



Universidad Nacional Autónoma de México

**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
Carrera de Biología**

**“Efecto de la microinyección de xilocaína en la
bursa ovárica, sobre la función ovárica en ratas
con el síndrome del ovario poliquístico”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGA
PRESENTA:**

SÁNCHEZ VERDE DIANA

Directora de tesis: Dra. Leticia Morales Ledesma

Asesoras de tesis:

Dra. Linares Culebro Rosa

Dra. Espinoza Moreno Julieta Azucena



**Investigación realizada gracias al programa UNAM DGAPA-PAPIIT
con clave IN207022**

CDMX, febrero 2024



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
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
Carrera de Biología

**“Efecto de la microinyección de xilocaína en la
bursa ovárica, sobre la función ovárica en ratas
con el síndrome del ovario poliquístico”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA
PRESENTA:

SÁNCHEZ VERDE DIANA

Directora de tesis: Dra. Leticia Morales Ledesma

Asesoras de tesis:

Dra. Linares Culebro Rosa

Dra. Espinoza Moreno Julieta Azucena



**Investigación realizada gracias al programa UNAM DGAPA-PAPIIT
con clave IN207022**

CDMX, Febrero 2024

AGRADECIMIENTOS

*A **DIOS** por el privilegio de la vida, por mi amada familia, amistades, y doctoras. Por siempre darme motivos para crecer y seguir adelante. Gracias.*

*A la **UNAM**, por permitirme desarrollarme como profesionista y como persona. Por su apoyo desde inicio hasta el final de mi carrera. Gracias*

*A la **Dra. Leticia Morales Ledesma** por darme la oportunidad y confianza de pertenecer a su equipo de trabajo. Por no soltarme en mis momentos más difíciles y brindarme siempre su apoyo, paciencia, amabilidad y sabiduría. Gracias desde lo mas profundo de mi corazón.*

*A la **Dra. Rosita** por mostrarme la bióloga que quiero ser en esta vida, por todos esos momentos enriquecedores de sabiduría académica e incluso personal. Por la confianza y el tiempo que me brindo. Gracias por nunca perder la fe en mi doctora. Gracias.*

*A la **Dra. Andrea**, por ser mi apoyo en mis momentos mas duros, por su calidez al escucharme y compartirme palabras de aliento. Por su ayuda incondicional, por su amabilidad, por sus consejos, por siempre mostrarme su lado más bello y cariñoso. GRACIAS.*

A los miembros del jurado:

Dra. Roldan Reyes Elia

Dra. Linares Culebro Rosa

Dra. Espinoza Moreno Julieta Azucena

Dra. Chaparro Ortega Andrea

Por dedicar tiempo a la revisión de este estudio y compartir sus conocimientos. Gracias.

A todos mis compañeros de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción.

DEDICATORIAS

A mis padres Mayra y Jesús y hermano Antonio, por ser mi mundo y mi mas grande razón de ser y de vivir. Por sostenerme, por alentarme, por cuidarme y regañarme, también; pero sobre todo por ayudarme a realizar uno de mis grandes sueños, ser bióloga. Gracias, por tanto. Gracias por todo. Los amo.

*A mi **MADRE MAYRA**. Mami gracias por enseñarme desde pequeña a soñar sin miedo y sin limitaciones. Todo lo que soy es gracias a ti y para ti. Eres mi vida, mi más grande motivación y mayor ejemplo a seguir. Gracias por estar siempre para mi incluso cuando no podías ni contigo misma. Gracias por todas tus palabras de amor y de apoyo. Este logro no se habría hecho realidad de no estar conmigo. Te amo mamita.*

*A mi **PADRE JESÚS**. Papito, gracias por todo tu apoyo incondicional. Por todos esos años de sacrificios y trabajo duro para que yo pudiera estudiar y por fin, el día de hoy, terminar mi carrera. Gracias por quedarte conmigo hasta altas horas de la noche cuando mis estudios se ponían pesados. Gracias por tu amor papá.*

*A mi **HERMANO ANTONIO**. Hermanito, gracias por todo tu apoyo y cariño. Gracias por hacerme reír y abrazarme cuando mas lo necesitaba, por hacerme compañía cuando estudiaba y regañarme cuando ya era tarde y aun no iba a dormir.*

*A mis **GATITOS Y PERRITOS**. Gracias por hacerme compañía en las madrugadas de estudio, por su amor y sus cariños en mis momentos vulnerables y más saturados de estrés. Gracias por todo su amor.*

*A mis amigas **MILDRED, MICHELLE y GREGORIO**. Por su apoyo incondicional durante el desarrollo de este trabajo. Por hacer mi estancia en el laboratorio mas alegre y amena. Gracias.*

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	5
❖ El Ovario	7
❖ Desarrollo Folicular	9
❖ Atresia	15
❖ Ovulación	16
❖ Esteroidogénesis Ovárica	19
❖ Inervación Ovárica	22
Xilocaína	27
Bursa Ovárica	28
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
HIPÓTESIS	30
OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS PARTICULARES	30
MATERIAL Y MÉTODO	31
Inducción del SOPQ	32
Microinyección de Xilocaína en la bursa ovárica	32
Autopsia	33
Morfología Ovárica y Dinámica Folicular	33
Cuantificación de Hormonas Esteroides	34
Análisis Estadístico	34
RESULTADOS	35
Efecto de la microinyección unilateral o bilateral de xilocaína, sobre las funciones ováricas	35
❖ Porcentaje de Animales Ovulantes	35
❖ Número de Ovocitos Liberados	37
❖ Dinámica Folicular	39
❖ Histología Ovárica	44
❖ Concentración de Hormonas Esteroides	46
❖ Peso de Órganos	48
DISCUSIÓN	50

MODELO	63
Conclusiones	65
REFERENCIAS	67

ABREVIATURAS

SOPQ Síndrome de Ovario Poliquístico	StAR Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda
VE Valerato de Estradiol	3β-HSD 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
NOS Nervio Ovárico Superior	17β-HSD 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
NV Nervio Vago	NPO Nervio del Plexo Ovárico
GnRH Hormona Liberadora de Gonadotropinas	GCMS Ganglio Celiaco Mesentérico Superior
LH Hormona Luteinizante	VIP Péptido Intestinal Vasoactivo
FSH Hormona Folículo Estimulante	NPY Neuropeptido Y
NA Noradrenalina	Ach Acetilcolina
SNC Sistema Nervioso Central	NIH Institutos Nacionales de la Salud
GDNF células gliales	ESHRE Sociedad Europea de Reproducción y Embriología
KL factor ligando c-Kit	ASRM Sociedad Americana de Medicina Reproductiva
FC Células Foliculares Aplanadas	SEA Sociedad de Exceso de Andrógenos
N Núcleo	NGF Factor de Crecimiento Neural
GC Células de la Granulosa	TH Tirosina Hidroxilasa
ZP Zona Pelúcida	ANDEVA Análisis de Varianza Multifactorial de dos vías
A Antro	Vh Vehículo
TI Células de la Teca Interna	ST Sin Tratamiento
TE Células de la Teca Externa	BI Bursa Ovárica Izquierda
CO Cúmulo Oóforo	
SG Estrato Granuloso	
LDL Lipoproteínas de baja densidad	
PKA Proteincinasa A	

BD Bursa Ovárica Derecha

AB Ambas bursas Ováricas

XILO Xilocaína

H-E Hematoxilina-Eosina

F Folículo,

FA Folículo Atrésico,

PQ Prequiste

Q Quiste.

GTD Monosulfato de Guanetidina

RESUMEN

El síndrome de ovario poliquístico (SOPQ) es un trastorno neuroendocrino, que afecta del 6 al 10% de mujeres en edad reproductiva. Se ha mostrado que, en roedores, la inyección de valerato de estradiol (VE) produce un cuadro clínico semejante al observado en la mujer, el cual incluye hiperandrogenismo, anovulación y estructuras quísticas. Una de las hipótesis sobre la etiología del SOPQ, postula que se debe a la hiperactividad de las fibras simpáticas que inervan al ovario vía el nervio ovárico superior (NOS). En ratas con SOPQ, la sección bilateral del NOS o la del nervio vago (NV), resulta en el restablecimiento de la respuesta ovulatoria. Estas evidencias han permitido sugerir que la información nerviosa que recibe el ovario vía el NOS y el nervio vago regulan la persistencia del SOPQ. Por otro lado, Domínguez y colaboradores (1998), mostraron que el adormecimiento de la señal nerviosa por la microinyección de xilocaína (anestésico local) en el ovario izquierdo, resulta en la disminución en el número de ovocitos liberados por ambos ovarios, lo que sugiere un bloqueo en la señal nerviosa que regula la función ovárica. Por lo tanto, el presente estudio tiene el objetivo de analizar si en ratas con SOPQ, el adormecimiento de las señales nerviosas restablece la función ovárica, por lo que se evaluó, el efecto de la microinyección de xilocaína en la bursa del ovario izquierdo, derecho o en ambas bursas, sobre la respuesta ovulatoria y la secreción de hormonas esteroides. Para ello, ratas de 10 días de edad fueron inyectadas con VE, al cumplir 60 días de edad fueron sometidas a la microinyección de 20 μ L de xilocaína en una o ambas bursas ováricas. En ratas con SOPQ, la microinyección de xilocaína en el ovario derecho resultó en la ovulación por ambos ovarios en el 38% de los animales, mientras que, cuando se microinyectó el ovario izquierdo, el 54% de los animales ovuló por el ovario derecho y el 38% por el izquierdo. Los animales microinyectados con xilocaína en ambas bursas ováricas presentaron una ovulación de casi el 50%

por el ovario izquierdo y el 11% por el ovario derecho. Estos resultados permiten sugerir que en animales con SOPQ, la microinyección unilateral o bilateral de xilocaína revierte parcialmente la condición de anovulación.

Por otro lado, no se observaron cambios significativos en la dinámica folicular cuando la xilocaína se aplicó de manera unilateral. Sin embargo, cuando ambas bursas fueron microinyectadas con el anestésico se observó que el ovario derecho es quien presenta un mayor número de folículos sanos, lo que se acompañó de una disminución en el número de quistes y prequistes.

En animales con o sin la patología, la microinyección unilateral o bilateral de xilocaína, resultó en un aumento en la concentración de la testosterona, así como en la de estradiol, respecto a sus grupos control.

