



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“Participación del Nervio Ovárico Superior en la fertilidad de la rata con Síndrome de Ovario Poliquístico como modelo de estudio”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Xóchitl Nallely Acuña Escalona

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Leticia Morales Ledesma
UNAM, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

COMITÉ TUTOR: Dra. Ana Lilia Cerda Molina
UNAM, Facultad de Medicina
Dra. Margarita Martínez Gómez
UNAM, Instituto de Investigaciones Biomédicas



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“Participación del Nervio Ovárico Superior en la fertilidad de la rata con Síndrome de Ovario Poliquístico como modelo de estudio”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Xóchitl Nallely Acuña Escalona

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Leticia Morales Ledesma
UNAM, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
COMITÉ TUTOR: Dra. Ana Lilia Cerda Molina
UNAM, Facultad de Medicina
Dra. Margarita Martínez Gómez
UNAM, Instituto de Investigaciones Biomédicas

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
OFICIO: CGEP/CPCB/FESZ/0798/2023
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **21 de agosto del 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS** de la estudiante **ACUÑA ESCALONA XÓCHITL NALLELY** con número de cuenta **412019788** con la tesis titulada **“Participación del Nervio Ovárico Superior en la fertilidad de la rata con Síndrome de Ovario Poliquístico como modelo de estudio”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LETICIA MORALES LEDESMA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO
Vocal: DR. JOSÉ RENÉ ESCALONA MUGICA
Vocal: DRA. ROSA LINARES CULEBRO
Vocal: DRA. ANGÉLICA TRUJILLO HERNÁNDEZ
Secretario: DRA. ANA LILIA CERDA MOLINA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 10 de octubre de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/CEC/EARR/cec



Agradecimientos

Al *Posgrado en Ciencias Biológicas*, por darme la oportunidad de cumplir un sueño académico más y poder acumular experiencias tanto profesionales como personales.

Al *Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías* por financiar mis estudios de posgrado por medio de la beca 1080127 y al apoyo financiero otorgado por DGAPA-PAPIIT con número de convenio IN207022.

A la **Doctora *Leticia Morales Ledesma*** por ayudarme a culminar una meta más en mi vida académica, por confiar y por estar pese a toda circunstancia, muchas gracias doctora.

A la **Doctora Ana Lilia Cerda Molina** y a la **Doctora Margarita Martínez Gómez** por sus valiosos comentarios que han servido para mejorar este trabajo, gracias infinitas por el tiempo dedicado cada semestre en los tutorales y por su aportación para siempre mejorar.

A los miembros del jurado:

Dra. **María de la Luz Navarro Angulo**

Dra. **Rosa Linares Culebro**

Dra. **Angélica Trujillo Hernández**

Dra. **Ana Lilia Cerda Molina**

Dr. **Jose Rene Escalona Mugica**

Por el tiempo en la revisión de esta tesis, así como de sus comentarios que ayudaron a fortalecer este trabajo. Muchas gracias por su apoyo.

A la Doctora Adriana, la Doctora Eli y al Doctor Román por el cuidado y dedicación que brindaron a los animales que se utilizaron en la parte experimental. Mil gracias.

Al Biólogo Roberto Chavira por su ayuda en la medición hormonal del experimento.





Dedicatorias

A la **Doctora Lety** muchas gracias por darme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo desde la licenciatura y haberme esperado tanto tiempo para ingresar al posgrado, y tenerme la paciencia para culminar este proceso. Por el tiempo que ha dedicado a revisar cada uno de los trabajos que he hecho y haberme guiado durante todo este tiempo, siempre estaré agradecida por lo que aprendí y lo que viví con ustedes, parte de la persona que soy se lo debo a usted. Mil gracias.

A la **Doctora Rosa Linares**, más que por lo que me llevé académicamente de ti, me llevo a la gran persona que eres, gracias por el tiempo, por las pláticas, por los enojos, por absolutamente todo. Siempre tuviste razón, todo lo que yo he hecho contigo ha sido y seguirá siendo extraordinario. Espero poder seguir contando con tu apoyo. Te estoy eternamente agradecida, por que me adoptaste desde el servicio social hasta el día de hoy que puedo ver culminada mi maestría. Por todos los comentarios hacia mi trabajo que me han ayudado a mejorar como estudiante. Mil y un gracias Rosa.





"En este lugar no perdemos demasiado tiempo mirando hacia atrás. Camina hacia el futuro, abriendo nuevas puertas y probando cosas nuevas, sé curioso... porque nuestra curiosidad siempre nos conduce por nuevos caminos."

Walt Disney

"Eres el dueño de tu vida y tus emociones, nunca lo olvides. Para bien y para mal "

El principito





A mis hijas **Andrea** y **Mariana**, mil gracias, por que parte de que este trabajo salga implicó no estar al 100% con ustedes, pero también se que ustedes saben que todo lo que hago es para y por ustedes. Las amo infinitamente.

A mi bebé pandémico **José Mario**, llegaste cuando menos lo esperaba y llegaste con regalo del cielo, yo siempre he pensado que tu regalo de llegada fue mi ingreso al posgrado, te amo infinitamente igual que a tus hermanas.

Mario gracias de aquí al infinito y de regreso y uno más que tú, gracias por siempre confiar en mí, por decirme que si se puede (si se pudo), por decirme “ponte a trabajar”, por ser mi amigo chismoso con quien poder platicar cosas que solo tu entiendes y por aconsejarme en momentos de crisis y de llanto. Pues no fue en la maestría 😊 déjame te cuento. Muchas gracias, sin tí, esto no hubiera sido posible, nada hubiese sido posible, gracias por ayudarme a realizar mi sueño e impulsar el siguiente. Te amo.

Pepe y **Sandra** muchas gracias, papás, por todo lo que me han brindado, por su apoyo incondicional en esta nueva etapa académica y personal, lo he dicho ya de antemano, yo soy lo que soy por las bases que tengo de ustedes, espero que se sientan orgullosos de lo que estoy haciendo. Los amo, aún nos queda camino por andar.





A esas personas especiales que llegaron para quedarse en mi vida, hemos forjado una amistad muy especial, he aprendido mucho de ustedes, las quiero hartísimo, muchas gracias por existir **Mich, Chore, Diana, Mizu, Elsa, Itzel** la 1/3 bióloga. En verdad muchas gracias por confiar en mí para todo, las aguarda un futuro prometedor, exploten su potencial al máximo, no lo guarden para después, ahí no sirve.

Jan, te convertiste en alguien bien especial para mí, no se si por que somos parecidas o bien diferentes, pero lo que si sé es que has hecho de mi una mejor persona, yo ya gané en esta vida por atraer personas como tú. Será un honor y un privilegio poder hacer el doctorado juntas. Gracias por ser, gracias por estar, gracias por todas esas palabras que me has dicho y que han hecho que me sienta mejor y que me impulsan a ser mejor persona, creo que no lo he hecho tan mal.

Karlita, Karliwis de mi vida y de mi corazón, no se que hiciste, pero te quiero un buen. Nos ha tocado conocernos y estar mucho tiempo juntas, pasar horas en el trayecto hasta casi perder lo que no tenemos, que nos toque la lluvia y hemos tenido pláticas para morirnos de risa. He aprendido un buen de cosas contigo y aún nos queda tiempo juntas, así que las risas de trayecto no se acaban 😊 y las cosas por aprender una de la otra tampoco. Te quiero un montón (ya te lo había dicho).





Chío que te digo que no sepas ya, la vida nos separa y nos volvemos a juntar, porque los caminos académicos nos llevan por los mismos lugares o yo te llevo conmigo, eso ha pasado desde la licenciatura, gracias por confiar y quedarte conmigo. Amiga, espero que nos toque vivir experiencias increíbles y que nos hagan crecer profesionalmente. Gracias por existir.

A mis amigos **Héctor Gasca y José Molina** para que ahora sí lean los agradecimientos y no se enteren dos años después. Muchas gracias por su amistad y muchas gracias por confiar en mí para llevar a cabo nuestros proyectos personales. Mil gracias por todas las risas y horas trabajando y riendo. Los quiero mucho.

A las nuevas personas que se están vinculando a mi vida, que han llegado a motivar diferentes aspectos tanto académicos como personales, uno de ellos al que le agradezco infinitamente al Doctor **Rene Escalona**, por qué decidió confiar en mí para realizar nuevos proyectos tanto académicos como profesionales. Aumentemos la Flor de la abundancia. También al Doc. **Carlos Larqué** que siempre me hace pensar y da la respuesta mas acertada “así lo quiso Diosito”. La doctora **Haydée Lugo** que siempre me pregunta como estoy y como me va en mis clases, muchas gracias por sumar a mi vida.

A mis amigos del posgrado en Ciencias Biológicas **José Luis** (pollo) y **Victor**, por siempre estar para platicar y resolver dudas, muchas gracias, me salvaron más de una vez.





Índice de contenido

Resumen	1
Abstract	3
Marco Teórico	5
El ovario	5
Foliculogénesis	7
Ovulación	16
Atresia Folicular	18
Esteroidogénesis Ovárica	21
Regulación Neuroendócrina del eje hipotálamo hipófisis ovario	25
Inervación Ovárica	26
Inervación Simpática del Ovario	27
Inervación Simpática del Ovario en el Síndrome de Ovario Poliquístico	29
Síndrome de Ovario Poliquístico	31
Hipótesis sobre el origen del Síndrome	35
Inducción del Síndrome de Ovario Poliquístico por medio de Valerato de Estradiol	38
Infertilidad	39
Periodo Gestacional	40
Planteamiento del Problema	44
Hipótesis	45
Objetivo General	45
Objetivos Particulares	45
Materiales y Métodos	46

Xóchitl Nallely Acuña Escalona





Inducción del Síndrome de Ovario Poliquístico	46
Animales Generación F1 de Apertura Vaginal	49
Animales Generación F1 de 70 Días	49
Procedimiento de Autopsia	50
Histología Ovárica y Morfometría	50
Cuantificación de Testosterona	51
Análisis estadístico	52
Resultados: Objetivo 1 Efecto de la Sección uni o bilateral del Nervio Ovárico Superior sobre la fertilidad de la rata con SOPQ	53
Discusión de Resultados	59
Conclusiones	64
Resultados: Objetivo 2 Sección del Nervio Ovárico Superior en madres tratadas con Vh o VE; Efectos sobre la primera generación filial	65
Discusión de Resultados	75
Conclusiones	81
Anexo	82
Referencias Bibliográficas	86





Abreviaturas

3 β -HSD 3 beta hidroxisteroide deshidrogenasa

Ach Acetilcolina

ACTH Hormona adrenocorticotropica

AMPc Adenosín monofosfato cíclico

ATP Adenosín trifosfato

BFGF Factor de crecimiento de fibroblastos básico

BMP15 Factor morfogenético del hueso 15

BMP4 Factor morfogenético del hueso 4

CGRP Péptido relacionado con el gen que codifica la calcitonina

DHEA Dehidroepiandrosterona

DHPG Hidroxifenilglicol

EGF Factor de crecimiento epidermal

FGF2 Factor de crecimiento de fibroblastos 2

FSH Hormona folículo estimulante

GAP Uniones comunicantes

GCMS Ganglio celiáco mesentérico superior

GDF9 Factor de crecimiento y diferenciación 9





- GnRH** Hormona liberadora de las gonadotropinas
- HDL** Lipoproteínas de alta densidad
- H-E** Hematoxilina Eosina
- H-H-O** Hipotálamo-hipófisis-ovario
- HVA** Ácido Homovanílico
- IGF1** Factor de crecimiento semejante a la insulina 1
- IL-6** Interleucina 6
- KGF** Factor de crecimiento de queratinocitos
- KL** Kit ligando
- LDL** Lipoproteína de baja densidad
- LH** Hormona luteinizante
- MHPG** 3 metoxi-4 hidroxifenilglicol
- NA** Noradrenalina
- NGF** Factor de crecimiento neural
- NOS** Nervio ovárico superior
- NPO** Nervio del plexo ovárico
- NPY** Neuropeptido Y
- OMI** Inhibidor de la maduración del ovocito
- PDFG** Factor de crecimiento derivado de las plaquetas





- PIGF** Factor de crecimiento placentar
- PKA** Proteína quinasa
- POA-AHA** Área preóptica hipotalámica anterior
- PRL** Prolactina
- SHBG** Globulina fijadora de hormonas sexuales
- SOPQ** Síndrome de ovario poliquístico
- SP** Sustancia P
- StAR** Proteína de regulación esteroideogénica aguda
- TH** Tirosina hidroxilasa
- TNF- α** Factor de necrosis tumoral α
- Unk** Natural Killer uterinas
- VE** Valerato de estradiol
- Vh** Vehículo
- VIP** Péptido intestinal vasoactivo





Resumen

El síndrome de ovario poliquístico (SOPQ), es la endocrinopatía más frecuente en la población femenina en edad reproductiva con una incidencia mundial del 5 al 15 %. En México se presenta entre el 6 y el 10 % y es considerada la mayor causa de infertilidad anovulatoria en el 80 % de los casos. Esta fisiopatología se correlaciona con alteraciones en la secreción de GnRH a nivel de hipotálamo o bien de las hormonas gonadotrópicas en la hipófisis.

El SOPQ tiene un carácter de heredabilidad del 70% donde se presenta por medio de herencia autosómica dominante, por lo que se estima que existe un riesgo 5 veces mayor de que las hijas de madres con SOPQ lo presenten. La gestación de una madre que padece la patología es un proceso que se ve alterado, donde la recurrencia de pérdidas peri-implantación y de abortos es alta.

En ratas tratadas con un estrógeno de larga actividad, como es el valerato de estradiol (VE), se produce una hiperactividad noradrenérgica de las fibras que transcurren por el nervio ovárico superior (NOS), siendo ésta la responsable del desarrollo del SOPQ. Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que, en ratas infantiles, la administración de VE provoca en la etapa adulta, alteraciones del ciclo estral, hiperandrogenismo, quistes foliculares y anovulación, efectos que son revertidos cuando se elimina la hiperactividad noradrenérgica por la sección del NOS.

Con el fin de analizar si los ovocitos de éstas hembras son capaces de ser fertilizados y si las características inducidas por el VE pueden ser presentadas en la primera generación filial, en la presente investigación se utilizó como modelo de estudio a hembras que fueron tratadas al día 10 post-nacimiento con VE y al día 60 de edad fueron sometidas a la sección izquierda, derecha o bilateral del NOS, diez días después de la cirugía fueron puestas a aparear y se registró la tasa de hembras gestantes, la duración de la gestación, número de crías y el número de hembras.





En las hembras tratadas con vehículo (Vh) la tasa de gestación fue muy semejante entre los grupos, independientemente si fueron sometidas a la sección uni o bilateral del NOS. En las hembras con SOPQ y sección derecha o bilateral del NOS fue menor el porcentaje de hembras gestantes, efecto que se acompaña de un mayor número de reabsorciones fetales, sobre todo cuando se analiza la sección derecha del NOS. La duración de la gestación y el número de crías no se modificó, sin embargo, en el grupo de madres con SOPQ y sección del NOS derecho solo una hembra logró la gestación a término con 7 crías vivas.

En las hijas se evaluó el día de la apertura vaginal y el primer estro vaginal. En las hijas provenientes de madres con SOPQ y la sección bilateral del NOS, la apertura y el primer estro se encuentran desfasados en comparación con las hijas del grupo tratado con Vh y con la sección bilateral del NOS. La tasa de animales ovulantes (TAO) al primer estro, y el número de ovocitos liberados no se altera en los animales provenientes de madres Vh con sección uni o bilateral. Esta respuesta también se observó en el grupo que proviene de madres con SOPQ y la sección del NOS izquierda, mientras que fue menor la TAO en las hijas de madres con SOPQ y la sección del NOS bilateral.

La TAO y el número de ovocitos liberados a los 70 días no se modificó en ninguna de las hijas, independientemente de la progenitora que provengan. Al primer estro o a los 70 días, provenientes de madres Vh o VE más sección del NOS no se observó hiperandrogenismo, ya que, la concentración de testosterona fue muy similar a la de un testigo solo tratado con Vh. La dinámica folicular en el grupo de hijas que provienen de madres con Vh o VE más la sección izquierda del NOS, el número de folículos es muy similar. Cuando las hijas provienen de madres con VE más la sección bilateral del NOS, disminuyó a la mitad el número de folículos en comparación con las hijas provenientes de madres tratadas con Vh más la sección bilateral del NOS.

Con estos resultados podemos concluir que, en las hijas de madres tratadas con VE, no se desarrollaron las características que definen al SOPQ, pero que existe una condición que adelanta el periodo de subfertilidad cuando las hijas provienen de madres con SOPQ y la sección bilateral del NOS.





Abstract

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most frequent endocrinopathy in the female population of reproductive age with a worldwide incidence of 5 to 15%. In Mexico it occurs between 6 and 10% and is considered the major cause of anovulatory infertility in 80% of cases. This pathophysiology is correlated with alterations in the secretion of GnRH at the level of the hypothalamus or of gonadotropic hormones in the pituitary gland.

PCOS has a heritability of 70% where it occurs through autosomal dominant inheritance, so it is estimated that there is a 5 times greater risk that the daughters of mothers with PCOS present it. The gestation of a mother suffering from the pathology is a process that is altered, where the recurrence of peri-implantation losses and abortions is high.

In rats treated with a long-acting estrogen, such as estradiol valerate (EV), there is noradrenergic hyperactivity of the fibers that run through the superior ovarian nerve (SON), which is responsible for the development of PCOS. Previous studies in our laboratory have shown that, in infant rats, EV administration causes alterations in the estrous cycle, hyperandrogenism, follicular cysts, and anovulation in adults, effects that are reversed when noradrenergic hyperactivity is eliminated by sectioning the SON.

In order to analyze if the oocytes of these females are capable of being fertilized and if the characteristics induced by EV can be presented in the first filial generation, in the present investigation females that were treated daily were used as a study model. 10 post-natal with EV and at day 60 of age underwent left, right, or bilateral NOS section, ten days after surgery they were mated and the rate of pregnant females, gestation duration, number of pups and the number of females.





In females treated with vehicle (Vh) the pregnancy rate was very similar between the groups, regardless of whether they underwent unilateral or bilateral sectioning of the SON. In females with PCOS and right or bilateral section of the SON, the percentage of pregnant females was lower, an effect that is accompanied by a greater number of fetal resorptions, especially when analyzing the right section of the SON. The duration of gestation and the number of pups did not change, however, in the group of mothers with PCOS and right SON section, only one female achieved full-term gestation with 7 live pups.

In the daughters, the day of vaginal opening and the first vaginal estrus were evaluated. In daughters from mothers with PCOS and bilateral SON section, opening and first estrus are delayed compared to daughters from Vh and bilateral SON section. The rate of ovulating animals (RO) at first estrus, and the number of oocytes released are not altered in animals from Vh mothers with unilateral or bilateral section. This response was also observed in the group that comes from mothers with PCOS and the left SON section, while the RO was lower in the daughters of mothers with PCOS and the bilateral SON section.

The RO and the number of oocytes released at 70 days did not change in any of the daughters, regardless of the parent they came from. At the first estrus or at 70 days, from Vh or EV mothers plus SON section, no hyperandrogenism was observed, since the testosterone concentration was very similar to that of a control only treated with Vh. The follicular dynamics in the group of daughters that come from mothers with Vh or EV plus the left section of the SON, the number of follicles is very similar. When daughters came from mothers with EV plus bilateral SON section, the number of follicles decreased by half compared to daughters from mothers treated with Vh plus bilateral SON section.

With these results we can conclude that, in the daughters of mothers treated with EV, the characteristics that define PCOS did not develop, but that there is a condition that advances the period of subfertility when the daughters come from mothers with PCOS and the bilateral section of the SON.





Marco Teórico

El ovario

El ovario realiza varias funciones, su papel primordial es el de liberar un ovocito en cada ciclo menstrual para ser fertilizado y llevar a cabo el desarrollo embrionario, así como preparar los órganos reproductivos para la gestación y el parto mediante la producción de hormonas esteroideas y proteicas (Gougeon, 2004).

En la rata los ovarios tienen un peso aproximado de 30 mg con dimensiones de 4.35 x 5.5 x 1.6 mm aproximadamente (Navarrete, 2014), mientras que, en la mujer, después de la pubertad tienen una medida de 4 x 3 x 1 cm, con un peso de siete gramos (Tresguerres, 2022). En la mujer se encuentran en la cavidad pélvica, fijados a la superficie posterior por el ligamento ancho a través de un pliegue del peritoneo llamado mesovario por el cual recibe aporte nervioso, vascular y linfático (Tresguerres y Castillo, 2005).

La superficie ovárica tiene capacidad auto regenerativa después de cada ovulación y de transportar sustancias dentro y fuera de la cavidad peritoneal (Strauss y Williams, 2014).

El ovario, aunque presenta modificaciones dependiendo de la especie de mamíferos, conserva una estructura muy similar y en él se distinguen tres zonas (Figura 1):

Corteza: Está constituida por mesotelio llamado epitelio superficial, el cual contiene tejido conectivo, la túnica albugínea y una zona más profunda la cual contiene a todos los tipos de folículos. La túnica albugínea es una capa no vascularizada de la corteza, mientras que folículos y cuerpos lúteos se pueden localizar en el borde medular, la cual es una zona altamente vascularizada e inervada (Gougeon, 2004).



Médula: Se encuentra en la mitad del ovario pudiéndose encontrar a los folículos atrésicos de los cuales se formará la glándula intersticial, así como los cuerpos lúteos. Está conformada por fibroblastos laxos embebidos en una matriz rica en colágena, fibras elásticas, vasos sanguíneos, linfáticos, y fibras nerviosas (Gougeon, 2004; Tresguerres y Castillo, 2005).

Hilio: Constituido por células epiteloides provenientes de la médula, con una conformación similar a organelos que tienen en su citoplasma lípidos y retículo endoplásmico liso, por esta zona ingresan los vasos sanguíneos y nervios que surgen a partir del mesovario (Gougeon, 2004).

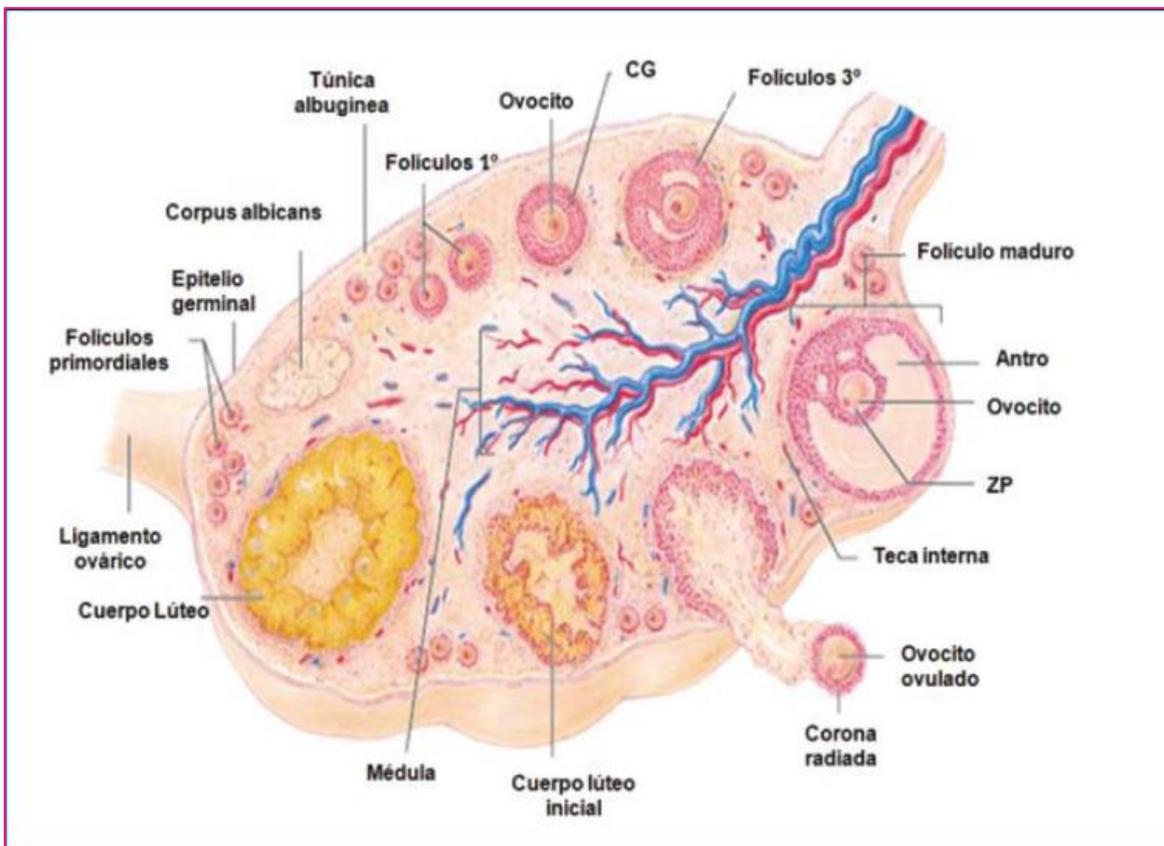


Figura 1. Imágen que muestra las partes que constituyen el ovario. (Tomado de Netter., 2003).





