2010). Entre los genes evaluados están:

- ⊗ **CYP11a:** codifica para el citocromo P450scc (Khan y col., 2019).
- ⊗ **CYP17:** codifica para el citocromo P450c17 α (Khan y col., 2019).
- ⊗ **El gen de la 5 α -reductasa:** en mujeres con SOPQ se mostró un aumento en la actividad de la 5 α -reductasa, involucrada en la conversión de T en dihidrotestosterona (DHT) (Barber y Franks, 2013).
- ⊗ **El gen del receptor de andrógenos (AR):** El cromosoma X contiene el gen del AR y se ha descrito que mutaciones en él son suficiente para causar la patología del SOPQ (Khan y col., 2019). Además, se ha observado que la

longitud de la secuencia de repetición de trinucleótidos polimórficos CAG dentro del gen del AR influye en la androgenicidad (aparición de los caracteres sexuales secundarios masculinos) y, por lo tanto, en el desarrollo y la expresión del SOPQ; por ejemplo, si la repetición de CAG es corta, más sensible a los andrógenos es el AR (Barber y Franks, 2013).

- ∅ **CYP19:** codifica para la síntesis de las aromatasas (Khan y col., 2019).
- ∅ **El gen del receptor de la FSH (FSH-R):** está relacionado con la respuesta ovárica a la FSH. Las mutaciones del FSH-R conducen al detenimiento del desarrollo folicular (McAllister y col., 2015).
- ∅ **El gen de la insulino-resistencia (INRS):** Las mutaciones en el dominio de la tirosina quinasa del receptor de insulina son causas conocidas de la resistencia a la insulina e hiperinsulinemia (Crespo y col., 2018).
- ∅ **El gen de la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG):** codifica para la síntesis de la SHBG, que al unirse tanto a la testosterona como a los estrógenos, regula la concentración de hormonas sexuales libres en el plasma (Khan y col., 2019).

Hiperactividad Simpática

Por estudios experimentales se ha sugerido que el desarrollo del SOPQ es el resultado de la hiperactividad de las fibras simpáticas que inervan al ovario (Lara y col., 1993; 2000).

Se ha mostrado que la inyección de VE a ratas altera el patrón del ciclo estral caracterizado por períodos prolongados de estro o diestro, incrementa la secreción de andrógenos y E₂, concentraciones variables de gonadotropinas y ocasiona anovulación (Brawer y col., 1986; Barria y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003). En los ovarios de estos animales no hay presencia de cuerpos lúteos recién formados, se presentan numerosos folículos antrales y grandes quistes foliculares caracterizados

por una delgada capa de células de la granulosa (generalmente una monocapa) y una capa tecal engrosada (Brawer y col., 1978; Hemmings y col., 1983; Brawer y col., 1986; Lara y col., 1993, 2000)

Lara y colaboradores (1993, 2000) mostraron que tras la administración de VE a ratas, en el ovario se observa un aumento de la expresión del NGF y de su receptor de baja afinidad p-75. La unión del ligando al receptor genera una cascada de señalización que viaja de manera retrógrada a través del NOS hasta el GCMS, donde aumenta la expresión de la tirosina hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de catecolaminas. Este evento favorece la síntesis y liberación de NA hacia el ovario. El aumento del tono noradrenérgico en el ovario conlleva a una mayor secreción de andrógenos y al desarrollo de quistes.

Se ha mostrado que en la rata, prepúber o adulta, tratada con VE, la sección bilateral del NOS resulta en ciclos estrales regulares, restablecimiento de las concentraciones de andrógenos y estrógenos y ocurre la ovulación, lo que es evidenciado por la presencia de cuerpos lúteos (Rosa-E-Silva y col., 2003; Morales-Ledesma y col., 2010).

Reprogramación Fetal

La *reprogramación fetal* postula que un *estímulo* dado en una edad gestacional crítica para la diferenciación, el crecimiento o el desarrollo de los órganos diana, induce cambios permanentes en el tamaño, estructura o la función de los órganos (Abbott y col., 2006; Maliqueo y Echiburú, 2014).

En los últimos años, se ha propuesto que el SOPQ pudiera tener su origen desde la vida intrauterina (Gur y col., 2015). Esta teoría enfatiza que los factores ambientales o la alteración del medio hormonal durante la vida prenatal influyen en el desarrollo de fenotipos del SOPQ a largo plazo (Rutkowska y Diamanti-Kandarakis, 2016).

Se ha mostrado que las modificaciones hormonales *in útero* pueden llevar a una *reprogramación fetal* (Recabarren y col., 2006). Por ejemplo, dado que el hiperandrogenismo es la principal característica de la fisiopatología del SOPQ, los modelos animales que imitan el exceso de andrógenos fetales pueden proporcionar una visión del origen de la patología (Figura 19) (Abbott y col., 2005; Wu y col., 2010; Tehrani y col., 2014).

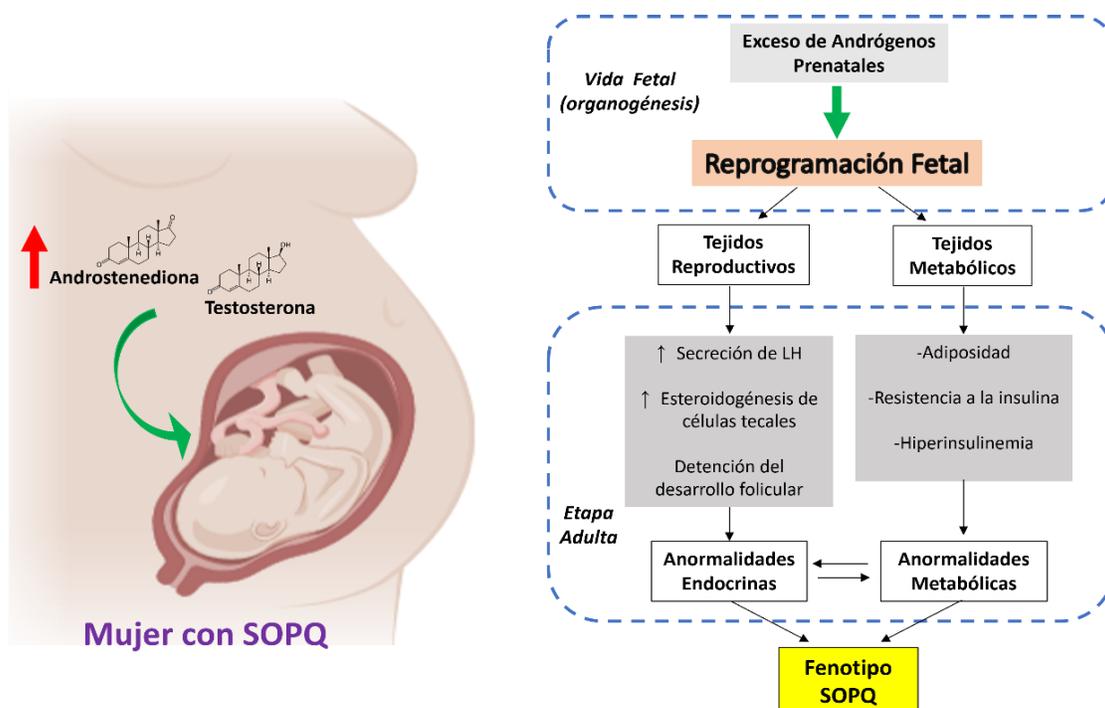


Figura 19. Exceso de andrógenos prenatales y desarrollo del fenotipo del SOPQ (Tomado y modificado de Xita y Tsatsoulis, 2006).

De igual forma, se ha sugerido que en el SOPQ existe un *fenómeno epigenético* inducido por el exceso de andrógenos, lo que ocasiona cambios en los tejidos en proceso de diferenciación y conduce a la manifestación de la patología en la vida adulta (Xita y Tsatsoulis, 2006; Maliqueo y Echiburú, 2014). Se han involucrado mecanismos epigenéticos en la etiología del SOPQ, ya que se ha mostrado que la metilación del ADN y los microARN está alterada en mujeres con SOPQ, en sangre,

tejido adiposo, células de la granulosa y teca, lo cual indica que las mujeres con la patología tienen una regulación epigenética diferente (Concha y col., 2017).

Los modelos animales con SOPQ *inducido prenatalmente* desarrollan características permanentes debido a las alteraciones a las que se someten los órganos en esta etapa de diferenciación, lo que conduce a modificaciones tanto en su estructura como en su funcionamiento (Tehrani y col., 2014).

Modelos de Exposición Prenatal a Esteroides

Androgenización Prenatal

El hiperandrogenismo es la manifestación clínica principal del SOPQ. Existe evidencia de que el desarrollo de esta patología puede comenzar durante el período intrauterino (Shi y Vine, 2012; Gur y col., 2015).

En la rata se han utilizado andrógenos como testosterona, DHEA, propionato de testosterona (PT) o DHT para inducir el SOPQ a través de inyecciones diarias (Wu y col., 2010) o implantes subcutáneos (Shi y Vine, 2012).

Wu y colaboradores (2010) mostraron que, en ratas hembra preñadas, la inyección diaria con *testosterona* o DHT por vía s.c. del día 16 al 19 de gestación, resulta en la descendencia femenina en un menor número de pezones, retraso en la edad de apertura vaginal, aumento en la distancia ano-vaginal y genitales masculinizados. Además, las crías presentan elevadas concentraciones de P_4 , testosterona, E_2 y LH, lo que se acompañó de la alteración del ciclo estral, con presencia de estró vaginal prolongado. La morfología ovárica reveló un menor número de cuerpos lúteos.

Por otro lado, el grupo de Tehrani (2014) mostró que, en ratas preñadas, la inyección de *testosterona* por vía s.c. en el día 20 de gestación resulta en la descendencia femenina en ciclos estrales irregulares, aumento de la distancia ano-vaginal,

incremento de las concentraciones de testosterona, LH, así como de la relación LH/FSH. Además, en el ovario se observó un menor número de folículos preovulatorios, de cuerpos lúteos y presencia de quistes foliculares.

Estrogenización Prenatal

Al momento no se ha descrito si la exposición **prenatal** del feto a los estrógenos resulta en el desarrollo del SOPQ. No obstante, se han reportado algunas alteraciones en la función reproductiva de las crías que durante la gestación fueron expuestas a estas hormonas.

En ratones hembra gestantes, la administración oral de *etinilestradiol* en el día 11-17 de gestación, resultó en las crías hembra adultas en un menor número de folículos primordiales y mayor número de quistes (Yasuda y col., 1977).

En 1978, Boylan mostró que la inyección s.c. de altas dosis de *dietilestilbestrol (DES)* a ratonas preñadas impide el parto y ocasiona abortos. En la descendencia femenina se observó un adelanto de la edad de apertura vaginal y el desarrollo precoz y anormal de los pezones. En la madurez, se observaron anomalías en el útero y los ovarios. Al aparearlas, estas hembras mostraron una fertilidad reducida y debido a la estructura anormal de sus pezones, no lograron amamantar a las crías. Estos resultados dependen de la dosis inyectada de DES y de la semana de administración, donde la tercera semana de gestación parece ser la más susceptible a alteraciones.

En ratonas, la inyección s.c. diaria de DES desde los 9 hasta los 16 días de preñez, resulta en las crías hembra, sacrificadas a diferentes intervalos de tiempo, en la disminución de la foliculogénesis, presencia de quistes y menor número de cuerpos lúteos (Newbold y col., 1983).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la mujer los problemas reproductivos van al alza, actualmente el SOPQ es la patología endocrina y metabólica más frecuente en mujeres de edad reproductiva que afecta aproximadamente al 15% de la población femenina a nivel mundial; mientras que en México la incidencia es del 6%. Se caracteriza por la presencia de hiperandrogenismo, anovulación y quistes foliculares, lo que conduce a la infertilidad. Actualmente, la presencia del SOPQ en mujeres jóvenes ha incrementado. Su origen se asocia a varios factores, entre ellos, los genéticos, ambientales o aquellos con un ambiente hormonal intrauterino alterado.

La exposición fetal a hormonas esteroides es crítica e induce una *reprogramación* permanente del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, lo que se traduce en la alteración irreversible de la capacidad reproductiva. Se ha mostrado que los efectos de la exposición intrauterina del feto a los estrógenos durante una etapa crítica del desarrollo dependen del día en que éstos son administrados.

Uno de los esteroides utilizados para la inducción del SOPQ es el VE, un estrógeno de larga actividad que altera las funciones del eje reproductivo e induce características semejantes a las descritas en la mujer con la fisiopatología. Al momento se desconoce si la administración de VE en hembras preñadas puede inducir la reprogramación fetal y favorecer el desarrollo del SOPQ en las crías. Por lo que en el presente estudio se inyectó VE en ratas con 16 o 18 días de gestación y se analizaron los efectos sobre las funciones del ovario en las crías hembra a la pubertad o etapa adulta.

HIPÓTESIS

Dado que la administración de VE resulta en el desarrollo del SOPQ y que las alteraciones hormonales en una etapa crítica del desarrollo intrauterino pueden ocasionar una *reprogramación fetal*, entonces la exposición *in útero* a un ambiente estrogénico resultará en el desarrollo de la fisiopatología en las crías a la pubertad o en la etapa adulta, efectos que dependerán del día de gestación en que sean expuestos los fetos al VE.

OBJETIVO GENERAL

Analizar si la administración de VE en ratas preñadas induce el desarrollo de las características del SOPQ en las crías a la pubertad o en la etapa adulta.

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar en crías púberes o adultas, los efectos de su exposición al VE en el día 16 o 18 del desarrollo intrauterino sobre:

- El peso corporal y el peso de los órganos
- El inicio de la pubertad
- El patrón del ciclo estral
- La respuesta ovulatoria
- La dinámica del desarrollo folicular
- La concentración de hormonas esteroideas en suero

MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en estricto apego a la Ley Mexicana de Protección Animal 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 protocolos experimentales utilizados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. Se hicieron todos los esfuerzos posibles para minimizar la cantidad de animales utilizados y su sufrimiento.

Ratas hembra de la cepa CII-ZV fueron alojadas en jaulas de acrílico bajo condiciones controladas de iluminación con 14 horas de luz por 10 horas de oscuridad (luces encendidas de las 5:00 a las 19:00 horas), a una temperatura de 22 ± 2 °C, con agua y alimento (Purina S.A., México) a libre demanda.

Diseño Experimental

Los animales fueron divididos al azar en diferentes grupos experimentales, cada uno conformado por 6-10 animales. Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, entre las 10:00 y 12:00 horas del día del estro.

Apareamiento

Se utilizaron ratas hembra nulíparas sexualmente maduras de tres meses de edad. Su ciclo estral fue monitoreado por la examinación citológica de los frotis vaginales diarios. Al momento de las cruzas, dos hembras en proestro se colocaron con un macho de fertilidad probada de la misma cepa y edad. A la mañana siguiente tras la observación del tapón espermático y/o espermias en el frotis vaginal, se consideró como el día cero de gestación (Figura 20). Dado que algunos investigadores designan

el día 1 de gestación tras la observación de espermatozoides en el frotis vaginal, la mayoría de los datos a los que se hace referencia en este estudio se han ajustado a nuestra estadificación, esto con el fin de facilitar las comparaciones entre diferentes estudios (Markham y Vaughn, 1991).

Hembras Gestantes

En el día 16 o 18 de gestación, las ratas preñadas fueron inyectadas por vía sc con 0.1 mL de aceite de sésamo (Vh) (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo., USA) o 2.0 mg de VE (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo., USA) disuelto en 0.1 mL del Vh, dosis que se ha probado es capaz de inducir el desarrollo del SOPQ (Brawer y col., 1986; Lara y col., 1993; Rosa-E-Silva y col., 2003; Morales-Ledesma y col., 2010; Cruz y col., 2012). Las hembras gestantes fueron monitoreadas diariamente hasta el momento del parto, que ocurrió alrededor del día 21-22 de gestación (Figura 20).

Cuando el parto de las hembras no ocurrió, se decidió autopsiarlas después de la fecha esperada de parto (DG 21 o 22), para evitar su sufrimiento; para lo cual fueron colocadas en una cámara de dióxido de carbono (CO₂), en la que se les mantuvo por 5 minutos. Durante la autopsia se extrajo el útero y se verificó la presencia de reabsorciones* y retenciones fetales en cada cuerno uterino. Los fetos retenidos (FR) fueron fijados en alcohol absoluto.

Crías

Al nacimiento (considerado como el día cero de vida), se registró el número de crías vivas y muertas. Al día siguiente, las crías fueron sexadas y colocadas en camadas de cinco hembras y un macho, esto con el fin de evitar alteraciones en la maduración del sistema nervioso central y de su aparato reproductor (Salas y col., 1991).

***Reabsorción:** hace referencia a un *conceptus* (embrión/feto y las membranas extraembrionarias) que se implantó con éxito y luego murió, lo que provocó la extracción del tejido embrionario, pero la retención del tejido extraembrionario que comprende la placenta (Bolon y Rousseaux, 2015).

Los animales tuvieron libre acceso a la mamá hasta los 24 días de vida (destete) y posteriormente al agua y alimento, hasta el día de la autopsia. Las crías fueron divididas en dos grupos experimentales: crías de hembras gestantes inyectadas con el Vh o el VE.

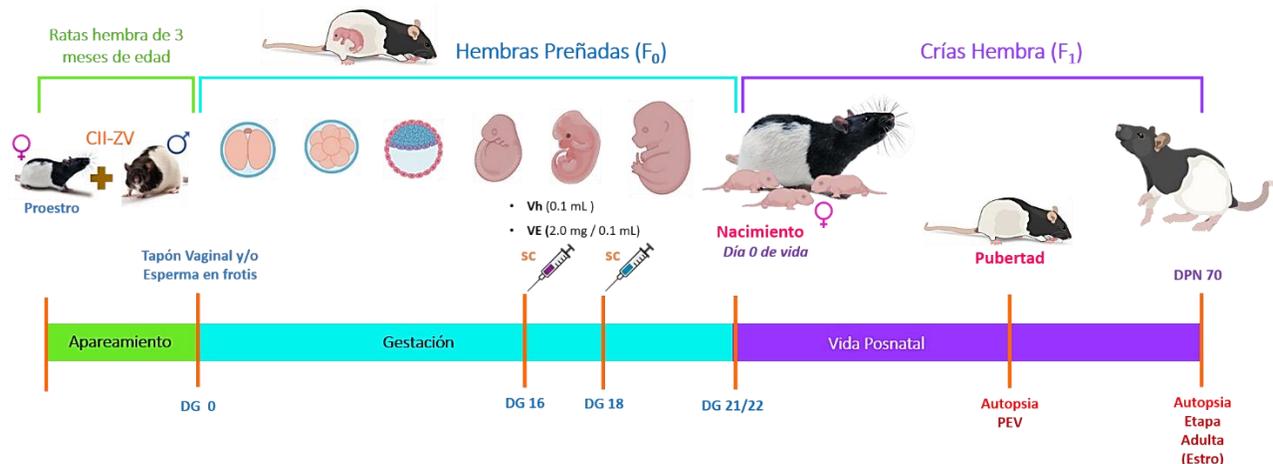


Figura 20. Esquema que muestra los grupos experimentales utilizados para evaluar los efectos de la estrogenización prenatal. DG: día de gestación; F₀: rata gestante; F₁: su descendencia de primera generación; Vh: vehículo; VE: valerato de estradiol; DPN: día posnatal; PEV: primer estro vaginal.

Apertura Vaginal y Frotis

Dado que en trabajos previos se ha mostrado que tras la administración del VE hay un adelanto de la canalización de la vagina (Rosa-E-Silva y col., 2003; Rosas, 2006), en este estudio se decidió monitorear la apertura vaginal en las crías de hembras inyectadas con VE a partir del día 14 de vida, mientras que en las crías de hembras tratadas con el Vh, fue a partir del día 30.

Una vez ocurrida la canalización vaginal, se realizó la toma de frotis vaginal diario. Algunas crías de ratas inyectadas con Vh o VE fueron sacrificadas al presentar su PEV.

Adicionalmente, con la finalidad de analizar si las características del SOPQ en la etapa adulta se agudizan, en otro grupo de animales, una vez que canalizaron vagina, se les realizó la toma del frotis vaginal diario por dos ciclos. Posteriormente, cuando cumplieron los 60 días de edad, se reinició el frotis por ocho días más y se les sacrificó al presentar un estro (Figura 20).

Procedimiento de Autopsia

Al momento de la autopsia, los animales fueron pesados en una balanza granataria y posteriormente sacrificados por decapitación. La sangre del tronco se colectó en tubos de ensaye, se dejó coagular a temperatura ambiente por 30 minutos y posteriormente se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 15 minutos. El suero se separó del botón celular, se dividió en alícuotas y se almacenó a -20 °C hasta el momento de la cuantificación de hormonas esteroideas.

Los ovarios, el útero, las glándulas adrenales, el bazo y el timo fueron disecados y pesados en una balanza analítica. Los oviductos se separaron de los ovarios y con ayuda de un microscopio estereoscópico y un par de agujas de disección se buscó el ámpula, se rasgó y se realizó el conteo del número de ovocitos liberados por cada ovario.

Valoración de la Dinámica del Desarrollo Folicular

Los ovarios de tres animales de cada grupo experimental fueron fijados en solución de Bouin durante 24 horas, deshidratados en alcohol (al 70%, 80%, 96% y absoluto) y cloroformo e incluidos en paraplast. Se realizaron cortes histológicos de manera seriada a 10 μm de grosor, se montaron y posteriormente se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina para su análisis morfométrico.