Tomados en conjunto, estos resultados nos permiten sugerir que, el adormecimiento de las señales neurales por la administración unilateral o bilateral del anestésico a nivel de bursa ovárica no disminuye significativamente la hiperactividad simpática que llega a la gónada vía el NOS, y por lo tanto la respuesta que se manda al hipotálamo a través del nervio vago no favorece el restablecimiento de los pulsos de secreción de gonadotropinas como se esperaba. Por lo que, es probable que existan mecanismos intrínsecos de los ovarios que estén regulando el mantenimiento y persistencia del SOPQ, tal como la inervación intrínseca de la gónada.

INTRODUCCIÓN

Las funciones ováricas se encuentran reguladas por una vía endocrina y una nerviosa (Tresguerres, 2003). La alteración en cualquiera de estas vías puede provocar el desarrollo de patologías, tales como el Síndrome de Ovario Poliquístico (SOPQ).

El SOPQ se puede definir como una fisiopatología que comúnmente afecta a mujeres en edad reproductiva (Moran, 2006), y que de manera clínica desarrolla un diverso cuadro de síntomas y signos; los cuales abarcan desde presentar un hiperandrogenismo clínico o bioquímico, disfunción ovárica (oligo-anovulación) y la presencia de ovarios poliquísticos (Checa y col., 2007).

El origen de esta condición aún es un debate, debido a la variedad de fenotipos que presentan. Sin embargo, en la búsqueda de establecer un modelo que pueda explicar la etiología del síndrome se han utilizado diversos modelos experimentales, que han permitido plantear algunas hipótesis sobre su etiología. Una de ellas se atribuye a la alteración a nivel hipotalámico, en la frecuencia de los pulsos de secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), lo cual a nivel ovárico resulta en una mayor liberación de hormona luteinizante (LH), sin modificar la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH), provocando una disociación en la relación de estas dos hormonas y en consecuencia, el establecimiento del hiperandrogenismo, oligo-anovulación y presencia de quistes en los ovarios (Moran, 2006).

Otra de las hipótesis que se plantea, se encuentra relacionada con la inervación y la hiperactividad de las fibras noradrenérgicas que llegan al ovario vía el nervio ovárico superior (NOS) (Lara y col., 2000). La sección bilateral del NOS disminuye la concentración de noradrenalina (NA) ovárica, lo que resulta en el restablecimiento de la ovulación y en la normalización de

las concentraciones séricas de hormonas esteroides (Barria y col., 1993). Sin embargo, Morales- Ledesma y colaboradores (2010) mostraron que cuando se realiza la sección unilateral del NOS, solo ovula el ovario inervado. Mientras que, la sección unilateral o bilateral del nervio vago en animales con SOPQ, resulta en el restablecimiento de la ovulación por ambos ovarios, lo que permite sugerir que la hiperactividad simpática no es la única vía responsable del desarrollo y mantenimiento de la fisiopatología (Linares y col., 2013).

Por otro lado, Domínguez y colaboradores en 1991 mostraron que la xilocaína, un anestésico local, cuando es inyectada en la bursa ovárica izquierda de ratas adultas cíclicas provoca una disminución en el número de ovocitos liberados. Por lo que, los autores sugieren que la xilocaína adormece las señales que la gónada pudiera enviar o recibir del sistema nervioso central (SNC).

Con base en lo anterior, en el presente estudio se decidió evaluar en el animal con SOPQ, el efecto de la microinyección de xilocaína como un bloqueador de las señales nerviosas que envía y recibe la gónada vía el NOS y el nervio vago, sobre la respuesta ovulatoria y el mantenimiento del SOPQ.

ANTECEDENTES

❖ El Ovario

Los ovarios (Figura 1) son dos cuerpos con forma de almendra. En la mujer después de la pubertad miden aproximadamente 3 cm de largo, 1.5 cm de ancho y 1 cm de espesor (Ross & Pawlina, 2015) y pesan alrededor de 15 gramos (Treguerres, 2005). Se encuentran alojados en la pelvis, fijados a la superficie posterior del ligamento ancho por medio de un pliegue peritoneal denominado mesoovario (Eynard y col., 2008).

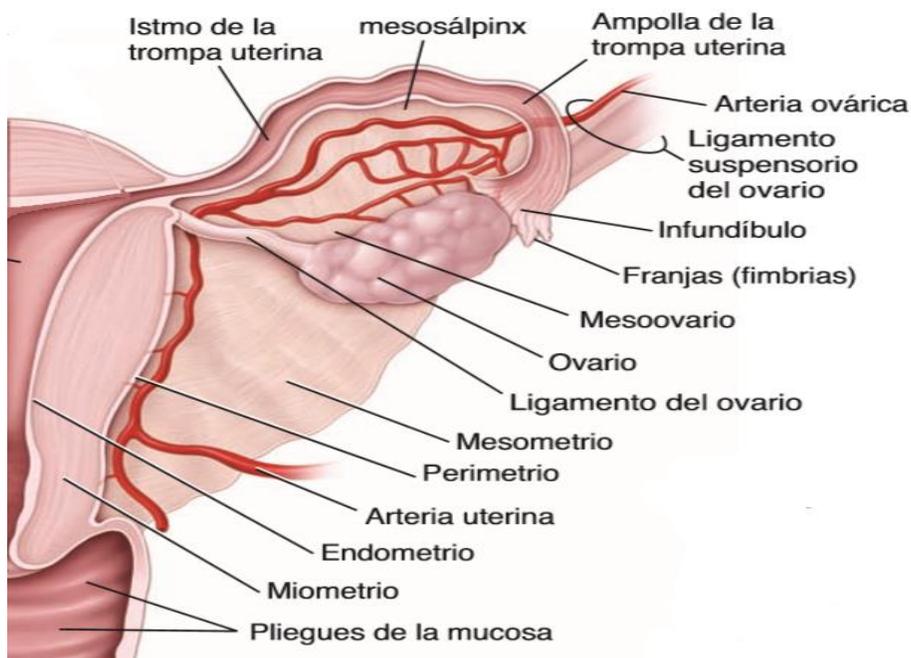


Figura 1. Esquema que muestra las estructuras que fijan a los ovarios (Tomada y modificada de Ross & Pawlina., 2015)

En la rata adulta, los ovarios tienen un peso aproximado de 30 mg cada uno y miden 4.35 mm de ancho, 5.5 mm de largo y 1.6 mm de grosor (Ramírez, 2011).

Después del quinto mes de vida fetal, en el ovario humano (Figura 2) se pueden observar tres regiones perfectamente estructuradas (Tresguerres, 2005):

1. **Corteza:** Es la zona externa del ovario que contiene folículos ováricos en diferentes etapas de desarrollo y está compuesta por una red de tejido conjuntivo, llamada estroma o también conocida como compartimiento intersticial (Garther y Hiatt, 2007).
2. **Médula:** Es un tejido conjuntivo que contiene vasos sanguíneos, vasos linfáticos, fibras nerviosas, así como células intersticiales e hiliares (Eynard y col., 2008).
3. **Hilio:** A través de éste ingresan nervios, vasos sanguíneos, linfocitos, tejido conectivo de sostén y algunas células esteroidogénicas denominadas células hiliares (Tresguerres, 2005).

Las funciones ováricas son la producción de óvulos y la secreción de hormonas esteroides (progesterona, testosterona y estradiol) y peptídicas (activina, inhibina y folistatina) (Tresguerres, 2005).

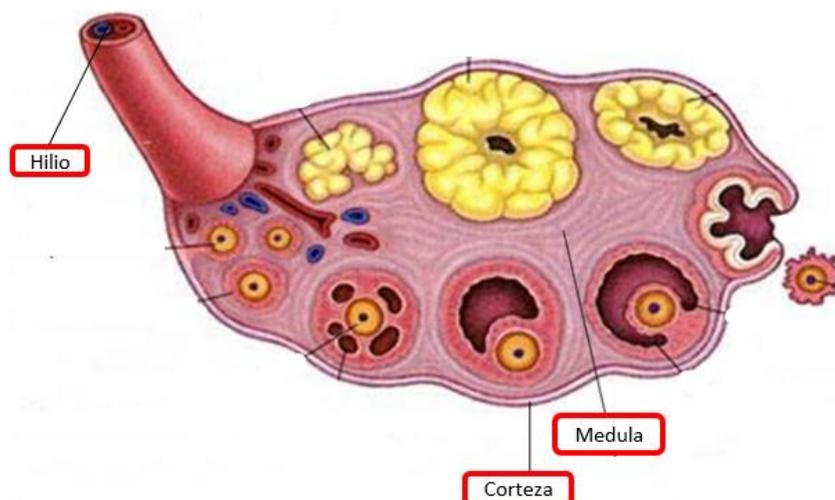


Figura 2. Esquema de un ovario de mujer señalando las 3 regiones principales que lo integran (modificado de Grther y Hiatt, 2007)

❖ Desarrollo Folicular

La foliculogénesis es el proceso por el cual un folículo primordial se desarrolla hasta llegar a ser un folículo preovulatorio (Figura 7) por acción de las gonadotropinas y por estímulo de la información nerviosa que llega al ovario (Domínguez y col., 1991; Tresguerres, 2003).

En la mujer, el desarrollo folicular comienza a partir del tercer mes de gestación y para el nacimiento hay aproximadamente dos millones de folículos primordiales, algunos de los cuales se desarrollarán a lo largo de su vida reproductiva (Sotomayor y col., 2008). Gran parte de los folículos primordiales sufre un proceso de atrofia, de tal forma que solamente unos 400,000 gametos están presentes en la pubertad. De éstos, solamente alrededor de 400 van a tener la oportunidad de madurar completamente y pasar a las trompas de Falopio y al útero, donde podrían ser fecundables, mientras que el resto experimentará un proceso de atresia (Tresguerres, 2003). En el caso de la rata, la foliculogénesis inicia 24 horas después del nacimiento y el crecimiento del folículo dura 19 días, desde que pasa de un folículo primordial hasta un folículo preovulatorio, el cual contiene un ovocito listo para ser ovulado (Hall, 2014). El crecimiento inicial de los folículos primordiales es independiente de la estimulación por gonadotropinas; quienes inician la estimulación del crecimiento folicular son el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y el factor ligando c-Kit (KL).

Para su estudio, los folículos se clasifican de acuerdo con su tamaño y características morfológicas en (Ross y Pawlia, 2015):

- **Folículo primordial:** presentan un tamaño que va de los 30 a las 60 μm de diámetro, están conformados por un ovocito primario diploide, con un diámetro de 9 a 25 μm , el cual se encuentra detenido en la etapa de

diploteno de la profase de la meiosis I (Carabatsos y col., 2002; Gartner y Hiatt, 2007) y rodeado por una capa de células aplanadas foliculares llamadas células pregranulosas (Figura 3) (Yen, 2001), donde se hace visible una lámina basal (Berne y Levy, 2006). Aquellos ovocitos que no se asocian con células somáticas para formar folículos primordiales degeneran y mueren por un proceso de muerte celular programada, llamado apoptosis (Domínguez y col., 1991).