Foliculogénesis

El folículo es la unidad anatómica y funcional del ovario (Yen, 2001) y su funcionamiento es mediado por gonadotropinas, factores de crecimiento, neurotransmisores y diversas relaciones intrafoliculares (Hafez y Hafez, 2002).

En la rata la foliculogénesis comienza 24 horas post-nacimiento, y pasa por un proceso de diferenciación que resultará en la formación masiva de folículos en un periodo de menos de 36 horas (Mayerhofer y col., 1997), después de esta fase organizacional (fase independiente de gonadotropinas), comienza la formación de los folículos primordiales, seguidos por un proceso de crecimiento y diferenciación dentro del cual adquieren receptores (aproximadamente en el séptimo día de vida postnatal) para gonadotropinas y son capaces de responder a ellas (fase dependiente de gonadotropinas)(Malamed y col., 1992, Mayerhofer y col., 1997).

En la mujer este proceso inicia desde la gestación, en la cuarta semana de vida embrionaria con la migración de las células germinales primordiales hacia las crestas gonadales, las cuales proliferan en el ovario embrionario hasta convertirse en ovogonias, entre la sexta semana de vida intrauterina su población se extiende por mitosis hasta alcanzar las diez mil células, al cumplir las 8 semanas ya se pueden encontrar aproximadamente seiscientos mil células, todo este proceso es regulado por tres eventos, mitosis, meiosis y atresia de las ovogonias, resultando en un número de células germinales de siete millones entre las 20 y 21 semanas de gestación (Strauss y Williams, 2014), mientras que al nacimiento se contarán con dos millones los cuales constituyen la reserva ovárica (figura 2) de la mujer (Vantman y Vega., 2010).





En su calidad de célula germinal, las ovogonias experimentan meiosis, entre la semana 8 y 13 de gestación entran en la primera profase meiótica y se transforman en ovocitos I, esta primera meiosis se detiene en el estado de dictioteno hacia finales de la profase I, no progresando a la metafase, entonces el núcleo es denominado vesícula germinativa por sus características morfológicas.

Este primer reposo meiótico en el humano depende de las concentraciones elevadas de adenosina-monofosfato cíclico (AMPc por sus siglas en inglés), la cual interactúa con las proteínas quinasas (PKA por sus siglas en inglés) regulando las purinas e inhibiendo la meiosis, sin embargo, también se han planteado otro tipo de factores como el inhibidor de la maduración de ovocito (OMI, por sus siglas en inglés) permitiendo que el arresto meiótico se extienda hasta 45 años (Abrir y col., 2004).

El crecimiento folicular inicia cuando los folículos primordiales emergen de la quiescencia y ocurre continuamente desde el sexto mes de vida intrauterina hasta la menopausia. La iniciación del crecimiento folicular involucra cambios en la morfología, incluyendo cambios en la forma de las células de la granulosa, el alargamiento del ovocito y la formación de la zona pelúcida (Gougeon, 1986).



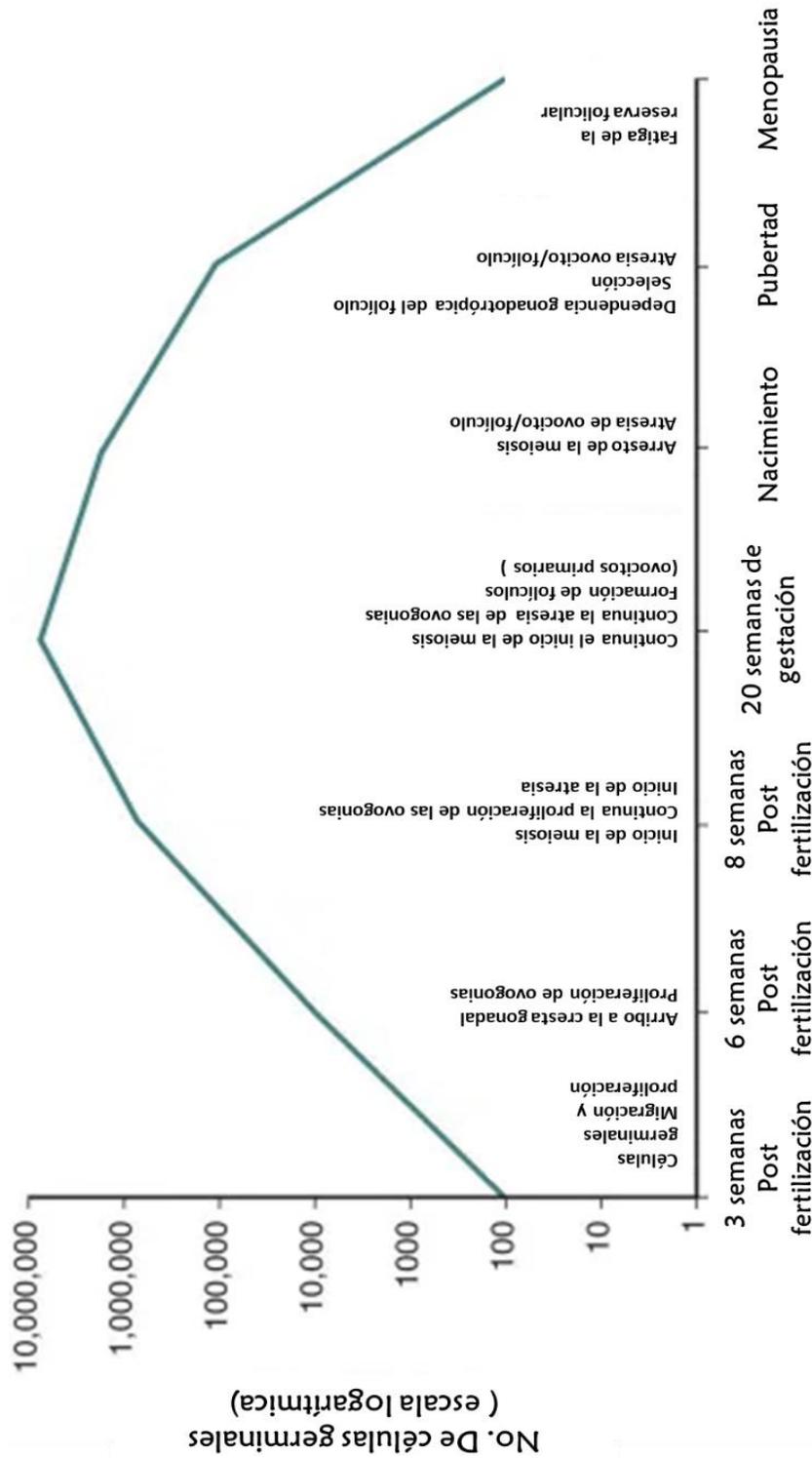


Figura 2. Esquema representativo de la cantidad de células germinales a la concepción y durante el desarrollo fetal. También muestra el número final de células que constituirán la reserva ovárica, así como la disminución del número de folículos a la menopausia (Tomado y modificado de Strauss y Williams, 2014).





Para su estudio la foliculogénesis se ha dividido en dos fases

Fase Folicular: En la rata, la etapa del proestro y el estro corresponden al periodo folicular, mientras que en la mujer inicia con el primer día de la menstruación comenzando con la fase de reclutamiento de los folículos hasta la aparición del folículo dominante (Hall, 2014).

Tanto en la mujer, como en la rata la concentración de FSH se encuentra alta al inicio de esta fase estimulando a varios folículos primordiales

Del día 9 al 14 los pulsos de GnRH (Hormona liberadora de las gonadotropinas por sus siglas en inglés) se dan cada 90 a 100 minutos, pero a mitad del ciclo la frecuencia se acorta hasta llegar a los 60 minutos, lo cual se relaciona con el feed-back negativo ejercido por el estradiol secretado por los folículos en crecimiento (Hall, 2014). Todo este circuito ayuda a que los folículos primordiales pasen a folículos primarios, antrales y preovulatorios (Yen, 2001).

En la rata, en el día del proestro, se alcanza la concentración más elevada de estradiol, para después descender y con ello dar paso a liberación de las gonadotropinas, la cual se produce en la noche del proestro (Freeman, 1994), las concentraciones de LH y de FSH se encuentran incrementadas, lo que ocasiona que las células de la granulosa entren en proliferación, mientras que las tecaes inician la síntesis de androstenediona y testosterona con lo cual se regula la maduración folicular (Levine, 2015).

En el estro la progesterona, estradiol y LH se encuentran basales, mientras que en las primeras horas del estro se observa un segundo pico de FSH, el cual se encuentra involucrado en la selección de los folículos que serán ovulados en el siguiente ciclo (Freeman, 1994)



Folículos Primordiales: Localizados en la superficie de la corteza del ovario (Yen, 2001; Flores y col., 2005). Con un diámetro aproximado de 0.05 mm (Erickson y Shimasaki, 2001). Contienen un ovocito primario, con un núcleo excéntrico rodeado de células planas llamadas pregranulosas (figura 3), las cuales se delimitan por una membrana basal. En la rata se encuentra un folículo a las doce horas del nacimiento, al llegar a las 24 horas podemos encontrar 500 por ovario y a las 36 horas aproximadamente 1300 (Malamed y col., 1992)

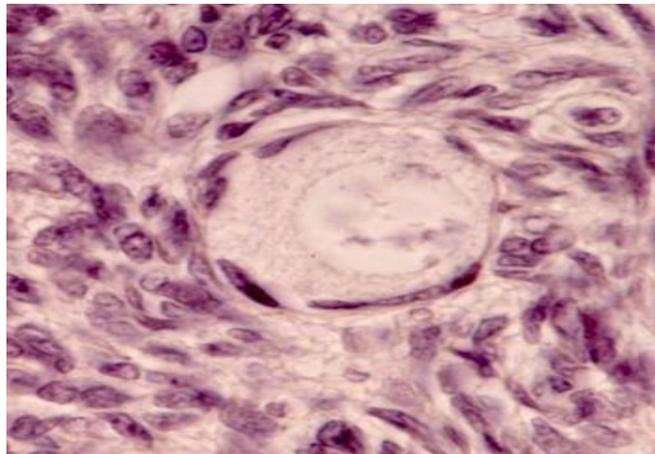


Figura 3. Microfotografía que muestra un folículo primordial rodeado de células pregranulosas y del estroma ovárico. Tomado de www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/atlas2013Agenitalfem1/images/image069.jpg

Folículos Primarios: Las células planas que rodean al ovocito se transforman en células cúbicas (figura 4) llamadas células de la granulosa (Levin, 2015; Flores-Pérez y col., 2005). Se forma la zona pelúcida, la cual es una capa de células con características retractiles y acidófilas, compuesta por glucoproteínas y glucosaminoglucanos, la cual nutre al ovocito. Estos folículos poseen un diámetro aproximado de 0.06 a 0.12 mm (Erickson y Shimasaki, 2001) y contienen de una a ocho células de la granulosa, las cuales secretan estrógenos e inhibina (Hirshfield, 1991).



Figura 4. Microfotografía que muestra un folículo primario, donde se muestra el cambio conformacional que muestran las células de la granulosa pasando de un epitelio plano a uno cúbico. Tomado de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/atlas2013A/genitalfem1/images/image055.jpg>

Folículos Secundarios: El crecimiento del folículo pasa de un diámetro de 0.03 mm a 0.12 mm con un aumento del número de capas de células de la granulosa que rodean al ovocito consistentes entre ocho y 10 capas de células de la granulosa (figura 5) (Erickson y Shimasaki, 2001; Vantman y Vega, 2010). En la rata, Los folículos secundarios aparecen desde el séptimo día de vida (Irusta, 2008).

El crecimiento de los folículos secundarios es inicialmente independiente de las gonadotropinas, ya que no expresan receptores a éstas, por lo que su desarrollo está bajo el control de los factores de crecimiento como son la proteína morfogenética del hueso 4 (BMP4), el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9), el factor de crecimiento de fibroblastos básicos (F), el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) y de Kit ligando (KL), esto antes de alcanzar el estadio antral (Noriko y col, 2015).



Se da una migración de las células que formaran la teca, esta migración es medida por señales provenientes de las células de la granulosa entre las cuales se incluyen KL y el factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF1). También depende de señales originadas en el ovocito, el cual expresa Factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDFG), GDF9 y BMP15. Tanto las señales originadas en las células de la granulosa como en el ovocito promueven la migración y la proliferación de las células tecales (Strauss y Williams, 2014).

Las células de la granulosa de un folículo secundario preantral, desarrollan receptores a FSH (alrededor de 1500 por célula de la granulosa), así como las uniones acopladas o uniones GAP (Vantman y Vega, 2010; Strauss y Williams, 2014). Junto con el desarrollo de las células de la teca se comienza a formar una red de vasos sanguíneos que darán origen a las arteriolas, estas transportarán a las gonadotropinas. Simultáneo a este proceso, los receptores de LH se comienzan a expresar en las células de la teca y con ello se adquiere la capacidad de sintetizar hormonas esteroideas (Strauss y Williams, 2014). Los folículos preantrales constituyen el pool del cual se iniciará el reclutamiento dependiente de FSH.



Figura 5. Microfotografía que muestra un folículo secundario, donde se muestra el aumento de las capas de células de la granulosa y las capas de las tecas tanto interna como externa. Se pueden observar también los cuerpos de Call-Exner, lo que constituirá al incrementar su tamaño el antro folicular. Tomado de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/atlas2013A/genitalfem1/images>





Folículo Terciario o Folículo de De Graff: Se comienza la formación del antro folicular y el desarrollo de las uniones comunicantes o GAP en las células tecaes, en las células de la granulosa y en las granulosa de la corona radiada, lo cual implica que el ovocito y las granulosa se encuentran eléctrica y metabólicamente acopladas, permitiendo una sincronización en respuesta a estímulos de diversos factores (Vantman y Vega., 2010).

Bajo el estímulo de la LH, la teca interna adquiere la capacidad de sintetizar andrógenos, el aumento de AMPc induce la expresión y la actividad de las diversas enzimas de la vía esteroidogénica (Vantman y Vega., 2010).

Las células de la granulosa se multiplican en unas 600 veces acompañado por un incremento simultáneo en el diámetro folicular total de más de 15 veces, esto debido en parte al crecimiento del antro folicular (Yen, 2001) por lo que el folículo alcanza un tamaño aproximado de 2.5 cm en la mujer, mientras que en la rata alcanza un tamaño de aproximadamente unas 500 μm (Peluso,1976) (figura 6).

El aumento de tamaño es debido a la gran concentración de líquido folicular, el cual contiene entre otras sustancias progesterona, necesaria para la ovulación, las células de la granulosa se disponen de manera uniforme a excepción de una zona en la cual se forma el *cumulus oophorus*, este lugar es donde se encuentra el ovocito (Hafez y Hafez, 2002).

La acumulación del líquido folicular es el responsable de que tanto el *cumulus oophorus* como la corona radiada se desprendan de la base, pendiendo de una unión muy frágil llamada pedúnculo de fijación, todo esto hace que la posición del ovocito sea excéntrica (Yen, 2001; Tresguerres y Castillo, 2005; Levine, 2015).



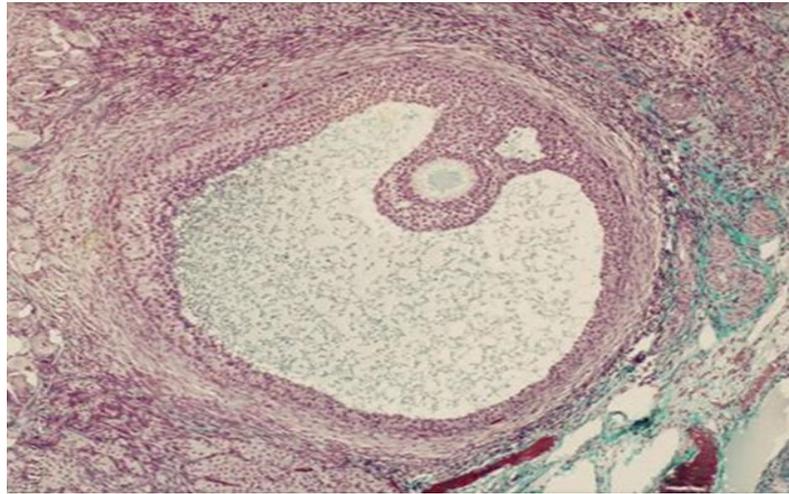


Figura 6. Microfotografía que muestra un folículo terciario o de De Graff donde se muestra el antro folicular completamente formado, así como la teca interna y externa, se aprecia también el cumulus oophorus. Tomado de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/atlas2013A/genitalfem1/images>

Fase Lútea: Inmediatamente después de la ovulación las células que formaron el folículo deben reorganizarse tanto estructural como funcionalmente para dar lugar a la formación de la glándula luteal, la cual está compuesta por una nueva red de vasos sanguíneos, células de la granulosa y de la teca (Pierson, 2019).

El cuerpo lúteo comenzará a producir la progesterona necesaria para mantener el proceso de gestación en caso de que el ovocito hubiese sido fertilizado (Pierson, 2019).

Este proceso se lleva a cabo en la mujer en el día 14 del ciclo menstrual y prevalece hasta el día 28, al acercarse el final de la fase lútea, la progesterona generada proporciona el feedback negativo para que el hipotálamo ya no produzca más FSH y LH, y con ello las concentraciones de 17- β estradiol y de progesterona son más altas, sin embargo, si no existe el embarazo, las concentraciones de estradiol y progesterona decaen y este evento hace que el cuerpo lúteo involucre.



En la rata la fase lútea es muy corta con una duración de aproximadamente de 2 días, con una escasa producción de progesterona, lo que ocasiona que el cuerpo lúteo involucre (Berne y Levy, 2001; Cora, 2015; Levin 2015).

En la rata el diestro corresponde a la fase lútea en donde se da un incremento en la concentración de progesterona, mientras que el estradiol y LH se encuentran basales (Levine,2015), puesto que el diestro es la etapa más larga, en el segundo día del diestro la concentración de estradiol comienza a aumentar de manera progresiva mientras avanza el ciclo estral (Levine,2015).

Ovulación

Una vez que el folículo alcanza el tamaño y la maduración adecuada, el pico de LH y de FSH reactivan algunos mecanismos que harán que el folículo se rompa y pueda liberar el ovocito secundario hacia el oviducto, este proceso puede tomar entre 10 y 36 horas dependiendo de la especie (Domínguez y col. 1991; Espey y Richards, 2005).

El pico preovulatorio de LH estimula y culmina la meiosis I del ovocito, dando lugar a un ovocito secundario el cual inicia su segunda división meiótica detenido en metafase. Este ovocito será el que se expulsará al momento de la ovulación y solo continuará su división si es que este llegase a ser fecundado. Las reacciones inflamatorias en el interior del folículo son provocadas por la lisis de los desmosomas ubicados en las células de la teca y de la granulosa, así como de las fibras de colágena que se encuentran en el folículo (Domínguez y col.1991; Sánchez-Criado, 1999).

Estos procesos inflamatorios causan la contracción de las fibras musculares presentes, lo cual culmina con la rotura de la pared del folículo (figura 7) (Domínguez y col, 1991).



A la par que se dan las reacciones inflamatorias también aumenta la concentración de las prostaglandinas las cuales ayudaran a la disgregación del *cumulus oophorus*, estas prostaglandinas ayudan a la formación del estigma en las células de la teca externa, por medio de la contracción de las células musculares lisas (Domínguez y col., 1991).

Una vez completado este proceso inflamatorio, la pared del folículo se colapsa y las células tecales migran hacia el antro folicular, que en conjunto con las células de la granulosa comenzarán a llenar la cavidad, iniciándose así la formación del cuerpo lúteo, el cual sintetizará progesterona (Domínguez y col., 1991; Moore y col., 2013).



Figura 7. Imagen que muestra el estigma y la liberación del ovocito. Tomada de ([https://www.babysitio.com/preconcepcion/la-ovulación](https://www.babysitio.com/preconcepcion/la-ovulacion)).



Atresia Folicular

La atresia es un proceso que se da de manera normal en el ovario, por medio del cual se eliminan todos los folículos que no hayan sido ovulados, este proceso se puede presentar en cualquier estadio del desarrollo folicular (Greenwald y col., 1994).

En la mujer existe una reducción en el número de ovocitos por medio de apoptosis, ya que el proceso de ovogénesis se inicia en la etapa fetal contando con seis millones de ovocitos, mientras que al momento del nacimiento contará con dos millones, de los cuales solo 400 serán ovulados en la etapa fértil a razón de uno por mes (Botella, 2005; Berne y Levy, 2006).

La atresia de los folículos puede ser dividida en dos tipos **Tipo A:** Involucra procesos de necrosis, con cambios en el ovocito. **Tipo B:** Existe degeneración de las células de la granulosa, sin afectar al ovocito y la zona pelúcida (figura 8) (Greenwald y col., 1994).

En el ovario existen diversos factores que se encargan de dirigir el proceso de atresia, como los andrógenos, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleucina 6 (IL-6), que se activan dependiendo del estado de los folículos (Flores- Pérez y col., 2005; Kapia y Hsueh, 1997).

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

La muerte del ovocito y su comunicación con las células de la granulosa, permiten la expresión de factores como el GDF-9, el cual permite a los folículos continuar con su crecimiento, pero no su desarrollo (Ojeda y Skinner, 2006).





La pérdida de los receptores de FSH, en las células de la granulosa no permite la correcta aromatización de los andrógenos, sin embargo, las células tecales aún mantienen la síntesis de progesterona y de AMPc (Erickson, 1982 en Domínguez y col,1991).

Para poder establecer el grado de atresia que mantiene los folículos, se han determinado diversos criterios (Hsueh y col. 1994).

- ✧ **Atresia I:** Los núcleos se encuentran picnóticos en las células de la granulosa.
- ✧ **Atresia II:** Se encuentran células de la granulosa dentro del antro folicular.
- ✧ **Atresia III:** Existe una fragmentación del ovocito, las células de la teca interna se encuentran hipertrofiadas y se observan pocas células de la granulosa.



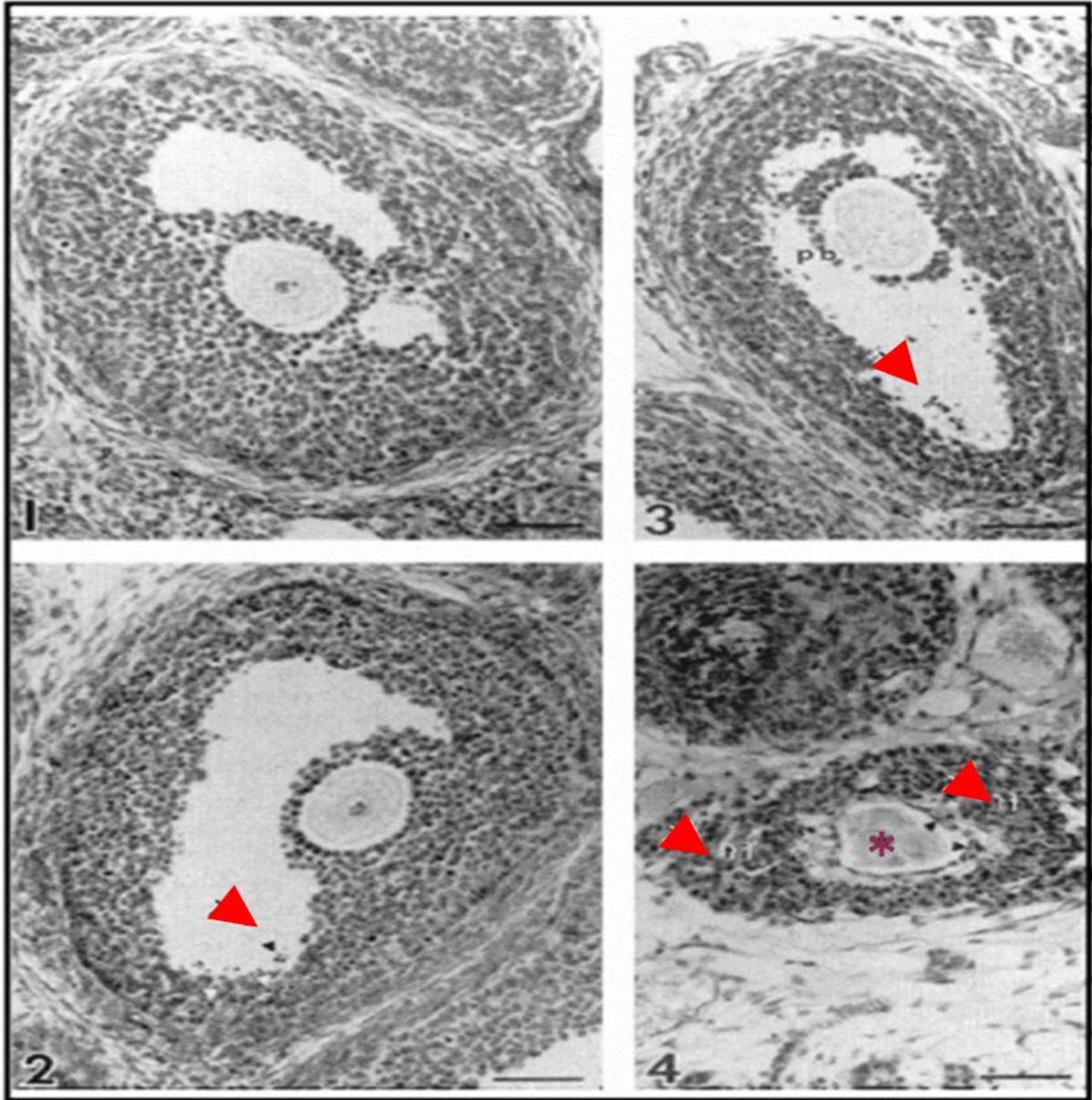


Figura 8. Microfotografías de cortes histológicos de rata que muestran los diferentes grados de atresia folicular. **1.-**muestra un folículo ovárico sano. **2.-** Folículo en atresia grado I donde las células de la granulosa presentan núcleos picnóticos, la flecha señala indicios de descamación . **3.-** folículo en atresia grado II las flechas señalan restos celulares en el antra folicular .**4.-** se muestra un folículo con atresia grado III, donde el asterisco indica la fragmentación del ovocito, los triángulos rojos indican la hipertrofia de las células tecales, las células de la granulosa son poco visibles y el folículo se encuentra colapsado. Las barras inferiores indican una escala de 50 μm (Tomado de Irusta, 2008).