Para la determinación del *diámetro folicular*, sólo se tomaron en cuenta aquellos folículos en donde su ovocito presentara núcleo y nucleolo bien definidos; y con ayuda de un ocular micrométrico se midió de membrana basal a membrana basal el diámetro mayor (D_1) y el perpendicular a éste (D_2) (Figura 21). El diámetro promedio (D_p) se calculó con la relación $D_p = (D_1 + D_2) / 2$ (Rosas, 2006).

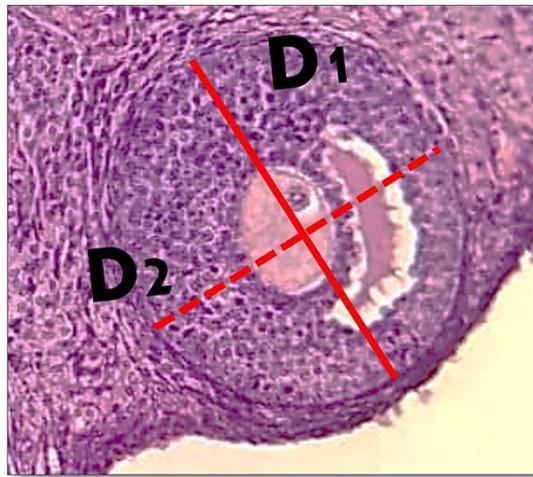


Figura 21. Representación esquemática de la medición del diámetro folicular. D_1 : diámetro mayor, D_2 : diámetro perpendicular.

De acuerdo con Hirshfield y Midgley (1978) y Vieyra y colaboradores (2019) los folículos se clasificaron como: pequeños (90-390 μm), medianos (391-500 μm) y grandes (>501 μm).

A su vez, se determinó la presencia de cuerpos lúteos, folículos sanos o atrésicos, prequistes y quistes foliculares. Se consideraron como *folículos atrésicos* aquellos que presentaron al menos una de las siguientes características: hipertrofia de las células tecales, núcleos picnóticos de las células de la granulosa, descamación de éstas en el antro folicular o desprendimiento del complejo cúmulo-ovocito (Greenwald y Roy, 1994). Se consideraron como *prequistes* aquellos folículos grandes caracterizados por presentar de cuatro a cinco capas de células de la granulosa, con una capa tecal aparentemente normal, con invaginaciones de la pared folicular y presencia o no de ovocito (Lara y col., 2000). Fueron definidos como

quistes foliculares aquellos que presentaron una cavidad antral amplia, hiperplasia tecal, disminución de las capas de la granulosa aparentemente sanas y ausencia del ovocito (Brawer y col., 1986; Lara y col., 2000).

Cuantificación de Hormonas Esteroideas en Suero

La cuantificación de hormonas esteroideas 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”.

Determinación de Progesterona

La cuantificación de P₄ en suero se realizó mediante la técnica de quimioluminiscencia (IMMULITE 1000). Se utilizó fosfatasa alcalina conjugada con un anti-ligando (anti-progesterona) en solución tampón y como sustrato quimioluminiscente, un anticuerpo policlonal de conejo (anti-progesterona) el cual recubre una microesfera.

Al adicionar el suero (25 µL) reacciona la hormona marcada que compite con la hormona de la muestra, generando una coloración violeta. Para la lectura de P₄, la mezcla se dejó incubar por dos ciclos de 30 minutos.

La intensidad de la señal fue cuantificada con un luminómetro. Dicha intensidad es inversamente proporcional a la concentración de la hormona dentro de la muestra. La concentración de P₄ en suero fue expresada en ng/mL. Los valores de los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron de 5.96 y 7.55%, respectivamente.

Determinación de Testosterona y Estradiol

La cuantificación de testosterona y E₂ se realizó por la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), con un kit comercial. Se tomaron 25 µL del suero y fueron colocados en los pozos correspondientes en las placas de ELISA destinadas para evaluar cada hormona, el anticuerpo estaba pegado en el fondo del pozo de la placa.

Para cada evaluación se adicionaron de 100 a 200 µL de sus reactivos enzimáticos correspondientes, se agitaron e incubaron a temperatura ambiente resguardándolos de la luz. Una vez culminado el tiempo de incubación de las hormonas, se eliminó el líquido presente en los pozos de las placas por vaciado y posteriormente con un buffer se hicieron de tres a cuatro lavados. Luego, se adicionó a cada pozo 100 µL de la solución de sustrato y se incubaron de 15 a 30 minutos a temperatura ambiente, por último, se agregaron 100 µL de la solución de paro. La absorbancia de cada pozo se leyó a 450 nm con ayuda de un equipo lector de placas. La concentración sérica de ambas hormonas fue expresada en pg/mL. Los valores de los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron de 6.42 y 7.32% para la testosterona, y para E₂ de 6.4 y 8.8%.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media (eem). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad InStat3 Software, Inc (San Diego, CA, EE. UU.).

Los datos obtenidos se sometieron a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Los resultados del peso corporal y de los pesos relativos de los órganos, la edad de apertura vaginal, del primer estro vaginal, la concentración de hormonas esteroides en suero y la población folicular mostraron una distribución normal, por lo que fueron analizados por pruebas paramétricas. La comparación entre dos grupos se realizó por la prueba "t" de Student.

Los resultados del número de ovocitos liberados no mostraron una distribución normal, por lo que se analizaron por la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, utilizada para comparar dos grupos.

La tasa de animales ovulantes (número de animales que ovulan/número total de animales) se analizó por la prueba exacta de Fisher.

Se consideraron como diferencias estadísticamente significativas aquellas cuya probabilidad fuera menor o igual a 0.05 ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS

Efectos de la exposición intrauterina al VE en el día 16 de Gestación

Curso de la Preñez y Crías al Nacimiento

En ninguna de las ratas gestantes inyectadas con el **Vh** en el día 16 de gestación se presentaron reabsorciones, FR ni abortos. Todas las hembras grávidas parieron el DG 21 o 22, sin embargo, se observó que 2 de las 4 mamás tuvieron crías muertas, las cuales no presentaron alteraciones en su estructura (Cuadro 2).

Cuando se inyectó el **VE** en las hembras gestantes, en 14 de 17 de ellas la gestación se prolongó y no parieron, y a la autopsia 5 de 17 mamás tuvieron FR en ambos cuernos uterinos o en el canal cervical; 4 de 17 hembras presentaron reabsorciones y FR; 1 mamá de 17 tuvo reabsorciones, FR y 7 fetos pretérmino*; y 4 de 17 hembras gestantes presentaron sólo reabsorciones (Cuadro 2; Figura 22 A-C). Los FR mostraron malformaciones* en la parte craneal y caudal del cuerpo (Figura 22 D-F).

Por otra parte, sólo 3 de 17 mamás parieron en el DG 21 o 22, de las cuales: 1 tuvo crías muertas y FR; y las otras 2 ratas gestantes tuvieron crías que sobrevivieron hasta el PEV o etapa adulta (Cuadro 2).

Cabe destacar que, antes de parir, algunas hembras grávidas que fueron tratadas con el VE presentaron sangrado vaginal días previos al parto, se encontraron muy delgadas y con su pelo erizado.

***Fetos Pretérmino:** Feto expulsado del útero al medio extrauterino antes de alcanzar suficiente madurez (Botella y Clavero, 1993; Gibb y col., 2006).

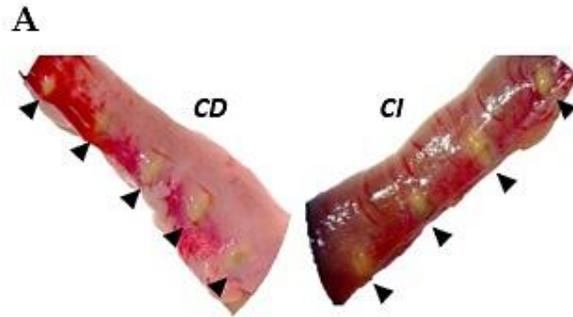
***Malformación:** Es un defecto estructural duradero que surge de un proceso de desarrollo intrínsecamente anormal que por lo general es incompatible con la supervivencia o que reduce notablemente la función posnatal (Bolon y Rousseaux, 2015).

Cuadro 2. Número de crías al nacimiento, de reabsorciones y fetos retenidos en el cuerno uterino izquierdo (CI), en el derecho (CD) o en el canal vaginal (CV) de ratas inyectadas en el día 16 de gestación con vehículo (Vh) o Valerato de estradiol (VE).

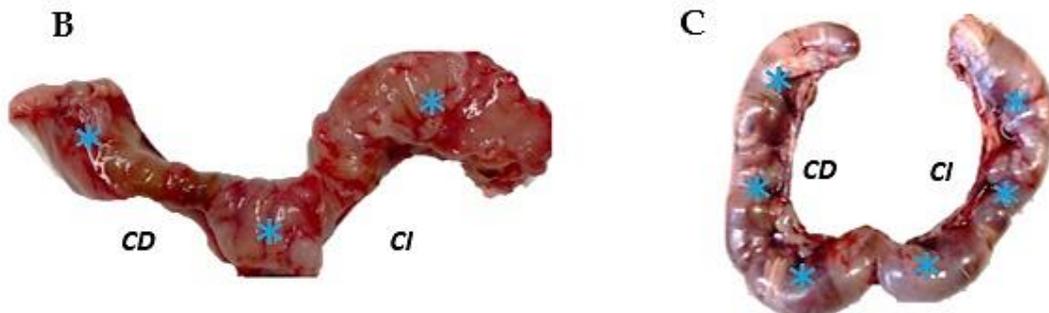
No. Mamá	Tratamiento prenatal	Día del parto	Curso de la Preñez					Crías al Nacimiento			Totales Nacidas Vivas
			Reabsorciones		Fetos Retenidos			Fetos Pretérmino	Crías Vivas	Crías Muertas	
			CI	CD	CI	CV	CD		♀/♂	♀/♂	
1	Vh	22	-	-	-	-	-	-	7/3	-	10
2		22	-	-	-	-	-	-	4/4	-	8
3		22	-	-	-	-	-	-	5/6	0/1	11
4		21	-	-	-	-	-	-	4/7	1/2	11
1	VE	X	-	-	3	-	2	-	-	-	-
2		X	-	-	5	-	8	-	-	-	-
3		X	-	-	8	-	5	-	-	-	-
4		X	-	-	3	-	3	-	-	-	-
5		X	-	-	1	1	1	-	-	-	-
6		X	4	3	1	-	1	-	-	-	-
7		X	3	4	1	-	-	-	-	-	-
8		X	7	6	-	1	-	-	-	-	-
9		X	3	6	-	1	1	-	-	-	-
10		X	7	2	-	-	1	7	-	-	-
11		X	8	7	-	-	-	-	-	-	-
12		X	3	2	-	-	-	-	-	-	-
13		X	-	6	-	-	-	-	-	-	-
14		X	-	6	-	-	-	-	-	-	-
15		21	-	-	4	-	3	-	-	2/0	-
16		22	-	-	-	-	-	-	4/5	-	9
17		21	-	-	-	-	-	-	7/7	-	14

X: mamás que debido a que no parieron el día 21 o 22 de gestación, fueron autopsiadas en la cámara de CO₂ para evitar su sufrimiento; - : indica que la rata gestante no tuvo ni reabsorciones, fetos retenidos, pretérmino o crías muertas.

Reabsorciones



Fetos Retenidos



Malformaciones de los fetos

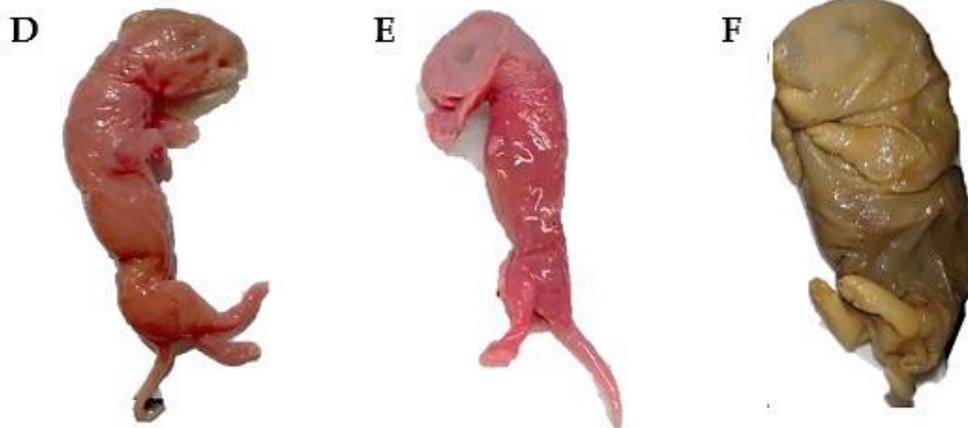


Figura 22. Efectos de la inyección del VE en ratas gestantes sobre las reabsorciones, retenciones y malformaciones fetales. Fotografías representativas de una porción de los cuernos uterinos derecho (CD) o izquierdo (CI) de ratas tratadas con VE en el día 16 de gestación, donde se señalan las reabsorciones fetales (cabeza de flecha) (A) y los fetos retenidos (asterisco) (B-C). Las fotografías D-F muestran las alteraciones en la región craneal y caudal del cuerpo de algunos de los fetos que quedaron retenidos en los cuernos uterinos.

Peso Corporal y Peso Relativo de los Órganos

Las hembras estrogenizadas *in útero* con VE y sacrificadas al PEV presentaron menor **masa adrenal y peso del útero** en comparación a su grupo control; mientras que las hembras sacrificadas en la etapa adulta mostraron aumento del **peso corporal**, sin cambios en el resto de los órganos analizados (Cuadro 3).

Cuadro 3. Media \pm eem del **peso corporal (g)** y de los **pesos relativos (mg/100 g)** de la masa ovárica, masa adrenal, el útero, bazo y el timo de las crías de ratas inyectadas en el día 16 de gestación con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) y que fueron sacrificadas al primer estro vaginal (PEV) o en la etapa adulta.

Tratamiento	Edad de Autopsia	n	Peso Corporal (g)	Masa Ovárica	Masa Adrenal	Peso del Útero	Peso del Bazo	Peso del Timo
Vh	PEV	10	131.0 \pm 2.4	30.8 \pm 2.5	40.3 \pm 3.9	163.6 \pm 5.8	284.5 \pm 14.2	261.8 \pm 10.3
VE		6	129.0 \pm 3.1	34.7 \pm 2.9	17.9 \pm 1.2*	139.3 \pm 8.8*	265.2 \pm 14.1	253.5 \pm 17.9
Vh	Etapa Adulta	10	206.1 \pm 1.9	31.1 \pm 1.5	28.3 \pm 1.2	145.7 \pm 4.9	222.6 \pm 9.8	157.2 \pm 7.3
VE		5	225.2 \pm 5.2*	28.6 \pm 1.7	26.2 \pm 1.8	161.6 \pm 11.7	214.8 \pm 16.7	146.2 \pm 5.6

* $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo Vh (Prueba "t" de Student).

Inicio de la Pubertad y Ciclo Estral

Los animales expuestos al VE en el día 16 de gestación mostraron un adelanto en la **edad de apertura vaginal** (flecha verde) respecto a su grupo control, sin cambios en la edad de aparición del **PEV** (punto rojo) (Figura 23).

Las **crías tratadas prenatalmente con Vh** mostraron ciclos estrales regulares; mientras que aquellas **tratadas in útero con el VE**, presentaron un patrón del ciclo estral irregular caracterizado por diestros continuos en la pubertad, sin embargo, en la etapa adulta el ciclo se regularizó (Figura 23).

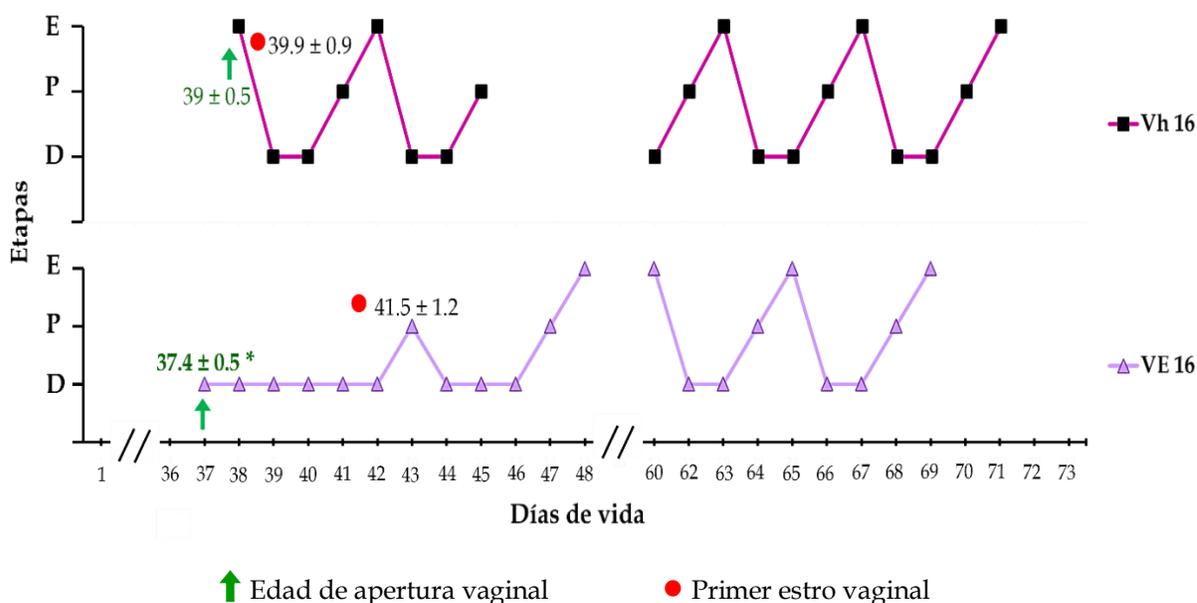


Figura 23. Patrón representativo del ciclo estral y la Media ± eem de la edad de Apertura Vaginal y del Primer Estro vaginal (días) de las crías de ratas inyectadas en el día 16 de gestación con vehículo (Vh, n=10 al PEV o etapa adulta) o valerato de estradiol (VE, n=6 o 5 al PEV o etapa adulta, respectivamente), y que fueron autopsiadas al primer estro vaginal o en la etapa adulta. E: estro; P: proestro; D: diestro. * $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo Vh (Prueba "t" de Student).

Respuesta Ovulatoria

Las crías de hembras tratadas durante la gestación con **Vh** o **VE** y sacrificadas al **PEV**, no mostraron diferencias en el **porcentaje de animales ovulantes** ni en el **número de ovocitos liberados** *totales* o por *ovario* (Figura 24).

Todas las crías tratadas prenatalmente con el Vh y sacrificadas en la etapa adulta ovularon; donde el *ovario derecho* tuvo un mayor **número de ovocitos liberados** en comparación al ovario izquierdo. En las crías tratadas durante la gestación con el **VE** y sacrificadas en la etapa adulta, el 100% de los animales ovuló y el **número de ovocitos liberados** por el *ovario derecho* fue menor en comparación a su respectivo grupo Vh (Figura 24).

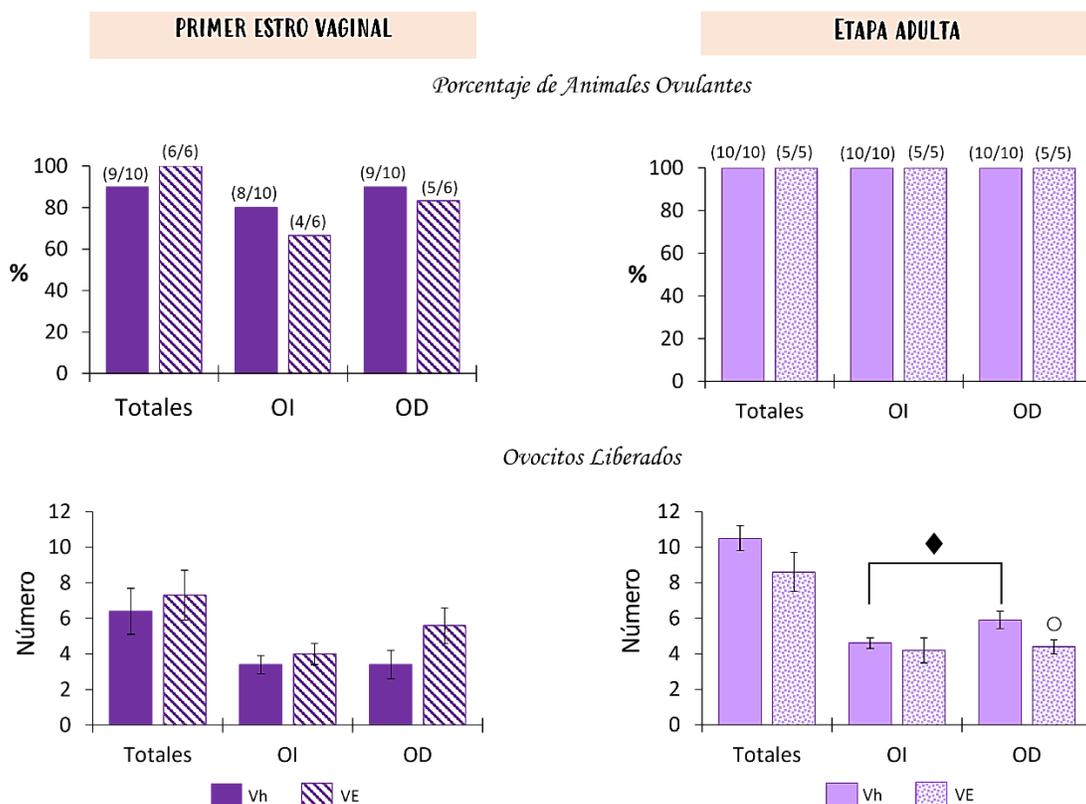


Figura 24. Porcentaje de animales ovulantes y media \pm eem del número de ovocitos liberados totales y por el ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) de las crías de ratas inyectadas en el día 16 de gestación con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), y que fueron sacrificadas al primer estro vaginal o en la etapa adulta. \blacklozenge $p < 0.05$ vs. OI; \circ $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo Vh OD (Prueba U de Mann-Whitney).