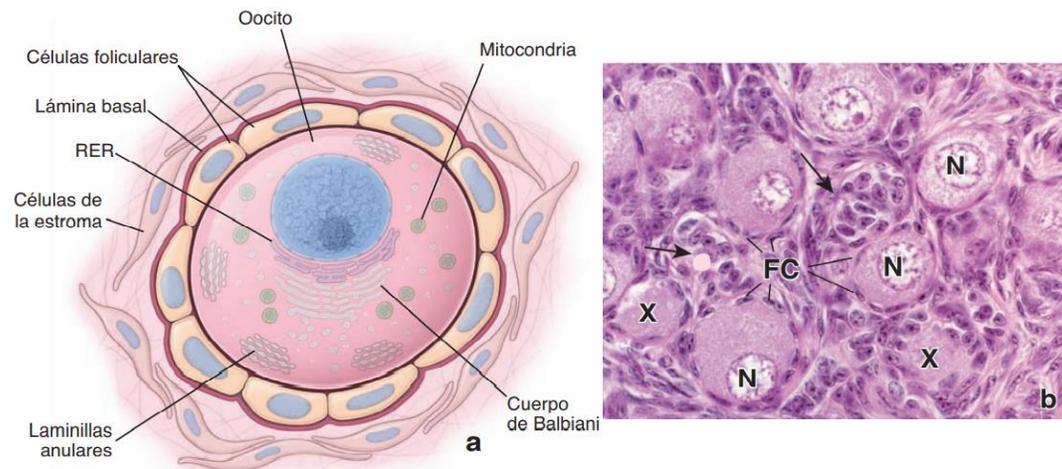


Figura 3. FOLÍCULO PRIMORDIAL a) Diagrama esquemático de un folículo primordial. b) fotomicrografía de los folículos primordiales muestra los oocitos rodeados por una capa simple de células foliculares aplanadas (FC). A menudo, el núcleo (N) del ovocito se encuentra en una posición excéntrica. Se señalan dos oocitos en los cuales el núcleo no está incluido en el plano de corte (X). En forma similar, hay dos folículos (flechas) que se cortaron tangencialmente y por ello sólo se ven las células foliculares y no el ovocito que ha quedado en otro plano. 640 X. (tomadas y modificadas de Ross & Pawlina., 2015)

➤ **Folículo primario:** cuando las células foliculares se tornan cúbicas el folículo recibe el nombre de folículo primario (Figura 4). Estos folículos tienen un diámetro de 100 a 120 μm (Valencia, 2002) y el ovocito primario crece hasta unos 60 μm de diámetro con un núcleo grande, denominado vesícula germinal (Gartner y Hiatt, 2007), presentan células foliculares cuboidales formando de 2 a 6 estratos celulares, que reciben el nombre de células de la granulosa. A medida que el ovocito crece, secreta proteínas específicas que se ensamblan en una cubierta extracelular denominada zona pelúcida (Ross & Pawlina, 2015).

A medida que las células de la granulosa proliferan, las células del estroma perifolicular forman una capa de células de tejido conjuntivo, la cual en etapas subsecuentes del desarrollo folicular comenzará a dar origen a la **teca folicular**, la cual inicialmente se observa con poco espesor, pero que progresivamente se dividirá en una teca interna y en una teca externa) justo por fuera de la lámina basal.

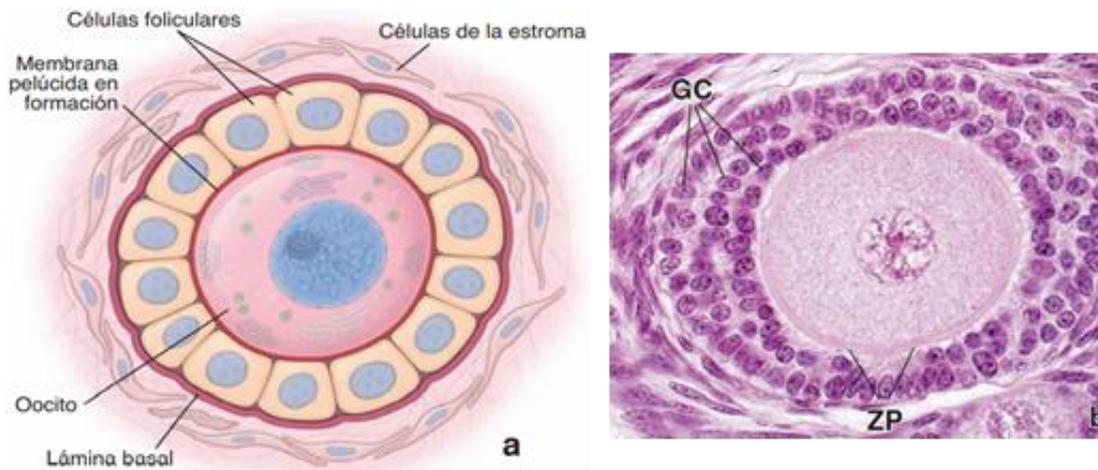


Figura 4. FOLÍCULO PRIMARIO a) Diagrama esquemático de un folículo primario. B) Fotomicrografía de un folículo primario. Donde pueden observarse múltiples capas de células de la granulosa (GC) que rodean el ovocito primario. La membrana pelúcida (ZP) está presente entre el ovocito y las células foliculares. 640 X (Tomada y modificada de Ross & Pawlina., 2015)

- **Folículo secundario:** Para este punto, el folículo presenta un diámetro aproximado de 200 μm , un estrato compuesto de 6 a 12 capas de células de la granulosa y múltiples espacios entre ellas, llamados cuerpos de Call-Exner, que al fusionarse formarán el antro folicular (Figura 5), el cual contiene progesterona, estradiol, inhibina, folistatina y activina, entre **otras hormonas** (Domínguez y col., 1991; Ross & Pawlina, 2015).

Es en este tipo de folículo donde las células de la teca folicular se diferencian en dos tipos:

- **Células de la teca interna,** se sitúan cercanas a la pared del folículo, son células muy vascularizadas y secretoras de andrógenos, incluyendo la androstenediona y la testosterona, bajo la influencia de la LH. Las células de la teca interna con diferenciación completa poseen características

ultraestructurales típicas de células productoras de esteroides, poseen una gran cantidad de receptores de hormona luteinizante (LH). En respuesta a la estimulación por LH, estas células sintetizan y secretan los andrógenos que son los precursores de los estrógenos. Además de las células secretoras, la teca interna contiene fibroblastos, haces de fibras colágenas y una red extensa de vasos pequeños típica de los órganos endocrinos.

- ✓ **Células de la teca externa**, es la capa más externa de células de tejido conjuntivo. Contiene sobre todo células de músculo liso y haces de fibras de colágeno. A diferencia de lo observado entre la capa de células de la granulosa y las células de la teca, donde la membrana basal establece un límite bien definido entre ambos estratos. Los límites entre la capa de la teca externa e interna no están bien delimitados.

Una vez que el ovocito alcanza un diámetro de 125 mm detiene su crecimiento (Ross & Pawlina, 2015) y comienza a ser rodeado por un grupo pequeño de células de la granulosa que se proyectan de la pared folicular al antro lleno de líquido. Su estructura se denomina cúmulo oóforo (Gartner & Hiatt, 2008).

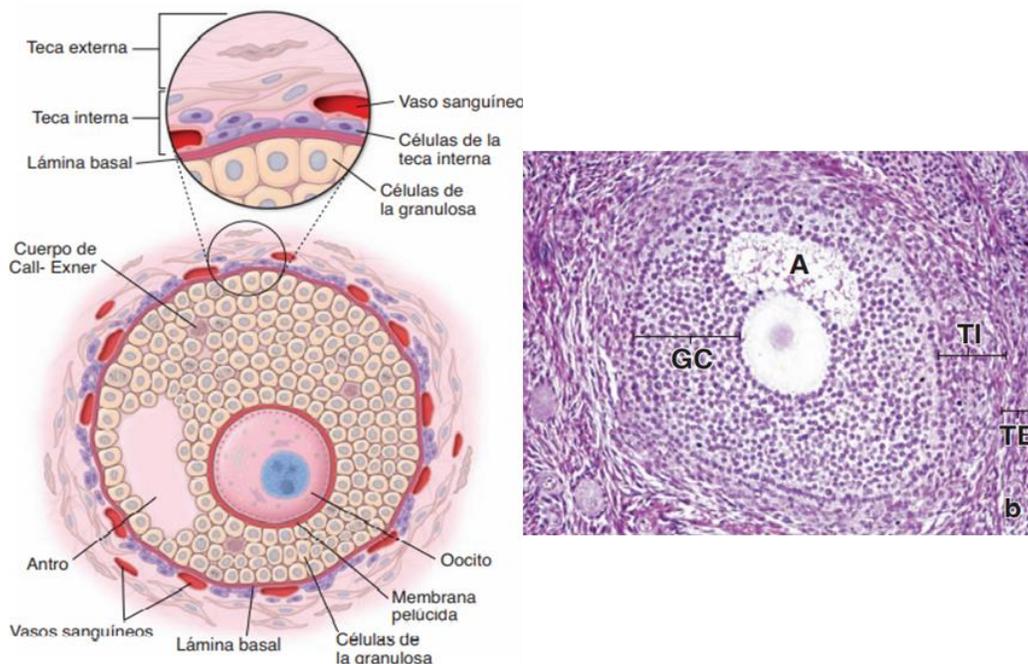


Figura 5. FOLÍCULO SECUNDARIO a) Diagrama esquemático de un folículo secundario. B) Fotomicrografía de un folículo secundario. Dentro del estrato granuloso (GC) es visible el antro (A), lleno de líquido folicular. Por fuera de la lámina basal del folículo secundario se pueden observar múltiples capas de células de la teca interna (TI) y de células de la teca externa (TE). 85X (Tomada y modificada de Ross & Pawlina., 2015)

➤ **Folículo terciario, preovulatorio o De Graaf:** presenta un diámetro mayor de 500 μm (Figura 6), que en el momento de la ovulación alcanza de 18 a 25 mm, por lo que sobresalen en la superficie del ovario (Ross y Pawlina, 2016). En la rata, estos folículos alcanzan un tamaño superior a las 500 μm (Peluso y col.,1976), el compartimento tecal se diferencia claramente en una teca externa y una teca interna, además se observa al ovocito rodeado por células de la granulosa que forman la corona radiada, el cumulo oóforo y células murales, que se encuentran delimitando la pared del antro folicular (Diaz y col., 2007; Gartner y Hiatt, 2007).