Esteroidogénesis Ovárica

El ovario produce estradiol y progesterona, así como cantidades pequeñas de estrona, androstenediona, testosterona y 17- α hidroxiprogesterona, también hormonas proteicas como la inhibina y la relaxina, todas estas hormonas producidas por las diferentes estructuras ováricas y el cuerpo lúteo (Tresguerres y Castillo, 2005).

Todas las hormonas esteroideas ováricas dependen del colesterol que puede ser obtenido a partir de diferentes fuentes (Hu y col., 2010):

- ✧ El colesterol que circula en la sangre en forma de lipoproteínas de alta (HDL) o baja densidad (LDL), el cual dependerá de la especie en estudio, en la rata la fuente más utilizada es a partir del HDL y en la mujer la principal fuente es LDL.
- ✧ El colesterol que es sintetizado de novo dentro del ovario a partir de acetil coenzima A.
- ✧ O bien, del colesterol que se libera de los esteres de colesterol almacenados en gotas lipídicas.

En las gónadas la internalización del colesterol requiere de una respuesta aguda para su conversión en pregnenolona, por lo que este proceso se lleva a cabo en minutos, inicia con el estímulo de los mensajeros primarios de naturaleza hormonal como lo son la LH y la FSH los cuales tienen receptores en la membrana de las células de la teca y de la granulosa respectivamente (Gómez-Chang y col., 2012; Strauss y Williams, 2014).

La unión de FSH y LH con su receptor activan una cascada de señalización (figura 9) por medio de la activación de adenilato ciclasa y catalizando la formación de AMPc intracelular mediado por Adenosín trifosfato (ATP).



El AMPc actúa entonces como un segundo mensajero estimulando a las PKA, las cuales ayudan a que la proteína de regulación esteroideogénica aguda (StAR) transporte el colesterol hacia la mitocondria y promueva así la esteroideogénesis en el ovario (Gómez-Chang y col., 2012).

Una vez que el colesterol se encuentra dentro de la mitocondria, el complejo P450 scc inicia su conversión a pregnenolona, la cual es limitante en el proceso de producción de hormonas esteroideas, por medio de tres reacciones, una 20 α -hidroxilación, 22 hidroxilación y un corte en la unión carbono-carbono 20,22 (Hu y col., 2010).

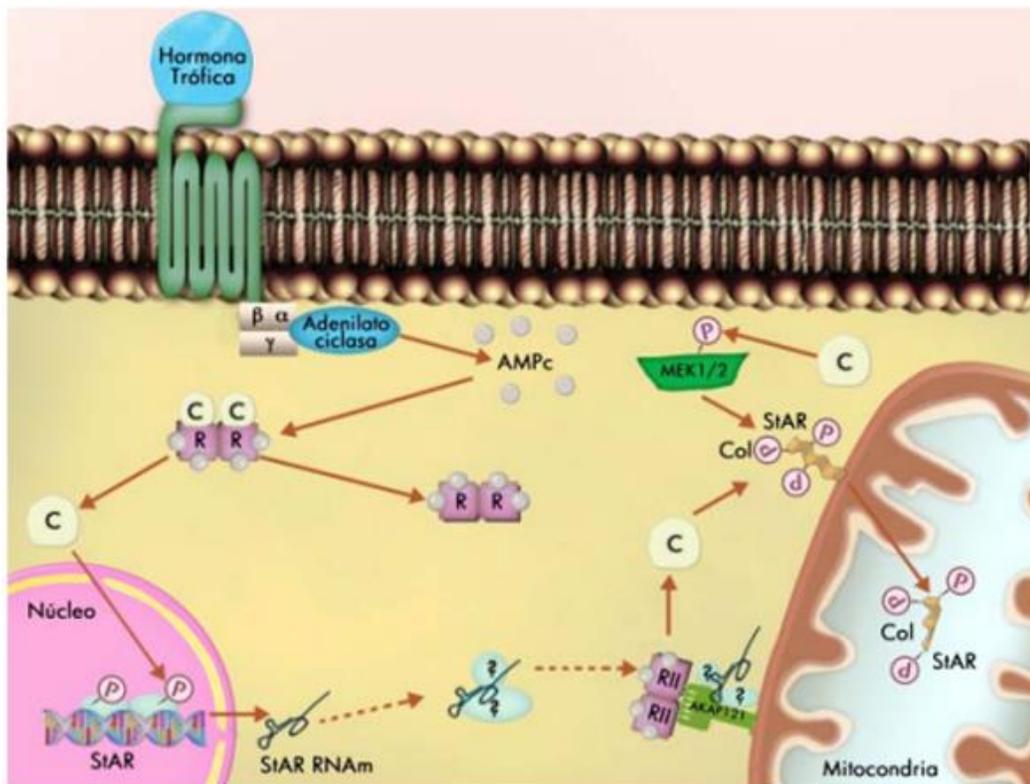


Figura 9. Muestra la regulación de la esteroidogénesis. La activación de receptores acoplados a proteínas G y de la vía mediada por AMPc-PKA produce la fosforilación de la proteína StAR o de factores de la transcripción, donde C: colesterol, R: receptor, P: fósforo (Tomado de Gómez-Chang y col., 2012).



La pregnenolona será liberada al retículo endoplásmico en donde podrá seguir dos vías:

✧ **Vía $\Delta 4$:** llevada a cabo por el cuerpo lúteo, donde por acción de la enzima 3β hidroxisteroide deshidrogenasa (3β -HSD) la pregnenolona es convertida a progesterona.

Posteriormente esta progesterona puede ser convertida a 17α hidroxiprogesterona por medio de la 17α -hidroxilasa, y al actuar la $17, 20$ liasa en androstenediona, siendo este último el precursor de los andrógenos (Hu y col.,2010).

✧ **Vía $\Delta 5$:** es llevada a cabo por los folículos ováricos. En las células tecales, la pregnenolona es transformada en 17α -hidroxipregnenolona por acción de la enzima 17α -hidroxilasa. La 17α -hidroxipregnenolona es convertida en progesterona por medio de la 3β -HSD y por acción de la $17, 20$ liasa puede ser convertida en dehidroepiandrosterona (DHEA) pudiéndose biotransformar por la 3β -HSD en androstenediona (figura 10) y testosterona (Yen, 2001).

Las células de la granulosa llevan a cabo la aromatización de los andrógenos a estradiol mediante la enzima CYP19 aromatasas, la cual es encontrada en grandes cantidades en la granulosa (Tresguerres y Castillo,2005).



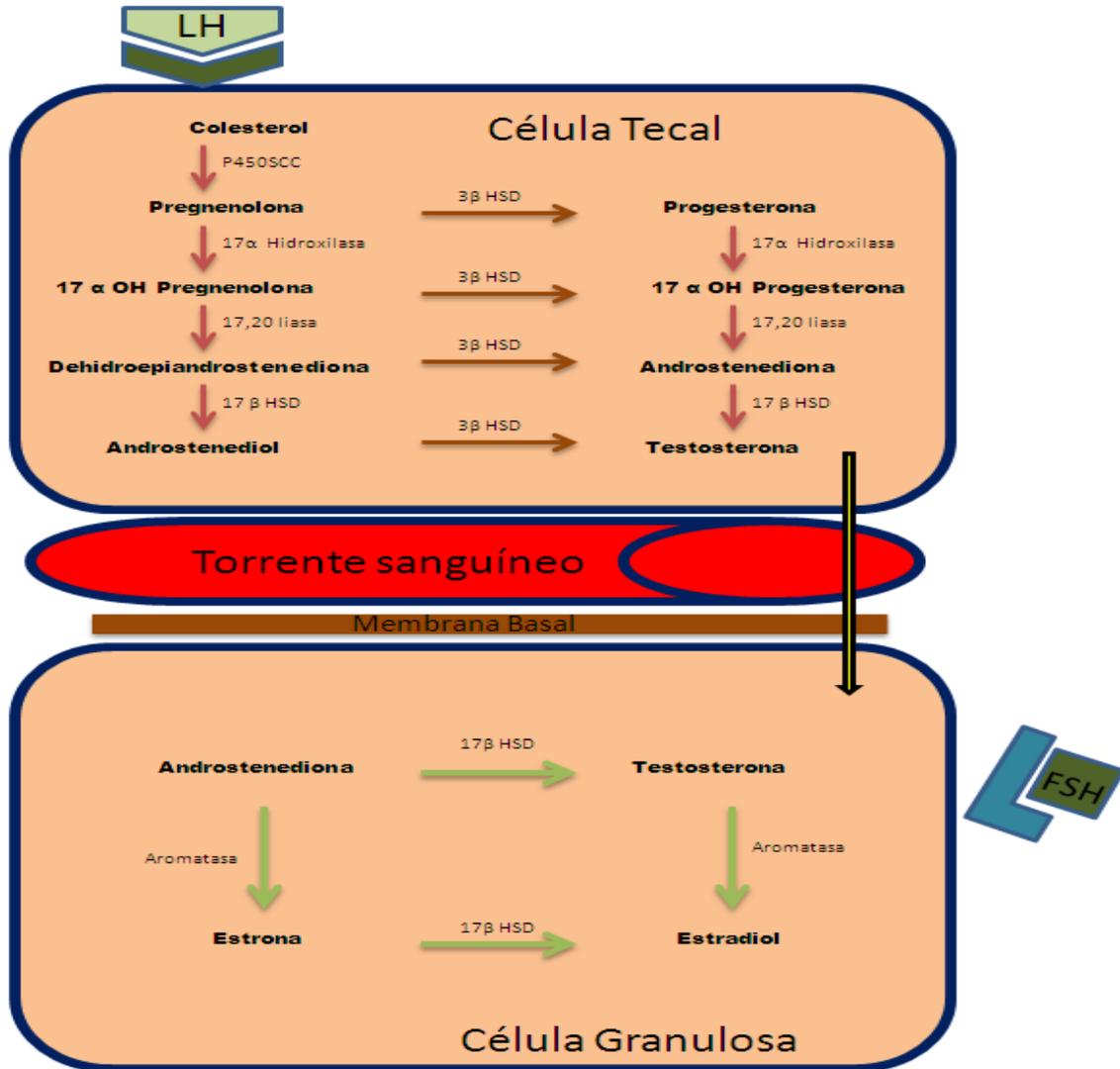


Figura 10. Esquema que muestra la síntesis de hormonas esteroides llevada a cabo por la interacción de las células de la granulosa y de la teca (Tomado de Tres Guerres y Castillo, 2005)





Regulación neuroendocrina del eje hipotálamo hipófisis ovario

El ovario posee 2 mecanismos de regulación estrechamente relacionados, un componente nervioso y un sistema endocrino orquestado por el eje Hipotálamo-Hipófisis- Ovario (H-H-O), donde en el hipotálamo existen alrededor de 1000 neuronas capaces de secretar GnRH, las cuales controlan la secreción de las gonadotropinas (Trujillo y col., 2015).

La GnRH es producida por un grupo de neuronas hipotalámicas originadas en la placa olfatoria de donde migran hacia áreas rostrales del diencefalo como el área preóptica hipotalámica anterior (POA-AHA) y los núcleos arqueado y ventromedial del hipotálamo (Trujillo y col., 2015).

En la eminencia media, la GnRH es liberada por las terminales axónicas de las neuronas GnRHérgicas, donde se unirá a receptores específicos localizados en la membrana plasmática de los gonadotropos favoreciendo así la secreción de las hormonas FSH y LH, cuya secreción se encuentra regulada por mecanismos de feedback positivos y negativos que se ejercen en el eje H-H-O (Tresguerres y Castillo, 2005; Trujillo y col., 2015).

En los folículos, la FSH estimula a las células de la granulosa para que produzcan inhibina, la cual alcanza su máximo pico junto con la LH en la fase folicular, lo cual frena la secreción de FSH.

Cuando la ovulación se ha completado la concentración de inhibina aumenta incluso a valores más altos que en la fase folicular, con lo cual el ovario deja de producir andrógenos dependientes de las gonadotropinas, la activina por su parte actúa como un antagonista de la inhibina, y esto hace que en los folículos se incremente la unión de la FSH a las células de la granulosa y se dé el estímulo para la aromatización y secreción de inhibina (Trujillo y col., 2015)



Mientras todo esto se lleva a cabo en las células de la granulosa, al mismo tiempo en las células tecales, tanto inhibina como activina se encuentran regulando la síntesis de andrógenos, mientras que inhibina incrementa el estímulo de LH activina lo suprime. Activina también actúa en las células de la granulosa suprimiendo la producción de progesterona con lo cual se inhibe su luteinización, incrementa la acción de FSH al inducir la formación de más receptores a LH en las células de la granulosa y frena la liberación de FSH hipofisiaria (Trujillo y col., 2015).

Inervación ovárica

La inervación ovárica consta de un componente simpático, uno sensorial y escasas fibras parasimpáticas. El soma de las neuronas simpáticas está localizado en los núcleos espinales de los ganglios periféricos y tiene dos vías por las cuales pueden ingresar (Dissen y Ojeda, 1999), las cuales son:

Nervio Ovárico Superior (NOS): Asociado al ligamento suspensorio del ovario, por el transcurren neurotransmisores como la noradrenalina (NA), el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y el neuropéptido Y (NPY) (Greiner y col., 2005). Esta inervación llega a vasos sanguíneos, las células tecales y las células que componen la glándula intersticial (Gerendai y col., 2000).

Nervio del Plexo Ovárico: Son fibras sensoriales que viajan junto con la arteria y la vena ovárica, por donde transcurren la sustancia P (SP), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), también se incluyen fibras que transportan NA y NPY e inervan la región de la corteza ovárica y las paredes de los folículos (Diessen y Ojeda, 1999; Fernandois y col., 2014).





Inervación Parasimpática: Las fibras que inervan los ovarios, provienen del X par craneal, el cual es conocido como nervio vago y está constituido por fibras de naturaleza parasimpática (Burden y Lawrence, 1977), por las cuales transcurren neurotransmisores como SP, CGRP, VIP, gastrina, somatostatina y acetilcolina (ACh) (Klein y Burden, 1988).

Inervación Simpática del ovario

De acuerdo con Lawrence y Burden (1980) el nervio ovárico superior es la principal vía de entrada de la inervación noradrenérgica del ovario, sin embargo, la descripción y análisis completo de las vías de comunicación del ovario con el sistema nervioso central aún se encuentran en estudio, hablándose así de una posible comunicación asimétrica entre ambos ovarios (Pastelín y col., 2017).

En la rata, las fibras simpáticas se encuentran en los segmentos torácico inferior (T9) y los lumbares superiores (L4) (Burden, 1978; Uchida y col., 2015) (figura 11), algunas de estas fibras nerviosas realizan relevos en ganglios paravertebrales o bien prevertebrales como lo es el Ganglio celiaco mesentérico superior (GCMS) (Klein y Burden, 1988).

Las fibras nerviosas del NOS carecen de mielina (Strauss y Williams.,2014) y desde el GCMS acompañan al ligamento suspensorio y dan inervación a las estructuras secretoras del ovario como son los folículos únicamente a nivel de la teca y las células intersticiales (Burden y Lawrence, 1980).

Las fibras simpáticas se encuentran activas desde antes de que exista un establecimiento del eje H-H-O y de que se inicie la foliculogénesis (Mayerhoffer y col., 1997), de esta manera participan en varios procesos importantes como son el desarrollo folicular, la ovulación y la esteroidogénesis por medio de los neurotransmisores que transcurren por ellas, vía la unión a su receptor (Morales Ledesma y col., 2015).



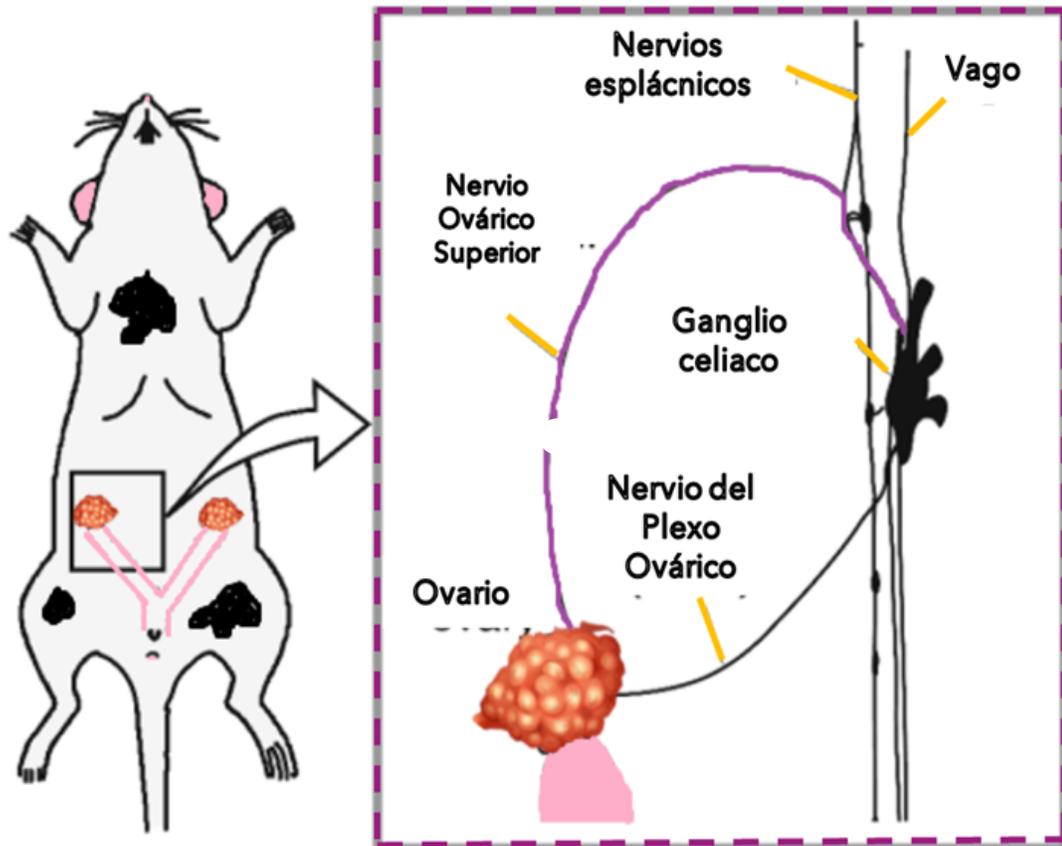


Figura 11. Esquema que muestra la representación de la ubicación del nervio ovárico superior (NOS), el nervio del plexo ovárico (NPO) y el nervio vago en la anatomía de la ratona. El NOS es el aporte de las fibras simpáticas que inervan el ovario (Tomado y modificado de Uchida y col., 2015).

La distribución de las fibras simpáticas en los mamíferos es muy similar y difieren solo en la densidad de la red que la conforma, la cual si es significativa entre especies (Burden, 1985).





*Inervación Simpática del Ovario en el Síndrome de Ovario
Políquístico*

El NOS tiene un papel importante en la regulación de las funciones ováricas y se piensa que también pueden ser parte fundamental en el desarrollo de diversas patologías ováricas como lo es el Síndrome de Ovario Poliquístico (SOPQ) (Lara y col., 1993).

El grupo de Semenova II en 1969 demostró por inmunohistoquímica que existe un incremento en la densidad de las fibras catecolaminérgicas en mujeres que padecían SOPQ. El grupo de Lara en 1993 demostró en un modelo animal tratado con un estrógeno de larga actividad que reproduce las características del síndrome, que existe una hiperactividad de las neuronas periféricas simpáticas que inervan el ovario.

Para que los ovarios mantengan su función y desarrollo es necesario que estos produzcan NGF el cual es sintetizado en las paredes foliculares y que es activado mediante la unión a su receptor de baja afinidad p75, esta unión provoca una cascada de señalización, donde al llegar al ganglio GCMS provoca un aumento en la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de las catecolaminas, lo que incrementa la concentración de NA y esto se ha observado antes de la producción de los quistes foliculares, manteniendo así la persistencia del síndrome (Lara y col., 2000).

Estudios realizados por el grupo de Shoupe y Lobo en 1984, mostraron que en mujeres que presentan el síndrome, existe una reducción del ácido homovanílico (HVA por sus siglas en inglés), el cual es el metabolito terminal de la dopamina y un aumento en la concentración de 3 metoxi-4 hidroxifenilglicol (MHPG por sus siglas en inglés) en la orina de las mujeres.

Puesto que la medición en orina de HVA es altamente confiable, los autores, proponen que existe una disminución central de la dopamina y un exceso de la noradrenalina debido a que la excreción del MHPG es un reflejo de una mayor actividad noradrenérgica.





García-Rudaz y colaboradores (1998), encuentran que en pacientes con síndrome existe una cantidad elevada de normetanefrina, metabolito de la NA y bajos niveles de hidroxifenilglicol (DHPG por sus siglas en inglés), el cual es el principal metabolito presináptico de la NA, con lo cual los autores sugieren que existe una disrupción en la recaptura de la NA o bien una desaminación de DHPG.

Luna y colaboradores en 2012 demostraron que la NA y los receptores β_2 adrenérgicos, se encuentran involucrados en la persistencia del síndrome. La inyección subcutánea por 10 días con isoproterenol, un agonista de los receptores β_2 adrenérgicos, resulta en la disminución del número de folículos preantrales sanos y en el incremento de la formación de quistes foliculares. Cuando se administra de manera simultánea el isoproterenol con un antagonista adrenérgico, como el propranolol, el número de quistes es similar a los observados en el grupo control.

La rata infantil tratada con VE, no ovula cuando alcanza la etapa adulta. Cuando se realiza la sección unilateral del NOS, el 80% de los animales ovula por el ovario inervado, mientras, que solo el 20% lo hace por el ovario denervado. Resultados que permitieron sugerir que la información neural que transporta el NOS participa en el mantenimiento del SOPQ (Morales y col., 2010).

Es posible que la respuesta del ovario denervado esté dada por el incremento en la concentración de NGF. El grupo de Lara (1990), mostró que en ratas de 23 días de edad la sección del NOS incrementa la concentración de NGF en el ovario denervado, seis días post denervación.





Síndrome de Ovario Poliquístico

Se tiene registro desde la antigüedad, que mujeres en edad reproductiva presentaban signos de masculinidad y robustez y no presentaban ciclos menstruales y no podían quedar gestantes (Ciotta y Stracquadario, 2015). Fue hasta el año 1935 que Stein-Leventhal describen en 7 mujeres la presencia de amenorrea, hirsutismo y obesidad, aunado a esto presentaban quistes ováricos. Actualmente esta patología es conocida como SOPQ.

Debido a lo complejo de su etiología diversos institutos han establecido patrones de diagnóstico (Gasol,2005). En 1990 el Instituto de Salud Infantil y Desarrollo Humano (NICHD por sus siglas en inglés) lo define como la presencia de un exceso de andrógenos con oligo-anovulación más la presencia de quistes ováricos, en ausencia de alguna otra patología que ocasionara que los andrógenos estuviesen elevados (Síndrome de Cushing, hiperplasia adrenal) (Luján y col., 2006). Por lo que los criterios a considerar para este instituto son los siguientes:

- ✘ Hiperandrogenismo clínico o bioquímico
- ✘ Oligomenorrea (menos de 6 menstruaciones por año) u oligo- ovulación
- ✘ Ovarios poliquísticos detectados por ultrasonido (más de 12 folículos antrales en un ovario con un volumen mayor a los 10 cm³).

En el 2003 el Consenso de Rotterdam concuerda que, de los criterios que el NICHD había previamente establecido, sería necesaria contar con la presencia de 2 de ellos, generándose una controversia ya que permitía el diagnóstico del síndrome aún sin la presencia de hiperandrogenismo (Merino y col., 2009).





Se dictamina en el 2009 un nuevo esquema de diagnóstico cuando la Sociedad del Exceso de Andrógenos y Síndrome de Ovario Poliquístico (AES-PCOS por sus siglas en inglés) y proponen como principal característica de diagnóstico al hiperandrogenismo ya fuese clínico o bioquímico, el cual puede estar acompañado ya sea de oligomenorreas u ovarios poliquísticos (Azziz y col., 2009; Luján y col., 2006).