Histología Ovárica

Los ovarios de las **crías tratadas en el día 16 de gestación con el Vh y sacrificadas al PEV** fueron revisados al microscopio y se observó la presencia de folículos en todas las etapas del desarrollo, algunos de los cuales fueron atrésicos, además de que se observaron cuerpos lúteos y pocos prequistes (Figura 25). Mientras que en las **crías estrogenizadas prenatalmente con el VE y sacrificadas al PEV**, se observaron numerosos folículos atrésicos, algunos cuerpos lúteos, así como muchos prequistes y pocos quistes (Figura 25).

En los ovarios de las crías tratadas *in útero* con el Vh y sacrificadas en la etapa adulta se apreciaron varios cuerpos lúteos y folículos en todas las etapas del desarrollo, algunos de los cuales presentaron signos de atresia (Figura 25). Sin embargo, en las **crías tratadas prenatalmente con el VE y sacrificadas en la etapa adulta**, se observaron numerosos folículos atrésicos, cuerpos lúteos, y prequistes (Figura 25).

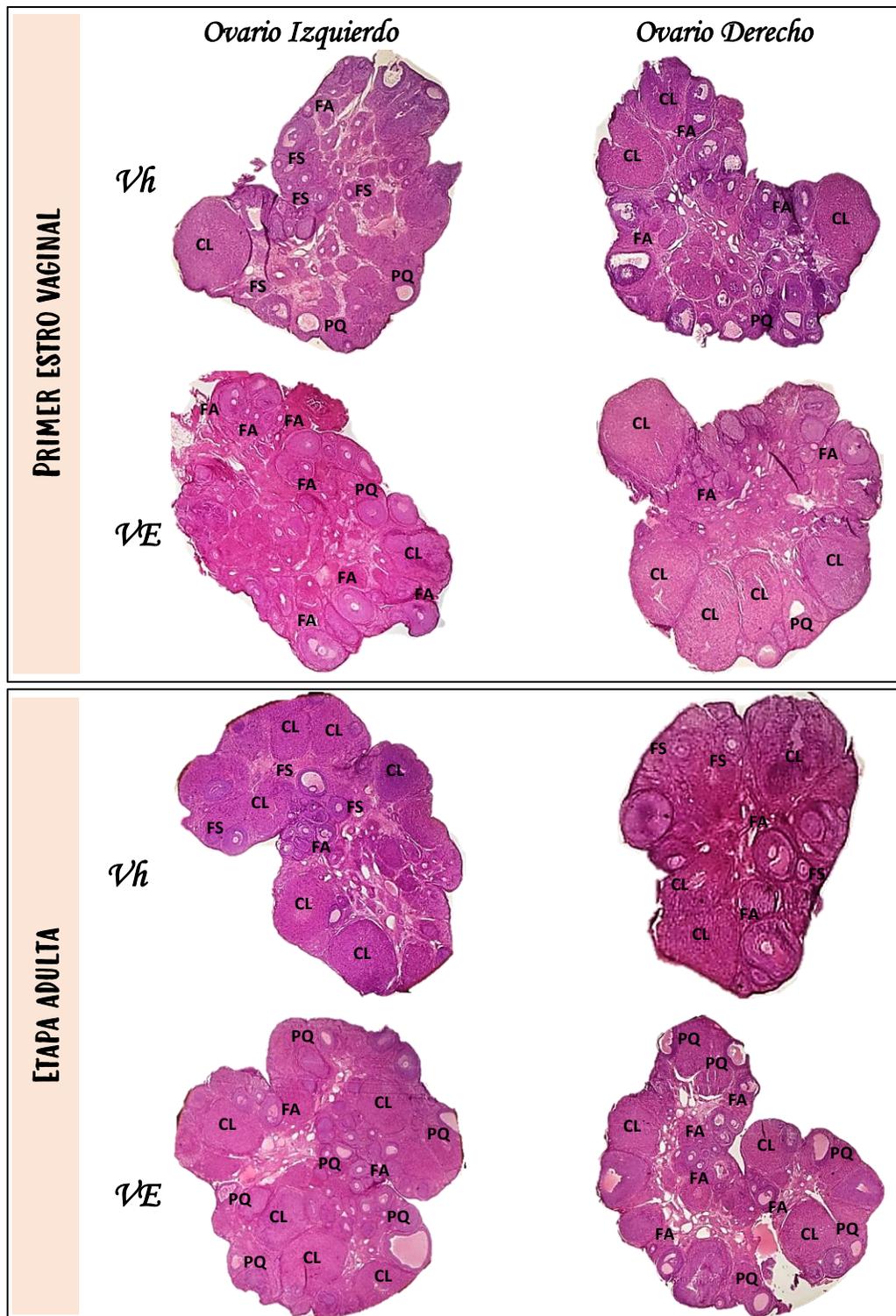


Figura 25. Micrografías representativas de la histología de los ovarios izquierdo y derecho de las crías de ratas inyectadas en el día 16 de gestación con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), y que fueron sacrificadas al primer estro vaginal (PEV) o en la etapa adulta. CL: cuerpo lúteo; FA: folículo atrésico; FS: folículo sano; PQ: prequiste. Tinción con la técnica de hematoxilina-eosina. Micrografías tomadas a 4x.

Hormonas Esteroideas

La concentración de P₄ en las crías tratadas prenatalmente con el VE y sacrificadas al PEV, fue mayor en comparación a su respectivo grupo control. No hubo cambios en las concentraciones de las hormonas cuando las ratas fueron sacrificadas a la etapa adulta (Cuadro 4).

Cuadro 4. Media ± eem de la concentración sérica de progesterona, testosterona y estradiol de las crías de ratas inyectadas en el día 16 de gestación con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), y que fueron sacrificadas al primer estro vaginal (PEV) o en la etapa adulta.

Tratamiento	Autopsia	HORMONAS		
		Progesterona (pg/mL)	Testosterona (ng/mL)	Estradiol (ng/mL)
Vh	PEV	4.0 ± 0.6	22.9 ± 0.1	251.6 ± 18.0
VE		9.7 ± 1.2*	22.9 ± 0.1	256.3 ± 11.7
Vh	Etapa Adulta	10.4 ± 2.4	0.4 ± 0.02	215.3 ± 29
VE		13.5 ± 1.6	0.4 ± 0.02	192.8 ± 28.7

* p<0.05 vs. su respectivo Vh (Prueba "t" de Student).

Resumen de Resultados

Efectos obtenidos en las crías hembra de ratas inyectadas en el día 16 de gestación con valerato de estradiol (VE), y que fueron sacrificadas al primer estro vaginal (PEV) o en la etapa adulta. Todas las comparaciones son *versus* su respectivo grupo Vh. ↑: aumento; ↓: disminución; =: sin cambios; % AO: porcentaje de animales ovulantes; OI: ovario izquierdo; OD: ovario derecho; P₄: progesterona; T: testosterona; E₂: estradiol.

Parámetros		Autopsia	
		PEV	Etapa Adulta
<i>Peso Corporal</i>		=	↑
<i>Peso de Órganos</i>	<i>Masa Ovárica</i>	=	=
	<i>Masa Adrenal</i>	↓	=
	<i>Peso del Útero</i>	↓	=
	<i>Peso del Bazo</i>	=	=
	<i>Peso del Timo</i>	=	=
<i>Edad de Apertura Vaginal</i>		Adelanto	
<i>Primer Estro Vaginal</i>		=	
<i>Ciclo Estral</i>		Irregular	Regular
% AO	<i>Totales</i>	=	=
	<i>OI</i>	=	=
	<i>OD</i>	=	=
<i>Ovocitos Liberados</i>	<i>Totales</i>	=	=
	<i>OI</i>	=	=
	<i>OD</i>	=	↓
<i>Hormonas Esteroides</i>	<i>P₄</i>	↑	=
	<i>T</i>	=	=
	<i>E₂</i>	=	=
<i>Histología Ovárica</i>	<i>Cuerpos Lúteos</i>	Algunos	Varios
	<i>Folículos Atrésicos</i>	Muchos	Muchos
	<i>Prequistes</i>	Muchos	Muchos
	<i>Quistes</i>	Pocos	Pocos

Efectos de la exposición intrauterina al VE en el día 18 de Gestación

Curso de la Preñez y Crías al Nacimiento

En las ratas inyectadas con el **Vh**, el parto ocurrió el día 21 o 22 de gestación. No hubo reabsorciones ni FR en los cuernos uterinos; sin embargo, murieron algunas de las crías de una mamá (Cuadro 5).

Las ratas tratadas con **VE** parieron el día 21 o 22 de gestación. Más del 50% de las mamás (5 de 7) tuvieron crías muertas al nacimiento o su muerte se produjo en los días posteriores al mismo (Cuadro 5). 2 de 7 hembras cometieron *canibalismo*. Sólo 1 de 7 hembras presentó cuatro reabsorciones en el cuerno uterino izquierdo y tres FR en el cuerno uterino derecho (Cuadro 5, Figura 26A), uno de los cuales se encontró cerca del cérvix, y los dos restantes en la porción más próxima al ovario (Figura 26 A). Los FR mostraron malformaciones en la parte craneal y caudal del cuerpo (Figura 26 B-E).

Además, 3 de 7 mamás tratadas con VE, tras parir, se encontraron muy delgadas, con su pelo erizado y se observó que se aislaron de las crías, dejándolas solas, sin alimentarlas; posteriormente estas mamás murieron, razón por la cual sus crías se colocaron con una mamá nodriza.

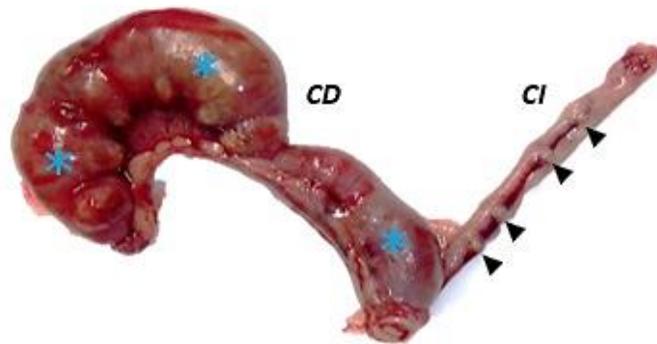
Cuadro 5. Número de crías al nacimiento, de reabsorciones y fetos retenidos en el cuerno uterino izquierdo (CI), en el derecho (CD) o en el canal vaginal (CV) de ratas inyectadas en el día 18 de gestación con vehículo (Vh) o Valerato de estradiol (VE).

No. Mamá	Tratamiento prenatal	Día del parto	Curso de la Preñez						Crías al Nacimiento		
			Reabsorciones		Fetos Retenidos			Fetos Pretérmino	Crías Vivas	Crías Muertas	Totales Nacidas Vivas
			CI	CD	CI	CV	CD		♀/♂	♀/♂	
1	Vh	22	-	-	-	-	-	-	6/6	-	12
2		21	-	-	-	-	-	-	5/6	-	11
3		22	-	-	-	-	-	-	4/5	-	9
4		21	-	-	-	-	-	-	4/4	3/0	8
5		21	-	-	-	-	-	-	3/12	-	15
1	VE	22	-	-	-	-	-	-	4/6	-	10
2		22 ♪	-	-	-	-	-	-	4/7	0/1	12
3		22	-	-	-	-	-	-	7/6	-	13
4		21 ♪	-	-	-	-	-	-	6/1	5/1	7
5		21 ♣	-	-	-	-	-	-	0/0	3/5	0
6		21 ♣	-	-	-	-	-	-	0/2	2/3	2
7		21 ♣	4	-	-	-	3	-	2/3	3/2	5

♣: mamás que parieron y días posteriores murieron. ♪: ratas que cometieron canibalismo - : indica que la rata gestante no tuvo ni reabsorciones, fetos retenidos, pretérmino o crías muertas.

Retenciones y reabsorciones fetales

A



Malformaciones de los fetos

B



C



D



E

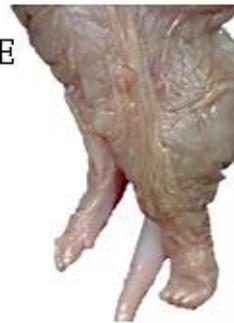


Figura 26. Efectos de la inyección del VE en ratas gestantes sobre las reabsorciones, retenciones y malformaciones fetales. (A) Fotografía representativa del útero de ratas tratadas con VE en el día 18 de gestación, donde se señalan con asterisco los fetos retenidos en el cuerno uterino derecho (CD), y con cabeza de flecha, las reabsorciones fetales presentes en el cuerno uterino izquierdo (CI). Las fotografías B-C muestran las alteraciones en la región craneal, y D-E en la región caudal del cuerpo de algunos de los fetos que quedaron retenidos en los cuernos uterinos.

Peso Corporal y Peso Relativo de los Órganos

En comparación a su grupo Vh, el **peso corporal** y **del útero** de las hembras estrogenizadas prenatalmente con VE y sacrificadas al PEV, fue menor; mientras que el **peso del bazo** aumentó (Cuadro 6). Las crías que fueron sacrificadas en la etapa adulta presentaron un aumento del **peso corporal** respecto a su grupo control; mientras que **la masa adrenal, el peso del útero y del timo** disminuyó (Cuadro 6).

Cuadro 6. Media \pm eem del **peso corporal (g)** y de los **pesos relativos (mg/100 g)** de la masa ovárica, masa adrenal, el útero, bazo y el timo de las crías de ratas inyectadas en el día 18 de gestación con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) y que fueron sacrificadas al primer estro vaginal (PEV) o en la etapa adulta.

<i>Tratamiento</i>	<i>Edad de Autopsia</i>	<i>n</i>	<i>Peso Corporal (g)</i>	<i>Masa Ovárica</i>	<i>Masa Adrenal</i>	<i>Peso del Útero</i>	<i>Peso del Bazo</i>	<i>Peso del Timo</i>
Vh	PEV	11	130.4 \pm 4.0	26.1 \pm 1.7	22.8 \pm 0.9	134.0 \pm 4.9	255.9 \pm 5.6	271.7 \pm 11
VE		11	104.2 \pm 2.4*	26.4 \pm 1.5	21.0 \pm 0.9	109.5 \pm 8.5*	297.3 \pm 11.1*	279.9 \pm 11.7
Vh	Etapa Adulta	11	201.0 \pm 2.9	27.1 \pm 0.7	26.7 \pm 1.1	155.7 \pm 7.0	228.3 \pm 4.9	171.4 \pm 12
VE		12	235.8 \pm 6.5*	29.7 \pm 1.6	21.1 \pm 1.2*	113.3 \pm 10.4*	217.5 \pm 7.2	135.2 \pm 11.4*

* $p < 0.05$ vs. Vh (Prueba "t" de Student).

Inicio de la Pubertad y Ciclo Estral

Los animales tratados prenatalmente con VE en el día 18 de gestación mostraron adelanto en la **edad de apertura vaginal** (flecha verde) respecto a su grupo Vh, sin cambios en la edad de aparición del **PEV** (punto rojo) (Figura 27).

Las crías tratadas prenatalmente con el Vh mostraron un patrón normal del ciclo estral tanto en la pubertad como en la etapa adulta; sin embargo, aquellas **hembras estrogenizadas prenatalmente con el fármaco** presentaron a la pubertad y etapa adulta alteración en el patrón del ciclo estral, caracterizado por diestros continuos (Figura 27).

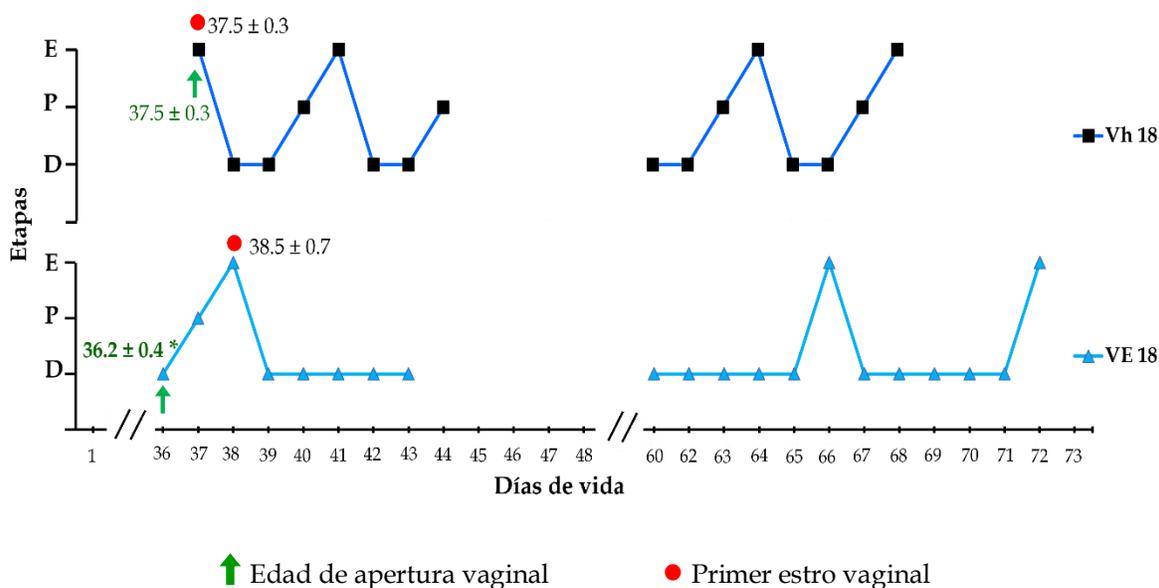


Figura 27. Patrón representativo del ciclo estral y la Media \pm eem de la edad de Apertura Vaginal y del Primer Estro vaginal (días) de las crías de ratas inyectadas en el día 18 de gestación con vehículo (Vh, n=11 al PEV o etapa adulta) o valerato de estradiol (VE, n=11 o 12 al PEV o etapa adulta, respectivamente), y que fueron autopsiadas al primer estro vaginal o en la etapa adulta. E: estro; P: proestro; D: diestro. * $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo Vh (Prueba "t" de Student).

Respuesta Ovulatoria

Todas las hembras tratadas prenatalmente con el **Vh y sacrificadas al PEV** ovularon, sin embargo, mostraron un menor **número de ovocitos liberados** por el ovario derecho respecto al izquierdo (Figura 28). En las hembras estrogenizadas *in útero* con **VE y sacrificadas al PEV**, el **porcentaje de animales ovulantes totales** disminuyó más del 50% respecto al Vh; donde solo el 20% de los animales ovuló por el *ovario izquierdo* (2 de 11), con una cuota ovulatoria de 1 y 4 **ovocitos**, respectivamente; mientras que por el *ovario derecho*, se observó una menor respuesta ovulatoria que solo llegó a ser estadísticamente significativa para el **número de ovocitos liberados** (Figura 28).

En las hembras tratadas prenatalmente con Vh y sacrificadas en la etapa adulta, el 100% de los animales ovuló, donde el *ovario derecho* liberó un mayor **número de ovocitos** que el izquierdo (Figura 28). Las **crías expuestas in útero al VE y sacrificadas en la etapa adulta** mostraron una disminución de más del 80% **de los animales ovulantes totales** respecto a su grupo Vh; de los cuales hubo un bloqueo total de la ovulación por parte del *ovario izquierdo*; y por el *ovario derecho*, sólo 2 animales ovularon 1 ovocito cada uno (Figura 28).