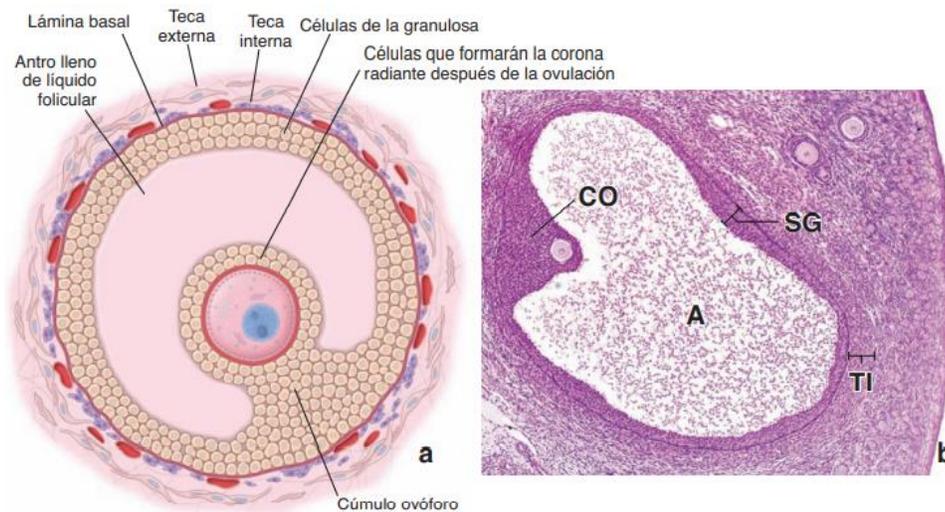


Figura 6. FOLÍCULO TERCIARIO a) Diagrama esquemático de un folículo terciario. B) . Fotomicrografía de un folículo terciario maduro. Nótese el gran antro (A) lleno de líquido y el cúmulo oóforo (CO) que contiene al ovocito. Las células restantes que rodean la luz del antro forman la membrana granulosa (el estrato granuloso, SG). La superficie del ovario es visible sobre la derecha. Se debe notar la presencia de dos folículos primarios (arriba, a la derecha). TI, teca interna. 45X (Tomada y modificada de Ross & Pawlina., 2015)

Poco antes de la ovulación, el ovocito y el cúmulo oóforo son desplazados hacia una posición excéntrica de la cavidad folicular. Durante el proceso de ovulación, este complejo es expulsado (Goldfien y Monroe, 2000) junto con la corona radiada a la cavidad abdominal, donde será captado por las fimbrias de la trompa ipsilateral y transportado al interior del útero, donde puede o no

ser fecundado. En el caso de la rata, la ovulación se produce 10 a 14 horas después de la liberación preovulatoria de las gonadotropinas (Espey, 1999). Unas horas antes, en la zona donde se produce la ruptura del folículo se pierde la túnica albugínea y degeneran las células de teca y de la granulosa. Disminuye la síntesis de andrógenos y aumenta la de progesterona. Cuatro a seis horas posteriores al inicio del proceso ovulatorio, los folículos comienzan a enrojecer, los capilares internos se dilatan y hay hiperemia en el tejido. El ápice del folículo maduro sobresale por encima de la superficie ovárica, el cual comienza a ser traslúcido y balonado. La pared folicular gradualmente se adelgaza por degradación de las fibras colágenas, inducida por la fibrinolisis sintetizada por las células de la granulosa, que es activada por el plasminógeno, producto de las células de la granulosa (Domínguez y col., 1991).

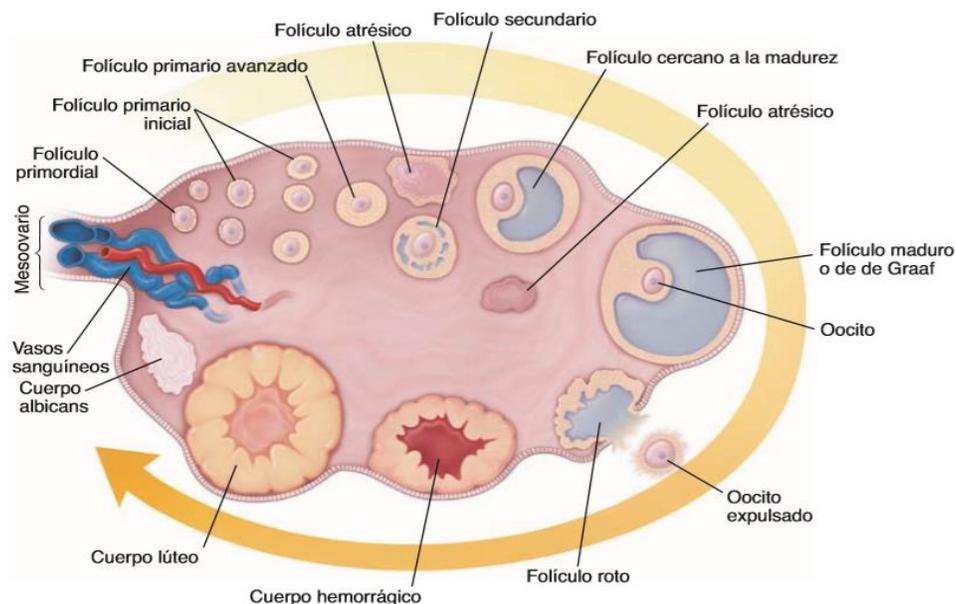


Figura 7. Esquema que muestra el proceso de foliculogénesis en el ovario de mujer. (Tomada y modificada de Ross & Pawlina., 2015)

❖ Atresia

En el ovario existen diversos factores encargados de regular la apoptosis, éstos varían dependiendo de la fase del desarrollo folicular ovárico (Flores y col., 2005). En la actualidad, la apoptosis es considerada el mecanismo principal de degeneración celular durante el proceso de la atresia; ya que es asociada con la falla en la producción o activación de enzimas, las cuales se encuentran participando en la remodelación tisular del tejido ovárico (García y col., 1997)

Aquellos folículos que no son seleccionados como dominantes, así como aquellos dominantes que no sean ovulados, se eliminarán por atresia (Hirshfield & Midgley, 1978) de manera natural es un proceso degenerativo, paulatino e irreversible, que se extiende en todo el folículo, con lo cual, éste pierde su integridad y funcionalidad (Chedrese, 2003; Sharma, 2000).

En la atresia destacan cambios morfológicos e histológicos, como son: núcleos picnóticos y fragmentación nuclear en las células de la granulosa, desprendimiento de las células de la granulosa por la pérdida de la matriz intercelular, desprendimiento del complejo cumulus-ovocito y en algunos casos hipertrofia de las células de la teca (Sharma, 2000). Además, ocurren procesos bioquímicos como la reducción en la síntesis de ADN en células de la granulosa (Greenwald., 1989; Rosales-Torres y col., 2000), pérdida de uniones comunicantes, pérdida de receptores a gonadotropinas (Carson y col., 1979) así como la disminución en la síntesis y expresión de ARNm para aromatasas y receptores a gonadotropinas (Tilly y col., 1992).

En la rata se ha propuesto una clasificación de la atresia basándose en las alteraciones que experimentan las capas de las células de la granulosa (Byskov, 1974). Estas se ordenan en tres fases progresivas:

- **FASE I:** Cuando menos del 10% de células de la granulosa presentan núcleos picnóticos generalmente cerca del antro folicular, mientras que

algunas de las células de la granulosa están todavía en mitosis (Byskov, 1974).

- **FASE 2:** En esta fase se observan entre el 10 y 30 % de células de la granulosa con picnosis, muy pocas células en mitosis y restos celulares en el antro folicular. La membrana basal pierde su integridad y los linfocitos T se infiltran entre las capas de granulosa. En esta etapa tan avanzada de la atresia, los folículos no pueden ser rescatados y son destinados a degenerar (Hirshfield, 1989).
- **FASE 3:** Existe una reducción en el número de células de la granulosa, debido a una baja tasa de mitosis. La capa tecal está hipertrofiada, y hay poca presencia de células de la granulosa (Hsueh y col., 1994). La membrana basal se separa y se fragmenta (Byskov, 1974).

❖ Ovulación

Es un proceso que consiste en la ruptura del folículo preovulatorio y la expulsión de un ovocito (Yen, 2001). Para ello, la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH) actúan en conjunto. La FSH estimula el crecimiento y maduración del folículo de Graaf, el cual ante el estímulo de la LH expulsa al ovocito secundario detenido en la etapa de diploteno de la metafase II de la meiosis II, acompañado de células del cúmulo oóforo y la corona radiada (Carabatsos y col., 2002).

El pico preovulatorio de LH desencadena una serie de eventos que culminan con la ovulación del folículo los cuales son:

- ✓ El ovocito reinicia la meiosis y las células foliculares de la granulosa se luteinizan. Las células de la granulosa se diferencian a células lúteas grandes y las de la teca a células lúteas pequeñas, capaces de producir progesterona, lo cual ocurre por el incremento en la expresión de enzimas que convierten el colesterol a progesterona (P450 ssc y 3β -HSD) y el

decremento de las que participan en la producción de estrógenos (P450arom) (Bao y Garverick, 1998).

- ✓ Una vez que el folículo se encuentra maduro, comienza a secretar colagenasa, cuya función es disolver el colágeno en el tejido conectivo que mantiene unidas las células foliculares. Los productos de degradación del colágeno provocan una reacción inflamatoria que atrae leucocitos, que a su vez secretan prostaglandinas en el folículo. Las prostaglandinas provocan contracción de las células musculares lisas presentes en la teca externas, y esto genera la ruptura de la pared folicular en su punto más débil. El líquido antral es expulsado junto con el óvulo, que queda rodeado por dos o tres capas de células de la granulosa (Guyton y Hall, 2011).
- ✓ Además de estimular la ruptura del folículo, el “pico” de LH produce que las células de la teca folicular migren hacia el interior del espacio antral, donde se mezclan con las células que formaban la granulosa y rellenan la cavidad. Después, ambos tipos de células se transforman en las células lutéicas del cuerpo lúteo.

Este proceso, que se denomina luteinización, comprende cambios bioquímicos y morfológicos. Las células lutéicas recién formadas acumulan gotas de lípidos y gránulos de glucógeno en su citoplasma y empiezan a secretar progesterona. La síntesis de estrógenos disminuye (Silverthorn, 2008).