Resulta muy difícil establecer la prevalencia del síndrome, debido a que depende de los criterios utilizados, así como de la zona geográfica en la que se esté diagnosticando, sin embargo, muchas mujeres siguen siendo esquematizadas bajo los criterios de Rotterdam, con lo cual aumenta la incidencia de los casos en aproximadamente un 50 % (al menos en mujeres del sur de Asia vs las caucásicas) (Gasol,2005; Khan y col., 2019).

Hoy en día el síndrome se ha reclasificado en cuatro fenotipos:

A: el cual incluye al hiperandrogenismo ya sea clínico o bioquímico, la disfunción ovulatoria, y la morfología ovárica característica (más de 12 quistes ováricos)

B: hiperandrogenismo y la disfunción ovulatoria

C: hiperandrogenismo y la morfología ovárica característica

D: incluye la disfunción ovulatoria y la morfología ovárica característica.

De las mujeres que presentan el SOPQ, la proporción de los fenotipos **A** y **B** se estima en un 45%, el **C** en un 35% y el **D** en aproximadamente el 20 %, siendo los fenotipos **A** y **C** considerados los más severos ya que en ellos se hace presente el hiperandrogenismo (Stener-Victorin y col., 2021).





El criterio utilizado hoy en día, es el dictaminado por la AES-PCOS, donde podemos encontrar una incidencia del 3 al 7% de las mujeres en edad reproductiva, en donde entre el 60 y 90 % de las mujeres tendrá presente el hiperandrogenismo.

Las cifras a nivel mundial oscilan entre el 5 y el 15% de las mujeres en edad reproductiva de los 18 a los 44 años (Khan y col.,2019), mientras que para México esta tasa se encuentra entre el 6 y 10 % (Moran, 1994; Azziz, 2004; Moran, 2010).

El síndrome, tiene una etiología (Figura 12) multifactorial, poligénica, sistémica, inflamatoria, con una disfunción esteroidea y autoinmune (Patel, 2018) con una heredabilidad cercana al 70 % (Stracquadanio y Ciotta, 2015).

Diversos estudios han demostrado que en familiares y hermanas se encuentra una herencia de tipo autosómica dominante ya que su prevalencia en estos casos es muy cercana al 60 %, mientras que en gemelas se estima cercana al 72 % (Khan y col.,2019).

Las hijas de madres con SOPQ tiene 5 veces más riesgo de presentar un diagnóstico positivo, sin embargo, aún no se tiene claro cuál es el proceso por el que se hereda la patología, aunque se han identificado algunos locis asociados al síndrome, estos solo presentan un 10 % de heredabilidad, cuando se estima que esta es de hasta un 70 % (Stener- Victorin y col., 2021).

En los varones que proceden de madres con SOPQ, se ha demostrado que presentan marcadores que aparecen en la patología como lo es el de la resistencia a la insulina y disfunción en las células β , presentándose las anomalías por debajo de los 8 años, mientras que en varones nacidos de madres sin SOPQ estas condiciones se presentan tarde en la vida (Stener- Victorin y col., 2021).





Fenotipos favorecedores/Genotipos protectores

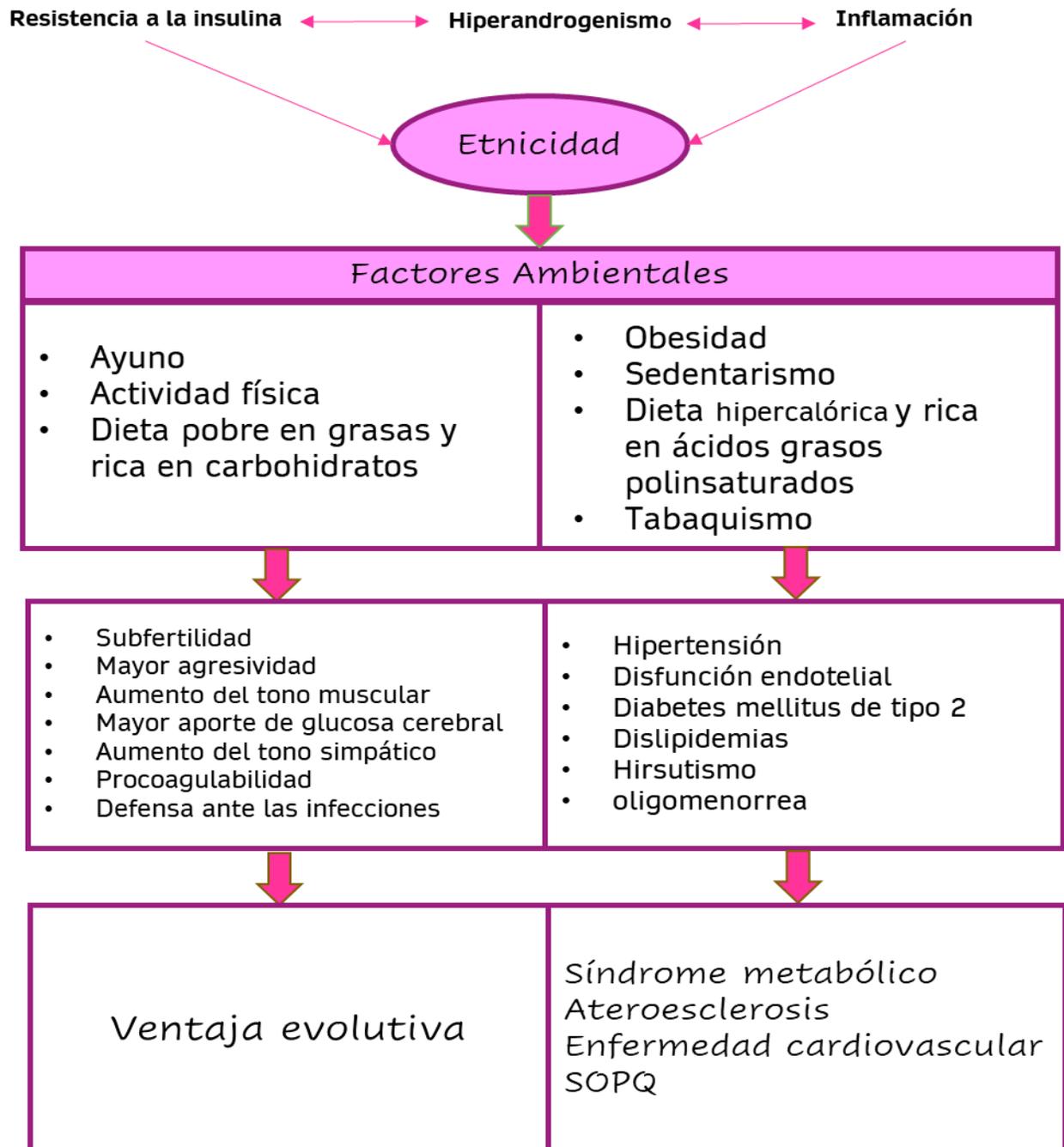


Figura 12 Esquema que muestra el carácter multifactorial del SOPQ (Tomado de Gasol,2015).





Hipótesis sobre el Origen del Síndrome de Ovario Poliquístico

Dada la heterogeneidad del síndrome, resulta difícil establecer su etiología. Diversos autores han planteado algunas hipótesis para poder explicar su origen, dentro de las cuales las más estudiadas son las siguientes:

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

Existen mecanismos de asa corta que controlan la secreción de GnRH, como la presencia de Kisspeptina y de GCRP 54, las cuales ayudan con la regulación de las secreciones, donde Kisspeptina es un potenciador del pulso y de la duración de la GnRH y CGR 54 actúa como un inhibidor de esta (Ben-Shlomo y Shlomo M,2011).

El péptido parecido a la Galanina (GALP, por sus siglas en inglés) tiene un efecto de estimulación directa en la liberación de GnRH, sin embargo, junto con la Kisspeptina expresan receptores a leptina, los cuales están ligados a la función de la neurona GnRH y ambas están ligadas a la función del sistema reproductivo (Ben-Shlomo y Shlomo M,2011).





Insulinorresistencia: En las mujeres que presentan SOPQ, se da una resistencia a la insulina en el tejido adiposo y músculo esquelético en términos de captación de glucosa, sin embargo, el ovario sigue siendo sensible a la insulina en términos de respuesta hormonal, se sabe que este mecanismo es único en el síndrome ya que es independiente de la intolerancia a la glucosa, así como de las concentraciones de insulina presentes en el organismo y de la cantidad de la grasa corporal (parámetros que si están reportados en los desórdenes metabólicos) (Dunaif y col, 1995; Blasch, 1999).

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

En el ovario la insulina actúa por diferentes vías:

- ✕ Actúa de manera sinérgica con la LH,
- ✕ Estimula a su receptor en las células tecales y del estroma ovárico,
- ✕ Incrementa la síntesis del IGF-1.
- ✕ Utilizan receptores híbridos IGF-1.

En el ovario, la insulina provoca un aumento de la síntesis de andrógenos, esto ocasionado por el incremento de la enzima P450 17 α , pero también este aumento se ve en las células reticulares de la glándula suprarrenal incrementando la secreción de dehidroepiandrosterona (DHEAS), potenciando la acción de la hormona adrenocorticotropica (ACTH), por lo que se sugiere que la insulina es un activador fisiológico de la esteroidogénesis adrenal (Tosi y col., 2011)





Por otra parte, esta insulinoresistencia bloquea la síntesis hepática de la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG por sus siglas en inglés) y ello incrementa la concentración de andrógenos libres (Caro y col., 2002).

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

Inervación: En roedores la inducción del SOPQ por la inyección de VE, un estrógeno de larga actividad, incrementa en el ovario la expresión del NGF y su receptor de baja afinidad el p-75 (Sotomayor- Zárate y col., 2007), este receptor al unirse al NGF, produce una casacada de señalización que al llegar al GCMS, provoca un aumento en la actividad de la TH, enzima limitante en la síntesis de catecolaminas, lo que resulta en el incremento en la concentración de NA, la cual viaja por el NOS hacia el ovario (Lara y col., 2000).

Las estructuras productoras de andrógenos en el ovario (las células de la teca y la glándula intersticial) se encuentran inervadas por el NOS, por el cual transcurren altas concentraciones de NA.

La NA tiene efecto mitogénico sobre las células tecaes que culmina con una sobreproducción de andrógenos (Seya y col., 2006; Liu y col., 2007) y por ende con un hiperandrogenismo. Por lo que el efecto de la hiperactividad simpática estaría manteniendo la persistencia del SOPQ.





Inducción del Síndrome de Ovario Poliquístico por medio de Valerato de Estradiol

Con el fin de entender la fisiopatología de SOPQ se han utilizado diversos modelos animales, entre los que se incluyen roedores, ovejas y primates. Sin embargo, los roedores ofrecen una alternativa efectiva debido a su constante reproducción y a su corto ciclo de vida, además permiten la posibilidad de controlar los factores ambientales en los que permanecen (Franks, 2009). La capacidad reproductiva de los roedores es similar a la de la mujer, en cuanto a los procesos que involucran al eje H-H-O, así mismo la regulación del desarrollo de los folículos y la ovulación presentan similitudes (Walters y col., 2012). La exposición natural o ambiental a componentes estrogénicos en etapas tempranas causan una disrupción en la función endócrina y ovárica (Cruz y col., 2012).

En la rata, la inyección de VE en diferentes estadios de edad promueve una condición anovulatoria, la cual está caracterizada por el daño folicular y la presencia de quistes en el estadio adulto. Se ha sugerido que la exposición en la etapa prenatal, afecta las crías por medio de una reprogramación epigenética, de manera que, al llegar a la etapa adulta presentan el fenotipo del síndrome (Cruz y col., 2012).

Tanto en las ratas neonatales, como infantiles y juveniles los efectos de la inyección del estrógeno son permanentes, incrementando en el ovario la expresión del NGF y su receptor de baja afinidad el P-75 (Sotomayor-Zárate y col., 2007; Lara y col., 2000), ocasionando pérdida de la ciclicidad estral, cornificación vaginal persistente, cambios en la morfología de los ovarios haciéndolos más pequeños y sin presencia de cuerpos lúteos nuevos, además de encontrarse una población reducida de folículos secundarios, también se encuentra la presencia de quistes foliculares, en los cuales se distingue un adelgazamiento de las capas de células de la granulosa y un engrosamiento en las células de la teca (Brawer y col., 1986).





Infertilidad

Se define a la infertilidad como una disminución en la capacidad de concebir y procrear y es un estado reversible, clínicamente se dice que una mujer es infértil cuando existe una incapacidad de concebir después de 12 meses de relaciones sexuales sin método anticonceptivo (Barbieri, 2002).

Se estima que la tasa de infertilidad está dada a razón de 1 de cada seis parejas que desean concebir, es decir que afecta entre el 15-20 % de parejas en edad reproductiva y si bien no es una condición que amenace la vida, tiene repercusiones a nivel del desarrollo social y psicológico de los individuos que la padecen (Burgo-Olmedo y col., 2003).

Una de las primeras causas de infertilidad es el SOPQ, siendo la principal causa de infertilidad anovulatoria en el 80% de los casos. La Organización Mundial de la Salud, reporta como causas de la infertilidad al factor tubario, con inclusión de la endometriosis en un 42 % de los casos y a los trastornos ovulatorios en un 33 %.

En México se reporta el factor endocrino- ovárico alterado en el 35% de los casos, siendo el SOPQ la alteración más frecuente con el 43% de los casos (Vargas y col., 2005).

La infertilidad anovulatoria es una condición en la cual el desarrollo y la ruptura del folículo se encuentran alterados y por lo tanto el ovocito no puede ser liberado del folículo (Franks, 1991), esta se encuentra correlacionada con la amenorrea u oligomenorrea severa.

La infertilidad anovulatoria está relacionada con cualquiera alteración que pueda interferir con la secreción de GnRH a nivel de hipotálamo o bien con la liberación de las gonadotropinas a nivel de la hipófisis (Magendzo, 2010), como ocurre en el SOPQ.





Periodo Gestacional

Tanto en la mujer como en la rata el aparato reproductor está integrado por los oviductos, el útero, el cérvix y la vagina. El útero de la rata a diferencia del de la mujer, posee dos cuernos uterinos que se encuentran completamente separados, la pared uterina puede ser dividida en tres capas funcionales

Endometrio: posee un epitelio cilíndrico simple que reviste el lumen del útero, por debajo de él y separado por una membrana basal encontramos tejido conectivo laxo muy vascularizado, también se encuentran glándulas uterinas que son invaginaciones del epitelio luminal (Geneser, 2000).

Miometrio: Constituido por dos capas de músculo liso, una interna que se encuentra orientada circularmente y la externa longitudinalmente (Geneser, 2000).

Perimetrio: Lo constituye tejido conectivo laxo, presenta mucha vasculatura, vasos linfáticos y fibras nerviosas (Geneser, 2000).

El **Cérvix** es un anillo fibroso ubicado entre la vagina y el útero, en la rata se encuentra dividido en un septum cervical que lo divide en dos y ambos conductos desembocan en la vagina (Nalbandov, 1996).

El cérvix durante el parto sufre modificaciones que hacen que la colágena se remodele lo que como consecuencia trae un arreglo diferente de los proteoglicanos que lo constituyen, son estas mismas modificaciones las que permiten el alumbramiento de las crías (Varayoud y col., 2001).



En la mujer, el periodo de gestación tiene una duración aproximada de 280 días, mientras que en la rata tiene una duración de entre 22 y 24 días. El establecimiento de la preñez tiene dos eventos endocrinos, el primero desencadenado por el apareamiento donde se modifican la liberación de los factores hipotalámicos lo que permite existan dos descargas (una diurna y una nocturna) de la prolactina (PRL), la cual ayuda a que se induzca la formación de receptores a LH en las células del cuerpo lúteo, secretando progesterona, necesaria para el mantenimiento de la preñez (Lohmiller y Swing, 2006). Un segundo evento es dependiente de la implantación en donde la placenta y las células del endometrio producen hormonas similares a la PRL y ejercen un efecto luteotrófico el cual es necesario para mantener la función del cuerpo lúteo hasta el final de la preñez (Bazer, 1999).

La etapa crítica durante el inicio de la preñez es la implantación, que comienza con la fijación del blastocisto en el útero y culmina con la formación de una placenta definitiva. Estos cambios dados en el epitelio y el estroma contribuyen a la formación de la decidua, este evento se encuentra bajo el control de estradiol y progesterona producidas por el cuerpo lúteo, permitiendo así que el útero sea receptivo y acepte la implantación del blastocisto (Wang y col., 2006).

Al sexto día, se puede encontrar diferenciado ya el trofoblasto, el epiblasto (ectodermo embrionario o primitivo) así como el endodermo primitivo.

El blastocisto de los murinos, aproximadamente entre el octavo y noveno día, las células de la masa interna constituyen las células troncales pluripotenciales, las cuales son capaces de generar cualquier tipo de células del cuerpo embrionario (Fernández Sánchez y Mayani, 2008).





La gastrulación es la etapa donde se dan los movimientos morfogénicos y se lleva a cabo la formación de las tres capas germinales. La gastrulación en murinos comienza aproximadamente en el día 6.5 post coito, mientras que en el humano se da entre el día 14 y 16. Después de este proceso los órganos inician su especialización y se establecen los ejes de simetría los cuales son fundamentales para el correcto desarrollo y funcionamiento (Fernández Sánchez y Mayani, 2008).

Se puede inferir que tanto en humanos como en cualquier mamífero estos procesos embrionarios son críticos para el desarrollo y supervivencia de los individuos.

La gestación es por tanto un proceso fisiológico con posibles complicaciones como:

Desnutrición materna: la cual puede afectar el peso fetal y el crecimiento de las crías en el largo plazo, existen periodos críticos durante la gestación que afectan el desarrollo de los tejidos adiposos y los centros hipotálamicos que regulan la ingesta calórica y el crecimiento. En ratas se ha demostrado que la restricción calórica induce el desarrollo de diabetes, obesidad e hipertensión de las crías (Maliqueo y Echiburú, 2014).

Sobrealimentación: las dietas ricas en carbohidratos o grasas también conducen a hipertensión y síndrome metabólico en las crías, modelos en ratones han mostrado que las crías pueden desarrollar obesidad, hígado graso y aumento de proteínas de alta densidad, presentan mayor sensibilidad a la insulina en músculo con una tolerancia a la glucosa de manera normal. Dietas altas en grasa inducen una reducción del peso, a largo plazo estas crías presentaran hiperinsulinemia, resistencia a la insulina e hipertertensión (Maliqueo y Echiburú, 2014).





Exposición a Esteroides sexuales: los esteroides son producidos de manera normal por la madre, por la placenta y por el feto y son importantes para el desarrollo fetal. La exposición prenatal a testosterona y o estrógenos puede conducir al desarrollo de obesidad en la vida adulta y síndrome metabólico (Maliqueo y Echiburú, 2014).

La exposición a andrógenos en la primera mitad de la gestación reduce la actividad de los islotes β pancreáticos e induce la resistencia a la insulina en hembras y machos, además las hembras producen mayor cantidad de grasa abdominal y visceral, estas anormalidades han sido observadas en mujeres que tiene SOPQ, por lo que se ha sugerido que este es un mecanismo que pudiese mediar la aparición del síndrome (Witchel y col., 2012).





Planteamiento del problema

El aumento crónico de la actividad nerviosa simpática del ovario, especialmente del NOS, produce cambios en el desarrollo de los folículos que no terminan de completar su ciclo de vida, diferenciándose hacia quistes foliculares.

El VE induce alteraciones en la dinámica de crecimiento y diferenciación del folículo ovárico, lo que resulta en un menor número de folículos antrales, una mayor incidencia de atresia y la formación de quistes foliculares, eventos que culminan en la anovulación.

En el ovario, existen terminales nerviosas simpáticas que transportan neurotransmisores, entre ellos la NA, la cual tiene efectos asociados a la regulación nerviosa del ovario, la producción de hormonas esteroideas y está involucrada en el desarrollo folicular. Se sabe que en mujeres con SOPQ, existe un aumento de la NA desencadenada por la hiperactividad de las fibras simpáticas que inervan el ovario, lo que culmina con la formación de quistes foliculares, y como resultado con un cuadro de infertilidad.

En la mujer el 80% de los casos de infertilidad de origen anovulatorio se encuentra asociada con el SOPQ, efecto que puede ser revertido al atenuar la actividad simpática del ovario. Además, se sabe que las hijas de madres que padecen SOPQ son propensas a desarrollarlo.

En la mujer, la competencia del ovocito es fundamental para que el proceso de gestación se lleve a cabo, sin embargo, en la rata con SOPQ se desconoce si los ovocitos obtenidos después de una denervación quirúrgica son competentes y por lo tanto viables y si las características del SOPQ se han improntado en la información genética y que puedan ser expresadas fenotípicamente en la generación F1.

Por ello, en el presente estudio, utilizando un modelo de ratas hembra con SOPQ inducido con VE, se analizó si la denervación quirúrgica del NOS ya sea de manera unilateral o bilateral, produce ovocitos que sean capaces de ser fertilizados y de mantener la gestación. Así mismo, se analizó si las crías de madres con SOPQ presentan las características del síndrome cuando inician la pubertad o cuando alcanzan la edad adulta.





Hipótesis

- ✧ Si en la rata con síndrome de Ovario Poliquístico la sección del nervio ovárico superior disminuye el tono simpático y son capaces de ovular, entonces es probable que estos ovocitos sean viables.

- ✧ Si en la rata con Síndrome de Ovario Poliquístico la condición es adquirida, entonces se espera que las hijas tengan características del síndrome y por lo tanto presenten hiperandrogenismo, quistes foliculares y anovulación.

Objetivo General

Analizar en la rata tratada con VE, la participación de la inervación simpática en la regulación de la fertilidad y si las características del SOPQ pueden ser transmitidas a las hijas en la generación F1

Objetivos Particulares

- 1) Analizar la tasa de fertilidad, la duración de la gestación, el número de crías y el número de hembras en la rata con SOPQ inducido por la inyección de VE, y sometida a la sección del NOS.
- 2) Analizar en las crías hembras, provenientes de madres con SOPQ y sometidas a la sección del NOS, el inicio de la pubertad, la primera ovulación, la concentración de testosterona y la dinámica del crecimiento folicular.





Materiales y Métodos

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

Antes de realizar cualquier procedimiento quirúrgico los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de una mezcla de Ketamina (40mg/kg/pc) y Xilacina (5mg/kg/pc).

Inducción del Síndrome de Ovario Poliquístico

Se utilizaron ratas hembra neonatas (figura 13) colocadas en camadas de cinco hembras y un macho. Las hembras al cumplir los 10 días de vida fueron inyectadas vía intraperitoneal con una dosis de 2 mg de VE (Sigma Chemical Co. St Louis Mo. USA) en 0.1 ml de aceite de sésamo que fungió como Vh (Sigma Chemical Co. St Louis Mo. USA). Como grupos de comparación se utilizaron animales inyectados intraperitonealmente a los 10 días de vida, con 0.1 ml de aceite de sésamo. Las crías tuvieron libre acceso a la madre hasta los 24 días de vida (día del destete) y posteriormente al agua y al alimento, hasta el día que fueron autopsiadas. En los animales inyectados con VE, se inició el monitoreo vaginal un día después de la fecha de inyección del estrógeno.

En el caso de las hembras inyectadas con Vh el monitoreo de la vagina se realizó a partir del día 30 de vida. Una vez que ocurrió la canalización de la vagina, se procedió con la toma de frotis vaginales diarios por un periodo de ocho días.



Los frotis se retomaron cuando las hembras tanto Vh como VE cumplieron 45 días hasta el día que fueron sometidas a la denervación del NOS.

Al cumplir los 60 días y bajo anestesia con ketamina/ xilacina, los animales fueron sometidos a una incisión dorsolateral de piel, músculo y peritoneo, se expuso el ovario y se procedió a la denervación, la cual consistió en el corte del ligamento suspensorio por el cual transcurre el nervio ovárico superior. Después del procedimiento el ovario fue regresado a la cavidad abdominal y se procedió a suturar el músculo y posteriormente la piel con sutura quirúrgica.

A cada animal sometido al procedimiento se le colocó una solución antiséptica para evitar la infección de la herida.

Al cumplir los 70 días de edad, en el día del proestro, las hembras fueron colocadas en camadas de dos hembras por macho de fertilidad comprobada con el fin de que las hembras reciban al macho para la cópula en el día del estro.

Por medio de frotis vaginales diarios nos aseguramos de que hubiese tapón espermático el cual se contó como el día uno de preñez, esto se corrobora con los diestros persistentes correspondientes al periodo de gestación.

Las ratas que lograron quedar gestantes se mantuvieron hasta el día del alumbramiento y posteriormente las crías fueron asignadas a un grupo que fue sacrificado al primer estro o bien al cumplir los 70 días de vida.

Las hembras que no lograron llevar a término la gestación fueron sometidas a eutanasia y posteriormente disectadas. En ellas se observó la anatomía del útero, donde se pudieron observar los sitios de implantación de los embriones y el hematoma que queda a consecuencia de este evento.