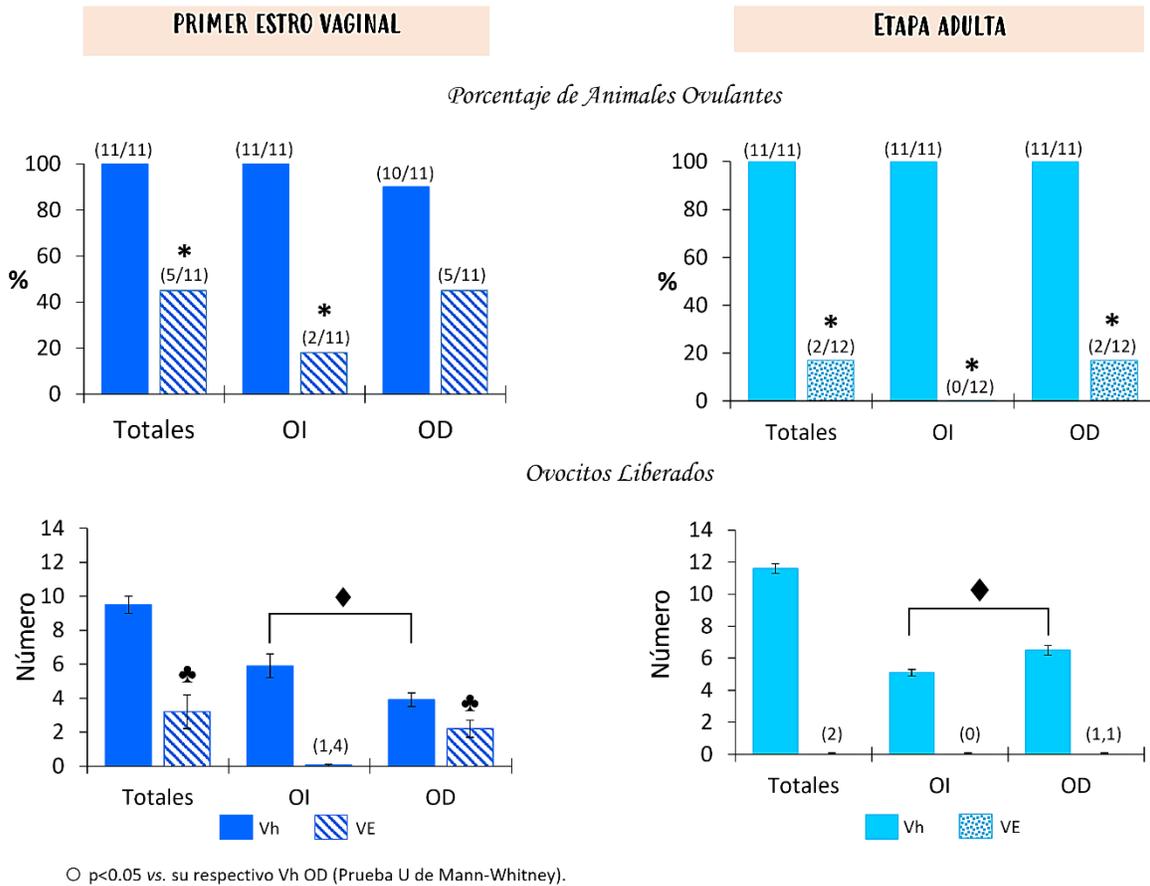


Figura 28. Porcentaje de animales ovulantes y Media ± eem del número de ovocitos liberados totales y por el ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) de las crías de ratas inyectadas en el día 18 de gestación con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), y que fueron sacrificadas al primer estro vaginal o en la etapa adulta. * p<0.05 vs. su respectivo grupo Vh (Prueba de Fisher). ♣ p<0.05 vs. su respectivo grupo Vh; ♦ p<0.05 vs. OI (Prueba U de Mann Whitney).

Histología Ovárica y Dinámica del Desarrollo Folicular

El análisis histológico de los ovarios izquierdo y derecho de **las crías tratadas prenatalmente con el Vh o el VE y sacrificadas al PEV**, reveló la presencia de varios folículos atrésicos y algunos prequistes. Solo en los ovarios de las crías expuestas prenatalmente al Vh se observaron también algunos CL (Figura 29).

Por otra parte, en el ovario izquierdo y derecho de **las crías tratadas con el Vh y autopsiadas en la etapa adulta**, se observaron varios folículos sanos, cuerpos lúteos, y algunos folículos atrésicos; sin embargo, en **las crías tratadas prenatalmente con el fármaco** hubo mayor presencia de folículos atrésicos, prequistes y quistes, así como algunos cuerpos lúteos (Figura 29).

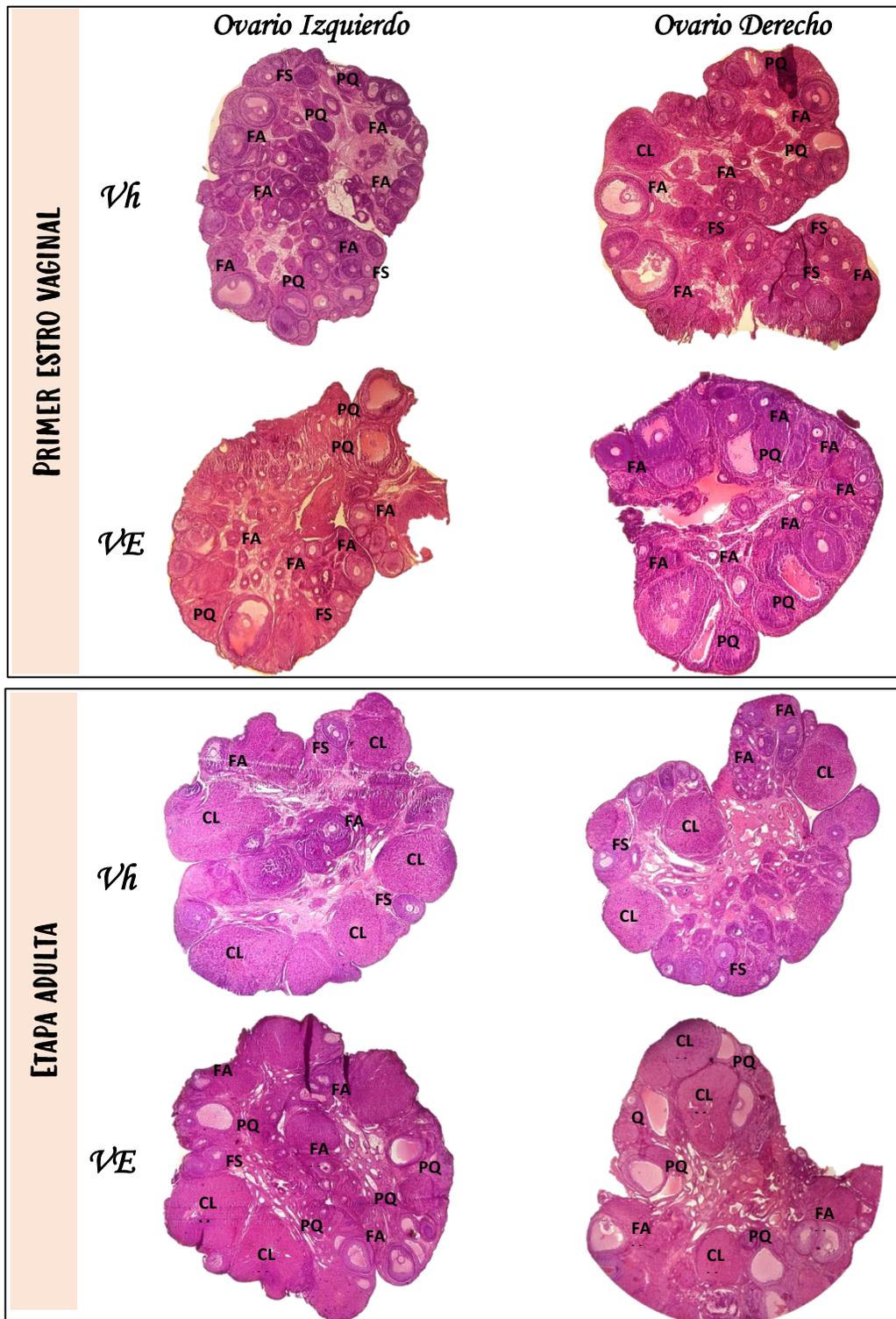


Figura 29. Micrografías representativas de la histología de los ovarios izquierdo y derecho de las crías de ratas inyectadas en el día 18 de gestación con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), y que fueron sacrificadas al primer estro vaginal (PEV) o en la etapa adulta. CL: cuerpo lúteo; FA: folículo atrésico; FS: folículo sano; PQ: prequiste; Q: quiste. Tinción con la técnica de hematoxilina-eosina. Micrografías tomadas a 4x.

El *ovario derecho* de **las crías tratadas in útero con Vh y sacrificadas al PEV** mostró un mayor número de folículos sanos que el *ovario izquierdo*. En comparación a sus respectivos grupos Vh, **las crías tratadas in útero con VE y sacrificadas al PEV** presentaron en el ovario izquierdo aumento del número de folículos totales; por parte del ovario derecho un menor número de folículos sanos, mientras que en ambos ovarios se observó un mayor número de folículos atrésicos y prequistes (Cuadro 7).

En las **crías expuestas prenatalmente con Vh y sacrificadas a la etapa adulta** no hubo diferencias en su población folicular entre el ovario izquierdo y derecho. Sin embargo, en aquellas que fueron expuestas al **VE** se observó que en ambos ovarios hubo un menor número de folículos sanos e incrementó el número de prequistes en comparación a sus respectivos grupos Vh (Cuadro 7).

En los grupos de ratas **tratadas in útero con VE y sacrificadas al PEV o en la etapa adulta** se desarrollaron muy pocos quistes (Cuadro 7).

Cuadro 7. Media \pm eem del número de folículos totales, sanos, atrésicos, prequistes y quistes presentes en el ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) de las crías de ratas inyectadas en el día 18 de gestación con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), y que fueron sacrificadas al primer estro vaginal (PEV) o en la etapa adulta.

Tratamiento	Autopsia	Número de Folículos				
		Totales	Sanos	Atrésicos	Prequistes	Quistes
Vh	OI	92.3 \pm 8.9	39.0 \pm 5.9	52.7 \pm 9.2	2.0 \pm 0.0	
	OD	117.7 \pm 21.3	71.3 \pm 13.3 ♪	45.3 \pm 14.6	1.0 \pm 0.6	
VE	OI	134.0 \pm 15.2 ♪	42.3 \pm 10.8	87.7 \pm 9.6 ♪	4.0 \pm 1.5 ♪	
	OD	128.7 \pm 10.8	34.7 \pm 4.3*	90.0 \pm 7.2*	3.7 \pm 0.3*	1.0 \pm 0.0
Vh	OI	110.5 \pm 20.5	79.8 \pm 22.5	29.0 \pm 7.8	1.8 \pm 1.4	
	OD	104.0 \pm 8.4	64.3 \pm 7.2	39.0 \pm 14.9	0.7 \pm 0.3	
VE	OI	89.8 \pm 21.5	28.0 \pm 11.8 ♪	49.0 \pm 12.9	10.8 \pm 3.1 ♪	2.0 \pm 1.7
	OD	96.3 \pm 18.7	30.8 \pm 7.8*	59.3 \pm 11.9	5.5 \pm 2.4*	0.8 \pm 0.5

♪ p<0.05 vs. su respectivo Vh OI; * p<0.05 vs. su respectivo Vh OD (Prueba t de Student).

El *ovario derecho* de **las crías tratadas con Vh y sacrificadas al PEV** presentó un mayor número de folículos sanos pequeños respecto a su *ovario izquierdo*; mientras que las tratadas con VE presentaron un menor número en comparación al grupo Vh (Cuadro 8).

En **las crías tratadas con Vh y autopsiadas en la etapa adulta** se observó un número similar de folículos pequeños, medianos y grandes en ambos ovarios; mientras que las **crías expuestas al VE** presentaron una menor población de folículos sanos pequeños en ambos ovarios respecto al grupo Vh y de folículos sanos medianos en el *ovario izquierdo* (Cuadro 8).

Cuadro 8. Media \pm eem del número de folículos sanos clasificados como pequeños, medianos o grandes, presentes en el ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) de las crías de ratas inyectadas en el día 18 de gestación con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), y que fueron sacrificadas al primer estro vaginal (PEV) o en la etapa adulta.

Tratamiento	Autopsia	Número de Folículos Sanos		
		Pequeños 90-390 μ m	Medianos 391-500 μ m	Grandes >501 μ m
Vh	OI	39.0 \pm 5.9	0	0
	OD	69.3 \pm 13.9 [♯]	1.3 \pm 0.9	0.7 \pm 0.3
<i>PEV</i>				
VE	OI	42.3 \pm 10.8	0	0
	OD	34.3 \pm 4.5*	0.3 \pm 0.3	0
<i>Etapa Adulta</i>				
Vh	OI	77.0 \pm 21.7	1.5 \pm 0.3	1.3 \pm 0.8
	OD	61.3 \pm 5.7	2.3 \pm 1.5	0.7 \pm 0.7
VE	OI	27.5 \pm 11.7 [♯]	0.5 \pm 0.3 [♯]	0
	OD	30.3 \pm 8.1*	0.5 \pm 0.3	0

♯ p<0.05 vs. su respectivo Vh OI; * p<0.05 vs. su respectivo Vh OD (Prueba t de Student).

Las crías tratadas con VE y autopsiadas al PEV mostraron un mayor número de folículos atrésicos pequeños en *ambos ovarios* en comparación a sus respectivos grupos Vh (Cuadro 9).

Cuadro 9. Media \pm eem del número de folículos atrésicos clasificados como pequeños, medianos y grandes presentes en el ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) de las crías de ratas inyectadas en el día 18 de gestación con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), y que fueron sacrificadas al primer estro vaginal (PEV) o en la etapa adulta.

Tratamiento	Autopsia	Número de Folículos Atrésicos		
		Pequeños 90-390 μ m	Medianos 391-500 μ m	Grandes >501 μ m
Vh	OI	45.3 \pm 10.5	5.3 \pm 2.4	2.0 \pm 2.0
	OD	39.7 \pm 13.3	3.0 \pm 2.1	2.7 \pm 2.2
<i>PEV</i>				
VE	OI	84.3 \pm 9.2[♯]	2.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.9
	OD	84.0 \pm 10.4*	3.7 \pm 1.2	2.3 \pm 2.3
<i>Etapa Adulta</i>				
Vh	OI	24.3 \pm 8.5	2.8 \pm 1.2	2.0 \pm 0.9
	OD	34.7 \pm 14.5	4.0 \pm 1.7	0.3 \pm 0.3
VE	OI	45.5 \pm 13.3	1.5 \pm 1.0	2.0 \pm 0.4
	OD	54.3 \pm 13.2	2.8 \pm 1.6	2.3 \pm 1.0

♯ p<0.05 vs. su respectivo Vh OI; * p<0.05 vs. su respectivo Vh OD (Prueba t de Student).

Hormonas Esteroideas

En comparación a su respectivo grupo Vh, la concentración de **testosterona** disminuyó en las crías tratadas prenatalmente con el VE y autopsiadas al PEV; mientras que las hembras sacrificadas en la etapa adulta presentaron bajas concentraciones de P₄ (Cuadro 10).

Cuadro 10. Media ± eem de la concentración sérica de la progesterona, testosterona y estradiol de las crías de ratas inyectadas en el día 18 de gestación con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE), y que fueron sacrificadas al primer estro vaginal (PEV) o en la etapa adulta.

Tratamiento	Autopsia	HORMONAS		
		Progesterona (pg/mL)	Testosterona (ng/mL)	Estradiol (ng/mL)
Vh	PEV	7.3 ± 0.9	23.0 ± 0.02	234.8 ± 12.8
VE		8.3 ± 1.1	0.3 ± 0.03*	199.5 ± 46.2
Vh	Etapa Adulta	10.1 ± 0.9	0.5 ± 0.04	201.7 ± 15.4
VE		5.6 ± 0.5*	0.6 ± 0.05	211.6 ± 19.2

* p<0.05 vs. su respectivo Vh (Prueba t de Student).

Resumen de Resultados

Efectos obtenidos en las crías hembra de ratas inyectadas en el día 18 de gestación con valerato de estradiol (VE), y que fueron sacrificadas al primer estro vaginal (PEV) o en la etapa adulta. Todas las comparaciones son *versus* su respectivo grupo Vh. ↑: aumento; ↓: disminución; =: sin cambios; % AO: porcentaje de animales ovulantes; OI: ovario izquierdo; OD: ovario derecho; P₄: progesterona; T: testosterona; E₂: estradiol.

Parámetros		Autopsia		
		PEV	Etapa Adulta	
<i>Peso Corporal</i>		↓	↑	
<i>Peso de Órganos</i>	<i>Masa Ovárica</i>	=	=	
	<i>Masa Adrenal</i>	=	↓	
	<i>Peso del Útero</i>	↓	↓	
	<i>Peso del Bazo</i>	↑	=	
	<i>Peso del Timo</i>	=	↓	
<i>Edad de Apertura Vaginal</i>		Adelanto		
<i>Primer Estro Vaginal</i>		=		
<i>Ciclo Estral</i>		Irregular	Irregular	
% AO	<i>Totales</i>	↓	↓	
	<i>OI</i>	↓	Bloqueo	
	<i>OD</i>	=	↓	
<i>Ovocitos Liberados</i>	<i>Totales</i>	↓	↓	
	<i>OI</i>	↓	Bloqueo	
	<i>OD</i>	↓	↓	
<i>Hormonas Esteroides</i>	<i>P₄</i>	=	↓	
	<i>T</i>	↓	=	
	<i>E₂</i>	=	=	
<i>No. de Folículos</i>	<i>Totales</i>		↑	=
	<i>Sanos</i>	<i>OI</i>	=	↓
		<i>OD</i>	↓	↓
	<i>Atrésicos</i>	<i>OI</i>	↑	=
		<i>OD</i>	↑	=
	<i>Prequistes</i>	<i>OI</i>	↑	↑
<i>OD</i>		↑	=	

	<i>Quistes</i>	<i>OI</i>	=	=
		<i>OD</i>	=	=
<i>Folículos Sanos</i>	<i>Pequeños</i>	<i>OI</i>	=	↓
		<i>OD</i>	↓	↓
	<i>Medianos</i>	<i>OI</i>	=	↓
		<i>OD</i>	=	=
	<i>Grandes</i>	<i>OI</i>	=	=
		<i>OD</i>	=	=
<i>Folículos Atrésicos</i>	<i>Pequeños</i>	<i>OI</i>	↑	=
		<i>OD</i>	↑	=
	<i>Medianos</i>	<i>OI</i>	=	=
		<i>OD</i>	=	=
	<i>Grandes</i>	<i>OI</i>	=	=
		<i>OD</i>	=	=

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que la administración de VE a ratas en el día 16 de preñez induce efectos tóxicos tanto en la madre como en los fetos, sin llevar al desarrollo de las características del SOPQ en las crías a la pubertad ni etapa adulta (Figura 30). Mientras que la estrogenización en el día 18 de gestación resulta en las crías hembras en el desarrollo de algunas de las características que van a definir el Síndrome del Ovario Poliquístico, las cuales se hacen más evidentes conforme avanza la edad del animal (Figura 31).

En teratología, la toxicidad materna se define como cualquier tipo de efecto adverso sobre la madre. Algunos criterios de valoración son la disminución de la ganancia del peso corporal, la alteración de la duración del período de gestación, además pueden reconocerse signos clínicos adversos como un comportamiento agresivo o aletargado, aparición del pelo, diarrea, vómito, convulsiones, sangrado vaginal y muerte (Rands y col., 1982; White y col., 1983; Danielsson, 2013). Por otra parte, los efectos tóxicos de un compuesto se manifiestan en el feto con anomalías estructurales, retraso en el crecimiento o la muerte (Sebastian y Borjeson, 2020). En el presente estudio se observó que en ambas edades gestacionales donde se administró el VE, las hembras gestantes mostraron una disminución del peso corporal (**DG 16:** $V_h = 340 \pm 4.0$ g vs. $VE = 299 \pm 9.4$ g; **DG 18:** $V_h = 422 \pm 9.8$ g vs. $VE = 392 \pm 17.2$ g; prueba t de Student, $p < 0.05$; datos de hembras en el DG 20); pelo erizado, sangrado vaginal días previos al parto y algunas cometieron canibalismo. Por otra parte, a diferencia de las hembras tratadas en el DG 18 con el VE, aquellas del DG 16 presentaron duración prolongada de la gestación (de hasta 7 días), lo cual se acompañó de una mayor presencia de **reabsorciones y retenciones fetales en el útero**. Los fetos retenidos mostraron **malformaciones estructurales**.

Sugerimos que a diferencia del día 18 gestacional, el día 16 representa una ventana de mayor susceptibilidad a la acción del VE, donde el estrógeno es capaz de inducir toxicidad materna y fetal, actuar como un teratógeno y provocar una mayor mortalidad fetal. Esto se apoya en trabajos previos realizados en ratas, ratones y monos rhesus hembra donde se ha mostrado que altas dosis de compuestos con actividad estrogénica (estradiol, dietilestilbestrol, 3,4,3',4'-tetraclorobifenilo, bisfenol A, caproato de hidroxiprogesterona combinada con VE, miroestrol) durante el desarrollo intrauterino afecta el curso normal de la gestación y el desarrollo embrionario y fetal. Estos estudios también muestran que los efectos obtenidos dependen del momento en que tiene lugar la exposición a los estrógenos, de la duración del tratamiento, de la dosis empleada, e incluso la cepa o especie utilizada (Jones y col., 1961; Boylan, 1978; McLachlan y col., 1982; White y col., 1983; Sarkar y col., 1986; Hendrickx y col., 1987; Zimmerman y col., 1991; Bartholomeusz y col., 1999).

El hecho de que las hembras estrogenizadas en el DG 18 hayan tenido menor número de fetos retenidos con malformaciones, en comparación con las tratadas en el DG 16 puede deberse a que la susceptibilidad a la teratogénesis disminuye a medida que avanza la diferenciación y la organogénesis, que en la rata, este período comprende del DG 6 u 8 al 18, momento en que el embrión se compone de dos o tres capas germinales hasta el cierre del paladar duro (Wilson, 1977; Fleeman y col., 2005; Sebastian y Borjeson, 2020).