Tras la ovulación, en principio, la hemorragia de los capilares en la teca interna hacia la luz folicular lleva a la formación del cuerpo hemorrágico con un coágulo central. El tejido conjuntivo desde el estroma invade entonces la antigua cavidad folicular. Las células de la granulosa y de la teca interna sufren un proceso de diferenciación denominado luteinización. Las células granulosas lutéicas (Ross & Pawlina, 2015) son células aumentadas en su tamaño, llenas de lípidos (ésteres de colesterol) (Berne y Levy, 2006) y las células lutéicas de la teca (Ross & Pawlina., 2015) son células de menor

tamaño, con origen de la teca interna y estas secretan progesterona, andrógenos y estrógenos (Gartner y Hiatt, 2007).

El cuerpo hemorrágico es convertido en una estructura temporal muy vascularizada llamada cuerpo amarillo, que actúa como una glándula endocrina (Gartner y Hiatt, 2007) ya que secreta progesterona y estrógenos. Estas hormonas estimulan el crecimiento y la actividad secretora del revestimiento del útero, el endometrio, para prepararlo para la implantación del cigoto en desarrollo en caso de que se produzca la fecundación, por lo que el cuerpo lúteo se llamará “cuerpo lúteo de gestación”. Sin embargo, si esto no ocurre, el cuerpo lúteo permanece activo durante 14 días y en este caso, se llama “cuerpo lúteo de la menstruación” (Ross & Pawlina, 2015). En la rata la vida funcional del cuerpo lúteo se estima que es de 4 días. En caso de que el ovocito no sea fecundado el cuerpo lúteo involuciona, y en el caso de la mujer es reemplazado por una cicatriz avascular conocida como cuerpo de *albicans* (Ross & Pawlina, 2015; Yen, 2001),

El mecanismo mediante el cual el cuerpo lúteo de la menstruación sufre una regresión no se comprende bien, pero se cree que es gracias a la liberación de prostaglandina $PGF2\alpha$ de las células de la granulosa luteinizadas y del útero, como respuesta a una reducción de las concentraciones de progesterona durante la segunda semana de la fase lúteínicas. Varios factores paracrinos (endotelina, proteína 1 quimiotáctica de los monocitos) producidos por las células inmunitarias y vasculares, pueden influir en la muerte y eliminación de las células de la granulosa luteinizadas (Berne y Levy, 2006). El cuerpo lúteo se degenera y experimenta una lenta involución después del embarazo o la menstruación, las células se llenan de lípidos, reducen su tamaño y experimentan autólisis, convirtiéndose en una cicatriz blanquecina, denominado cuerpo de *albicans*, que se hunde en la médula del ovario y se absorbe lentamente (Ross & Pawlina, 2015; Yen, 2001).

❖ Esteroidogénesis Ovárica

El precursor de la biosíntesis de esteroides es el colesterol, el cual es obtenido por las células esteroidogénicas a partir de 3 vías: 1) En forma de lipoproteínas, que circulan en la sangre. 2) El que se sintetiza *de novo* dentro del ovario a partir de acetil-coenzima A y 3) El que se libera de los ésteres del colesterol almacenados en gotas lipídicas (Tresguerres, 2005).

En el ovario, el colesterol utilizado en la producción de progesterona, testosterona y estradiol es principalmente a partir de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que viajan por vía sanguínea. El folículo ovárico presenta dos tipos de estratos celulares, las células de la teca que cuentan con las enzimas necesarias para la formación de progesterona y andrógenos, por estímulo de la LH y las células de la granulosa, las cuáles tomando como sustrato a los andrógenos producidos por las células de la teca sintetizan estrógenos por acción de las aromatasas, cuya actividad es estimulada por la FSH (Miller y Styne, 2001; Tresguerres, 2005).

La síntesis de hormonas esteroides inicia con la unión de la LH a sus receptores específicos de membrana, los cuales se encuentran en las células de la teca interna. Esta unión estimula la síntesis intracelular de AMP-cíclico, el cual activa a la proteincinasa A (PKA). En las gónadas, así como en las glándulas suprarrenales, la respuesta aguda mediada por AMPc-PKA produce la fosforilación de proteínas involucradas en el transporte de colesterol hacia la mitocondria (Gómez-Chang y col., 2012). En las células de teca, la unión de LH con sus receptores produce que, en la membrana externa de sus mitocondrias se realice el ingreso del colesterol hacia la membrana interna con ayuda de la proteína reguladora de la Esteroidogénesis aguda (StAR), donde posteriormente será transformado en pregnenolona a partir de

hidroxilaciones en los carbonos 20 y 22 por acción del complejo enzimático P450sc α (22-hidroxiilasa; 20-hidroxiilasa; 20,22-desmolasa) (Chang y col., 2012; Díaz, 2004)

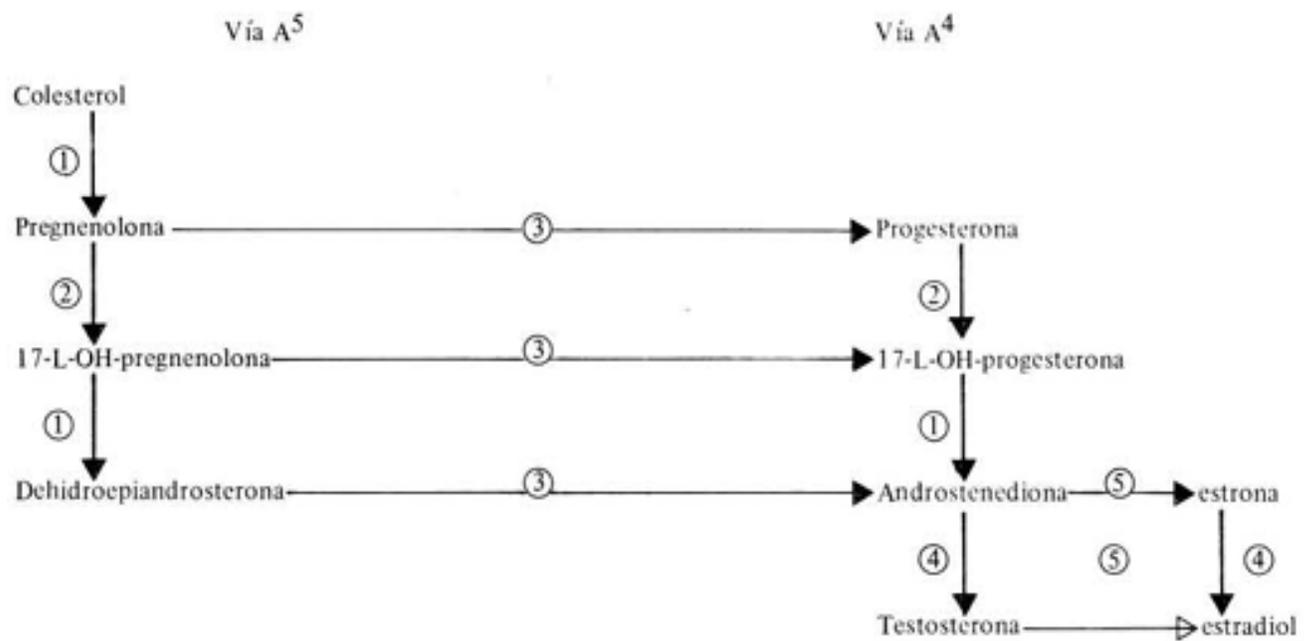
Una vez sintetizada la pregnenolona pasa al retículo endoplásmico liso, donde se encuentran las enzimas que la metabolizan a través de dos rutas (Figura 8):

1. La vía Δ^4 : esta ruta se lleva a cabo en el cuerpo lúteo (Miller y Styne, 2001), el primer paso es la síntesis de progesterona a partir de pregnenolona por acción de la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD). Después la 17 α -hidroxilasa la convierte en 17 α -OH-progesterona, que es convertida finalmente en androstenediona por acción de la 17,20 liasa. La androstenediona por efecto de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD), es convertida en testosterona. Ambos andrógenos (androstenediona y testosterona) son precursores de los estrógenos sintetizados por las células de la granulosa (Díaz, 2004).
2. La vía Δ^5 : se da principalmente en las células de la teca interna (Miller y Styne, 2001). En esta ruta la pregnenolona es convertida en 17 α -OH-pregnenolona por medio de la 17 α -hidroxilasa, la cual forma parte del complejo p450c17. La 17 α -OH-pregnenolona es convertida en dehidroepiandrosterona (DHEA) por efecto de la 17,20 liasa. La DHEA por acción de la 3 β -HSD, es convertida en androstenediona, la cual por efecto de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) es metabolizada a testosterona (Sánchez Criado, 1999). La 17 β -HSD también convertirá la estrona a estradiol (Díaz, 2004).

Una vez que se obtiene androstendiona o bien testosterona, secretadas por las células de la teca interna (Ganong, 2001); el siguiente paso es la síntesis de estrógenos, la cual se lleva a cabo en las células de la granulosa, por estímulo de la FSH (Tresguerres y Castillo, 2005; Yen, 2001).

La enzima citocromo P450 aromatasas cataliza la insaturación y aromatización del anillo A y produce estrona a partir de la androstenediona. Por otro lado, la enzima 17 β -OH-esteroide deshidrogenasa convierte la androstenediona a testosterona y la estrona en 17 β -estradiol (Smith, 1999).

Los andrógenos son secretados hacia la vena ovárica y a las células de la granulosa, donde la mayor parte de los andrógenos pasan por una biotransformación por acción de las aromatasas, dando como resultado estrona y estradiol (Tresguerres, 1999)



Enzimas:

- ① Desmolasa
- ② 17-L-hidroxilasa
- ③ 3 β -OH-deshidrogenasa
A⁵⁻⁴ isomerasa
- ④ 17 β -OH-deshidrogenasa
- ⑤ Aromatasas,

Figura 8. Descripción de la esteroidogénesis gonadal (Imagen tomada y modificada de Givens, J.R 1977)

❖ Inervación Ovárica

El ovario de los mamíferos recibe inervación extrínseca densa de los nervios simpáticos posganglionares, que se originan en el ganglio ovárico y en los plexos celíaco y renal (Burden y col., 1985; Curry y col., 1985). Esta información llega a la gónada femenina a través del Nervio Ovárico Superior (NOS) y del Nervio del plexo ovárico (NPO) (Dissen y Ojeda, 1999). Del mismo modo, el ovario recibe información parasimpática a través del nervio vago (Burden y col., 1983) (Figura 9).

Estos paquetes nerviosos, modulan la reactividad de los tres compartimientos ováricos (folicular, luteal e intersticial) a las señales hormonales (Domínguez y Cruz-Morales, 2011).