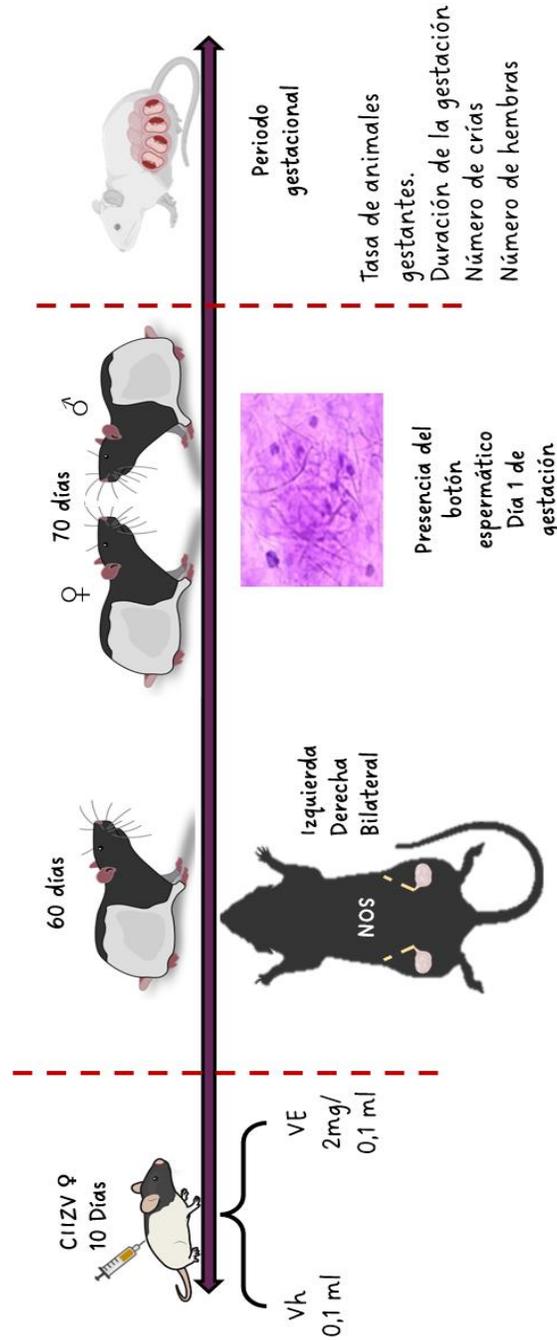


Figura 13. Grupo experimental usado para evaluar los efectos de la denervación quirúrgica del NOS y viabilidad de los ovocitos, en animales Vh y VE.

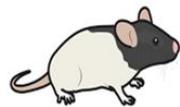


1.- Animales Generación F1 de apertura vaginal

De las crías obtenidas del experimento anterior (figura 14) se seleccionaron las hembras y se esperó el día de la apertura vaginal, una vez presentado el estro, los animales fueron sacrificados.

2.- Animales Generación F1 de 70 días

De la misma manera, se seleccionó otro grupo de hembras que se dejaron hasta cumplir los 70 días de edad. En estos animales se observó el día de la apertura vaginal y la presencia del estro, por medio de frotis vaginales, los animales se dejaron evolucionar hasta cumplir los 50 días de edad, tiempo después del cual se retomaron los frotis y se autopsiaron en el día del estro al cumplir los 70 días.



Autopsiadas a la apertura vaginal



Autopsiadas a los 70 días de edad

Figura 14. Grupo experimental usado para evaluar los efectos de la administración del Vh y VE y la sección del NOS, en las hijas de madres con SOPQ.





Procedimiento de Autopsia

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

Histología ovárica y morfometría

Los ovarios de todos los grupos experimentales fueron fijados en una solución de Bouin por 24 horas, después de este tiempo los ovarios fueron deshidratados por medio de alcoholes a diferentes concentraciones (70, 80, 96% y absoluto) y cloroformo, posteriormente fueron incluidos en paraplast (Leica Biosystems Richmon Inc.USA).

Se seleccionaron al azar 3 animales por grupo y se realizaron los cortes histológicos que se llevaron a cabo de manera seriada con un grosor de 10 μm y se tiñeron con la técnica de Hematoxilina- Eosina (H-E).

La determinación del diámetro folicular se realizó con un ocular micrométrico (1/100 divisiones), donde fue medido el diámetro mayor (D1) y el perpendicular (D2), que corresponde a la distancia de la membrana basal a membrana basal como se muestra en la figura 15. El diámetro promedio se calculó con la relación $D_p = (D1 + D2) / 2$, y se determinó solo en aquellos folículos cuyo ovocito presentó núcleo y nucleolo bien definido.



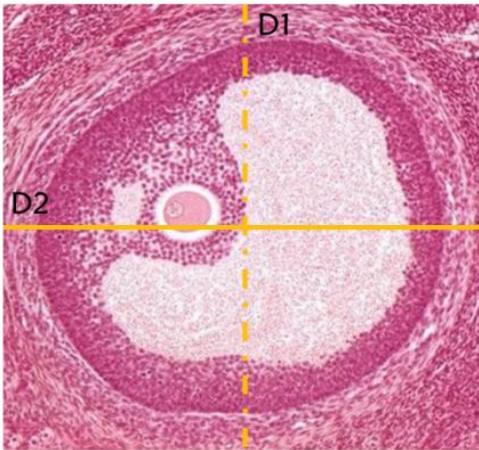


Figura 15. Representación esquemática de la medición del diámetro folicular D1, diámetro mayor D2; diámetro perpendicular

La dinámica folicular se evaluó por la proporción de folículos pequeños de 90 a 390 μ , folículos medianos de 391 a 500 μ y mayores a 500 μ son considerados como folículos preovulatorios (Hirshfield, 1991).

Cuantificación de Testosterona

La cuantificación de testosterona se realizó en el Laboratorio de Hormonas Esteroides del departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” por medio de un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) en fase sólida, basado en el principio de unión competitiva (DRG Instruments GmbH, Germany). La concentración de testosterona fue expresada en pg/ml de suero. Los coeficientes de variación intra e interespecíficos para la testosterona fueron de 6.42 y 7.32 % respectivamente.



Análisis estadístico

La comparación del número de hembras gestantes y la tasa de animales ovulantes (número de animales que ovulan/número total de animales) se analizó por una prueba exacta de Fisher, mientras que los días de la gestación, número de crías, número de hembras, la apertura vaginal, la presencia del primer estro, el número de ovocitos liberados y la dinámica folicular fueron analizados por una U de Mann Whitney. La concentración de testosterona se analizó mediante una ANOVA de una vía. Cuando existió la necesidad de analizar entre grupos se utilizó una “t” de Student.

Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias que fueron iguales o menores a 0.05





Resultados

Objetivo 1:

Efecto de la Sección unilateral o bilateral del Nervio Ovárico Superior sobre la fertilidad de la rata con SOPQ





Porcentaje de Hembras gestantes

Con respecto a las madres que fueron tratadas con Vh y sometidas a la sección del NOS el 100% de las hembras fue capaz de quedar gestante, esto independientemente de si la sección era izquierda, derecha o bilateral. En los grupos con denervación unilateral se observó la presencia de reabsorciones las cuales fueron identificadas por la presencia de hematomas en el útero.

Cuando la sección izquierda del NOS es realizada a hembras tratadas con VE, el 69 % de las hembras resultó gestante, mientras que con la sección derecha sólo fue gestante el 46 % y con la sección bilateral el 54 % (figura 16). El porcentaje de reabsorciones en las hembras con sección del NOS izquierdo fue del 15.3%, con la sección derecha fue del 27.3% y cuando la sección se realizó de manera bilateral se presentó un 15.4% de reabsorciones.



Hembras Gestantes

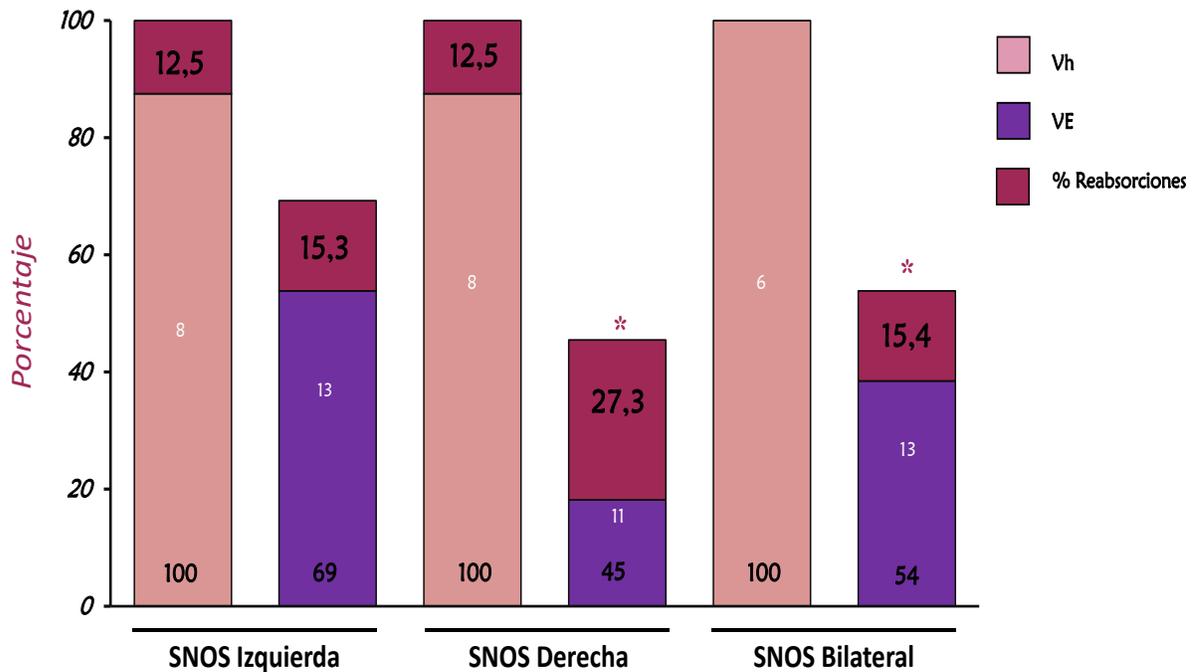


Figura 16. Porcentaje de hembras gestantes que fueron tratadas con vehículo (Vh) o Valerato de Estradiol (VE) a los 10 días de vida y posteriormente a los 60 días de edad fueron sometidas a la sección del Nervio Ovárico Superior (SNOS) izquierda, derecha o bilateral y fueron puestas con machos de fertilidad comprobada a los 70 días de vida. El número en blanco indica la n de cada grupo, los números al pie indican el porcentaje total de hembras gestantes, mientras que los números superiores indican el porcentaje de reabsorciones fetales por grupo * $p < 0.05$ vs su grupo vh. (Prueba exacta de Fisher).





Días de gestación

La duración promedio de la gestación de las hembras tratadas con Vh o con VE y sometidas a la sección del NOS izquierda, derecha o bilateral fue de 21 días, con lo cual seccionar el NOS no tiene ningún efecto sobre los días que dura la preñez en la rata (figura 17).

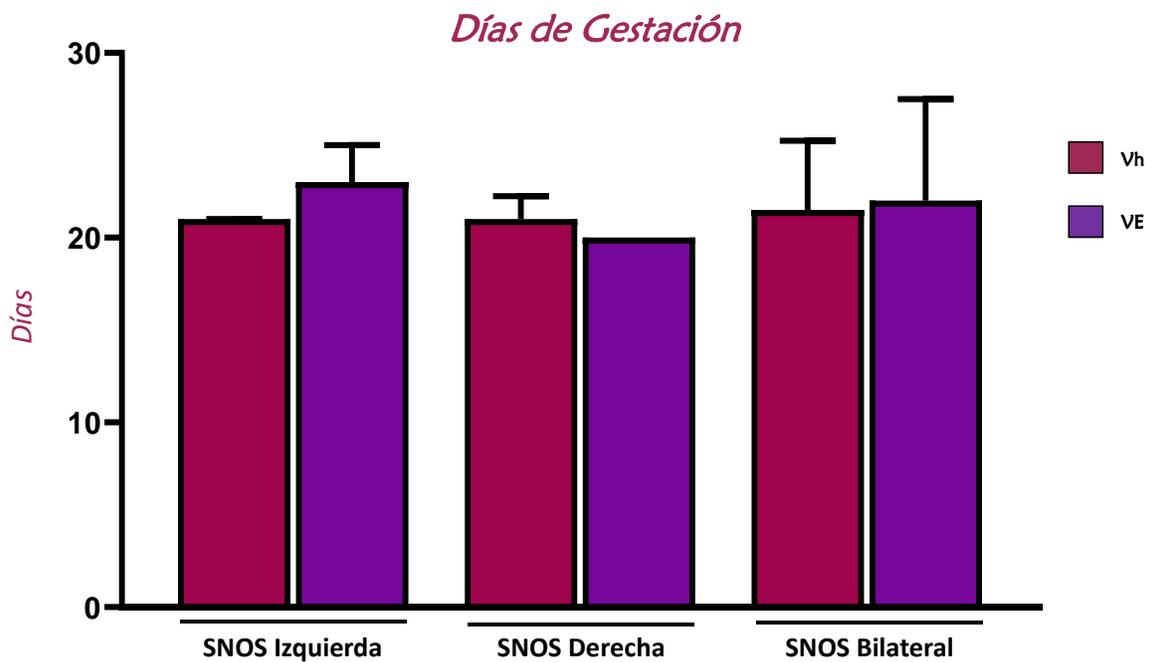


Figura 17. Mediana \pm rango intercuartil de la duración de la gestación de hembras que fueron tratadas con Vehículo (Vh) o Valerato de Estradiol (VE) y sometidas a la sección del NOS izquierda, derecha o bilateral a los 60 días de vida y a los 70 días de vida puestas con machos de fertilidad comprobada. Datos analizados por U de Mann Whitney donde $p > 0.13$



Número de Crías

El número de crías obtenidas en las camadas del grupo con VE y sección del NOS izquierdo fue similar al grupo con Vh, el mismo comportamiento se observa en el grupo con sección bilateral del NOS

En el grupo de hembras tratadas con VE y sección del NOS derecho únicamente contamos con dos hembras que parieron, una de las cuales no se logró contar ya que se presentó canibalismo, la otra hembra parió 7 crías (figura 18).

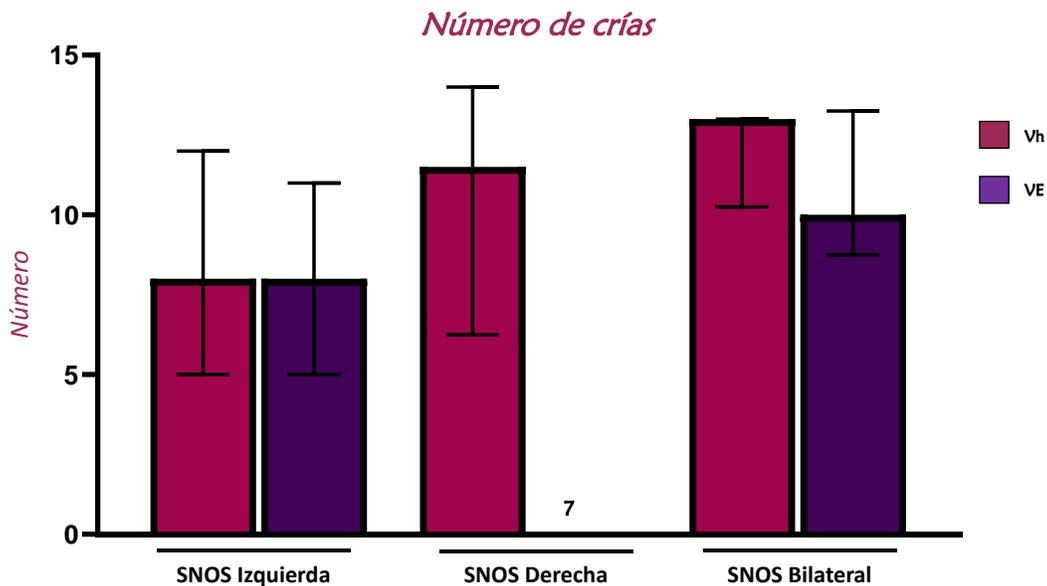


Figura 18. Mediana \pm rango intercuartil del número de crías que fueron obtenidas de los diferentes grupos experimentales. No se marca la diferencia significativa en el grupo VE con sección derecha del NOS, puesto que solo una de las hembras produjo 7 crías. Datos de la mediana analizados por U de Mann Whitney donde $p > 0.20$



Número de Hembras

El número de hembras nacidas de las hembras tratadas con Vh y sometidas a la sección unilateral o bilateral del NOS fue similar. Sin embargo, podemos observar una ligera tendencia a la disminución en el grupo sección izquierda, pero sin que esta sea estadísticamente significativa.

En cuanto a los grupos de hembras tratadas con VE y sometidas a la sección del NOS ya sea izquierdo o bilateral, se observó un comportamiento muy semejante al grupo Vh. Por otro lado, el grupo VE y sección del NOS derecho, sólo hay una cría hembra, proveniente de la única hembra que tuvo crías vivas (figura 19).

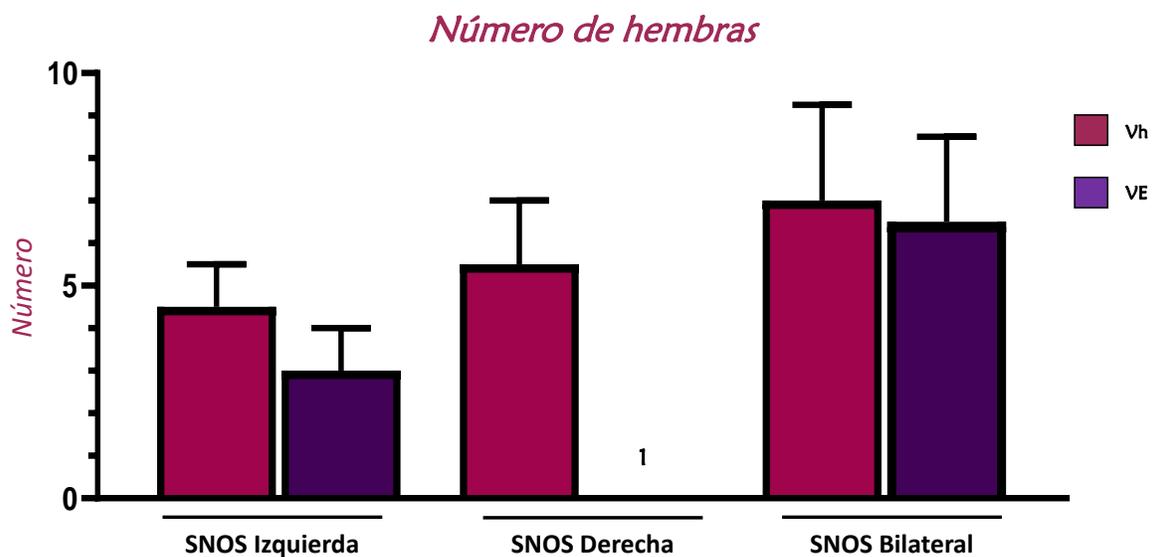


Figura 19. Mediana \pm rango intercuartil del número de hembras que fueron obtenidas de madres tratadas con Vh o con VE y sometidas a la sección del NOS ya sea izquierda, derecha o bilateral al día 60 de edad y puestas con machos al día 70 de vida. Prueba U de Mann Whitney donde $p > 0.054$





Discusión de Resultados

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que en la rata tratada con VE a los 10 días de edad y sometidas a la sección del NOS unilateral o bilateral a los 60 días de vida, la condición de SOPQ es revertida y que los ovocitos resultantes tienen la capacidad de ser fecundados. La información que transporta el NOS parece no estar involucrada con los mecanismos que regulan el proceso de gestación.

En la rata, la inducción del SOPQ mediante la administración de VE en ratas adultas (60 días de edad), ocasiona pérdida del ciclo estral, los ovarios se ven disminuidos de tamaño, presentan quistes foliculares y ausencia de cuerpos lúteos (Barria y col., 1993), de igual manera, cuando es inyectado al día 10 post nacimiento se presenta adelanto de la pubertad, pérdida del ciclo estral, así como hiperandrogenismo y la presencia de quistes foliculares en estadio adulto (Rosas Gávilan, 2006).

Tanto en la mujer (Semenova II., 1969) como en la rata (Yen, 1999) con SOPQ, se ha reportado un incremento en la densidad e hiperactividad de las fibras simpáticas que llegan a la teca de los folículos y de la glándula intersticial (Hernández y col., 1988), dando como resultado un incremento en la cantidad de NA que llega al ovario, precedido por un incremento del NGF y su receptor de baja afinidad el p75, eventos que han sido sugeridos anteceden a la formación de los quistes foliculares (Lara y col., 2000).

En ratas con SOPQ, inducido por VE, la sección del NOS, resulta en cambios en el número de animales ovulantes dependiendo del nervio que sea seccionado, teniendo así que la sección izquierda resulta en un 75 % de animales ovulantes por el ovario inervado, mientras que con la sección derecha este número decrece al 60 %, y cuando ambos nervios son seccionados el 50 % de los animales son capaces de liberar un número de ovocitos semejante a los de un animal control. Estos resultados han permitido sugerir que la eliminación del aporte noradrenérgico que transcurre por el NOS restaura parcialmente las funciones ováricas (Morales y col., 2010).



En el presente estudio, al igual que lo previamente reportado, se observó que, en las hembras con síndrome inducido con VE, la sección del NOS ya sea izquierda, derecha o bilateral es capaz de restaurar la funcionalidad del ovario. De esta manera, quedó gestante el 69% de las hembras con sección izquierda, un 49% con la sección derecha y un 54% cuando la sección se llevó a cabo de manera bilateral.

Estos resultados permiten sugerir una respuesta diferencial ante la denervación del NOS y que resulta más evidente cuando se realiza del lado derecho, puesto que existen diferencias en la cantidad de fibras que llegan a un ovario u otro con lo que también la cantidad de NA que reciben es diferente, haciendo que la secreción de LH como de FSH se vea afectada (Lara y col., 2002), así como en la cantidad del flujo de sangre que llega a uno u otro, lo cual pudiese estar propiciando los cambios en la ovulación.

De manera fisiológica los ovarios de las ratas producen un número distinto de ovocitos por ambos ovarios, es así, que mientras el ovario izquierdo produce una media de 6 ovocitos el ovario derecho produce un 33% menos de ovocitos por ciclo estral (Carrasco-García y col., 2008).

En el presente estudio, la tasa de hembras gestantes coincide con los reportes previos que indican la tasa de animales ovulantes en respuesta a la sección del NOS. Sin embargo, se observó que en las hembras con SOPQ la sección derecha provocó un mayor número de reabsorciones fetales, es decir, que de 5 hembras gestantes que se tuvieron 3 presentaron reabsorciones.

El desarrollo del útero en las mujeres y en las ratas termina su proceso de manera postnatal el cual está regulado por la prolactina, las interacciones epitelio-estromales, genes Hox, factores de crecimiento intrínsecos y hormonas esteroideas producidas por el ovario (Spencer y col., 2005), por lo que algún desbalance en estas regulaciones podrá tener consecuencias a nivel reproductivo.





En mujeres con Síndrome se ha reportado que existe un aumento en la incidencia de abortos (30 al 50%) en comparación con mujeres sanas (Glueck y col.,2001), esto puede deberse a que existe una disrupción entre el embrión, el endometrio y sus respectivas interacciones (Palomba y col.,2020) y que además la histoarquitectura del endometrio difiere en mujeres que padecen la patología de las que no (Quezada y col.,2006).

El proceso del cambio morfológico y fisiológico de las células del endometrio (decidua) se ve alterado en el síndrome, este proceso es de vital importancia para las implantaciones, si esta alterado se encuentran anormalidades que incluyen una falla en la implantación, abortos, preclamsia y nacimientos antes de término (Palomba y col.,2020).

Las anormalidades primarias del endometrio juegan un papel determinante en la salud reproductiva. Se han encontrado alteraciones en 9 genes relacionados con la apoptosis en mujeres con síndrome 5 de ellos están regulados al alza (incluyendo Bcl 2) y 4 (incluyendo a FAS asociado a dominio de muerte) regulados a la baja, también hay una disrupción en el receptor a progesterona sobre todo en PR α y PR β , estos alteran los procesos de implantación, existe también una disrupción en el receptor a andrógenos los cual interfiere con el papel de la progesterona (Palomba y col.,2020).

Los procesos de inmunidad y de inflamación también presentan modificaciones y la angiogénesis se ve alterada ya que se encuentran niveles altos de VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular, por sus siglas en inglés), PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas, por sus siglas en inglés), PlGF (Factor de crecimiento placental) y de TGF β (Palomba y col.,2020).





En ratonas que han sido tratadas con testosterona en una gestación temprana existe una reducción del crecimiento de la arteria uterina, lo cual decrece la expresión de factores de angiogénesis en la placenta y se observa un incremento en la hipoxia placentaria, así como también una disminución de las Unk (Natural Killer uterinas) las cuales interfieren con el proceso de angiogénesis y por lo tanto existe un mayor número de reabsorciones fetales (Gong y col., 2019).