El período de gestación más largo que se observó en nuestras ratas inyectadas al día 16 de gestación es similar a la descrita por Zimmerman y colaboradores (1991) quienes mostraron que en ratas tratadas con DES entre los días 6 al 18 de gestación aumenta la duración de la gestación, que de acuerdo con los autores se debe a una alteración en la relación de progesterona/estrógeno, clave para iniciar el trabajo de parto.

Las crías tratadas *in útero* con VE en el DG 18 y autopsiadas a la pubertad, mostraron un bajo **peso corporal**, mientras que en la etapa adulta, tanto las crías tratadas en el DG 16 o 18, presentaron aumento del peso corporal. Cabe destacar que tras la administración del VE a las ratas gestantes, éstas mostraron un bajo peso corporal y un aparente estado de desnutrición. Es posible que esta condición en la madre redujera de manera importante los nutrientes hacia los fetos, causándoles alteraciones en su desarrollo durante la vida postnatal. Woodall y colaboradores (1996) mostraron que las crías de las madres con alimentación restringida presentan una disminución del peso corporal, lo cual fue atribuido a un reducido suministro de alimento al feto. Otra posibilidad es que en los animales expuestos al VE durante la vida intrauterina haya disminuido la concentración del IGF-I, que se ha descrito, participa en la regulación del crecimiento fetal y responde rápidamente a los cambios en la nutrición del feto (Baker y col., 1993).

El **útero** expresa receptores de estrógenos α (ER α), esenciales para la proliferación del epitelio uterino; y ER β que se han asociado con una función antiproliferativa (Schönfelder y col., 2004; Zama y Uzumcu, 2010). Nuestros resultados muestran que independientemente del día de exposición *in útero* al VE, las crías a la pubertad presentaron un menor **peso del útero**, efecto similar se observó en la etapa adulta cuando las crías fueron expuestas prenatalmente al VE en el DG 18. Sugerimos que aún ante las elevadas concentraciones de estrógenos a las que fueron expuestos los animales durante su desarrollo prenatal, la disminución del peso del útero podría deberse a una menor expresión y/o afinidad de los ER α . Schönfelder y colaboradores (2004) reportaron que en ratas grávidas, el tratamiento por sonda con bisfenol A (BPA) en los DG 6-21, resultó en las crías hembra adultas en una disminución del grosor del epitelio uterino, lo que se acompañó, controversialmente, de una mayor expresión del ER α y disminución de los ER β , razón por la cual, los autores atribuyeron este efecto a una desregulación en la expresión de ambos receptores. Una segunda explicación a este resultado podría

estar relacionada con los genes Hox, en específico el gen Hoxa10 y 11, los cuales están implicados en la proliferación y diferenciación de células uterinas. Un estudio mostró que ratas neonatalmente expuestas a DES o BPA, presentan en la etapa infantil una reducción de la expresión del ARNm de Hoxa10 y Hoxa11 (Varayoud y col., 2008).

En el presente estudio se observó que independientemente del día de exposición *in útero* con VE, todas las crías presentaron un **adelanto en la edad de la apertura vaginal**, similar a lo descrito en la literatura cuando las ratas fueron tratadas en la etapa neonata (Cruz y col., 2012) o infantil (Rosa-E-Silva y col., 2003; Rosas, 2006; Morales-Ledesma y col., 2010). En la rata, la única señal externa que indica que la pubertad ha iniciado es la canalización de la vagina (Ojeda y Skinner, 2006). Algunos autores proponen que el inicio de la pubertad se produce en respuesta a la alta concentración de los estrógenos (Levy y col., 1995; Ojeda y Skinner, 2006) y otros sugieren que se debe a los andrógenos (Zarrow y col., 1969; Iwasa y col., 2015). Dado que en este estudio la concentración de estradiol no se encontró modificada y la testosterona estaba disminuida al momento de la autopsia (pubertad), sugerimos que el adelanto en la edad de apertura vaginal pudiera deberse a las elevadas concentraciones de estrógenos a las que fueron expuestos prenatalmente los animales al momento de la inyección del estrógeno en la madre que sensibilizaron la membrana vaginal. No podemos descartar que hayan aumentado estas hormonas previo a la canalización de la vagina.

Otra posibilidad es que la pubertad en las crías de ratas tratadas con VE sea el resultado de alguna alteración a nivel hipotalámico. El inicio de la pubertad ocurre con la reactivación de las neuronas que secretan GnRH (Clarkson y col., 2009; Mayer y col., 2010). Se ha descrito que dicho evento no sólo está controlado por la disminución de la sensibilidad de las neuronas GnRHérgicas a la retroalimentación negativa de los estrógenos (Cui y col., 2015), sino que además es regulado por neuropéptidos como la kisspeptina, que estimula la secreción de la GnRH (Clarkson

y col., 2009; Herbison, 2016; Xie y col., 2022). Dado que en roedores la población de neuronas *Kiss* se origina durante el desarrollo embrio-fetal y ya expresan receptores a estrógenos α (DG 11.5-12.5) (Desroziere y col., 2012; Kumar y col., 2014), sugerimos que el tratamiento prenatal con VE ocasionó una alteración en la función de dichas neuronas lo que condujo a un adelanto en el inicio de la pubertad. En apoyo a esta interpretación se ha mostrado que en ratas tratadas con etinilestradiol o zearalenona, una micotoxina estrogénica, incrementa la expresión del ARNm de kisspeptina en el núcleo arqueado y la densidad de las fibras de kisspeptina (Kriszt y col., 2015; Yang y col., 2016). El grupo de Yang (2016) propuso un mecanismo mediante el cual se activa de manera prematura la vía de señalización hipotalámica kisspeptina-GPR54 (receptor de la kisspeptina)-GnRH, lo cual estimula la liberación de gonadotropinas a una edad más temprana, lo que resulta en el adelanto de la canalización vaginal.

Las crías tratadas al DG 16 con el Vh o el VE no mostraron cambios significativos en la **respuesta ovulatoria**. El 90% de las crías tratadas al DG 16 con el Vh presentaron una respuesta ovulatoria normal al inicio de la pubertad, respuesta similar se observó en las crías expuestas al VE. Mientras que, en las crías expuestas al VE en el DG 18, la capacidad ovulatoria fue menor al 50%. La falta de ovulación podría atribuirse a la influencia de la testosterona. Existen reportes que muestran que la inyección de VE aumenta la concentración de andrógenos (Rosa-E-Silva y col., 2003; Morales-Ledesma y col., 2010; Venegas y col., 2019), mientras que otros no reportan cambios (Hemmings y col., 1983; Rosas, 2006); y en ambos casos, los animales no ovulan. En las crías tratadas *in útero* con VE en el día 16, la concentración de testosterona fue similar a un grupo Vh, y ovularon de manera normal. Mientras que en aquellas estrogénizadas en el DG 18, la concentración de testosterona al primer estro vaginal fue menor y la cuota ovulatoria fue baja, e incluso se llegó a un bloqueo de la ovulación cuando los animales llegaron a la etapa adulta.

Otra posible explicación a la falta de ovulación en los animales tratados al DG 18 con VE y sacrificados hasta la etapa adulta pudiera ser la hiperactividad nerviosa. Se ha reportado que 30 días después de la administración del VE, aumenta la expresión ovárica del NGF y de su receptor p75, lo que conlleva a una mayor concentración de la NA ovárica y una disminución de la concentración de las gonadotropinas; estos eventos resultan en la alteración de la dinámica del desarrollo folicular y en consecuencia la falta de ovulación (Lara y col., 1993; 2000; Stener-Victorin y col., 2000; Rosa-E-Silva y col., 2003; Sotomayor-Zárate y col., 2008; Morales-Ledesma y col., 2010).

El hecho de que a los 18 DG se observe una mayor repercusión del VE sobre la **respuesta ovulatoria** (tanto a la pubertad como en la etapa adulta) que en las crías estrogenizadas en el DG 16, podría deberse a que al momento de realizar la inyección en el DG 16, la inervación simpática aún no haya comenzado su desarrollo, y probablemente por ello, el VE no provoque una alteración significativa sobre la capacidad ovulatoria. Mientras que en las crías tratadas con el VE en el DG 18 es posible que ya se encuentren fibras de naturaleza catecolaminérgica y que la exposición prenatal al estrógeno haya incrementado la actividad de los nervios simpáticos, resultando en una condición anovulatoria similar a la descrita en el SOPQ (Lara y col., 1993; 2000; Rosa-E-Silva y col., 2003).

Estas sugerencias se apoyan en el trabajo de McKey y colaboradores (2019), quienes mostraron que en el ratón, las proyecciones neurales derivadas de células de la cresta neural (estructura de donde deriva el sistema nervioso periférico) ingresan al mesonefros dorsal de embriones hembras en el DG 15. Posteriormente, la inervación invade el interior (la cara dorsal) del ovario en el DG 16, y a partir del DG 18, se forma una densa red neuronal dentro de la médula ovárica en desarrollo.

Además, el grupo de De Champlain y colaboradores (1970), que trabajó con fetos de rata a partir de los 17 DG, reportó un rápido desarrollo del sistema nervioso

simpático durante la primera mitad de la tercera semana de gestación. En ovarios fetales de rata de 19 DG se observan fibras de naturaleza catecolaminérgica, evidenciado por la presencia de fibras inmunorreactivas a la TH (Malamed y col., 1992); y para el DG 21 ya se encuentran fibras de nervios de NPY dentro del tejido conectivo periférico al ovario fetal de rata (Allen y col., 1989).

De acuerdo con nuestros hallazgos sugerimos que los efectos de los estrógenos sobre la inervación ovárica y por ende, sobre la capacidad ovulatoria, van a depender del día gestacional en que éstos son administrados, lo cual sugiere la existencia de una ventana de mayor vulnerabilidad de estas fibras al efecto del VE, siendo el DG 18 donde la afectación es más evidente.

En el presente trabajo se observó en las crías de hembras tratadas con el Vh en el DG 16 o 18, que la respuesta ovulatoria *es asimétrica* y varía en función de la edad del animal. Tales asimetrías funcionales entre los ovarios derecho e izquierdo se han relacionado con la inervación que reciben (Domínguez y Cruz-Morales, 2011). Klein y Burden (1988) reportaron que el ovario derecho posee un mayor número de fibras simpáticas que se proyectan desde el GCMS a través del NOS y del NPO. Mientras que el grupo de Tóth (2007) informó que en comparación al ovario derecho, el izquierdo posee un predominio de la inervación supraespinal.

La administración de VE a ratas gestantes en el día 16 ocasionó aumento de la concentración de **progesterona** en las crías autopsiadas a la pubertad. Dado que en estos animales la ovulación no se modificó, es posible que la actividad de la 3β -HSD haya incrementado. Esta idea se apoya en el hecho de que en los animales tratados con VE incrementa la actividad de esta enzima en el tejido estromal y en la pared folicular del ovario (Rosa-E-Silva y col., 2003).

Las crías sacrificadas en la etapa adulta provenientes de ratas gestantes tratadas con el VE en el DG 18, presentaron una disminución en la concentración de la

progesterona, este efecto podría deberse a que en estos animales la capacidad ovulatoria disminuyó considerablemente, lo cual se acompañó de una menor presencia de cuerpos lúteos.

Se ha descrito que alrededor del 75 al 95% de las mujeres con el SOPQ presentan aumento de la concentración de la testosterona (hiperandrogenemia) (Witchel y col., 2019; Waldman y Legro, 2019; Stener-Victorin y Deng, 2021). En el presente estudio, aquellas crías púberes provenientes de ratas estrogenizadas en el día 18 de gestación, mostraron una disminución de la concentración de la **testosterona**. Sugerimos que este resultado pudiera estar asociado con las diferentes edades de los animales en las que el fármaco fue administrado. Los reportes experimentales donde se ha utilizado al VE muestran resultados controversiales, ya que algunos han informado que tras la administración del estrógeno a ratas infantiles (de 10 o 14 días de edad) se incrementa la concentración de andrógenos (Rosa-E-Silva y col., 2003; Rosas, 2006; Morales-Ledesma y col., 2010; Venegas y col., 2019), mientras que otros reportan su disminución cuando lo inyectan en la etapa neonatal (12 horas o 1 día de vida) o adulta (Stener-Victorin y col., 2005; Sotomayor-Zárate y col., 2008; Cruz y col., 2012).

Se ha descrito que los ovarios de las mujeres con SOPQ carecen de folículos preovulatorios dominantes y contienen muchos folículos antrales pequeños, lo que indica que presentan una falla en la maduración folicular (Lara y col., 1993).

Las crías púberes que fueron tratadas prenatalmente con VE en el día 18, mostraron un mayor número de **folículos totales**, este efecto podría explicarse por el hecho de que la población de folículos atrésicos y de prequistes aumentó considerablemente en estos animales.

La FSH estimula el crecimiento del folículo ovárico y actúa como un factor antiatretogénico (Kaipia y Hsueh, 1997). El grupo de Brawer (1986) mostró que la administración de VE ocasiona la disminución de la FSH lo que se acompaña de una reducción en el número de folículos sanos. Este evento podría explicar por qué las

crías estrogenizadas con VE en el DG 18 presentaron disminución del número de **folículos sanos** pequeños (90-390 μm), tanto a la pubertad como en la etapa adulta.

En las crías sacrificadas a la pubertad, la disminución de los folículos sanos se acompañó del incremento en la **atresia**. Descartamos que este efecto se deba a los andrógenos, que actúan como un factor atretogénico (Kaipia y Hsueh, 1997), ya que estos no incrementaron. Por lo anterior, sugerimos que la alteración en la población folicular observada en estos animales se debe a la disminución de factores antiatretogénicos. Sotomayor-Zárate y colaboradores (2008), reportaron que la inyección de VE a ratas neonatas ocasionó un descenso de la Δ_4 -androstenediona y a pesar de ello la atresia aumentó, lo que lo atribuyeron a la disminución del NGF. Asimismo, el grupo de Brawer (1986) mostró una disminución de la FSH tras la administración de VE y el consecuente aumento de folículos atrésicos.

Se ha reportado que la administración del VE induce el desarrollo del SOPQ y en el ovario se aprecian estructuras prequísticas y quistes foliculares (Brawer y col., 1986; Lara y col., 1993, 2000; Rosa-E-Silva y col., 2003). En el caso de las crías tratadas *in útero* con VE en el día 18 presentaron un mayor número de **prequistes foliculares** cuando los animales fueron sacrificados en la etapa adulta. Es posible que este efecto esté mediado por la activación de las fibras simpáticas, evento que precede a la formación de los quistes, tal y como se ha descrito previamente (Hemmings y col., 1983; Lara y col., 1993, 2000; Stener-Victorin y col., 2000; Sotomayor-Zárate y col., 2008). Estos resultados podrían ser, en parte, la explicación a la falta de ovulación en estos animales.

En nuestros animales no se observó la formación de **quistes foliculares**, aun cuando se ha señalado que 56 días después de la administración del VE los quistes ya son visibles en el ovario de la rata (Brawer y col., 1978, 1986). A pesar de no haber quistes, estas hembras presentaron bloqueo en la ovulación. Probablemente este bloqueo se

mantenga ya que cuentan con una gran cantidad de prequistes, que en algún momento van a diferenciarse en quistes.

La administración de VE a ratas de diferentes edades induce la interrupción del **ciclo estral**, con la aparición de estros o diestros continuos, esto como resultado de la alta concentración de E₂ en plasma (Brawer y col., 1978; Farookhi y col., 1985; Brawer y col., 1986; Rosa-E-Silva y col., 2003; Rosas, 2006; Navarrete, 2014).

En el presente estudio, el tratamiento prenatal con VE ocasionó en las crías períodos de **diestros continuos**; sin embargo, sólo en aquellas tratadas en el DG 16 y autopsiadas en la etapa adulta, el ciclo estral se regularizó. Es posible que los andrógenos sean responsables de la alteración del patrón del ciclo estral. Se ha descrito que en ratas, el tratamiento pre y posnatal con DHT (un andrógeno no aromatizable) altera el ciclo estral caracterizado por varios días en diestro, aun cuando en los animales no se modifica la concentración de testosterona (Mannerås y col., 2007; Osuka y col., 2017), tal como ocurrió en este estudio. No descartamos que el propio ovario sintetice un factor que cause esta aciclicidad. Esta interpretación se apoya en el hecho de que en ratas con SOPQ, la hemiovariectomía restablece el ciclo estral (Farookhi y col., 1985).

El hecho de que el patrón del ciclo estral se restaura solamente en aquellos animales estrogenizados en el DG 16 sugiere la existencia de una ventana de vulnerabilidad prenatal, en la cual, las alteraciones reproductivas inducidas por el tratamiento con VE son reversibles o irreversibles y que esto depende del momento de la exposición, tal y como se ha mostrado que ocurre con tratamientos posnatales (Cruz y col., 2012).

Tomados en conjunto, los resultados del presente estudio muestran que el tratamiento prenatal con VE a ratas gestantes en el DG 18 resulta en la vida posnatal de las crías, en el desarrollo de algunas de las características que definen la fisiopatología del SOPQ, esto como resultado de la posible activación de las fibras nerviosas simpáticas que inervan al ovario (Figura 31), sin descartar los cambios provocados a nivel del eje HHO.

MODELOS

Modelo 1

La administración de VE a ratas en el día 16 de gestación, ocasionó efectos tóxicos en la mayoría de las madres como en su descendencia. El número de muertes fetales durante el curso de la preñez aumentó, mientras que las crías que nacieron mostraron a la pubertad alteraciones reproductivas, manifestadas con una mayor concentración de P_4 , modificación del patrón del ciclo estral, adelanto de la canalización vaginal, mientras que en la etapa adulta dichas alteraciones reproductivas no persistieron. Este DG representa una ventana de mayor vulnerabilidad al efecto del VE como un tóxico y teratógeno y no conduce al desarrollo del SOPQ en la vida posnatal de la descendencia (Figura 30).

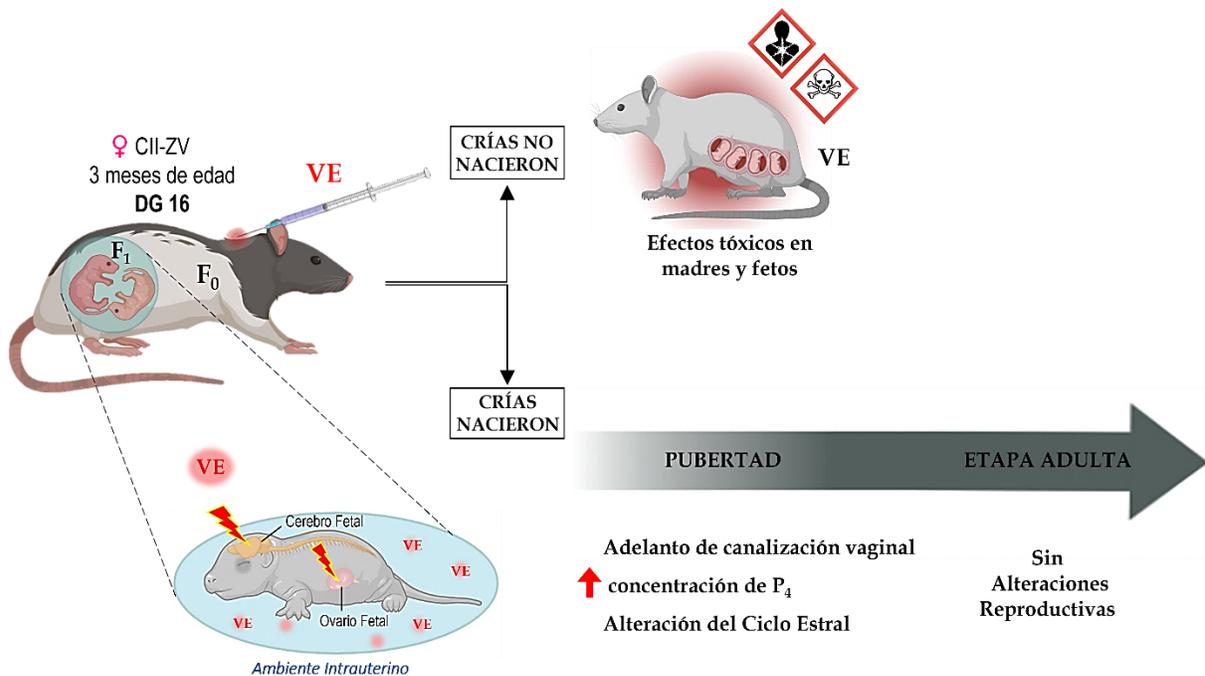


Figura 30. Esquema que muestra los efectos de la inyección del VE en ratas en el día 16 de gestación sobre las madres gestantes, así como en las crías hembras autopsiadas a la pubertad o en la etapa adulta. CII-ZV: cepa de los animales; DG: día de gestación/gestacional; F₀: rata gestante; F₁: su descendencia de primera generación; VE: valerato de estradiol; ☠: indica que los productos con este pictograma pueden perjudicar determinados órganos, se consideran cancerígenos y provocan defectos genéticos si se manipulan durante el embarazo; ☠: indica toxicidad/muerte; HHO: eje hipotálamo hipófisis ovarios; P₄: progesterona.