El NOS, forma parte de la información de tipo simpática, cuyas fibras se originan en los segmentos T11 a L4 de la médula espinal y hacen sinapsis en el ganglio celiaco mesentérico superior (GCMS) (Dissen y Ojeda, 1999). Las fibras postganglionares que viajan a través de este nervio contienen noradrenalina (NA) principalmente, un neurotransmisor que en el ovario (Lara y col., 2002) estimula la esteroidogénesis (Aguado y col., 1986; Hernández y col., 1988), el desarrollo folicular y la ovulación; vía la activación de los adrenoreceptores α y β (Venegas y col., 2019). Además de la NA, por el NOS viajan neurotransmisores como: el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y neuropéptido Y (NPY) (Greiner y col., 2005). Este nervio llega principalmente a la glándula intersticial y a las células de la teca interna de los folículos (Burden y col., 1985), sin embargo, las fibras no entran en las células de la granulosa ni en el cuerpo lúteo (Dissen y Ojeda, 1999; Gerendai y col., 2000). También inervan el útero y el oviducto.

El NPO, viaja junto con la vena y la arteria ovárica e inerva predominante la vasculatura ovárica (Dissen y Ojeda, 1999; Lara y col., 2002). Está constituido por fibras sensoriales que transportan neurotransmisores como sustancia P

(SP), péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), así como por fibras simpáticas que transportan NPY y NA. Las fibras sensoriales derivan de los ganglios de la raíz dorsal de los segmentos torácico inferior T9-T11 y lumbar superior L2-L4. Las fibras simpáticas provienen del GCMS (Dissen y Ojeda, 1999; Gerendai y col., 2005).

El nervio vago representa la inervación parasimpática del ovario. Sin embargo, la ruta que siguen las fibras dentro de la gónada es desconocida. Este nervio transporta SP, CGRP, somatostatina, gastrina y principalmente acetilcolina (Ach) (Klein y Burden, 1988).

Se plantea que estos nervios son parte de los que inervan la vasculatura ovárica (Dissen y Ojeda, 1999). Las fibras de este paquete nervioso derivan del ganglio de la raíz dorsal de los segmentos T10 a L2, además del ganglio nodoso (Morales, 2015)

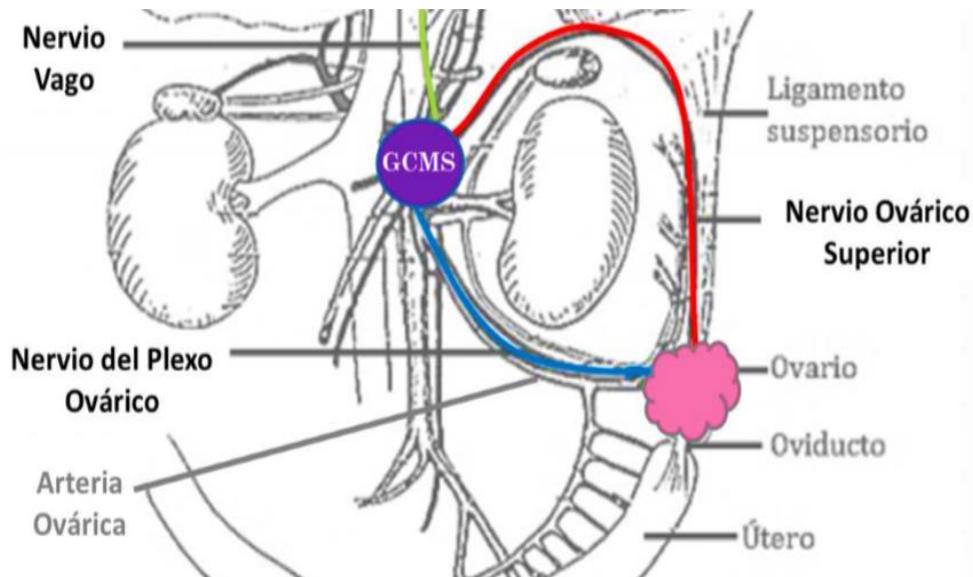


Figura 9. Esquema que muestra la inervación extrínseca que llega al ovario vía nervio ovárico superior (NOS), nervio del plexo ovárico (NPO) y nervio vago (NV). Tomado y modificado de Lawrence y Burden, 1980.

Síndrome de Ovario Poliquístico

El síndrome de ovario poliquístico (SOPQ) se puede definir como un desorden endocrino (Franks y col., 1996) que afecta a mujeres en edad reproductiva y se considera una de las principales causas de infertilidad femenina.

Dependiendo del consenso utilizado, la prevalencia y los criterios para diagnosticar a una mujer con SOPQ pueden variar.

En 1990, los Institutos Nacionales de la Salud (NIH, por sus siglas en inglés), lo definieron como la “presencia de hiperandrogenismo asociado a anovulación crónica sin otra causa específica de enfermedad adrenal o hipofisiaria que curse con irregularidades menstruales o exceso de andrógenos”, sin considerar el aspecto morfológico de los ovarios; señalando que la prevalencia del SOPQ a nivel mundial es del 4 al 7 %. Posteriormente, la Sociedad Europea de Reproducción y Embriología (ESHRE) y la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) en Rotterdam (2003), proponen una nueva definición del síndrome y consideran que para su diagnóstico las mujeres deben presentar por lo menos 2 de los siguientes tres criterios: oligovulación y/o anovulación, hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico e incorporó la presencia de morfología de ovarios poliquísticos a través de la ultrasonografía, señalando una prevalencia del 15 al 18% de las mujeres en edad reproductiva.

En el 2007, un panel de expertos de la Sociedad de Exceso de Andrógenos (AES), establecen una prevalencia del 3 al 7% y recomienda que en el diagnóstico del SOPQ se deba considerar al hiperandrogenismo como un criterio predominante en el diagnóstico del síndrome. También propuso que los criterios de diagnóstico de los NIH deben incluirse al momento de diagnosticar una mujer con la patología (Goodarzi y col., 2011; Morán, 2006).

En la actualidad, los criterios que se aplican para diagnosticar a una mujer con la patología dependen del lugar donde sea atendida. Sin embargo, el que

establece la Sociedad de Exceso de Andr6genos (AES) es el m1s aplicado. Donde estas mujeres se caracterizan principalmente por presentar hiperandrogenismo acompa1ado o no de:

- 1) Una disfunci3n menstrual (oligo-anovulaci3n)
- 2) Presencia de ovarios poliqu1sticos (de 12 o m1s fol1culos de 2 a 9 mm de di1metro y volumen ov1rico superior a 10 cm³) (Azziz y col., 2006; Checa, 2007; Dunaif, 1997).

Esta fisiopatolog1a tambi3n se asocia con trastornos metab3licos, tal como la resistencia a la insulina, obesidad, diabetes mellitus tipo 2, problemas cardiovasculares (Goodarzi y col., 2011; Lobo y Carmina, 2000); as1 como con c1ncer de ovario (Dumesic y Lobo, 2013; Lobo y Carmina, 2000) y depresi3n (Hollindrake y col., 2007).

A pesar de que se han descrito las caracter1sticas cl1nicas del SOPQ, se desconoce su etiolog1a, sin embargo, se tienen algunas hip3tesis:

1. Alteraci3n de los pulsos de secreci3n de GnRH: Se sabe que en una mujer sana la frecuencia del pulso de GnRH se da uno cada 90min. Sin embargo, en mujeres con el s1ndrome se presenta uno cada 60 minutos (Waldstreicher y col., 1988). Este incremento en la frecuencia resulta en un exceso de secreci3n de LH causando que las c3lulas de la teca “sobre estimuladas” comiencen a producir m1s andr6genos. Por otro lado, la secreci3n de FSH se observa disminuida, produciendo una alteraci3n en la aromatizaci3n de los andr6genos a estr3genos en las c3lulas de la granulosa, en el desarrollo/maduraci3n folicular y en la liberaci3n de progesterona l1tea conduciendo a un hiperandrogenismo sostenido y disfunci3n ovulatoria (Bremer, 2010; Dumesic y col., 2012).

2. Hiperactividad Simpática: Estudios realizados en mujeres con SOPQ, muestran la presencia de una alta densidad de fibras nerviosas catecolaminérgicas a nivel ovárico (Heider y Pedal, 2001).

Roedores inyectados con valerato estradiol (VE), un estrógeno de larga actividad provoca el desarrollo de características similares a las de la mujer con el SOPQ. Se ha mostrado que el VE incrementa a nivel ovárico la expresión del Factor de Crecimiento Neural (NGF) y su receptor de baja afinidad el p-75. La unión de este receptor con el NGF en la terminal del NOS provoca, a nivel del GCMS, el aumento en la actividad de la Tirosina Hidroxilasa (TH). Esta enzima es limitante en la síntesis de catecolaminas por lo que al aumentar su actividad se produce un incremento en la secreción NA ovárica. La NA al llegar a la gónada vía el NOS resulta en el desarrollo del SOPQ dado posiblemente por el aumento en la secreción de andrógenos, lo que favorecerá la presencia de prequistes y quistes, además de la oligo-anovulación (Lara y col., 2000).

En ratas tratadas con VE, la eliminación del aporte noradrenérgico mediante la sección bilateral del NOS restaura la ovulación (Lara y col., 1993), mientras que la sección unilateral del mismo nervio, en el mismo modelo animal, restaura la ovulación principalmente en el ovario inervado a pesar de las altas concentraciones de NA observadas en el ovario inervado de estos animales (Morales-Ledesma y col., 2010). Por otro lado, la eliminación del aporte parasimpático por la sección unilateral o bilateral del nervio vago en ratas con SOPQ resultó en el restablecimiento de la ovulación en ambos ovarios (Linares y col., 2013), lo cual se acompañó con una disminución en la concentración de NA a nivel del ganglio celíaco mesentérico superior (Linares y col., 2017). Con estas evidencias se concluye que la inervación simpática y vagal tiene un efecto estimulante en el desarrollo del SOPQ.

Xilocaína

La xilocaína o también llamada lidocaína es un anestésico local amídico de acción inmediata (1 a 3 minutos) y duración de efecto intermedio (60 a 180 minutos). Impide la generación y la conducción del impulso nervioso. El bloqueo de la conducción nerviosa aparece en las fibras delgadas (propioceptivas y nociceptivas) antes que en las más gruesas (táctiles y motoras). Su sitio de acción es la membrana celular, en donde altera en forma reversible los flujos iónicos y disminuye la permeabilidad a los iones de sodio, acción que estabiliza la membrana e inhibe su despolarización, y en consecuencia el bloqueo de la conducción nerviosa (Rodríguez, 2005). Además de bloquear la conducción en los axones nerviosos en el sistema nervioso periférico, la lidocaína tiene efectos importantes sobre el sistema nervioso central y el sistema cardiovascular (Cardona y col., 2003).