La exposición a estrógenos de manera prenatal o en la infancia tiene consecuencias a largo plazo tanto en mujeres como en ratas, las altas tasas de pérdidas de embriones en la peri-implantación o las reabsorciones son resultado de defectos no reconocidos en el desarrollo del útero o bien en su función (Spencer y col., 2005).

Con toda esta evidencia, en nuestro grupo experimental podemos asumir que la exposición al VE provocó cambios en el útero de los animales experimentales por la alta concentración de estrógenos a los que estuvieron expuestos y es por ello que no todas las hembras lograron la gestación, caso contrario el que se tiene con los animales Vh donde si bien se encontró una reabsorción por grupo, el 100% de los animales quedaron gestantes.

Se requieren estudios de mayor profundidad que nos pudieran señalar que tan grave es el daño en los úteros para comprender si el NOS se encuentra involucrado en los procesos que no permiten la correcta gestación de las crías cuando se secciona el nervio derecho.



En cuanto al número de crías previamente se ha reportado que para la cepa CII-ZV el promedio de ovocitos liberados es de 12, igual que para el número de crías por camada (García Sustegui y col.,2017).

Cuando se realiza la sección unilateral del NOS, el número de ovocitos liberados por el ovario denervado disminuye, en tanto que en el inervado incrementa (Morales y col., 1993). En el presente estudio observamos que en el grupo inyectado con Vh y sección unilateral o bilateral del NOS no se alteró el número de crías por camada.

Por lo que podemos sugerir que la participación del componente noradrenérgico es esencial en los procesos que culminaran con la ovulación, pero no es un componente que afecte la viabilidad de los ovocitos.

La duración de la gestación de la rata (*rattus norvegicus*) se encuentra en un periodo que oscila entre los 21 y 26 días (Romero y Legorreta, 1993). En la cepa CII-ZV se ha reportado que esta especie entra en labor de parto alrededor del día 21 de gestación (García Sustegui y col; 2017).

En el presente estudio, los resultados muestran que tanto las hembras inyectadas con Vh y sometidas a la sección unilateral o bilateral del NOS, así como las hembras inyectadas con VE y con denervación unilateral o bilateral del NOS, el día del parto no se modificó en ninguno de los grupos experimentales. Donde en promedio la duración de la gestación fue de 21 días.

Con estos resultados podemos sugerir que la información neural que transporta el NOS, no se encuentra implicada en los procesos que involucra la gestación o el parto de las hembras, tanto si expresa o no el SOPQ.





Conclusiones

- ✧ Los ovocitos liberados por las hembras con SOPQ inducido con VE y sometidas a la sección del NOS izquierdo, derecho o bilateral son viables para la fertilización.
- ✧ Existe una respuesta diferencial entre ovario izquierdo y derecho ante la sección del NOS en el número de hembras que logran llevar a término la gestación.
- ✧ La exposición en etapa infantil a los estrógenos modificó las condiciones uterinas en el estadio adulto por lo cual no todas las hembras lograron la gestación a término.
- ✧ Los días de la gestación, el número de crías y el inicio del parto parecen no depender de la información neural que transporta el NOS.





Resultados

Objetivo 2:

Sección del Nervio Ovárico Superior en madres tratadas con Vh o VE. Efectos sobre la primera generación filial





Día de la apertura vaginal y del primer estro vaginal

Con respecto al día de la apertura vaginal (figura 20) las hembras provenientes de madres tratadas con Vh o Ve y sometidas a la sección del NOS izquierdo y el grupo proveniente del Vh y la sección del NOS derecha no mostraron diferencias manteniendo una media de 38 días para el día que se presenta la apertura vaginal y en el tiempo que les toma alcanzar el primer estro vaginal, las hembras provenientes de madres con Vh y la sección del NOS bilateral en comparación con su grupo proveniente del VE más la sección bilateral presentan un atraso en el día de la apertura vaginal mismo efecto que se presenta al momento de alcanzar el primer estro vaginal.



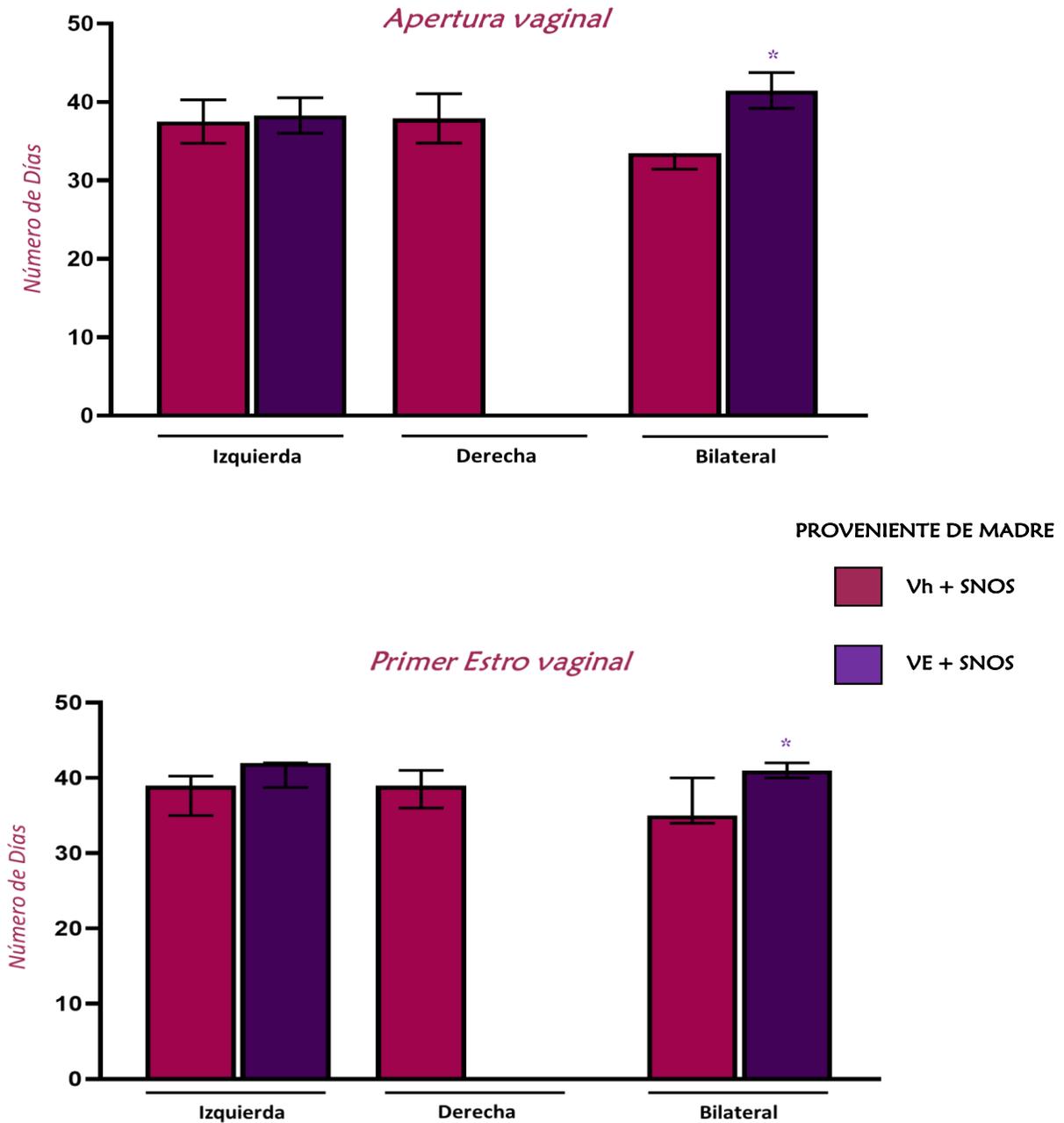


Figura 20. Mediana \pm rango intercuartil del día de la apertura vaginal y primer estro vaginal de las crías de madres tratadas con vehículo (Vh) o Valerato de Estradiol (VE) a los 10 días de edad y sometidas a los 60 días a la sección del SNOS izquierda o bilateral. El * $p < 0.05$ vs Vh Bilateral. Prueba U de Mann Whitney donde $p < 0.0001$ para ambos parámetros.





Tasa de animales ovulantes y número de ovocitos liberados en ratas de apertura vaginal y de 70 días.

A la apertura vaginal aproximadamente el 60% los animales provenientes de madres tratadas con Vh y sometidas a la sección del NOS izquierdo o derecho logró ovular, este mismo comportamiento es registrado en las hembras de apertura vaginal que provienen de madres con sección del NOS izquierdo pero que fueron tratadas con VE. Del grupo proveniente de madres con sección bilateral del NOS tratadas con Vh el 100% de las hembras ovula, mientras que las hijas de madres con VE y sección del NOS bilateral solo lo hace el 33%.

En cuanto al número de ovocitos liberados, en todos los grupos de animales ovulantes, liberaron un promedio de 8 ovocitos liberados, sin embargo, el grupo que proviene de madres con sección bilateral del NOS y tratadas con VE, solo dos hembras de 6 fueron capaces de ovular con una cuota de 10 y de 9 ovocitos respectivamente.

A los 70 días de edad el 100% de las hembras provenientes de madres tratadas con VH y sometidas a la sección izquierda o bilateral del NOS son capaces de ovular, en tanto, que con la sección derecha lo hace el 80%. Cuando son analizadas las hembras provenientes de madres tratadas con VE y sometidas a la sección del NOS izquierdo o bilateral se encuentra que ovulan solo el 50 y el 63 % respectivamente.

En las hembras ovulantes sacrificadas a los 70 días de edad, la media de ovocitos liberados es de 11. Se observa una ligera disminución del número de ovocitos que no es significativa cuando es comparada con las hijas provenientes de madres Vh sometidas a la sección del NOS izquierdo.



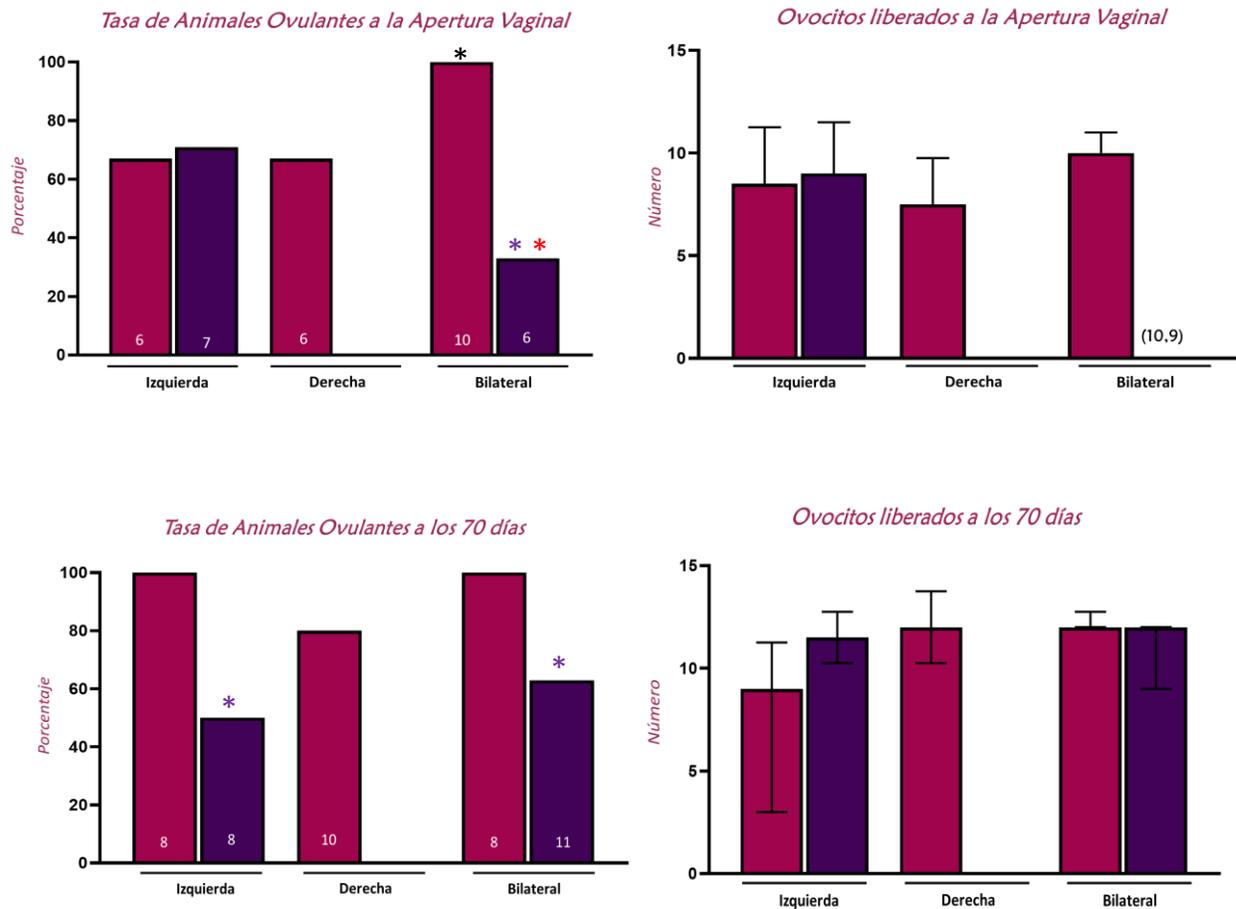


Figura 21. Tasa de animales ovulantes y Mediana \pm rango intercuartil del número de ovocitos liberados de crías a la apertura vagina y a los 70 días de edad provenientes de madres tratadas con vehículo (Vh) o Valerato de Estradiol (VE) a los 10 días de edad y sometidas a los 60 días a la sección del SNOS izquierda o bilateral. El * $p < 0.05$ vs su grupo Vh, * $p < 0.05$ vs Vh izquierda y Vh derecha, * $p < 0.05$ vs VE izquierda. Prueba exacta de Fisher para tasa de animales ovulantes y U de Mann Whitney para número de ovocitos liberados.





Cuantificación de testosterona

Las hembras provenientes de madres tratadas con Vh o con VE y sometidas a la sección del nervio ovárico superior ya sea izquierda, derecha o bilateral mantienen un comportamiento similar en cuanto a las concentraciones de testosterona, manteniéndose en concentraciones por debajo de un animal testigo VE (figura 22).

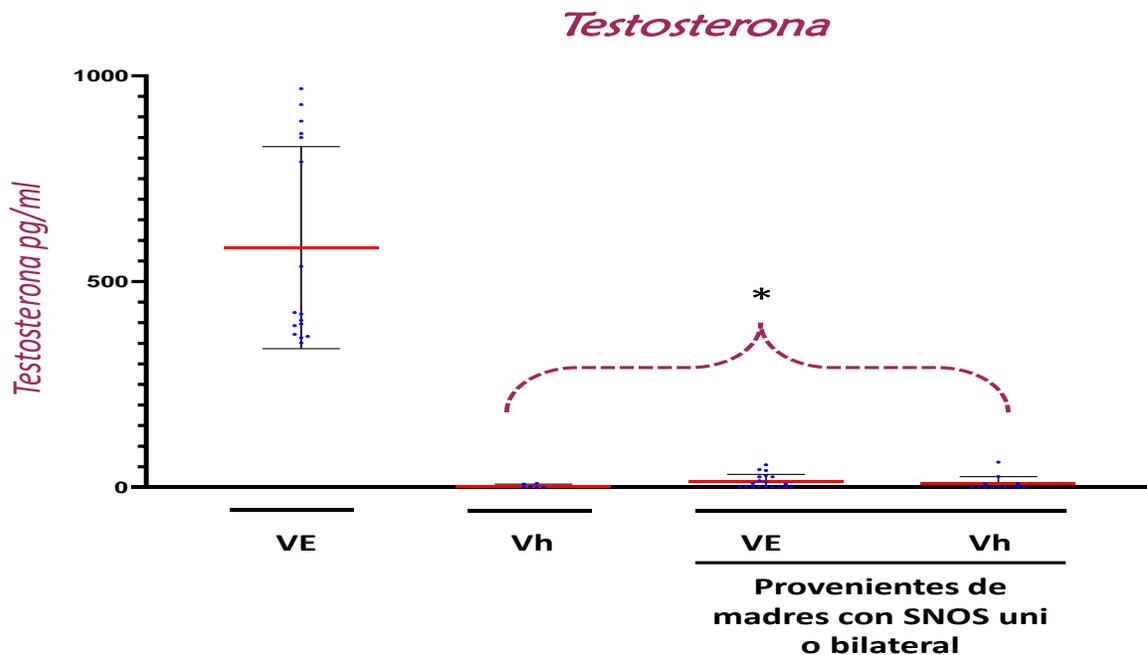


Figura 22. Mediana \pm rango intercuartil de la concentración de testosterona de ratas provenientes de madres que fueron tratadas con VE o Vh a los 10 días de edad y sometidas a la sección del NOS a los 60 días. * $p < 0.05$ vs VE. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía donde $p < 0.0001$





Dinámica folicular

Las hijas de madres inyectadas con VE y sometidas a la sección izquierda del NOS y sacrificadas a la apertura vaginal no presentan diferencias en cuanto al número de folículos pequeños, pero fue menor el número de folículos medianos en comparación con el grupo proveniente de madres tratadas con Vh y la sección del NOS izquierdo. En las hembras sacrificadas al día 70 de edad, fue mayor el número de folículos grandes en las hijas de madres con VE y sección izquierda del NOS (figura 23 y 24).

En las hembras provenientes de madres con VE y sometidas a la sección bilateral del NOS y que fueron sacrificadas a la apertura vaginal, es menor el número de folículos pequeños en comparación con su grupo Vh y sometidas a la sección bilateral del NOS. Las hembras que fueron sacrificadas a los 70 días y que provienen de madres tratadas con VE y sección bilateral del NOS, mostraron un menor número de folículos pequeños y medianos, en tanto que, es mayor el número de folículos grandes, en comparación con su grupo Vh y sometidas a la sección bilateral del NOS (tabla 1).





Izquierda	FOLÍCULOS		
	90-390 μ	391-500 μ	<500 μ
	Pequeños	Medianos	Grandes
Vh AV	146	10	3
VE AV	183	3 *	4
Vh 70	287	6	6
VE 70	276	8	13 *
Bilateral	Pequeños	Medianos	Grandes
Vh AV	442	10	4
VE AV	202 *	10	6
Vh 70	601	8	8
VE 70	312 *	2 *	14 *

Tabla 1. Tabla que representa el número de folículos totales provienen de las crías de hembras tratadas a los 10 días de edad con Vh o con VE y que al día 60 fueron sometidas a la sección del NOS izquierda o bilateral. Las crías fueron sacrificadas a la apertura vaginal (AV) o a los 70 días de vida (70). *p<0.05 vs su grupo proveniente del Vh. Prueba U de Mann Whitney.





Ovarios de hijas provenientes de madres con Vh o VE y sección del NOS izquierdo

Apertura vaginal

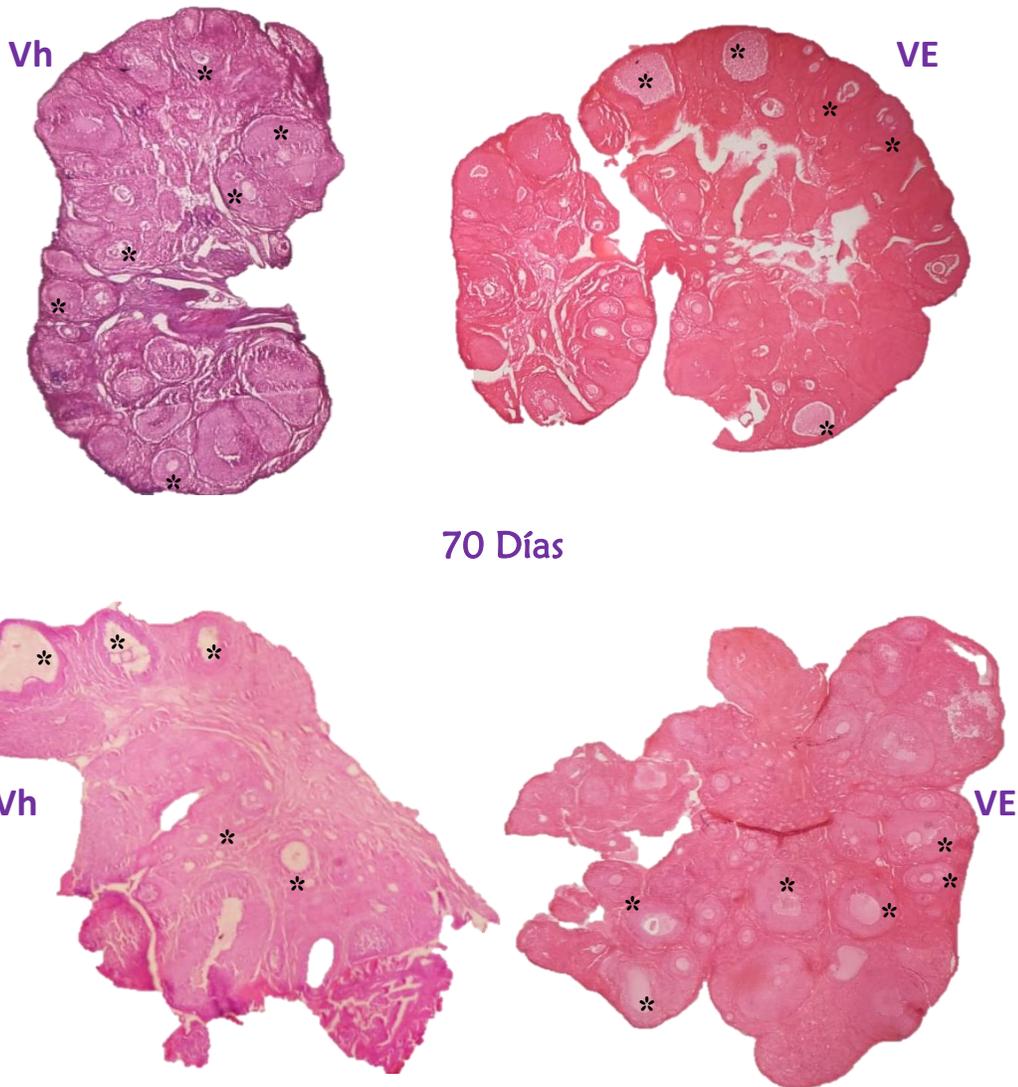


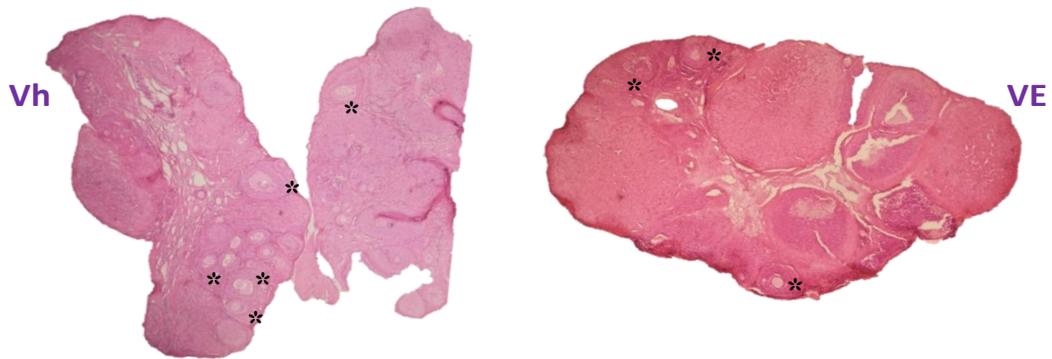
Figura 23. Microfotografías tomadas a 4x y teñidas con Hematoxilina-Eosina de ovarios representativos de los grupos de hijas que provienen de madres tratadas con Vh o con VE y que fueron sometidas a la sección del NOS izquierdo y sacrificadas al primer estro vaginal o a los 70 días de edad. Se pueden observar folículos en diferentes estadios del desarrollo, los * marcan los folículos, en diferentes etapas de crecimiento.





Ovarios de hijas provenientes de madres con Vh o VE y sección del NOS bilateral

Apertura vaginal



70 Días

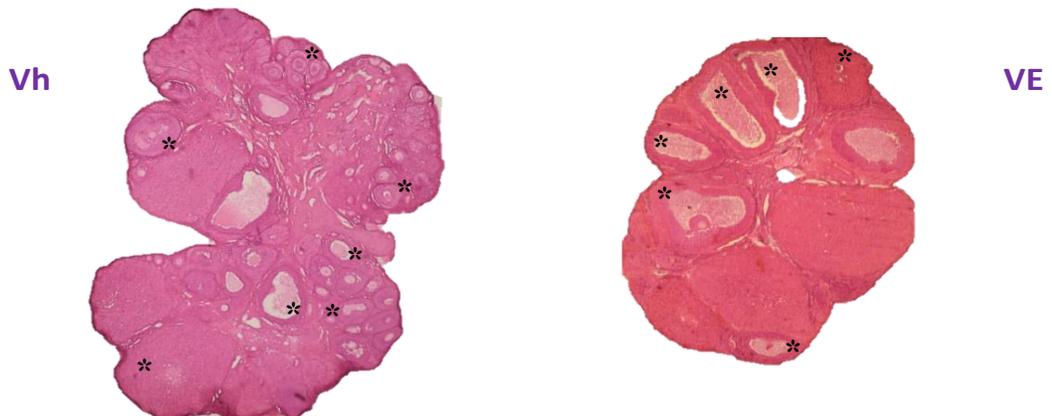


Figura 24. Microfotografías tomadas a 4x y teñidas con Hematoxilina-Eosina de ovarios representativos de los grupos de hijas que provienen de madres tratadas con Vh o con VE y que fueron sometidas a la sección del NOS bilateral y sacrificadas al primer estro vaginal o a los 70 días de edad. Se pueden observar folículos en diferentes estadios del desarrollo, los * marcan los folículos, en diferentes etapas de crecimiento.