Modelo 2

En comparación a las madres gestantes y sus fetos tratados en el DG 16, **la inyección de VE a ratas grávidas en el día 18**, provocó efectos tóxicos menos drásticos en ellas y sus fetos. Por otra parte, las crías que sobrevivieron mostraron a **la pubertad** disminución de la cuota ovulatoria y de la concentración de testosterona, adelanto de la apertura vaginal, la alteración del ciclo estral y aumento de la población de folículos atrésicos y prequistes. Mientras que cuando **las crías alcanzaron la etapa adulta** presentaron bloqueo de la ovulación, el ciclo estral persiste alterado y la población de prequistes aumentó un poco más que en la pubertad.

Sugerimos que, posiblemente en este día gestacional ya haya presencia de fibras catecolaminérgicas, las cuales estén implicadas en la aparición de estos efectos. En la literatura se ha descrito que el desarrollo de la inervación simpática es un proceso que se lleva a cabo antes del nacimiento del animal. Además, el día en que se administró el VE en este estudio es muy cercano con el día en el que el grupo de Malamed (1992) reportó presencia de estas fibras en el ovario de rata (DG 19). Con base en lo anterior, es posible que el VE disponible en el entorno intrauterino haya hiperactivado esas fibras NAérgicas (como se ha mostrado previamente por Lara y colaboradores, 2000) y en consecuencia, los animales en la vida posnatal desarrollen algunas de las características que definirán al SOPQ (Figura 31).

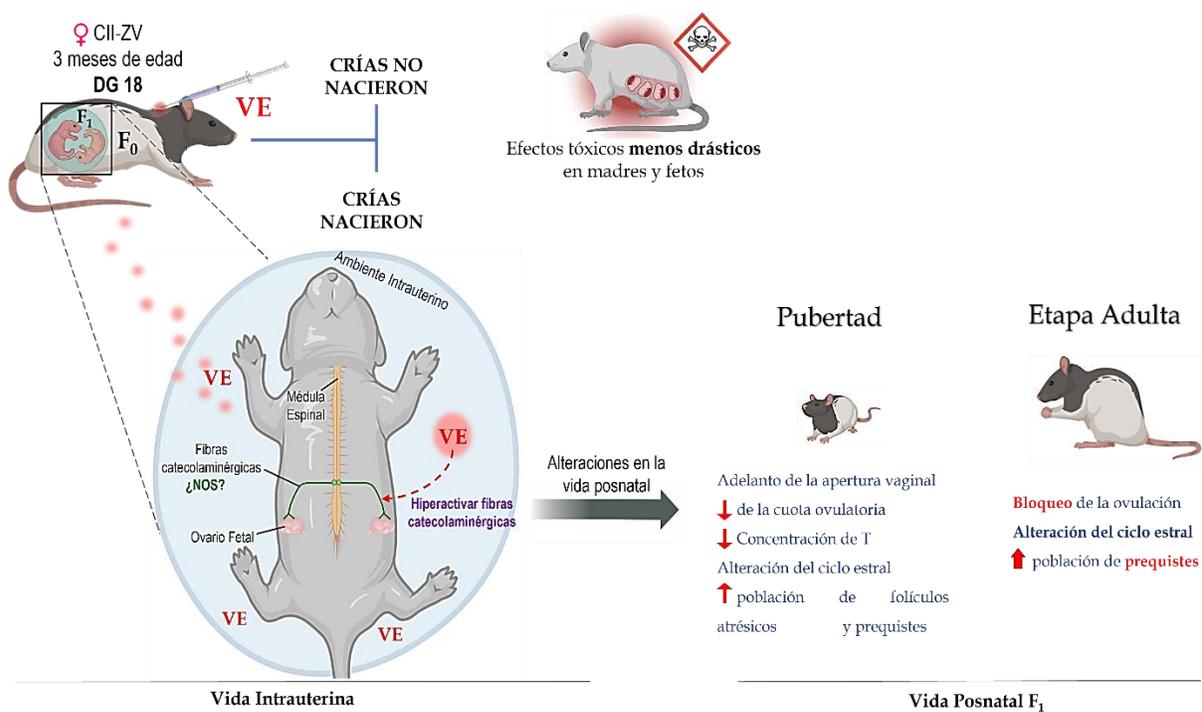


Figura 31. Esquema que muestra los efectos de la inyección del VE en ratas en el día 18 de gestación sobre las crías hembras autopsiadas al primer estro vaginal (PEV) o en la etapa adulta. CII-ZV: cepa de los animales; DG: día de gestación/gestacional; F₀: rata gestante; F₁: su descendencia de primera generación; VE: valerato de estradiol; ☠: indica toxicidad/muerte; NOS: nervio ovárico superior; T: testosterona.

CONCLUSIONES

- ∅ El presente estudio apoya la hipótesis de que el entorno intrauterino adverso puede reprogramar en la descendencia, los tejidos u órganos en diferenciación ocasionando alteraciones reproductivas funcionales en la vida posnatal, y que esto podría promover el desarrollo del SOPQ.
- ∅ Existe una ventana de vulnerabilidad prenatal en la cual las alteraciones reproductivas inducidas por el VE son reversibles o irreversibles, y que dependen del día gestacional en que tiene lugar la exposición.
- ∅ La inyección única con 2 mg de VE a ratas grávidas en el DG 16 ocasiona toxicidad materna y fetal; así como malformaciones o muerte fetal. Además, en este DG, el tratamiento no conduce en la vida posnatal de las crías al desarrollo de la fisiopatología del SOPQ.
- ∅ La exposición prenatal de las crías al VE en el día 18 de gestación resulta en la etapa adulta, en el bloqueo de la capacidad ovulatoria y la aparición de estructuras prequísticas, que son algunas de las características que van a definir al SOPQ.

PERSPECTIVAS

Con base en los resultados del presente estudio se propone:

- Realizar la cuantificación de la concentración de hormonas esteroideas en las ratas gestantes antes y después de la inyección del VE, e incluso en un día cercano al parto, esto con el fin de observar cómo se altera la homeostasis del medio intrauterino y poder dar una mejor explicación de los eventos que están reprogramando la función reproductiva en la descendencia, o en su caso, dilucidar porqué algunas ratas grávidas presentaron retenciones fetales.
- Analizar si el tratamiento prenatal con VE en el DG 18 es capaz de inducir todas las características de la fisiopatología del SOPQ. Para ello, se propone dejar evolucionar a las crías hasta los 90 días de vida, esto con la finalidad de observar si se forman quistes foliculares y si esto se acompaña de una condición hiperandrogénica.
- Con el fin de apoyar o rechazar la hipótesis de si las alteraciones de la función reproductiva inducidas en las crías por el tratamiento con VE en el DG 18 y autopsiadas en la etapa adulta son el resultado de la hiperactividad de las fibras simpáticas, se pretende analizar en estos animales los efectos de la sección uni o bilateral del NOS.
- En el día 19 de gestación, se ha reportado la presencia de fibras de naturaleza catecolaminérgica en los ovarios de rata fetal, con base en esto, sugerimos administrar el VE a ratas grávidas en este DG y evaluar si el estrógeno hiperactiva dichas fibras e induce el desarrollo de la fisiopatología en la vida posnatal de las crías.

REFERENCIAS

- ⊗ Abbott DH, Barnett DK, Bruns CM, Dumesic DA. (2005) Androgen Excess Fetal Programming of Female Reproduction: A Developmental Aetiology for Polycystic Ovary Syndrome. *Human Reproduction Update*. 11(4): 357-374.
- ⊗ Abbott DH, Dumesic DA, Levine JE, Dunaif A, Padmanabhan V. (2007). Animal Models and Fetal Programming of the Polycystic Ovary Syndrome. En: Azziz R, Nestler JE, Dewailly D. (Eds.) *Androgen Excess Disorders in Women: Polycystic Ovary Syndrome and Other Disorders*. 2ª edición. Humana Press. Totowa, NJ. Cap. 23. pp: 259-272.
- ⊗ Abbott DH, Padmanabhan V, Dumesic DA. (2006) Contributions of Androgen and Estrogen to Fetal Programming of Ovarian Dysfunction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 4(1), 17.
- ⊗ Aguado LL, Ojeda SR. (1984) Ovarian Adrenergic Nerves Play a Role In Maintaining Preovulatory Steroid Secretion. *Endocrinology*. 114(5):1944-1946.
- ⊗ Allen LG, Wilson FJ, Macdonald GJ. (1989) Neuropeptide Y-Containing Nerves in rat Gonads: Sex Difference and Development. *Biology of Reproduction*. 40: 371-378.
- ⊗ Andrews WW, Ojeda SR. (1981) A Detailed Analysis of the Serum Luteinizing Hormone Secretory Profile in Conscious, Free-Moving Female Rats During the Time of Puberty. *Endocrinology*. 109(6): 2032-2039.
- ⊗ Arteaga SM, García MI. (2017) Gametogénesis. Formación del Espermatozoide y del Ovocito. En: Arteaga SM, García MI. (Eds.) *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*. 2ª edición. Editorial Médica Panamericana. Ciudad de México. Cap. 4. pp: 33-54.
- ⊗ Asselin E, Xiao CW, Wang YF, Tsang BK. (2000) Mammalian Follicular Development and Atresia: Role of Apoptosis. *Biol Signals Recept*. 9:87-95.
- ⊗ Azziz R. (2006) Controversy in Clinical endocrinology. Diagnosis of Polycystic Ovarian Syndrome: The Rotterdam Criteria are Premature. *The Journal of Clinical endocrinology & metabolism*. 91(3): 781-785.
- ⊗ Azziz R. (2018) Polycystic Ovary Syndrome. *Reproductive Endocrinology and Fertility: Clinical Expert Series*. 132(2):321-336.
- ⊗ Baker DJP, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. (1993) Fetal Nutrition and Cardiovascular Disease in Adult Life. *The Lancet*. 341: 938- 941.
- ⊗ Baldani DP, Skrgatic L, Ougouag R. (2015) Polycystic Ovary Syndrome: Important Underrecognized Cardiometabolic Risk Factor in Reproductive-age Women. *International Journal of Endocrinology*. 1-17.
- ⊗ Barber TM, Franks S. (2013) Genetics of Polycystic Ovary Syndrome. *Front Horm Res*. 40: 28-39.
- ⊗ Barber TM, Franks S. (2019) Genetic and Environmental Factors in the Etiology of Polycystic Ovary Syndrome. En: Leung PCK, Adashi EY (Eds.) *The Ovary*. 3ª edición. Academic Press. Reino Unido. Cap. 27. pp: 437-459.
- ⊗ 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: 2696-2701.
- ⊗ Barrios de Tomasi J, Aguirre A, Aguirre F. (2012) Desarrollo Folicular en el Ovario. *Rev Sal Quintana Roo*, 12-18.
- ⊗ Bartholomeusz RK, Bruce NW, Lynch AM. (1999) Embryo Survival, and Fetal and Placental Growth Following Elevation of Maternal Estradiol Blood Concentrations in the Rat. *Biology of Reproduction*. 61: 46-50.
- ⊗ Baskind NE, Balen AH. (2016) Hypothalamic-pituitary, ovarian and adrenal contributions to polycystic ovary syndrome. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 37: 80-97.

- ⊗ Basuino L, Silveira CF. (2016) Human Follicular Fluid and Effects on Reproduction. *JBRA Assist. Reprod.* 20(1): 38-41.
- ⊗ Bazer Fw. (1999) Maintenance of Pregnancy. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) *Encyclopedia of Reproduction*. Editorial Academic Press. San Diego, California. EUA. Volumen 3. pp: 1002-1006.
- ⊗ Beaudoin AR. (1980) Embriology and Teratology. En: Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH. (Eds.) *The Laboratory Rat*. Academic Press, New York. Vol. 2. pp 75-101.
- ⊗ Beaumont HM, Mandl AM. (1962) A Quantitative and Cytological Study of Oogonia and Oocytes in the Foetal and Neonatal Rat. *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 155(961): 557-579.
- ⊗ Becú-Villalobos D, Lacau-Mengido M. (1990) Control Hormonal del Desarrollo Puberal en la Rata Hembra. *Acta Physiology Pharmacology Latinoamerican.* 40: 1-17.
- ⊗ Bolon B, Rousseaux CG. (2015) Essential Terminology for Mouse Developmental Pathology Studies. En: Bolon B. (Ed.) *Pathology of the Developing Mouse. A Systematic Approach*. CRC Press. Cap. 3. pp: 27-38.
- ⊗ Borum K. (1961) Oogenesis in the Mouse. A Study of the Meiotic Prophase. *Exp. Cell Res.* 24(3): 495-507.
- ⊗ Botella J, Clavero JA. (1993) Parto Pretérmino y Embarazo Postérmino. En: Botella J, Clavero JA. (Eds.). *Tratado de Ginecología*. 14ª edición. Ediciones Días de Santos. Madrid. Cap. 34. pp. 431-442.
- ⊗ Bowen-Shauver JM, Gibori G. (2004) The Corpus Luteum of Pregnancy. En: Leung PCK, Adashi EY. (Eds.) *The Ovary*. 2ª edición. Elsevier. USA. Cap 12. pp:201-230.
- ⊗ Boylan ES. (1978) Morphological and Functional Consequences of Prenatal Exposure to Diethylstilbestrol in the Rat. *Biology of Reproduction.* 19: 854-863.
- ⊗ Brawer JR, Munoz M, Farookhi R. (1986) Development of the Polycystic Ovarian Condition (PCO) in the Estradiol Valerate-Treated Rat. *J Reprod. Fert.* 59: 267-272.
- ⊗ Brawer JR, Naftolin F, Martin J, Sonnenscheins C. (1978) Effects of a single Injection of Estradiol Valerate on the Hypothalamic Arcuate Nucleus and on Reproductive Function in the Female Rat. *Endocrinology.* 103(2):501-512.
- ⊗ Bremer AA. (2010) Polycystic Ovary Syndrome in the Pediatric Population. *Metabolic Syndrome and Related Disorders.* 8(5): 375-394.
- ⊗ Bulun SE, Adashi EY. (2009) Fisiología y Patología del Eje Reproductor Femenino. En: Kronenberg H, Melmed S, Polonsky K, Reed P. (Eds.) *Williams Tratado de Endocrinología*. Elsevier. 11ª edición. Cap. 16. pp. 549-622.
- ⊗ Burden HW, Leonard M, Smith CP, Lawrence Jr. IE. (1983) The Sensory Innervation of the Ovary: a Horseradish Peroxidase Study in the Rat. *The Anatomical record.* 207(4): 623-627.
- ⊗ Caravaca FP, Castel JM, Guzmán JL, Delgado M, Mena Y, Alcalde MJ, González P. (2005) Anatomía y Fisiología de los Aparatos Reproductores Femenino y Masculino. En: *Bases de la Producción Animal*. Servicio de publicaciones Universidad de Cordoba. Cap. 3. pp: 57-78.
- ⊗ Carlson BM (2014a) Preparación para el Embarazo. En: Carlson (Eds.) *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*. 5ª edición. Elsevier. Barcelona. España. Cap. 1. pp. 2-23.
- ⊗ Carlson BM (2014b). Transporte de los Gametos y Fecundación. En: Carlson (Eds.) *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*. 5ª edición. Elsevier. Barcelona. España. Cap. 2. pp. 24-36.
- ⊗ Castro ME. (1999) Cambios en la Maduración y Crecimiento del Folículo Ovárico, Secreción de Gonadotropinas, Esteroides Ováricos y Monoaminas Hipotalámicas Durante el Desarrollo Prepuberal en la Rata. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. FES Zaragoza.
- ⊗ Chaudhari N, Dawalbhakta M, Nampoothiri L. (2018) GnRH dysregulation in polycystic ovarian syndrome (PCOS) is a manifestation of an altered neurotransmitter profile. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1):1-13.
- ⊗ Chedrese J. (2003) Regulación Autócrina y Paracrina del Desarrollo Folicular I: Efecto de los Esteroides. *Revista colombiana de Ciencias Pecuarias.* 16(2): 171-182

- ⊗ Clarkson J, Boon WC, Simpson ER, Herbison AE. (2009) Postnatal Development of an Estradiol-Kisspeptin Positive Feedback Mechanism implicated in Puberty Onset. *Neuroendocrinology*. 150(7):3214-3220.
- ⊗ Colledge WH. (2004) GPR54 and Puberty. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 15(9):448-453.
- ⊗ Concha F, Sir-Petermann T, Recabarren SE, Pérez F. (2017) Epigenética del Síndrome de Ovario Poliquístico. *Rev Med Chile*. 145: 907-915.
- ⊗ Constanzo LS. (2011) Fisiología Reproductiva. En: Constanzo (Eds.) Fisiología. 4ª edición. Elsevier. Barcelona. España. Cap. 10. pp. 443-464.
- ⊗ Craig J, Orisaka M, Wang H, Orisaka S, Thompson W, Zhu C, Kotsuji F, Tsang BK. (2007) Gonadotropin and Intra-ovarian Signals Regulating Follicle Development and Atresia: the Delicate Balance Between Life and Death. *Frontiers in Bioscience*. 12:3628-3639.
- ⊗ Crespo RP, Bachega TASS, Mendonça BB, Gomes LG. (2018) An Update of Genetic Basis of PCOS Pathogenesis. *Arch Endocrinol Metab*. 62(3): 352-361
- ⊗ Cruz G, Barra R, González D, Sotomayor-Zárate R, Lara H. (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.
- ⊗ Cui P, Yang C, Zhang K, Gao X, Luo L, Tian Y, Song M, Liu Y, Zhang Y, Li Y, Zhang X, Su S, Fang F, Ding J. (2015) Effect of Estrogen on the Expression of GnRH and Kisspeptin in the Hypothalamus of Rats during Puberty. *Theriogenology*. 84(9): 1556-1564.
- ⊗ D'Albora H, Anesetti G, Lombide P, Dees WL, Ojeda SR. (2002) Intrinsic neurons in the mammalian ovary. *Microscopy Research and Technique*. 59(6):484-489.
- ⊗ D'Albora H, Lombide P, Ojeda SR. (2000) Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study. *Cell and Tissue Research*. 300(1):47-56.
- ⊗ Damdimopoulou P, Chiang C, Flaws JA. (2019) Retinoic Acid Signaling in Ovarian Folliculogenesis and Steroidogenesis. *Reproductive Toxicology*. 87:32-41.
- ⊗ Danielsson BR. (2013) Maternal Toxicity. En: Barrow PC. (Ed.) Teratogenicity Testing. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). Vol. 947. Cap. 24. pp: 311-325.
- ⊗ De Champlain J, Malmfors T, Olson L, Sachs Ch. (1970) Ontogenesis of Peripheral Adrenergic Neurons in the Rat: Pre-and Postnatal Observations. *Acta Physiol Scand*. 80:276-288.
- ⊗ De la Cruz RR. (1998) Control Endocrino del Ciclo Reproductor en la Rata: Una Experiencia Docente Utilizando un Método de Caracterización Citológico. *Revista de Enseñanza Universitaria*. pp: 545-554.
- ⊗ De Rijk EPCT, Van Esch, E, Flik G. (2002) Pregnancy Dating in the Rat: Placental Morphology and Maternal Blood Parameters. *Toxicologic Pathology*. 30(2): 271-282.
- ⊗ Derrickson B. (2018) Aparatos Reproductores. En: Derrickson B. (Ed.) Fisiología Humana. Editorial Médica Panamericana. Ciudad de México. Cap. 23. pp: 781-829.
- ⊗ Desroziers E, Droguerre M, Bentsen AH, Robert V, Mikkerlsen JD, Caraty A, Tillet Y, Duittoz A, Franceschini I. (2012) Embryonic Development of Kisspeptin Neurons in Rat. *Journal of Neuroendocrinology*. 24: 1284-1295.
- ⊗ Dey SK, Lim H. (2006) Implantation. En: Knobil E, Neill JD (Eds.) Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Vol. 1. 3ª edición. EUA. Cap. 4. pp:147-188.
- ⊗ Díaz BN. (2004) Bioquímica Básica de las Hormonas Esteroides: Biología y Clínica del Cáncer. *Biocáncer*. 2: 1-22.
- ⊗ Dissen G, Ojeda SR. (1999) Ovarian Innervation. En: Knobil E, Neill J (Eds.) Encyclopedia of Reproduction. Academic Press. USA. 3: 583-589.
- ⊗ Dissen GA, Hirshfield AN, Malamed S, Ojeda SR (1995) Expression of Neurotrophins and Their Receptors in the Mammalian Ovary is Developmentally Regulated: Changes at the Time of Folliculogenesis. *Endocrinology* 136: 4681-4692.