Se absorbe bien a través de las mucosas y de los sitios de depósito, y su velocidad de absorción depende del sitio y vía de administración, y de la dosis aplicada. Se distribuye rápido en el organismo y se une moderadamente a las proteínas plasmáticas. Se desalquila en el hígado hasta convertirse en monoetilglicina y xilidina, metabolitos activos que se convierten en 4-hidroxi-2,6-dimetilanilina y se excreta en la orina conjugada con sulfato (Cardona y col., 2003; Rodríguez y col., 2005).

Bursa Ovárica

En muchas hembras de la clase mammalia, los ovarios se encuentran envueltos por un saco membranoso llamado bursa ovárica (Kirbas y col., 2020; Martin y col., 1981). En los roedores, la bursa es un pliegue del peritoneo que envuelve al ovario (Botella, 2005).

Esta estructura se encuentra constituida por tres capas (Martin y col., 1981):

1. La capa interna la cual está formada por epitelio discontinuo que da hacia el ovario.
2. La capa intermedia formada por tejido conjuntivo que contiene fibroblastos, bloques de células de musculo liso y vasos sanguíneos.
3. La capa externa formada por epitelio continuo que se encuentra en contacto con la cavidad peritoneal.

La bursa ovárica es quien le proporciona al ovario el microambiente ideal para el mantenimiento de los ovocitos (Beck, 1972). Además, permite el intercambio de sustancias entre las células musculares lisas y los vasos sanguíneos ubicados dentro de la bursa y a su vez impide la salida del líquido hacia el peritoneo (Martin y col., 1981).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El SOPQ es un trastorno endocrino, que afecta del 6 al 10% de las mujeres en edad reproductiva. Se caracteriza por la presencia de quistes ováricos, anovulación y por la alteración en la producción y metabolismo de los andrógenos, lo que resulta en hiperandrogenismo.

Se ha mostrado que en roedores la inyección de VE produce un cuadro clínico semejante al observado en la mujer, el cual incluye hiperandrogenismo, anovulación y estructuras quísticas.

En ratas con SOPQ, la sección bilateral del NOS así como la del nervio vago resulta en el restablecimiento de la respuesta ovulatoria. Estas evidencias han permitido sugerir que la información nerviosa que recibe el ovario vía el NOS y el nervio vago regulan su persistencia.

Domínguez y colaboradores (1998), mostraron que la microinyección de solución salina en el ovario derecho y de xilocaína (anestésico) en el ovario izquierdo, resulta en la disminución en el número de ovocitos liberados por ambos ovarios, lo que sugiere un bloqueo en la señal nerviosa que regula la función ovárica.

Con base en los antecedentes anteriormente señalados, el objetivo del presente estudio fue analizar si en ratas con SOPQ el “adormecimiento” de la señal neural por la microinyección de xilocaína a nivel de la bursa ovárica, es capaz de restablecer las señales hipotalámicas que regulan la función ovárica, y con ello, el restablecimiento de la ovulación.

HIPÓTESIS

Dado que el desarrollo del SOPQ, inducido por la inyección de VE, es estimulado por la información nerviosa que llega al ovario vía el NOS y el nervio vago, si disminuimos la señal que se genera en los ovarios y que va al sistema nervioso central, por la microinyección de xilocaína en la bursa ovárica, entonces, el hipotálamo normalizará sus pulsos de secreción lo que resultará en la ovulación.

OBJETIVO GENERAL

Analizar en el animal con SOPQ el efecto del bloqueo de las señales nerviosas, que viajan del ovario hacia el hipotálamo por el nervio vago y del hipotálamo al ovario a través del NOS, sobre el mantenimiento de la fisiopatología.

OBJETIVOS PARTICULARES

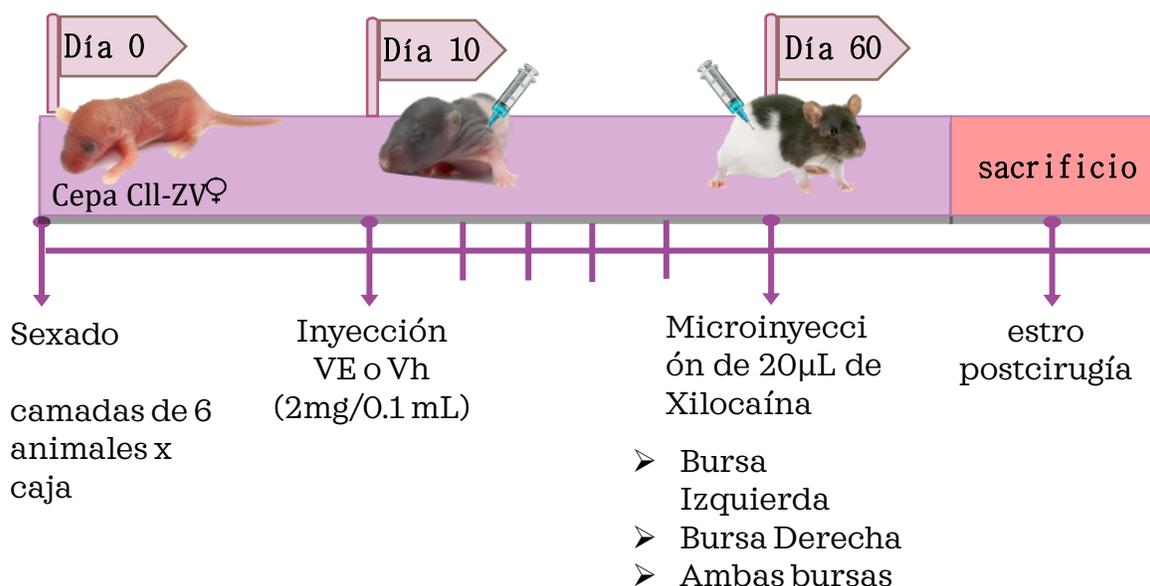
Evaluar en animales con SOPQ, inducido por la inyección de VE, el efecto de la microinyección unilateral o bilateral de xilocaína en la bursa ovárica sobre:

- Porcentaje de animales ovulantes
- Número de ovocitos liberados
- Dinámica folicular
- Morfología ovárica
- Concentración de hormonas esteroides
- Peso de órganos

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron ratas hembra recién nacidas de la cepa CII-ZV, las cuales se mantuvieron en condiciones controladas de iluminación (14h de luz por 10 h de oscuridad) y temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. El día de nacimiento se consideró como el día cero, las crías fueron sexadas y colocadas en camadas de seis individuos por caja, cinco hembras y un macho, esto con la finalidad de evitar alteraciones en la maduración del sistema nervioso central (Salas y col., 1991). Los animales tuvieron libre acceso a la madre y después del destete (24 días de vida) a comida y agua.

Los animales fueron asignados al azar a uno de los siguientes grupos experimentales constituidos por 10 animales cada uno (Figura 10).



Grupos experimentales:

ST	Vh	VE
ST.XILO.BI	Vh.XILO.BI	VE.XILO.BI
ST.XILO.BD	Vh.XILO.BD	VE.XILO.BD
ST.XILO.AB	Vh.XILO.AB	VE.XILO.AB

Figura 10. Esquema que muestra el diseño experimental que se realizó en este estudio. ST: Sin tratamiento, Vh: Vehículo, VE; Valerato de Estradiol, XILO: Xilocaína, BI: Bursa Izquierda, BD; Bursa Derecha, AB; Ambas Bursas

Inducción del SOPQ

Ratas de 10 días de vida se inyectaron por vía intramuscular con 2 mg de VE (Sigma Chemical Co. St Louis Mo. USA) disuelto en 0.1 ml de aceite de sésamo (Sigma Chemical Co, St Louis Mo. USA), que fungió como vehículo (Vh). Como grupos de comparación se utilizaron animales inyectados con Vh o sin tratamiento.

Al día siguiente de la inyección del fármaco fueron revisadas diariamente hasta el día en que se observó apertura vaginal, a partir de este momento se inició la toma de frotis vaginal durante 2 ciclos completos, mismos que se reanudaron ocho días antes de que los animales cumplieran 60 días de edad.

Microinyección de Xilocaína en la bursa ovárica

Animales intactos o previamente inyectados a los 10 días de edad con Vh o VE, al cumplir 60 días de edad fueron sometidos a la microinyección en la bursa ovárica izquierda, derecha o ambas bursas con 20µL de xilocaína (lidocaina (20 mg 2-diethylamine-2',20. 6'-acetoxilidide clorhydrate ml-1)) con 0.01 mg de

adrenalina (Xylocaine) ml-1 (Astra Chemicals, Naucalpan, México). Para ello, se realizó una incisión dorsolateral en la piel, músculo y peritoneo de aproximadamente 2 cm de largo, a través de la cual se extrajo el ovario unido al útero, se identificó la bursa ovárica y se procedió a microinyectar la xilocaína, tras un minuto de espera se retiró la aguja con cuidado, se colocó una gota de pegamento quirúrgico, se regresó el ovario a la cavidad peritoneal y posteriormente se suturó la herida. Este procedimiento se realizó de manera unilateral, en el ovario izquierdo o derecho, o bilateral del animal. Todos los animales fueron sacrificados al presentar un estro vaginal post-cirugía.

Autopsia

Los animales fueron pesados y sacrificados por decapitación. Al momento de la autopsia, se diseccionaron y pesaron: glándulas adrenales, útero, ovarios, bazo y timo. De los ovarios se removieron los oviductos y se buscó en ellos la presencia de ovocitos *in situ* con ayuda de un microscopio estereoscópico (Nikon, modelo SMZ Japón).

Morfología Ovárica y Dinámica Folicular

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

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

Cuantificación de Hormonas Esteroides

La cuantificación de hormonas esteroides en suero se realizó por medio de un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) en fase sólida, basado en el principio de unión competitiva (DRG Instruments GmbH, Germany).

La concentración de progesterona y estradiol fue expresada en ng/ml, y la de testosterona en pg/ml de suero. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron 6.7% y 7.9% (progesterona), 6.4% y 7.3% (testosterona) y 7.1% y 8.3% (estradiol).