Discusión de Resultados

En la rata, la apertura vaginal es el evento que indica el inicio de la pubertad, en muchas ocasiones se encuentra asociado con la aparición del primer estro. Estos eventos ocurren aproximadamente entre el día 42 postnacimiento (Maeda y col., 2000). En la cepa CII-ZV se ha reportado que el inicio de la pubertad ocurre entre los días 35-45 posteriores al nacimiento (García Suastegui y col., 2017).

El inicio de la pubertad depende de factores ambientales, nutricionales, conductuales, entre otros. Algunos autores consideran que este evento se encuentra ligado al peso de la rata, donde al alcanzar el 50% del peso que tendrán en la madurez, se da el inicio de la pubertad, sin embargo, el indicador más fiable de su inicio es cuando la rata alcanza una talla de 150 mm (Bennett y Vickery., 1970).

Los resultados del presente estudio muestran que las hijas provenientes de madres tratadas con Vh o con VE y sometidas a la sección del NOS izquierdo presentan una edad de apertura vaginal semejante, efecto que no sucede cuando la sección se realiza de manera bilateral, ya que las hijas que provienen de madres con síndrome presentan un retraso en la edad de la apertura vaginal, en comparación con las hembras provenientes del Vh.

Se sabe que la hormona de crecimiento (GH) tiene un papel determinante en la apertura vaginal, ya que la concentración de esta hormona va incrementando desde el día 25 hasta que alcanza concentraciones semejantes a las de un animal adulto dos días antes de la apertura vaginal. Experimentos en ratas que han sido hipofisectomizadas y posteriormente tratadas con GH, la apertura vaginal se restablece (Ojeda y col., 1977).

La falta de concentraciones adecuadas de GH pudiera servirnos de explicación al por que les toma más tiempo poder alcanzar la edad de apertura vaginal, pero tampoco se puede descartar que en estas ratas no exista un correcto balance en la síntesis de receptores que sean capaces de responder a gonadotropinas o bien a estrógenos, lo cual también podría estar participando en los procesos que culminan con el inicio de la pubertad.





Algunos autores señalan que el retraso en la apertura vaginal podría deberse a que existe una baja concentración de leptina. Esta adipocina desempeña un papel importante en la regulación de la GnRH en el hipotálamo, de manera que en la hipófisis regula la cantidad de LH secretada, sugiriendo, una señal metabólica que inicia la pubertad (Quintero y col., 2008).

La presencia del primer estro y la apertura vaginal son eventos que se llevan a cabo de manera simultánea, donde a la rata le toma en promedio una semana regular sus ciclos estrales después de la apertura vaginal (Vidal, 2017). Nuestros resultados muestran que estos sucesos, tanto la apertura como la aparición del primer estro vaginal, se llevan a cabo de manera simultánea.

Además, existe otro fenómeno denominado sincronización estral, donde entre el 50 y el 75 % de los animales presentarán el mismo ciclo (Harris y Kesel, 1990), con lo que corroboramos que no existe una diferencia marcada en la edad en la que se presenta la apertura y el primer estro, ya que nuestras ratas se encuentran sincronizadas.

En la rata, la aparición del patrón de secreción de LH circulante se caracteriza por la presencia repetida de picos cada 30-60 minutos, estimulando de esta manera la producción de 17β estradiol, con lo cual se culminará el desarrollo final del ovario.

Así mismo, la PRL en plasma, facilita y mantiene los receptores ováricos de LH necesarios para la consecuente secreción de progesterona (Gullace F y Galassi P., 1995); estos cambios se dan en la etapa peripuberal de la rata y estimulan la primera ovulación.





En cuanto a la tasa de animales ovulantes se encontró una disminución del número de hembras que ovulan, provenientes de madres con síndrome y sección del NOS bilateral, una posible explicación a este suceso puede ser la desincronización en los patrones de secreción de GnRH que no se han establecido de manera correcta y que la cantidad circulante de estradiol es la suficiente para que se produzca la apertura vaginal, pero no la suficiente para poder estimular la secreción de LH que permita se lleve a cabo la ovulación. Se sabe que alteraciones en los cambios ambientales y la intensidad lumínica, así como la activación del eje del estrés pueden hacer que la apertura vaginal, el primer estro y la primera ovulación lleguen en momentos distintos (Gullace F y Galassi P., 1995).

En ratas de 70 días de edad provenientes de madres tratadas con VE y sometidas a la sección del NOS izquierda o bilateral, hay una menor tasa de animales ovulantes. Estos resultados nos podrían indicar, que algunos aspectos del síndrome pueden ser transmitidos a la prole. Un posible mecanismo es mediante modificaciones epigenéticas, las cuales en el estadio adulto alteran la expresión de algunos genes. Esta idea se ve apoyada por el hecho de que este comportamiento no se evidencia en las hijas provenientes de madres tratadas con Vh y sometidas a la sección del NOS ya sea izquierda o bilateral.

La ovulación es un mecanismo altamente coordinado que comienza con la reactivación de la meiosis por parte del ovocito arrestado en dictioteno, hasta la rotura de la pared folicular seguida de la restructuración y diferenciación del tejido para dar lugar al cuerpo lúteo (Russell y Robker, 2007).





En nuestro grupo experimental las hembras provenientes de madres tratadas con VE y sometidas a la sección del NOS bilateral, la cantidad de folículos que se encuentran tanto al momento de la apertura vaginal como a los 70 días de edad se encuentran disminuidos en un 50% en comparación con su grupo proveniente de madres tratadas con Vh y sometidas a la misma sección. Estos resultados permiten sugerir que se encuentra alterada la secreción de gonadotropinas, o de manera alternativa, en los folículos se encuentra modificada la respuesta de los receptores a estas hormonas.

Sin embargo, ya que la disminución es muy significativa, eso podría apuntar a que la foliculogénesis de la rata pudo verse alterada desde el periodo gestacional. Al día 15 de gestación la vascularización del ovario es escasa y para el día 18 la cantidad de células germinales que se tienen está en su punto máximo, disminuyendo para el día 21 de gestación (Morales E., 1994). Si existe una alteración en el número de células germinales, es probable que esto entonces desencadene la falta de folículos en el estadio adulto.

Una de las hipótesis del SOPQ involucra la disminución del número de folículos primordiales y un aumento del número de folículos primarios, dando como resultado un fenotipo de poliquistosis ovárica (García Rojas y col., 2014). Si bien, en nuestros animales se lograron contabilizar folículos primarios, pero no primordiales y tampoco quistes ováricos, podemos suponer que las características que generan el síndrome se establecen después de los 70 días de edad, lo que explicaría porque aún no hay formación de quistes foliculares y por ende no se presente el incremento de la testosterona, que es el principal indicador de la patología. Dada la mínima cantidad de folículos que observamos, también podemos sugerir que existe una falla en el ovario que culminará con una disminución en la reserva de folículos, que nos hace pensar que se adelantará el término del período reproductivo de la rata la vida fértil de la rata.





Podemos suponer que en las ratas provenientes de madres con SOPQ y sección del NOS bilateral, se está alterando algún mecanismo que provoca que se presenten algunas características que pueden indicar que en un futuro el síndrome se establecerá, pero aún más importante podría ser el hecho de que no todas las características se presentan en un orden determinado y que cuando una se presenta el organismo tarda en asimilar la condición y presentar otra característica del SOPQ. Sin embargo, hacen falta más estudios para identificar como es la sucesión de eventos.

Tampoco podemos descartar que la falta de ovulación pueda deberse a que los mecanismos en los que se encuentra involucrada LH se encuentran alterados. Por ejemplo, la falta de señal de LH disminuye el contenido de EGF (factor de crecimiento epidermal, por sus siglas en inglés) en el líquido folicular, el cual es necesario para disminuir la concentración de guanosin monosfosfato cíclico dentro del complejo *cúmulus ophorus*, y poder de esta manera continuar la reanudación de la meiosis (García Balderas A., 2016).

En la mujer, la insuficiencia ovárica precoz o prematura se considera una amenorrea secundaria, la cual se presenta antes de los 40 años, y no tiene que ver con el cese de la vida reproductiva (menopausia), pero sí con la disminución de la producción de folículos, teniendo como características principales al hipoestrogenismo, lo cual puede causar enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, así como trastornos neurodegenerativos (Lara M. y Escalante C., 2015).

Se ha descrito que la etiología de la falla ovárica precoz tiene distintos orígenes, siendo el genético el más común de ellos, también puede ser ocasionada por una deficiencia en las enzimas que participan en la esteroidogénesis como son la 17 α hidroxilasa, la 17-20 desmolasa y las aromatasas (Lara M. y Escalante C., 2015).



No descartamos que, con la depleción de la cantidad de folículos, las ratas provenientes de madres con inducción del síndrome pudieran entrar en este proceso de falla ovárica precoz.

Durante el envejecimiento reproductivo de la rata (a los 8 meses inicia el período de la subfertilidad), se ha demostrado que existe un aumento de la NA que llega al ovario y con esto un incremento en el tono simpático del ovario, sin embargo, se sabe que existe una disminución en los valores de NGF, de igual manera existe una disminución en la concentración del estradiol el cual comienza su disminución a los seis meses de edad, para quedar sin variaciones cerca de los 14 meses (Acuña E.,2009).

Tampoco podemos descartar que en nuestras ratas pueda existir un envejecimiento prematuro del ovario o bien una falla ovárica precoz, puesto que nos encontramos en el periodo de optima fertilidad de la rata, sin embargo, son necesarios estudios de mayor profundidad para descartar cualquiera de las dos patologías antes mencionadas, ya que, con estos resultados, la fertilidad de las hijas se ve comprometida acortando su periodo de vida reproductiva.

Las ratas que han sido tratadas con VE y sacrificadas, ya sea en estadio adulto o bien en la etapa infantil presentan hiperandrogenismo, sin embargo, cuando las hembras son sometidas a la sección del NOS de manera unilateral o bilateral presentan concentraciones de testosterona por debajo del límite de detección del ensayo (Linares, 2011).

En nuestro grupo experimental, las hembras provenientes de madres tratadas ya sea con Vh o con VE y sometidas a la sección uni o bilateral de NOS, presentan esta misma característica, la concentración de testosterona se encuentra también por debajo del límite de detección, indicando así que las hijas no presentan un estado hiperandrogénico.





Conclusiones

- ✧ La rata proveniente de madre con SOPQ y sección del NOS uni o bilateral no presenta características del síndrome, al menos no en la generación filial 1.
- ✧ Las crías provenientes de madres Vh o con síndrome y sección del NOS, no presentan hiperandrogenismo.
- ✧ Las hembras provenientes de madres con VE más la sección bilateral del NOS presentan una disminución de folículos ováricos.
- ✧ En las hembras provenientes de madres tratadas con VE y sección bilateral del NOS, la disminución en la población folicular puede llevar al adelanto de la subfertilidad.





Anexo

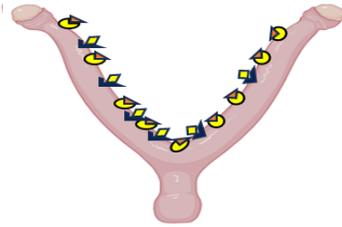
Modelo de madres con sección del NOS uni o bilateral



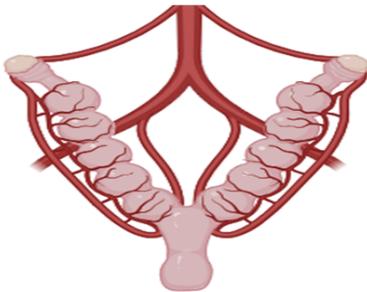
Rata sin
patología



Correcto
desarrollo del
útero



La cantidad de receptores de
progesterona y estradiol se encuentran
"normales" y funcionales



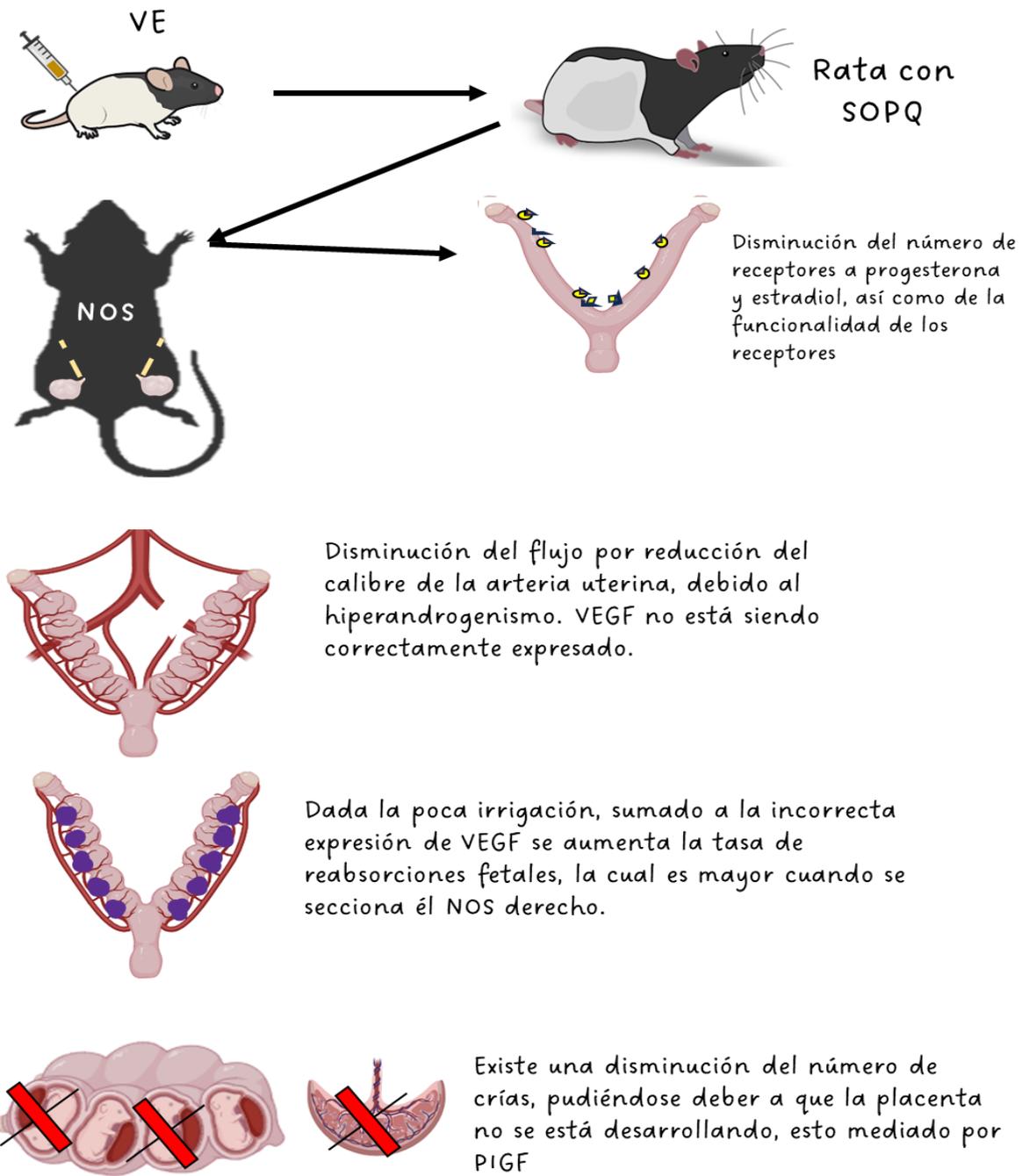
La vasculatura del útero no
presenta alteraciones, por lo que
existe una correcta irrigación.
Existe una correcta expresión de
VEGF.



Se da la correcta implantación de
las crías, PIGF se expresa
permitiendo el crecimiento de la
placenta, por lo tanto, existe una
gestación exitosa

Anexo 1: Esquema representativo de los procesos que creemos están facilitando la gestación en una rata sin patología, de acuerdo con lo señalado en la discusión del objetivo 1.





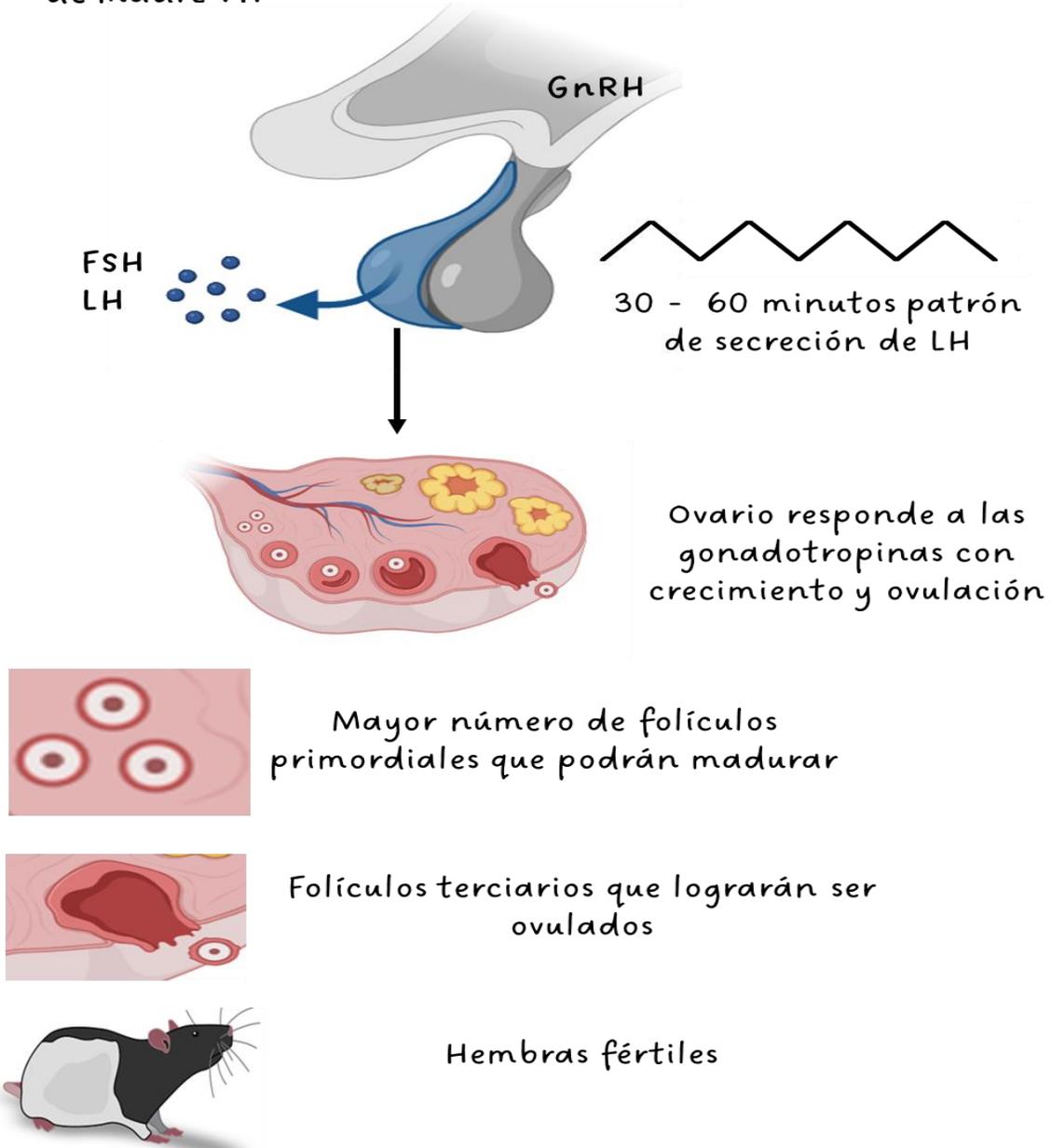
Anexo 2: Esquema representativo de los procesos que creemos se encuentran desregulados en útero por la acción del VE en el estadio infantil de la rata. Las características del SOPQ han sido atenuadas por la sección del NOS en el estadio adulto, sin embargo, el daño al útero es irreversible con lo que no se permite la correcta implantación de los embriones, o bien existen pocas crías, de acuerdo con lo señalado en la discusión del objetivo 1.





Modelo de la generación F1

Rata proveniente de madre VH

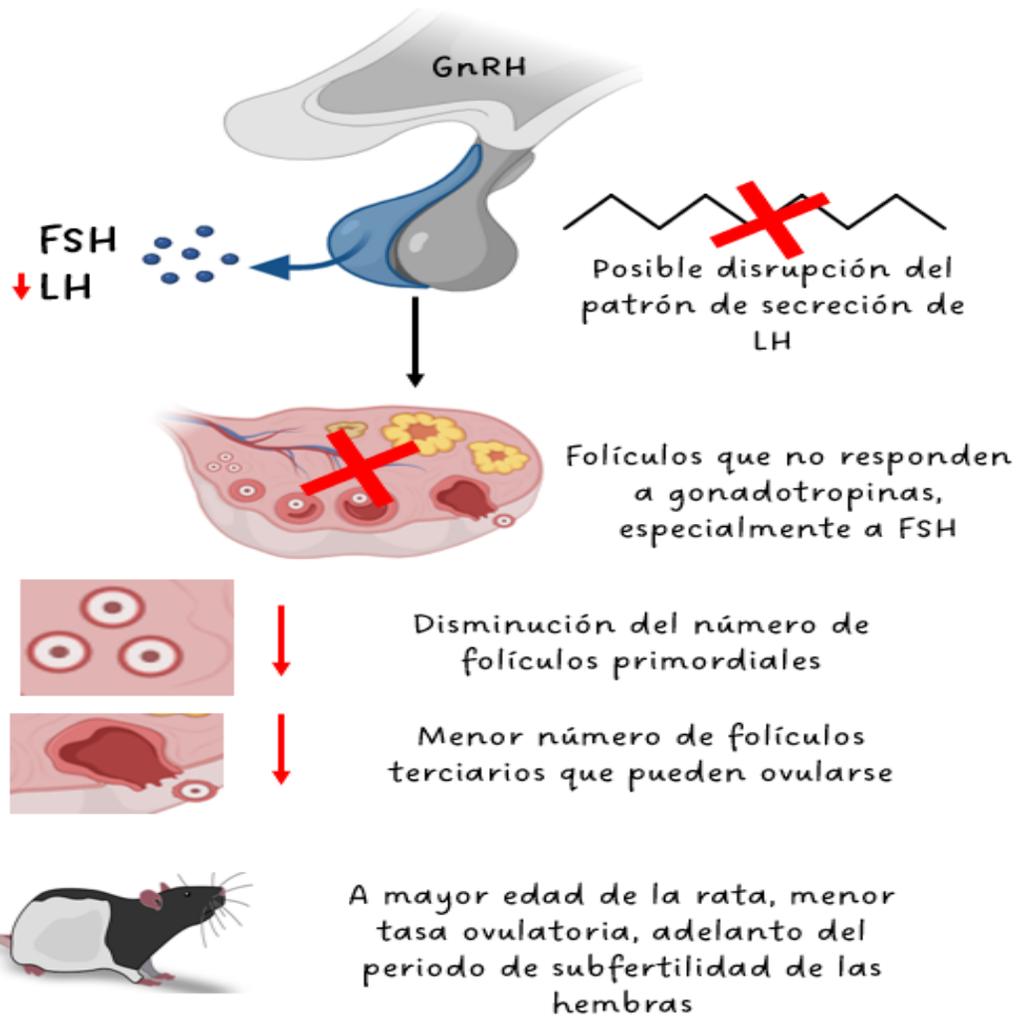


Anexo 3: Esquema representativo de los procesos que sigue el eje HHO en las hijas que provienen de madres tratadas con VH y sección del NOS uni o bilateral. Los ovarios están respondiendo de manera adecuada, y por tanto la fertilidad en las crías esta conservada esto de acuerdo con lo señalado en la discusión del objetivo 2.





Rata proveniente de madre con SOPQ



Anexo 4: Esquema representativo de los procesos que sigue el eje HHO en las hijas que provienen de madres tratadas con VE y sección del NOS uni o bilateral. Los ovarios no responden de manera adecuada a las gonadotropinas, especialmente a FSH impidiendo el correcto desarrollo de folículos, por tanto, evita el crecimiento de estos y la reserva folicular se encuentra disminuida, es por ello que existen menos folículos primordiales y preovulatorios con lo cual la fertilidad de estas hembras se encuentra comprometida, también se maneja una incorrecta secreción de LH con lo cual se ve comprometida la ovulación, tal y como se ha discutido en el objetivo 2.