- ⊗ Dissen GA, Paredes A, Romero C, Lees WL, Ojeda SR. (2004) Neural and Neurotrophic Control of Ovarian Development. En: Leung PCK, Adashi EY (Eds.) *The Ovary*. 2ª edición. Academic Press. Reino Unido. Cap. 1. pp. 3-23.
- ⊗ 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*. UNAM. Coordinación de la Investigación Científica. Programa Universitario de Investigación en Salud. Cap. 7. pp. 163-188.
- ⊗ Domínguez R, Cruz-Morales SE. (2011) The Ovarian Innervation Participates in the Regulation of Ovarian functions. *Endocrinology and Metabolic Syndrome*. S4:001.
- ⊗ Domínguez R. (2015) Lateralización del Hipotálamo y los Ovarios. En: *Procesos Fisiológicos y Toxicológicos de la Reproducción*. Puebla, México. Editorial BUAP Dirección de Fomento Educativo. pp: 135-153.
- ⊗ Duffy DM, Ko C, Jo M, Brannstrom M, Curry TE. (2019) Ovulation: Parallels With Inflammatory Processes. *Endocrine Reviews*, 40(2):369–416.
- ⊗ Durkee TJ, McLean MP, Hales DB, Payne AH, Waterman MR, Khan I, Gibori G. (1992) P450_{17α} and P450_{scc} Gene Expression and Regulation in the Rat Placenta. *Endocrinology*. 130(3):1309-1317.
- ⊗ Eisner JR, Barnett MA, Dumesic DA, Abbott DH. (2002) Ovarian Hyperandrogenism in Adult Female Rhesus Monkeys Exposed to Prenatal Androgen Excess. *Fertility and Sterility*. 77(1): 167-172.
- ⊗ Elliot TS, Agonistes S. (2008) Reproducción y Desarrollo. En: Silverthorn DU (Eds.) *Fisiología Humana. Un Enfoque Integrado*. Editorial Médica Panamericana. 4ª edición Cap. 26. pp:821-860.
- ⊗ Erb C. (2006) Embriology and Teratology. En: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL. (Eds.) *The Laboratory Rat*. 2ª edición. Academic Press. Cap. 28. pp: 817-846.
- ⊗ Erickson GF. (1986) An Analysis of the Follicle Development and Ovum Maturation. *Sem. Rep. Med.* 4(03): 233-254.
- ⊗ Escobar ML, Echeverría OM, Palacios-Martínez S, Juárez-Chavero S, Sánchez-Sánchez L, Vázquez-Nin GH. (2019) Beclin 1 Interacts With Active Caspase-3 and Bax in Oocytes From Atretic Follicles in the Rat Ovary. *J of Hist Cyto*. 67(12):873-889.
- ⊗ Espey LL, Richards AS. (2006) Ovulation. En: Knobil E, Neill JD (Eds.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Vol. 1. 3ª edición. EUA. Cap. 11. pp:425-474.
- ⊗ Espinoza C, Matute N, Ochoa S, López E. (2011) Caracterización Clínica de Pacientes con Síndrome de Ovarios Poliquísticos. *Rev Med Hondur*. 79 (3): 128-131.
- ⊗ Everett JW. (1935) Morphological and Physiological Studies Of The Placenta In The Albino Rat. *Journal of Experimental Zoology*. 70(2): 243-285.
- ⊗ Farookhi R, Hemmings R, Brawer JR. (1985) Unilateral Ovariectomy Restores Cyclicity in Rats with A Polycystic Ovarian Condition. *Biology of Reproduction*. 32: 530-540.
- ⊗ Feng Y, Zhang P, Zhang Z, Shi J, Jiao Z, Shao B. (2016) Endocrine Disrupting Effects of Triclosan on the Placenta in Pregnant Rats. *Plos One*. 1-14.
- ⊗ Fernández M, Bourguignon N, Lux-Lantos V, Libertum C. (2010) Neonatal Exposure to Bisphenol A and Reproductive and Endocrine Alterations Resembling the Polycystic Ovarian Syndrome in Adult Rats. *Environmental Health Perspectives*. 118(9): 1217-1222.
- ⊗ Fernández-Tresguerres JA, Castillo C. (2005) Fisiología del Eje Hipotálamo-Hipófiso-Ovárico. En: Fernández-Tresguerres JA, Ariznavarreta C, Cachofeiro V, Cardinali D, Escrich E, Gil-Loyzaga P, Lahera V, Mora F, Romano M, Tamargo J. (Eds.) *Fisiología Humana*. 3ª edición. McGraw-Hill. México. Cap. 79. pp: 1007-1023.
- ⊗ Fernández-Tresguerres JA. (2010) Fisiología del Eje Hipotálamo-Hipófiso-Ovárico. En: Fernández-Tresguerres JA, Ariznavarreta C, Cachofeiro V, Cardinali D, Escrich E, Gil-Loyzaga P, Lahera V, Mora F, Romano M, Tamargo J. *Fisiología Humana*. 4ª edición. McGraw-Hill. México, DF. Cap. 83. pp: 1041-1060.

- ⊗ Fleeman TL, Cappon GD, Chapin RE, Hurtt Me. (2005) Effects of Feed Restriction During Organogenesis on Embryo-Fetal Development in the Rat. *Birth Defects Research (Part B)*. 74: 442-449.
- ⊗ Flores-Pérez I, Rosas-Velasco C, Romano MC, Pérez-Martínez M. (2005) Apoptosis y Atresia Folicular: Un Binomio Esencial en el Desarrollo Ovárico. *Vet. Méx.* 36(1):87-105.
- ⊗ Freeman ME. (2006) Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. En: Neill JD (Eds.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Vol. 2. 3ª edición. EUA. Cap. 43. pp: 2327-2388.
- ⊗ Furukawa S, Hayashi S, Usuda K, Abe M, Hagio S, Ogawa I. (2011) Toxicological Pathology in the Rat Placenta. *Journal of Toxicologic Pathology*. 24(2): 95-111.
- ⊗ Furukawa S, Tsuji N, Sugiyama A. (2019) Morphology and physiology of rat placenta for toxicological evaluation. *Journal of Toxicologic Pathology*. 32(1):1-17.
- ⊗ Gartner LP, Hiatt JL. (2008) Sistema Reprodutor Femenino. En: Gartner y Hiatt (Eds.) *Texto Atlas de Histología*. 3ª edición. McGraw-Hill Interamericana. México. Cap. 20. pp: 463-488.
- ⊗ Gibb W, Lye SJ, Challis JRG. (2006) Parturition. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) *Encyclopedia of Reproduction*. 3a edición. Academic Press. San Diego. Vol. 2. Cap. 55. pp. 2925-2974.
- ⊗ Gibori G, Antczak E, Rothchild I. (1977) The Role of Estrogen in the Regulation of Luteal Progesterone Secretion in the Rat After Day 12 of Pregnancy. *Endocrinology*. 100(6): 1483-1495.
- ⊗ Gibori G, Chatterton RT, Chien JL. (1979) Ovarian and Serum Concentrations of Androgen Throughout Pregnancy in the Rat. *Biology of Reproduction*. 21:53-56.
- ⊗ Gibori G, Khan I, Warshaw ML, McLean MP, Puryear TK, Nelson S, DurkeeTJ, Azhar S, Steinschneider A, Rao MC. (1988) Placental-Derived Regulators and the Complex Control of Luteal Cell Function. *Recent Progress in Hormone Research*. (44): 377-429.
- ⊗ Gibori G, Sridaran R. (1981) Sites of Androgen and Estradiol Production in the Second Half of Pregnancy in the Rat. *Biology of Reproduction*. 24: 249-256.
- ⊗ Gioia, L. (1996). Control of Ovarian Innervation. *Zygote*. 4(04): 295-298.
- ⊗ Gómez-Chang E, Larrea F, Martínez-Montes F. (2012) Vías de Señalización Asociadas a la Esteroidogénesis. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 15(1): 24-36.
- ⊗ Goodarzi M, Chazenbalk G, Abbott D, Dumesic D. (2014). Intrauterine Environment and Polycystic Ovary Syndrome. *Seminars in Reproductive Medicine*. 32(03): 159-165.
- ⊗ Goodarzi M, Dumesic D, Chazenbalk G, Azziz R. (2011) Polycystic Ovary Syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nature Reviews*. 7, 219-231.
- ⊗ Gore-Langton RE, Armstrong DT. (1994) Follicular Steroidogenesis and Its Control. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) *The Physiology of Reproduction*. 2ª edición. Raven Press, Ltd. New York. Cap. 11. pp: 571-611.
- ⊗ Gore-Langton RE, Armstrong DT. (1994) Follicular Steroidogenesis and its Control. En: Knobil, Neill JD (Eds.) *The Physiology of Reproduction*. Editorial Raven Press. pp:571-628.
- ⊗ Greenwald GS, Roy SK. (1994) Follicular Development and its Control. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) *The Physiology of Reproduction*. 2ª edición. 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 Innervation in Development of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrine*. 28 (3): 319-324.
- ⊗ Grummer RR, Carroll DJ. (1988) A Review of Lipoprotein Cholesterol Metabolism: Importance to Ovarian Function. *Journal of Animal Science*, 66(12), 3160- 3173.
- ⊗ Gur EB, Karadeniz M, Turan GA. (2015) Fetal Programming of Polycystic Ovary Syndrome. *World J Diabetes*. 6(7): 936-942.
- ⊗ Hall JE. (2011) Fisiología Femenina antes del Embarazo y Hormonas Femeninas. En: Hall JE (Ed.) *Guyton y Hall. Tratado de Fisiología Médica*. 12ª edición. Elsevier. Barcelona, España. Cap.81. pp-987-1002.
- ⊗ Hall JE. (2019) Neuroendocrine Control of the Menstrual Cycle. En: Strauss JF, Barbieri RL. (Eds.) *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology*. 8ª edición. Elsevier. China. Cap.7. pp:149-166.

- ⊗ Hatch R, Rosenfield R, Kim MH, Tredway D. (1981) Hirsutism: Implications, etiology, and management. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 815-830.
- ⊗ Hemmings R, Farookhi R, Brawer JR. (1983) Pituitary Ovarian Responses to Luteinizing Hormone Releasing Hormone in a Rat with Polycystic Ovaries. *Biology of Reproduction.* 29:239-248.
- ⊗ Hendrickx AG, Korte R, Leuschner F, Neumann BW, Poggel A, Binkerd P, Prahalada S, Gunzel P. (1987) Embryotoxicity of Sex Steroidal Hormones in Nonhuman Primates: II. Hydroxyprogesterone Caproate, Estradiol Valerate. *Teratology* 35:129-136.
- ⊗ Herbison AE. (2016) Control of Puberty Onset and Fertility by Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Endocrinology.* 1-15.
- ⊗ Hirshfield AN (1991) Development of Follicles in the Mammalian Ovary. *Inter Rev of Cytol.* 124: 43-101.
- ⊗ Hirshfield AN, DeSanti AM. (1995) Patterns of Ovarian Cell Proliferation in Rats During the Embryonic Period and the First Three Weeks Postpartum. *Biol of Rep.* 53:1208-1221.
- ⊗ Hirshfield AN, Midgley R. (1978) Morphometric Analysis of Follicular Development in the Rat. *Biology of Reproduction.* 19:597-605.
- ⊗ Hofmann GE. (1998) Hormones of Pregnancy. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) Encyclopedia of Reproduction. Academic Press. San Diego. Vol. 2. pp. 670-680.
- ⊗ Holesh JE, Bass AN, Lord M. Fisiología, Ovulación. [Actualizado el 8 de mayo de 2022]. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): Publicación de StatPearls; 2022 enero. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441996/>
- ⊗ Hsueh AJW, Billig H, Tsafiriri A. (1994) Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process. *Endocrine Reviews.* 15(6):707-723.
- ⊗ Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Azhar S. (2010) Cellular Cholesterol Delivery, Intracellular Processing and utilization for Biosynthesis of Steroid Hormones. *Nutrition & Metabolism.* 7(47):1-25.
- ⊗ Hughes CK, Pate JL. (2019) Luteolysis and the Corpus Luteum of Pregnancy. En: Leung PCK, Adashi EY (Eds.) The Ovary. 3ª edición. Academic Press. Reino Unido. Cap. 17. pp: 269-292.
- ⊗ Hummertsch K, Irving-Rodgers HF, Schwartz J, Rodgers RJ. (2019) Development of the Mammalian Ovary and Follicles. En: Leung PCK, Adashi EY (Eds.) The Ovary. 3ª edición. Academic Press. Reino Unido. Cap. 4. pp: 71-82.
- ⊗ Inoué S, Leblond CP, Laurie GW. (1983) Ultrastructure of Reichert's Membrane, a Multilayered Basement Membrane in the Parietal Wall of the Rat Yolk Sac. *J. Cell. Biol.* 97: 1524-1537.
- ⊗ Irusta G. (2008) Mecanismos involucrados en la atresia del folículo ovárico: relación entre esteroidogénesis, angiogénesis y apoptosis. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- ⊗ Iwasa T, Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. (2015) The Advancement of the Onset of Vaginal Opening in Female Rats Subjected to Chronic Testosterone Treatment Occurs independently of Hypothalamic Kiss1 and RFRP Expression. *Neuroendocrinology Letters.* 36(8):767-770.
- ⊗ Jennes L. (1989) Prenatal Development of the Gonadotropin-Releasing Hormone-Containing Systems in Rat Brain. *Brain Research.* 482(1): 97-108.
- ⊗ Jollie WP. (1990). Development, Morphology, And Function Of The Yolk-Sac Placenta Of Laboratory Rodents. *Teratology.* 41(4): 361-381.
- ⊗ Jones HEH, Waynforth HB, Pope GS. (1961) The Effect of Miroestrol on Vaginal Cornification, Pituitary Function and Pregnancy in the Rat. *J Endocrin.* 22:293-302.
- ⊗ Kaipia A, Hsueh AJW. (1997) Regulation of Ovarian Follicle Atresia. *Annu. Rev. Physiol.* 59:349-363.
- ⊗ Kerr JF, Wylie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J Cancer.* 26:239-257.
- ⊗ Khan MJ, Ullah A, Basit S. (2019) Genetic Basis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Current Perspectives. *The Application Of Clinical Genetics.* 12: 249-260.

- ⊗ Klein CM, Burden HW. (1988) Anatomical Localization of Afferent and Postganglionic Sympathetic Neurons Innervating the Rat Ovary. *Neuroscience Letters* 85: 217-222.
- ⊗ Koeppen BM, Stanton BA. (2009) Berne y Levy. Fisiología. 6ª edición. Editorial Elsevier. Barcelona, España. Cap. 43. pp. 788-789.
- ⊗ Krehbiel RH, Plagge JC. (1962) Distribution Of Ova In The Rat Uterus. *The Anatomical Record*. 143(3): 239-241.
- ⊗ Kriszt R, Winkler Z, Polyak A, Kuti D, Molnar C, Hrabovszky E, Kalló I, Szoke Z, Ferenczi S, Kovacs KJ. (2015) Xenoestrogens Ethinyl Estradiol and Zearalenone Cause Precocious Puberty in Female Rat Via Central Kisspeptin Signaling. *Endocrinology*. 1-13.
- ⊗ Kumar D, Freese M, Drexler D, Hermans-Borgmeyer I, Marquardt A, Boehm U. (2014) Murine Arcuate Nucleus Kisspeptin Neurons Communicate with GnRH Neurons *In Utero*. *The Journal Of Neuroscience*. 34(10):3756-3766.
- ⊗ Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, Ojeda SR. (2000) An Increased Intraovarian Synthesis of Nerve Growth Factor and its Low Affinity Receptor is a Principal Component of Steroid-induced Polycystic Ovary in the Rat. *Endocrinology*. 141: 1059-1072.
- ⊗ Lara HE, Ferruz J, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR. (1993) Activation of Ovarian Sympathetic Nerves in Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology*. 133: 2690-2695.
- ⊗ Lara HE, McDonald JK, Ojeda SR. (1990) Involvement of Nerve Growth Factor in Female Sexual Development. *Endocrinology*. 126(1):364-375.
- ⊗ Lawrence IE, Burden HW. (1980) The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The Anatomical Record*. 196 (1):51-59.
- ⊗ Leung PCK, Cheng CK. (2004) Gn-RH as an Autocrine Regulator in the Human Ovary. En: Leung PCK, Adashi EY (Eds.) *The Ovary*. 2ª edición. Academic Press. Reino Unido. Cap. 17. pp. 289-304.
- ⊗ Levy JR, Faber KA, Ayyash L, Hughes CL. (1995) The Effect of Prenatal Exposure to the Phytoestrogen Genistein on Sexual Differentiation in Rats. *Soc for Exp Biol and Med*. 208: 60-66.
- ⊗ Lohmiller JJ, Swing SP, Hanson MM. (2020) Reproduction and Breeding. En: Suckow MA, Hankenson FC, Wilson RP, Foley PL. (Eds.) *The Laboratory Rat*. 3ª edición. Reino Unido. Cap. 6. pp. 157-179.
- ⊗ López LP, Hernández I, Pascacio H, Gordillo K, Cardena GN, Madrid RM. (2012) Correlación entre Insulino-Resistencia e Hiperandrogenismo. *Ginecol Obstet Mex*. 80(1): 30-35.
- ⊗ Ma YJ, Ojeda SR. (1997) Neuroendocrine Control of Female Puberty: Glial and Neuronal Interactions. *JID Symposium Proceedings*. 2(1):19-22.
- ⊗ Maeda (2000) Physiology of Reproduction. En: Krinke GJ (Eds.) *The Laboratory Rat*. Elsevier. Cap. 9. pp: 145-176.
- ⊗ Magendzo A. (2010) Anovulación y Disfunción Ovulatoria e Infertilidad. *Rev Med Clin Condes*. 21(3): 377-386.
- ⊗ Malamed S, Gibney JA, Ojeda SR. (1992) Ovarian Innervation Develops Before Initiation Of Folliculogenesis In The Rat. *Cell & Tissue Research*. 270(1): 87-93.
- ⊗ Maldonado O, Ramírez I, García JR, Ceballos GM, Méndez E. (2012). Colesterol: Función biológica e implicaciones médicas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 43(2):7-22.
- ⊗ Maliqueo M, Echiburú B. (2014) Programación Fetal de las Enfermedades Metabólicas. *Rev Farmacol Chile*. 7(1): 33-46.
- ⊗ Mangoushi MA. (1974) The Fate of Grafted Fetal Ovaries in the Rat. *J Anat*. 118(3):601-610.
- ⊗ Mannerås L, Cajander S, Holmang A, Seleskovic Z, Lystig T, Lonn M, Stener-Victorin E. (2007) a New Rat Model Exhibiting Both Ovarian and Metabolic characteristics of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology*. 148(8): 3781-3791.
- ⊗ Markham JA, Vaughn JE. (1991) Migration Patterns of Sympathetic Preganglionic Neurons in Embryonic Rat Spinal Cord. *Development of Preganglionic Neurons*. 22(8):811-822.

- ⊗ Mattheij JAM, Swarts JJM. (1991) Quantification and Classification of Pregnancy Wastage in 5-day Cyclic Young Through Middle-Aged Rats. *Laboratory Animals*, 25(1): 30-34.
- ⊗ Mayer C, Acosta-Martínez M, Dubois S, Wolfe A, Radovick S, Boehm U, Levine JE. (2010) Timing and Completion of Puberty in Female Mice Depend on Estrogen Receptor α -signaling in Kisspeptin Neurons. *PNAS*. 107(52):22693-22698.
- ⊗ McAllister JM, Legro RS, Modi BP, Strauss JF. (2015) Functional Genomics of PCOS: from GWAS to Molecular Mechanisms. *Trends Endocrinol Metab*. 26(3): 118-124.
- ⊗ McArdle CA, Roberson MS. (2015) Gonadotropes and Gonadotropin-Releasing Hormone Signaling. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 4^a edición. Academic Press. EUA. Vol. 1. Cap. 10. pp: 335-397.
- ⊗ McGee EA, Hsueh AJW. (2000) Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. *Endocrine Reviews*. 21(2):200-214.
- ⊗ McKey J, Bunce C, Batchvarov IS, Ornitz DM, Capel B. (2019). Neural Crest-Derived Neurons Invade the Ovary but not the Testis During Mouse Gonad Development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1-6.
- ⊗ McLachlan JA, Newbold RR, Shsh HC, Hogan MD, Dixon RL. (1982) Reduced Fertility in Female Mice Exposed Transplacentally to Diethylstilbestrol (DES). *Fertility and Sterility*. 38(2): 364-371.
- ⊗ Meijis-Roelofs HMA, Kramer P, Sander HJ. (1983) Changes in Serum Concentrations of Luteinizing Hormone in the Female Rat Approaching Puberty. *J Endocr*. 98: 241-249.
- ⊗ Merino P, Schulin-Zeuthen C, Codner E. (2009) Diagnóstico del Síndrome de Ovario Poliquístico: Nuevos Fenotipos, Nuevas Incógnitas. *Rev Med Chile*. 137: 1071-1080.
- ⊗ Miller WL, Auchus RJ. (2011) The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and its Disorders. *Endocrine Reviews*. 32(1):81-151.
- ⊗ Mobeen S, Apostol R. Ovarian Cyst. [Actualizado el 13 de junio de 2022]. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): Publicación de StatPearls; 2022 enero. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560541/>
- ⊗ Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. (2013) Primera Semana del Desarrollo Humano. En: Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG (Eds.) *Embriología Clínica*. 9^a edición. Elsevier. Barcelona. España. Cap. 2. pp. 13-39.
- ⊗ Morales M, Álvarez R. (2010) La rata como modelo biológico. Diversos enfoques del desarrollo *in útero* y posnatal, con referencia especial al aparato reproductor de la rata hembra Sprague Dawley. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- ⊗ 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*. 8:9.
- ⊗ Morales-Ledesma L. (2015) Regulación Neuroendocrina del Ovario. En: *Procesos Fisiológicos y Toxicológicos de la Reproducción*. Puebla, México. Editorial BUAP Dirección de Fomento Educativo. pp. 113-133.
- ⊗ Morán C, Tena G, Morán S, Ruiz P, Reyna R, Duque X. (2010) Prevalence of Polycystic Ovary Syndrome and Related Disorders in Mexican Women. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 69(4): 274-280.
- ⊗ Morán C. (2006) Síndrome de ovario poliquístico. En: Delgado D, Fernández del Castillo C. (Eds.). *Ginecología y Reproducción humana*. Colegio Mexicano de Especialistas en Ginecología y Obstetricia A.C. México. Art. 35. pp. 313-318.
- ⊗ Morishige WK, Pepe GJ, Rothchild I. (1973) Serum Luteinizing Hormone, Prolactin and Progesterone Levels During Pregnancy in the Rat. *Endocrinology*. 92(5):1527-1530.
- ⊗ Navarrete, M. (2014) Modificación de las funciones ováricas en el animal con Síndrome de Ovario Poliquístico, inducido por la administración de Valerato de Estradiol o la exposición a estrés por