Referencias Bibliográficas

1. Acuña E., Fornes Romina., Fernando Daniela., Garrido Maritza P., Greiner Mónica., Lara Hernán E., Paredes H. Alfonso. (2009) "Increases in norepinephrine release and ovarian cyst formation during ageing in the rat" *Reprod. Bio. Endocrinol* 7, 64.
2. Azziz R., Carmina E., Dewailly D., Diamanti-Kandarakis E., Escobar-Morreale F., Futterweit W., Witchel F. (2009). "The Androgen Excess and PCOS Society Criteria for the Polycystic Ovary Syndrome: The Complete Task Force Report" *Fertility and Sterility*, 91(2): 456-488.
3. Balasch J. (1999) "Síndrome de los ovarios poliquísticos: de la ginecología a la endocrinología o hacia una concepción unitaria". *Endocrinol. Nutr.* 46: (8) 251.
4. Barb CR., Kraelin RR. (2004) "Role of leptin in the regulation of gonadotropin secretion in farm animals" *Anim. Reprod. Sci.* 82-83:155-167
5. Barbieri RL. (2001) "La consulta inicial de fertilidad: recomendaciones sobre el tabaquismo, el índice de masa corporal y el consumo de alcohol y cafeína" *Revista Americana de Obstetricia y Ginecología* 185(5)1168-1173.
6. Bazer, F. (1999). Maintenance of Pregnancy. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Eds. Knobil, E.; Neill, J.D, Academic Press, New York, USA, 1002-1006.
7. Bennett JP., Vickery BH., (1970). Rats and mice. In: Hafez, E.S.E. (Ed.), *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*. Press, New York, NY. 145-176.
8. Berne R., Levy M. (2001) "Fisiología" 3aed. Editorial Elsevier-Science. Madrid.
9. Berne R., Levy M. (2006) "Fisiología" 4aed. Editorial Elsevier-Science. Madrid.
10. Botella J. (2005) "El ovario de los vertebrados" En: *El Ovario Fisiología y Patología*. Capítulo 1. pp.1 -22 Editorial Díaz de Santos. Madrid. España.
11. Braw RH., Tsafirri A. (1980) "Follicles Explanted from Pentobarbitone treated Rats Provide a Model for Atresia" *Journal of Reproduction and Fertility* 59: 259-265.
12. Brawer JR., Muñoz M., Farookhi R. (1986) "Development of the Polycystic Ovarian Condition (PCO) in the Estradiol Valerate Treated Rat" *Biology of Reproduction* 35:647-655.
13. Bremer A. (2010) "Polycystic Ovary Syndrome in the Pediatric Population" *Metabolic Syndrome and Related Disorders* 8 (5): 375-394.





14. Burden HW (1985) "The adrenergic innervation of mammalian ovaries" In: Ben Jonathan N, Bahar JM, Weiner R, editores "Catecholamines as hormone regulators" New York: Serono Simposia Publications from Raven Press. 261-278.
15. Burden HW 1978 Ovarian innervation. In *The Vertebrate Ovary: Comparative Biology*, pp 615-638. Ed RE Jones. New York Plenum Press.
16. Burden HW., Lawrence IE. (1977) "The effect of Denervation on Compensatory Ovarian Hypertrophy" *Neuroendocrinology* 23: 368-378.
17. Burgo Olmedo S., Chillik C., Kopelman S., (2003) "Definición y causas de la infertilidad" *Revista Colombiana de Ginecología y obstetricia* 54(4)1-22
18. Caro C., Fuhrer J., Sáez R., Rubio V., Moreno L. Cumsille M. (2002) "Efectos de la Metformina en el Síndrome de Ovario Poliquístico Asociado a Insulinoreistencia" *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología* 67 (1): 34-40.
19. Carrasco García A., Camacho Pernas M., Pacheco Cabrera P., Carrillo Castilla P. (2008) "Estudio de la actividad contráctil uterina basal durante el ciclo de la rata" *Rev. Med. UV*, 8(1):25-32
20. Ciotta L., Stracquadanio M. (2015) "Metabolic Aspects of PCOS: Treatment with Insulin Sensitizers". Editorial Springer ebook:1-15.
21. Cora CM., Kooestra L., Travlos G. (2015) "Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears" *Toxicologic Pathology*. 43; 776-793.
22. Cruz G., Barra R., González D., Sotomayor-Zárate R., Lara HE. (2012). Temporal Window in Which Exposure to Estradiol Permanently Modifies Ovarian Function Causing Polycystic Ovary Morphology in Rats. *Fertility and Sterility*, 98(5): 1283-1290.
23. Cruz Neculpán Gonzalo Andrés. (2011) "Efecto de la exposición a estradiol sobre la función reproductiva de la rata: cambios tempranos en la expresión génica y participación del factor de crecimiento nervioso" Tesis doctoral. Chile
24. Dissen G., Ojeda S. (1999) "Ovarian Innervation" *Encyclopedia of Reproduction*. Editorial Academic Press. USA. Cap. 3 pp. 583-589.
25. Domínguez R., Chávez R., Cruz ME. (1991) "La Regulación del Crecimiento y del Desarrollo del Folículo Ovárico" En: *Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción*. Editorial Miguel Ángel Porrúa. México; pp. 161-192.





26. Dumesic AD., Abbott H., Padmanabhan V. (2007) "Polycystic Ovary Syndrome and its Developmental Origins" *Endocrinology Metabol Disorders*. 8(2): 127-141
27. Dunaif A. (1995). "Hyperandrogenic Anovulation (PCOS): A Unique Disorders of Insulin Action Associated with an Increased Risk of Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus" *American Journal of Medicine*; 98(5): 33-39
28. Erickson G., Shimasaki S. (2001). "The Physiology of Folliculogenesis: The Role of Novel Growth Factors" *Fertility and Sterility*. 75(5) :943-949.
29. Espey L., Richards JA. (2005) "Ovulation" En: Knobil E., Neill JD (Eds). *The Physiology of Reproduction*, 3a ed. Editorial Raven Press. New York. Vol 2 Cap. 10: 425-474.
30. Fernández Sánchez V., Mayani H. (2008) "BMP4: Importante regulador del desarrollo embrionario y la hematopoyesis" *Revista de investigación clínica* 60:68-74
31. Fernandois D., Garrido M., Lara HE., Paredes A. (2014), "Regulación Neuronal de la Función Ovárica durante el Envejecimiento Reproductivo", *Revista Farmacología de Chile*. 7(1): 47-55.
32. Flores FI., Velasco C., Pardo MC., Pérez-Martínez M., (2005) "Apoptosis y Atresia Folicular: Un Binomio Esencial en el Desarrollo Ovárico" *Veterinaria México*. 36; 87-101.
33. Flores ME., Segura JE., (2005); "Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico"; *Revista Mexicana de Neurociencias*; 6; 315-326.
34. Flores-Pérez FI., Rosas-Velasco C. Romano-Pardo M., Pérez-Martínez M. (2005) "Apoptosis y Atresia Folicular: Un Binomio Esencial en el Desarrollo Ovárico" *Veterinaria México*. Vol. 36(1):91-103.
35. Franks S. (2001) "Diagnosis and treatment of anovulation. In: Hiller SG (ed.) *Ovarian endocrinology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford UK; pp 227-238.
36. Freeman M.E., 1994: *The Neuroendocrine Control of the ovarian cycle of the rat*. En: (Knobil E., Neill D.J. eds.) *The Physiology of Reproduction*. 2^d edition. Raven Press.
37. G. Robin, C. Ferte-Delbende, C. Proust-Richard, W. Karouz, D. Dewailly, S. Catteau-Jonard. (2012) "Infertilidad femenina de origen endocrino" *EMC-Gineología-Obstetricia*. 40(4):1-28
38. García Balderas Alejandra. (2016) Tesis de grado en Farmacia "Mecanismos moleculares y regulación endocrina de la ovulación" Universidad de Sevilla.
39. García Rudaz C., Armando I., Levin G. (1998) "Peripheral catecholamine alterations in adolescents with polycystic ovary syndrome" *Clinical Endocrinology (Oxford)* 49: 221-228.





40. Gasol F. (2005) "Epidemiología y Conceptos Generales" En: Síndrome de Ovario Poliquístico. Editorial Panamericana. Cap 1. pp. 13-24.
41. Gerendai I., Tóth El., Boldogkői Z., Medveczky I., Halász B., (2000) "CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function" Journal of the Autonomic Nervous System. 80: 40-45.
42. Gómez-Chang E., Larrea F., Martínez-Montes F. (2012) "Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis" Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 15 (1): 24-36.
43. Gougeon A. (2004) "Dynamics of Human Follicular Growth: Morphologic, Dynamic, and Functional Aspects" En: The Ovary. 2aed. Elsevier Academic Press. San Diego, USA. cap 2; pp 25-43.
44. Greenwald GS., Roy SK. (1994) "Follicular Development and its Control" En: Knobil E., Neill JD (Eds). The Physiology of Reproduction. 2aed. Editorial Raven Press. New York. Vol. 2. Cap. 12. pp. 629-724.
45. Gullace Federico, Galassi P. (1995) "Reproducción de animales de laboratorio" en Fisiología veterinaria. Autores: Sacristán Albino, González Javier. Páginas 987-998 Universidad de Buenos Aires, Argentina.
46. Hafez ESE., Hafez B. (2002) "Reproducción e Inseminación Artificial en Animales", 7aed. Editorial McGraw Hill. Cap. 2; 13-29.
47. Hall JE., (2014) "Neuroendocrine Control of the Menstrual Cycle" En: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Physiological Control Systems and Governing Gonadal Function. Cap 8; 141-156.
48. Harris M. A., Kesel M.L. (1990) "An improved method for accurately time mating in rats" Lab. Anim Sci. 4, 424-425.
49. Hsueh AJW., Billig H., Tsafiri A. (1994) "Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process" Endocrinology 15: 707-724.
50. Hu J., Zhang Z., Wen-Jun S., Salmar A. (2010) "Cellular Cholesterol Delivery, Intracellular Processing and Utilization for Biosynthesis of Steroid Hormones" Nutrition and Metabolism. 7 (47): 1-25.
51. Irusta G. (2008) Tesis Doctoral "Mecanismos Involucrados en la Atresia del Folículo Ovárico: Relación entre Esteroidogénesis, Angiogénesis y Apoptosis" Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Buenos Aires, Argentina.





52. Kalra SP. (1993) "Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the ovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge" *Revista Endocrinología*; 14:507-538.
53. Khan M., Ullah A., Basit S. (2019) "Genetic basis of polycystic ovary syndrome (PCOS): Current perspectives" *The applications of clinical genetics* 12:249-260
54. Klein CM., Burden HW. (1988) "Anatomical Localization of Afferent and Postganglionic Sympathetic Neurons Innervating the Rat Ovary" *Neuroscience Letters*. 85: 217-222.
55. Lara H., Hill D., Katz H., Ojeda S. (1990) "The gene encoding nerve growth factor is expressed in the immature rat ovary: effect of denervation and hormonal treatment" *Endocrinology*. 126(1):357-363
56. Lara HE, Ferruz JL, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR. Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*. 1993;133(6):2690-5
57. Lara HE., Dissen A., Leyton V., Paredes A., Fuenzalida H., Fiedler JL., Ojeda S. (2000) "An Increased Intraovarian Synthesis of Nerve Growth Factor and its Low Affinity Receptor is a Principal Component of Steroid-Induced Polycystic Ovary in the Rat" *Endocrinology*. 141 (8): 1059-1072.
58. Lara HE., Ferruz JL., Luza S., Bustamante DA., Borges Y, Ojeda SR., (1993) "Activation of Ovarian Sympathetic Nerves in Polycystic Ovary Syndrome" *Endocrinology*. 133: 2690-2695.*Lara HE., Ferruz JL., Luza S., Bustamante DA., Borges Y., Ojeda SR. (1993). "Activation of Ovarian Sympathetic Nerves in Polycystic Ovary Syndrome". *Endocrinology*. 133(6): 2690-2695.
59. Lara Mariarlenis., Escalante Cesar. (2015). Falla ovárica prematura. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*, 13(3), 136-145
60. Lawrence IE Jr, Burden HW. The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *Anat. Rec*. 1980;196(1):51-9
61. Levine JE. (2015) "Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat" En: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. Physiological Control Systems and Governing Gonadal Function. Cap. 26; 1-59.
62. Linares R. (2011) "Interacción entre los nervios ovárico superior y vago en la regulación de la ovulación y la secreción hormonal : la rata con síndrome de ovario poliquístico como modelo de estudio" Tesis de Maestría, México, Universidad Nacional Autónoma de México.



63. Lohmiller, J.J.; Swing, S.P. (2006). Reproduction and breeding. In: The laboratory rat Eds: Suckow, M.A.; Weisbroth, S.H.; Franklin, C.L. American College of Laboratory Animal Medicine Series, Academic Press, pp 147-165
64. Luján E., Hernández-Marín I., Ruiz-Ayala A. (2006) "Utilidad Actual de las Pruebas Diagnósticas de Hiperandrogenismo" *Ginecología y Obstetricia de México*. 74 (6): 327-333.
65. Luna SL, Neuman S, Aguilera J, Brown DI, Lara HE. In Vivo β -Adrenergic Blockade by Propranolol Prevents Isoproterenol-Induced Polycystic Ovary in Adult Rats. *Horm. Metab. Res.* 2012;44 (9):676-81
66. Maeda KI., Ohkura S., Tsukamura H., 2000. Physiology of reproduction. In: Krinke G.J. (Ed.), *The Laboratory Rat*. Academic Lea and Febiger, Philadelphia, PA, pp. 299-315
67. Magendzo A. "Anovulación y disfunción ovulatoria e infertilidad" *Revista Médica Clínica Las Condes*. 21(3) 377-386.
68. Malamed S., Gibney J., Ojeda S. (1992) "Ovarian Innervation Develops Before Initiation of Folliculogenesis in the Rat" *Cell and Tissue Research*. 270:87-93.
69. Maliqueo Manuel, Echiburú Bárbara. (2014) "Programación fetal de las enfermedades metabólicas" *Sociedad de Farmacología de Chile, Revista Farmacología de Chile* 7(1):33-46
70. Matalliotakis I., Kourtis A., Koukoura O. (2006) "Polycystic Ovary Syndrome: Etiology and Pathogenesis" *Archives of gynecology and obstetrics*. 27(4): 187-197.
71. Mayerhofer A., Dissen G., Costa M., Ojeda S. (1997) A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary" *Endocrinology* 138:3320-3329
72. Mora C., Morales L., Quiróz U., Domínguez R (2000) "Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in infantile rats on follicular growth" *Journal of endocrinology* 166:205-211
73. Morales L, Chávez R, Domínguez R. Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve. *Med Sci Res.* 1993; 21:15-17
74. Morales Ledesma L., Linares R., Rosas G., Moran C., Chavira R., Cárdenas M., (2010) "Unilateral sectioning of the superior ovarian nerve of rats with polycystic ovarian syndrome restores ovulation in the innervated ovary" *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8:99





75. Morales Pérez María Esthela (1994) Tesis doctoral “Estudio ultraestructural sobre la organización de los folículos primordiales en la rata” Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina. Monterrey, Nuevo León.
76. Morales AJ., Laughlin GA., Butzow T. (1996) “Insulin, Somatotrophic, and Luteinizing Hormone Axes in Lean and Obese Women with Polycystic Ovary Syndrome: Common and Distinct Features” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(8): 2854-2864.
77. Morales-Ledesma L. (2015). “Regulación Neuroendócrina del Ovario” En *Procesos Fisiológicos y Toxicológicos de la Reproducción*. Puebla, México. Editorial BUAP Dirección de Fomento Educativo. pp. 113-133.
78. Morán C, Pastelín CF, Rosas NH, Morales-Ledesma L., Linares R., Domínguez R. (2010) “Anatomical Organization and Neural Pathways of the Ovarian Plexus Nerve in Rats” *Journal of Ovarian Research* 10:18.
79. Moran C, Tapia MC, Hernandez E, Vazquez G, Garcia Hernández E, Bermúdez JA. (1994) “Etiological Review of Hirsutism in 250 Patients” *Archives of Medical Research*, 25(3), 311-314
80. Nalbandov, A.V. (1969). La estructura de los sistemas reproductores. En: *Fisiología de la Reproducción*. Ed. Nalbandov; AV; Acribia; Zaragoza; España; pp 26-62.
81. Navarrete MI. (2014) Tesis de Licenciatura “Modificación de las Funciones Ováricas en el Animal con Síndrome de Ovario Poliquístico Inducido por la Administración de Valerato de Estradiol o la Exposición de Estrés por Frío.” Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México DF.
82. Netter FH. (2003) “Atlas de Anatomía Humana” 3aed. Editorial Masson, España.
83. Noriko S., Komatsu K., Wang J., Mamoru Y., Fumita K., Akira I., (2015) “Regulation of secondary follicle growth by theca cells and insulin-like growth factor 1” *Advance Publication by J-STAGE, Journal of reproduction and development*. Pp 1-28.
84. Ojeda S R., Jameson H E. (1977) “Developmental patterns of plasma and pituitary growth hormone (GH) in the female rat” *Endocrinology* 100: 881-889.
85. Ojeda SR., Skinner MK. (2006). “Puberty in the Rat” En: *Knobil and Neill’s Physiology of Reproduction*. Editorial Elsevier. pp. 2061-2126.



86. Orisaka M., Orisaka S., Jiang JY., Craig J., Wang Y., Kotsuji F., Tsang BK. (2006) "Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage" *Mol. Endocrinol.* 20:2456-2468
87. Otsuka F., Yamamoto S., Erickson., Shimasaki S., (2001) "Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression" *J Biol. Chem.* 276:11387-11392
88. Otsuka F., McTavish KJ., Shimasaki S. (2011) "Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function" *Mol. Reprod. Dev.* 78: 9-21
89. Pastelin CF., Rosas NH., Morales Ledesma L., Linares R., Dominguez R., Moran C. (2017) "Anatomical organization and neural pathways of the ovarian plexus nerve in rats" *J. Ovarian Res.* 10:18
90. Peluso J., Steger RW., Hafez ES. (1976) "Development of Gonadotrophin-binding sites in the Immature Rat Ovary" *Journal of Reproduction and Fertility.* 47(1): 55-58.
91. Pierson Roger A. (2019) "Human folliculogenesis revisited: The menstrual Cycle visualized by ultrasonography" Edit. Elsevier. Capitulo 3. 51-69
92. Quezada S., Avellaira C., Jhonson MC., Gabler F., Fuentes A., Vega M. (2006) "Evaluation of steroid receptors, coregulators, and molecules associated with uterine receptivity in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome" *Fertil Steril.* 85:1017-1026
93. Quintero V. Juan C., Ruíz Cortez Zulma T. (2008) "Efectos de la leptina en el inicio de la pubertad en animales machos" *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* 21(1),97-108.
94. Reiner M., Paredes A., Araya V., Lara HE. (2005) "Role of Stress and Sympathetic Inervation in Development of Polycystic Ovary Syndrome" *Endocrine.* 28 (3):319-324.
95. Rojas García P P., Recabarren M P., Palma S., Maliqueo M., Carrasco A., Sir Petermann T., Recabarren S E. (2014) "Ovarian morphometry and mRNA expression of antimullerian hormone (AMH), follicle stimulating hormone receptor (FSHR) and nuclear factor kappa B (NFkB) in growing follicles of females lambs prenatally exposed to testosterone" *Arch. Med. Vet.* 46,13-21
96. Rosas G. (2006) Efecto de la inducción del Síndrome del Ovario Poliquístico en la rata infantil, sobre la dinámica del crecimiento folicular y la secreción de hormonas esteroides. Tesis de licenciatura México: Universidad Nacional Autónoma de México.



97. Russell DL., Robker RL. (2007) "Molecular Mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex" *Humupd (Oxford)*. 13(3):289-312.
98. Salehi M., Baravo R., Sheikh A., Gouller A., Poretsky L. (2004) "Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome: Whats is the role of Obesity?" Elsevier: 358-376.
99. Sánchez-Criado JE. (1999) "Fisiología del Ovario" en Tresguerres JA (Eds.) *Fisiología Humana*. 2a Edición. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. Madrid, España. Cap. 75. Pp.1040-1055.
100. Semenova II (1963) *Vest. Akad. Med. Nauk SSSR* 24:58-62
101. Semenova II. (1969) "Adrenergicheskaia innervatsiia iaichnikov pri sindrome shteina-leventalia (Adrenergic innervation of ovaries in Stein-Leventhal syndrome). *Vestn Akad Med Nauk SSSR*. 24(9):58-62. Russian.
102. Seya T, Akazawa T, Tsujita T, Matsumoto M. (2006) "Role of Toll-like Receptors in Adjuvant-augmented Immune Therapies. Evid Based Complement" *Alternative Medicine*. 3:31-38.
103. Shoupe D., Lobo R., (1985) "Evidence for altered catecholamine metabolism in polycystic ovary syndrome" *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 150:536-554
104. Sotomayor-Zárate R., Dorfman M., Paredes A., Lara HE. (2008) "Neonatal Exposure to Estradiol Valerate Programs Ovarian Sympathetic Innervation and Follicular Development in the Adult Rat" *Biology of Reproduction*. 78: 673-680.
105. Sotomayor-Zárate R. (2008) Tesis Doctoral: "La Administración Neonatal de Estrógenos y Andrógenos, Afecta la Función Reproductiva de la Rata Adulta y la Neurotransmisión Monoaminérgica en el Hipotálamo Ventromedial. Estudios Neuroquímicos y Farmacológicos in vivo" Universidad de Chile. Santiago de Chile.
106. Stein IF., Leventhal ML. (1935) "Amenorrhea Associated whit Bilateral Polycystic Ovaries" *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 29(2): 181-191
107. Stener Victorin E., Deng Q. (2021) "Epigenetic inheritance of polycystic ovary syndrome- challenges and opportunities for treatment" *Nat. Rev. Endocrinol*. 17(9):521-533
108. Strauss JD., Williams CJ. (2014) "The Ovarian Life Cycle" En: Yen SSC., Jaffe 's (eds.) *Reproductive Endocrinology*. 7aed. Cap. 9. pp. 157-191
109. Tarazona A., López A., Olivera-Angel M., (2010) "La competencia del ovocito: qué, cómo y cuándo" *Acta de biología*. Colombia 15(3)3-18





110. Telford I., Woodruff C., Linford R. (1962) "Fetal resorption in the rat as influenced by certain antioxidants" The George Washington University, School of medicine, Department of anatomy, Washington DC. 29-36
111. Tresguerres JA., Castillo C. (2005) "Fisiología del Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario" En: Tresguerres JA (Eds). Fisiología Humana. 3ª edición. Editorial McGraw-Hill. Madrid. España Cap. 79. pp. 107-118.
112. Trujillo A., Gutiérrez G., Linares R., Cortés Ma. C., Eguibar J., (2015), "El Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovarios Un Viejo Conocido, Nuevos Hallazgos y más por Conocer". En: Procesos Fisiológicos y Toxicológicos de la Reproducción. Editorial BUAP, Dirección de Fomento Editorial Puebla, México. pp: 95-111.
113. Uchida S., Kagitani F. (2015) "Autonomic nervous regulation of ovarian function by noxious somatic afferent stimulation" *J. Physiol Sci.* 65:1-9
114. Vandenberg J.G. (2003) "Prenatal hormone exposure and sexual variation" *Am. Sci.* 91,218-225.
115. Vantman David., Vega Margarita (2010) "Fisiología reproductiva y cambios evolutivos con la edad de la mujer" *Rev. Med. Clin. Condes.* 21(3) 348-362.
116. Varayoud A., Ramos J., Joazeiro P., Montes G., Muñoz M., Luque E. (2001) "Characterization of fibroblastic cell plasticity in the lamina propria of the rat uterine cervix at term" *Biology of reproduction.* 65:375-383
117. Vargas, J. A. V., Núñez, D. A. O., Marín, I. H., Rodríguez, J. M. T., & Ayala, A. R. (2005). Análisis epidemiológico de la infertilidad en una población mexicana. *Ginecol Obstet Mex*, 73, 360-4
118. Vidal JD., (2017). "The impact of age on the female reproductive system: a pathologist's perspective". *Toxicol. Pathol.* 45, 206-215.
119. Wang, H.; Dey, S.K. (2006). Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet* 7: 185-199
120. Witchel S., Recabarren S., González F. (2012) "Emerging concepts about prenatal genesis, aberrant metabolism and treatment paradigms in polycystic ovary syndrome" *Endocrine*, 42: 562-534.





121. Yen SSC. (1999) "Polycystic ovary syndrome (hyperandrogenic chronic anovulation)" In: Yen SS, Jaffe RB, editors. Reproductive endocrinology. Philadelphia: WB Saunders Co. 4ta ed. P 436-476
122. Yen SSC. (2001) "Ciclo Menstrual Humano: Regulación Neuroendocrina". EN: Yen SSC, Jaffe RB., Barbieri RL. (eds.) Endocrinología de la Reproducción. 4ª edición. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. Cap. 7. Pp. 212-216.
123. Yen SSC., Vela P., Rankin J. (1970) "Inappropriate Secretion of Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone in Polycystic Ovarian Disease" The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 30 (4): 435-442.