- frío. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad De Estudios Superiores Zaragoza.
- ⊗ Newbold RR, Bullock BC, McLachlan MC. (1983) Exposure to Diethylstilbestrol During Pregnancy Permanently Alters the Ovary and Oviduct. *Biology of Reproduction*. 28, 735-744.
 - ⊗ Ogren L, Talamantes F. (1988) Prolactins of Pregnancy and Their Cellular Source. *International Review of Cytology*. 112:1-65.
 - ⊗ Ojeda SR, Andrews WW, Advis JP, Smith-White S. (1980) Recent Advances in the Endocrinology of Puberty. *Endocrine Rev*. 1: 228-257.
 - ⊗ Ojeda SR, Skinner MK. (2006). Puberty in the Rat. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) *Encyclopedia of Reproduction*. 3a edición. Academic Press. San Diego. Vol. 2. Cap. 38. pp. 2061-2126.
 - ⊗ Osuka S, Iwase A, Nakahara T, Kondo M, Saito A, Bayasula, Nakamura T, Takikkawa, S, Goto M, Kotani T, Kikkawa F. (2017). Kisspeptin in the Hypothalamus of Two Rat Models of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology*. 158(82):367-377.
 - ⊗ Pastelín CF, Rosas NH, Morales-Ledesma L, Linares R, Domínguez R, Morán C. (2017) Anatomical organization and neural pathways of the ovarian plexus nerve in rats. *Journal of Ovarian Research*, 10(18):1-7.
 - ⊗ Pérez JM, Maroto KE. (2018) Síndrome de Ovarios Poliquísticos. *Medicina Legal de Costa Rica Edición Virtual*. 35(1): 94-105.
 - ⊗ Rajah R, Glaser EM, Hirshfield AN. (1992) The Changing Architecture of the Neonatal Rat Ovary During Histogenesis. *Developmental Dynamics*. 194:177-192.
 - ⊗ Rajkovic A, Pangas SA, Matzuk MM. (2006). Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. En: Knobil E, Neill JD (Eds.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Vol. 1. 3ª edición. EUA. Cap. 11. pp:383-423.
 - ⊗ Rands PL, White RD, Carter MW, Allen SD, Bradshaw WS. (1982) Indicators of Developmental Toxicity Following Prenatal Administration of Hormonally Active Compounds in the Rat. I. Gestational Length. *Teratology*. 25:37-43.
 - ⊗ Raperport C, Homburg R. (2019) The Source of Polycystic Ovarian Syndrome. *Clinical Medicine Insights: Reproductive Health*. 13: 1-6.
 - ⊗ Raynaud, JP. (1973) Influence of Rat Estradiol Binding Plasma Protein (EBP) on Uterotrophic Activity. *Steroids*. 21(2):249-258.
 - ⊗ Recabarren SE, Sir-Petermann T, Maliqueo M, Lobos A, Rojas-García P. (2006) La Exposición Prenatal a Andrógenos como Factor de Reprogramación Fetal. *Rev Med Chile*. 134: 101-108.
 - ⊗ Richards JS. (1980) Maturation of Ovarian Follicles: Actions and Interactions of Pituitary and Ovarian Hormones on Follicular Cell Differentiation. *Phys. Rev*. 60(1): 51-89.
 - ⊗ Robker RL, Hennebold JD, Russell DL. (2018) Coordination of Ovulation and Oocyte Maturation: A Good Egg at the Right Time. *Endocrinology*. 159(9): 3209-3218.
 - ⊗ Rolaki A, Drakakis P, Millingos S, Loutradis D, Makrigiannakis A. (2005) Novel Trends in Follicular Development, Atresia and Corpus Luteum Regression: A Role for Apoptosis. *Repr. BioM. Online*. 11(1): 93-103.
 - ⊗ Rosa-E-Silva A, Guimaraes MA, Padmanabhan V, Lara HE. (2003) Prepuberal Administration of Valerate Disrupts Cyclicity and Leads to Cystic Ovarian Morphology during Adult Life in the Rat: Roles of Sympathetic Innervation. *Endocrinology*. 144: 4289-4297.
 - ⊗ Rosales AM. (1998) Atresia Follicular. En: Velázquez (Ed.) *Biología de la Reproducción*. Universidad Autónoma Metropolitana. México. Cap. 9. pp. 223-261.
 - ⊗ Rosas GG. (2006) Efecto de la Inducción del Síndrome de Ovario Poliquístico en la Rata Infantil, Sobre la Dinámica del Crecimiento Follicular y la Secreción de Hormonas Esteroides. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, FES Zaragoza.
 - ⊗ Rosen MP, Cedars MI. (2012) Sistema Reproductor Femenino e Infertilidad. En: Gardner DG, Shoback D. (Eds.) *Greenspan Endocrinología básica y clínica*. 9ª edición. McGraw-Hill. México. Cap. 13. pp. 423-477.

- ⊗ Rosenblatt JS, Mayer AD, Giordano AL. (1988) Hormonal Basis During Pregnancy for the Onset of Maternal Behavior in the Rat. *Psychoneuroendocrinology*. 13(1,2):29-46.
- ⊗ Ross MH, Pawlina W. (2015) Sistema Genital Femenino. En: Pawlina (Eds.) *Histología Texto y Atlas. Correlación con Biología Molecular y Celular*. 7ª edición. Wolters Kluwer. Barcelona, España. Cap. 23. pp. 897-964.
- ⊗ Russell DL, Robker RL. (2007) Molecular Mechanisms of Ovulation: Co-ordination Through the Cumulus Complex. *Human Reproduction Update*. 13(3):289-312.
- ⊗ Rutkowska AZ, Diamanti-Kandarakis E. (2016) Polycystic Ovary Syndrome and Environmental Toxins. *Fertility and Sterility*. 1-11.
- ⊗ Sadler TW. (2012) *Embriología Médica*. 12ª edición. Wolters Kluwer Health. Barcelona. España. pp. 384.
- ⊗ Salas M, Torrero C, Pulido S, Pérez H. (1991) Acciones Neurotrópicas de las Hormonas Tiroideas Durante la Ontogenia Neural. En: *Ontogenia Neuronal, Aspectos Corporativos y Mecanismos de Regulación*. pp: 177-198.
- ⊗ Sánchez-Criado, JE. (1999) Fisiología del Ovario En: Tresguerres JA, *Fisiología Humana*. 2ª edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid. España. Cap 75.
- ⊗ Sarkar K, Kinson GA, Rowsell HC. (1986) Embryo Resorption Following Administration of Steroidal Compounds to Rats in Mid Pregnancy. *Can J Vet Res*. 50:433-437.
- ⊗ Schönfelder G, Friedrich K, Paul M, Chahoud I. (2004) Developmental Effects of Prenatal Exposure to Bisphenol A on the Uterus of Rat Offspring. *Neoplasia*. 6(5): 584-594
- ⊗ Sebastian MM, Borjeson TM. (2020) *Embriology and Teratology* En: Suckow MA, Hankenson FC, Wilson RP, Foley PL. (Eds.) *The Laboratory Rat*. 3ª edición. Academic Press. Cap. 23. pp: 863-890.
- ⊗ Shi D, Vine DF. (2012) Animal Models of Polycystic Ovary Syndrome: A Focused Review of Rodent Models in Relationship to Clinical Phenotypes and Cardiometabolic risk. *Fertility and Sterility*. 98(1): 185-195.
- ⊗ Sir-Petermann T, Maliqueo M, Angel B, Lara HE, Pérez-Bravo F, Recabarren SE. (2002) Maternal Serum Androgens in Pregnant women with Polycystic Ovarian Syndrome: Possible Implications in Prenatal Androgenization. *Human Reproduction*. 17(10): 2573-2579.
- ⊗ Sir-Petermann T, Preisler J, Magendzo A. (2013) Síndrome de Ovario Poliquístico. Diagnóstico y Manejo. *Rev Med Chile*. 24(5): 818-826.
- ⊗ Smith M, Jennes L. (2001) Neural signals that regulate GnRH Neurons directly during the Oestrous Cycle. *Reproduction*. 122(1): 1-10.
- ⊗ Smith MS, Freeman ME, Neill JD. (1975) The Control of Progesterone Secretion During the Estrous Cycle and Early Pseudopregnancy in the Rat: Prolactin, Gonadotropin and Steroid Levels Associated with Recue of the Corpus Luteum of Pseudopregnancy. *Endocrinology*. 96:219-226.
- ⊗ Smith-White S, Ojeda SR. (1981) Changes in Ovarian Luteinizing (LH) and Follicle Stimulating Hormone (FSH) Receptor Content and in Gonadotropin-Induced Decarboxylase Activity During Prepubertal and Puberal Development of the Rat. *Endocrinology*. 109: 152-161.
- ⊗ Sordia L. (2014) *Ginecología: Casos Clínicos*. Editorial El Manual Moderno. México. pp. 404.
- ⊗ Sotomayor-Zárate R, Dorfman M, Paredes A, Lara HE. (2008) Neonatal Exposure to Estradiol Alters Ovarian Sympathetic Innervation and Follicular Development in the Adult Rat. *Biology of Reproduction*. 78: 673-680.
- ⊗ Spencer TE. (1999) Maternal Recognition of Pregnancy. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) *Encyclopedia of Reproduction*. Editorial Academic Press. San Diego, California. EUA. Volumen 3. pp: 1006-1015.
- ⊗ Sridaran R, Basuray R, Gibori G. (1981) Source and Regulation of Testosterone Secretion in Pregnant and Pseudopregnant Rats. *Endocrinology*. 108(3): 855-861.
- ⊗ Sridaran R, Mahesh VB. (1989) Suppression of Luteal Estradiol Receptors and Progesterone Synthesis by a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist (WY-40972) During Midgestation. *Biology of Reproduction*. 40:276-282.

- ⊗ Stamatiades GA, Carroll RS, Kaiser UB. (2019) GnRH—A Key Regulator of FSH. *Endocrinology*, 160(1): 57–67.
- ⊗ Stener-Victorin E, Deng Q. (2021) Epigenetic Inheritance of Polycystic Ovary Syndrome—Challenges and Opportunities for Treatment. *Nature Reviews Endocrinology*. 17(9): 521–533.
- ⊗ Stener-Victorin E, Lundeborg T, Waldenström U, Manni L, Aloe L, Gunnarsson S, Janson PO. (2000) Effects of Electro-Acupuncture on nerve Growth Factor and Ovarian Morphology in Rats with Experimentally Induced Polycystic Ovaries. *Biology of Reproduction*. 63: 1497-1503.
- ⊗ Stener-Victorin E, Ploj K, Larsson BM, Holmäng A. (2005) Rats with Steroid-Induced Polycystic Ovaries develop Hypertension and Increased Sympathetic Nervous system Activity. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 3(1): 44.
- ⊗ Stouffer RL, Hennebold JD. (2015) Structure, Function, and Regulation of the Corpus Luteum. En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 4ª edición. Academic Press. EUA. Vol. 1. Cap. 23. pp: 1023-1076.
- ⊗ Strauss JF. (2019) Organization of Ovarian Steroidogenesis Cells and Cholesterol Metabolism. En: Leung PCK, Adashi EY (Eds.) The Ovary. 3ª edición. Academic Press. Reino Unido. Cap. 5. pp: 83-93.
- ⊗ Sun X, Ito J, Potter SJ, Dey SK, DeFalco T. (2017) Extragonadal Oocytes Residing in the Mouse Ovarian Hilum Contribute to Fertility. *Biology of Reproduction*. 96(5): 1060–1070.
- ⊗ Taya K, Greenwald GS. (1981) In Vivo and in Vitro Ovarian Steroidogenesis in the Pregnant Rat. *Biology of Reproduction*. 25:683-691.
- ⊗ Tehrani FR, Noroozadeh M, Zahediasl S, Piryaei A, Azizi F. (2014) Introducing a Rat Model of prenatal Androgen-Induced Polycystic Ovary Syndrome in Adulthood. *Exp Physiol*. 99.5: 792-801.
- ⊗ Tharian K, Warner J. (2011) Polycystic Ovarian Syndrome in Adolescent Girls. *Pediatrics and Child Health*. 21(7): 309-314.
- ⊗ Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML, Johnson AL. (1995) Expression of Members of the Bcl-2 Gene Family in the Immature Rat Ovary: Equine chorionic Gonadotropin Mediated Inhibition of Granulosa Cell Apoptosis is Associated with Decreased bax and Constitutive Bcl-2 and Bcl-xlong Messenger Ribonucleic Acid Levels. *Endocrinology*. 136: 232–241.
- ⊗ Torres-Ramírez N, Escobar ML, Vázquez-Nin GH, Ortiz R, Echeverría OM. (2016) Paraptosis-like Cell Death in Wistar Rat Granulosa Cells. *Development, Growth & Differentiation*. 58(8): 651-663.
- ⊗ Tóth IE, wiesel O, Boldogkoi Z, Balint K, Tapaszti Z, Gerendai I. (2007) Predominance of Supraspinal Innervation of the Left Ovary. *Microscopy Research and Technique*. 70: 710-718.
- ⊗ Trujillo A, Gutiérrez GP, Linares R, Cortés MC, Eguibar JR. (2015) El Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovarios. Un Viejo Conocido, Nuevos Hallazgos y Más por Conocer. En: Procesos Fisiológicos y Toxicológicos de la Reproducción. Puebla, México. Editorial BUAP Dirección de Fomento Educativo. pp:95-112.
- ⊗ Uchida K, Kadowaki M, Nomura Y, Miyata K, Miyake T. (1970) Relationship Between Ovarian Progesterone Secretion and Corpora Lutea Function in Pregnant Rats. *Endocrinol. Japon.* (6):499-507.
- ⊗ Urbanski HF, Ojeda SR. (1983) The Juvenile-Peripubertal transition period in the Female Rat: Establishment of a Diurnal Pattern of Pulsatile Luteinizing Hormone Secretion. *Endocrinology*. 117: 644-649.
- ⊗ Vantman D, Vega M. (2010) Fisiología Reproductiva y Cambios Evolutivos con la Edad de la Mujer. *Rev. Med. Clin. Condes*. 21(3): 348-362.
- ⊗ Varayoud J, Ramo S JG, Bosquiazzo VL, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. (2008) Developmental Exposure to Bisphenol a Impairs the Uterine Response to Ovarian Steroids in the Adult. *Endocrinology*, 149(11): 5848–5860.
- ⊗ Vaticón D. (2010) Fisiología de la Gestación. En: Tresguerres (Eds.) Fisiología Humana. 4ª edición. McGraw-Hill Interamericana. México. Cap. 85. pp. 1074-1092.
- ⊗ Venegas B, De León-Gordillo LY, Rosas G, Espinoza JA, Morán C, Domínguez R, Morales-Ledesma L. (2019) in Rats with Estradiol Valerate-Induced Polycystic Ovary Syndrome, the

- Acute Blockade of Ovarian β -Adrenoreceptors improve Ovulation. *Repro. Biol, and Endo.* 17(95):1-10.
- ⊗ Vieyra E, Ramírez DA, Linares R, Rosas G, Domínguez R, Morales-Ledesma L. (2019) Stimulation of Nicotinic Receptors in the Suprachiasmatic Nucleus Results in a Higher Number of Growing Follicles and Ova Shed. *Experimental Physiology.* 1-11.
 - ⊗ Waldman IN, Legro RS. (2019) Polycystic Ovary Syndrome. En: Leung PCK, Adashi EY (Eds.) *The Ovary.* 3ª edición. Academic Press. Reino Unido. Cap. 26. pp: 415-435.
 - ⊗ Warshaw ML, Johnson DC, Khan I, Eckstein B, Gibori G. (1986) Placental Secretion of Androgens in the Rat. *Endocrinology.* 119(6):2642-2648.
 - ⊗ Weizenbaum FA, Adler NT, Ganjam VK. (1979) Serum Testosterone Concentrations in the Pregnant Rat. *Journal of Steroid Biochemistry.* 10:71-74.
 - ⊗ Welt C, Schneyer A. (2019) Inhibin, Activin, and Follistatin in Ovarian Physiology. En: Leung PCK, Adashi EY (Eds.) *The Ovary.* 3ª edición. Academic Press. Reino Unido. Cap 6. pp: 95-105.
 - ⊗ White RD, Allen SD, Bradshaw WS. (1983). Delay in the Onset of Parturition in the Rat Following Prenatal Administration of Developmental Toxicants. *Toxicology Letters.* 18:185-192.
 - ⊗ Whitlock K, Postlethwait J, Ewer J. (2019) Neuroendocrinology of reproduction: Is Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) dispensable? *Frontiers in Neuroendocrinology.* pp:1-12.
 - ⊗ Williams CL, Stancel GM. (1996) Estrógenos y Progestágenos. En: Goodman y Gilman (Eds.). *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.* 9ª edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México. Sección III. Cap. 57. pp: 1497-1529.
 - ⊗ Wilson JG. (1977) Current Status of Teratology: General Principles and Mechanisms Derived From Animal Studies. En: Wilson JG, Fraser FC. (Eds.). *Handbook of Teratology.* Vol. 1. Cap. 2. Plenum Press. New York. pp: 47-74.
 - ⊗ Witchel SF, Oberfield SE, Peña AS. (2019) Polycystic Ovary Syndrome: Pathophysiology, Presentation, and Treatment with Emphasis on Adolescent Girls. *Journal of the Endocrine Society.* 3(8): 1545-1573.
 - ⊗ Woodall SM, Breier BH, Johnston BM, Gluckman PD. (1996) A Model of Intrauterine Retardation Caused by Chronic Maternal Undernutrition in the Rat: Effects on the Somatotrophic Axis and Postnatal Growth. *Journal of Endocrinology.* 150: 231-242.
 - ⊗ Woodruff JB, Hyman AA, Boke E. (2017) Organization and Function of Non-dynamic Biomolecular Condensates. *Trends in Biochemical Sciences.* 43(2): 81-94.
 - ⊗ Wu XY, Li ZL, Wu CY, Liu YM, Lin H, Wang SH, Xiao WF. (2010) Endocrine Traits of Polycystic Ovary Syndrome in Prenatally Androgenized Female Sprague-Dawley Rats. *Endocrine Journal.* 1-9.
 - ⊗ Xie Q, Kang Y, Zhang C, Xie Y, Wang C, Liu J, Yu C, Zhao H, Huang D. (2022) The Role of Kisspeptin in the Control of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis and Reproduction. *Frontiers in endocrinology.* 13: 1-16.
 - ⊗ Xita N, Tsatsoulis A. (2006) Review: Fetal Programming of Polycystic Ovary Syndrome by Androgen Excess: Evidence from Experimental, Clinical, and Genetic Association Studies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 91(5): 1660-1666.
 - ⊗ Yang R, Wang YM, Zhang L, Zhao ZM, Zhao J, Peng SQ. (2016) Prepubertal Exposure to an Oestrogenic Mycotoxin Zearalenone induces Central Precocious Puberty in immature Female Rats Through the Mechanism of Premature Activation of Hypothalamic Kisspeptin-GPR54 Signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 62-74.
 - ⊗ Yasuda Y, Kihara T, Nishimura H. (1977) Effect of Prenatal Treatment with Ethinyl Estradiol on the Mouse Uterus and Ovary. *Am J Obstet Gynecol.* 127(8):832-836.
 - ⊗ Yeh J, Adashi EY. (2001) Ciclo Ovárico. En: Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RLL. (Eds.) *Endocrinología de la Reproducción. Fisiología, Fisiopatología y Manejo Clínico.* 4ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Cap. 6. pp: 164-202.

- ⊗ 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 & Metabolism*. 30(4): 435-442.
- ⊗ Yen SSC. (2001) Síndrome del Ovario Poliquístico (Anovulación crónica hiperandrogénica). En: Yen SC, Jaffe RB, Barbieri RL. (Eds.). *Endocrinología de la Reproducción*. 4ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. Cap. 17. pp. 465-510.
- ⊗ Yépez R, Estévez E. (1981) Hormonas Placentarias. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas*. 6(2):145- 150.
- ⊗ Zama AM, Uzumcu M. (2010) Epigenetic Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Female Reproduction: An Ovarian Perspective. *Frontiers in neuroendocrinology*, 31(4): 420–439.
- ⊗ Zarrow MX, Naqvi RH, Denenberg VH. (1969) Androgen-Induced Precocious Puberty in the Female Rat and Its Inhibition by Hippocampal Lesions. *Endocrinology*. 84(1): 14-19.
- ⊗ Zimmerman SA, Clevenger WR, Brimhall BB, Bradshaw WS. (1991) Diethylstilbestrol-Induced Perinatal Lethality in the Rat. II. Perturbation of Parturition. *Biology of Reproduction*. 44: 583-589.