Análisis Estadístico

Los resultados de la media \pm eem del peso corporal, y del peso relativo de ovarios, útero, adrenales, bazo y timo; así como la concentración sérica de hormonas esteroides, fueron analizados por la prueba de Análisis de Varianza Multifactorial de dos vías (ANDEVA de dos factores) seguida de la prueba de Tukey-Kramer. El porcentaje de animales ovulantes se analizó por la prueba exacta de Fisher para proporciones. El número de ovocitos liberados; así como la población folicular fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de Dunn. Todo el análisis estadístico se realizó usando el programa estadístico GraphPad Prism 8.3.0. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor a 0.05 ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Efecto de la Microinyección Unilateral o Bilateral de Xilocaína, Sobre las Funciones Ováricas

❖ Porcentaje de Animales Ovulantes

En los animales sin tratamiento previo, la microinyección de xilocaína en la bursa ovárica izquierda o derecha, no modificó el porcentaje de animales ovulantes. Sin embargo, cuando ambas bursas fueron microinyectadas con el anestésico, hay una tendencia a la disminución que no llega a ser estadísticamente significativa (Figura 11 A).

En los animales con Vh y microinyectados con el anestésico en la BI se observó una disminución en el porcentaje de animales ovulantes por parte de ambos ovarios con respecto al grupo Vh testigo, la cual no llegó a ser estadísticamente significativa (Figura 11 B).

En el caso de los animales inyectados con VE se observó un bloqueo casi total de la ovulación, ya que solo 2 de 9 animales ovularon por el ovario izquierdo y 1 de 9 por el ovario derecho. En comparación con los animales inyectados solo con VE, la microinyección de xilocaína en la bursa izquierda o derecha, resultó en el 40% de animales ovulantes. Mientras que con la microinyección bilateral de xilocaína ovularon el 57% de los animales por el ovario izquierdo y sólo el 14% por el ovario derecho (Figura 11 C).

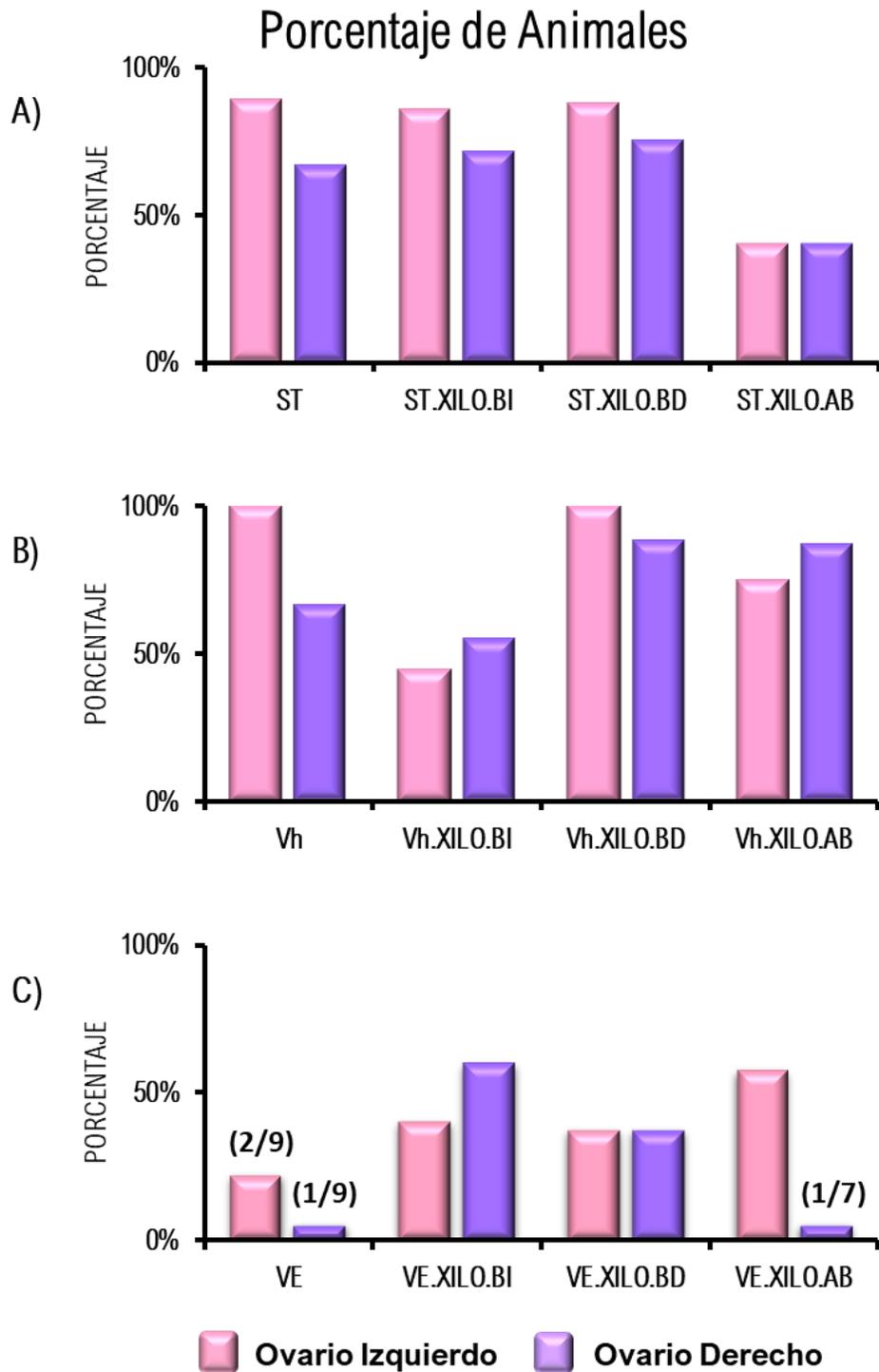


Figura 11. Porcentaje de animales Ovulantes por el ovario izquierdo o derecho de ratas hembra sin tratamiento (ST), o inyectadas a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o Valerato de Estradiol (VE) y sometidas a los 60 días de edad a la microinyección en la bursa ovárica izquierda (BI), derecha (BD) o ambas (AB) con Xilocaina (XILO) y sacrificadas al estro vaginal post cirugía

❖ Número de Ovocitos Liberados

En los grupos sin tratamiento, así como en el grupo Vh la microinyección en la bursa izquierda, derecha o en ambas bursas no modificó el número de ovocito liberados por el ovario izquierdo ni por parte del ovario derecho (Figura 12 A y B).

De los 10 animales tratados con VE solo ovularon dos de ellos con una cuota ovulatoria de 1 y 3 ovocitos por el ovario izquierdo y 7 por la gónada derecha. Sin embargo, en los grupos sometidos a la microinyección unilateral izquierda con xilocaína se observó un número de ovocitos liberados similar a los grupos Vh. Por otro lado, en el grupo VE, la microinyección de xilocaína en ambas bursas resultó en la liberación en promedio de 3 ovocitos por el ovario izquierdo y 7 ovocitos por el ovario derecho (Figura 12 C).

Número de Ovocitos Liberados

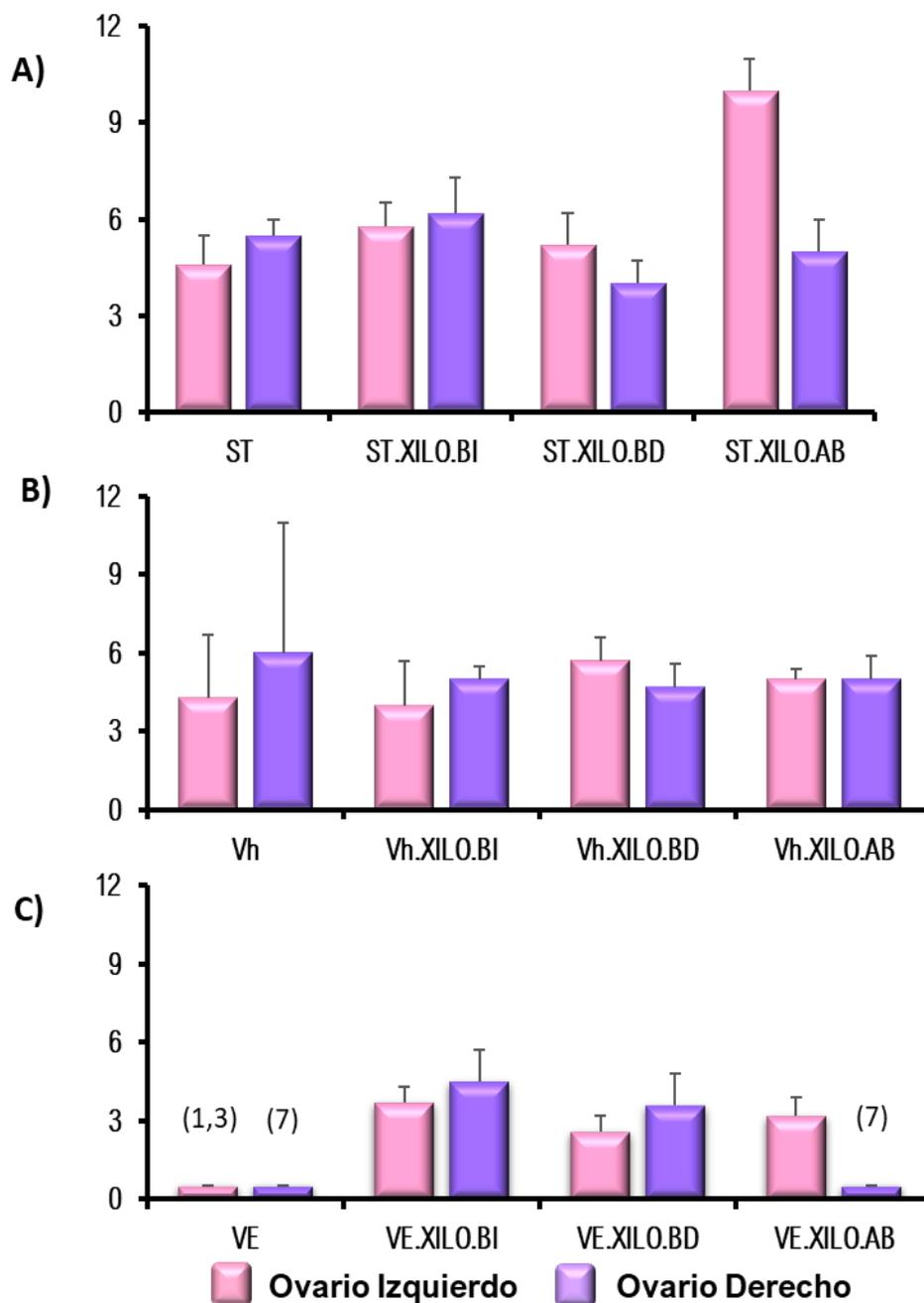
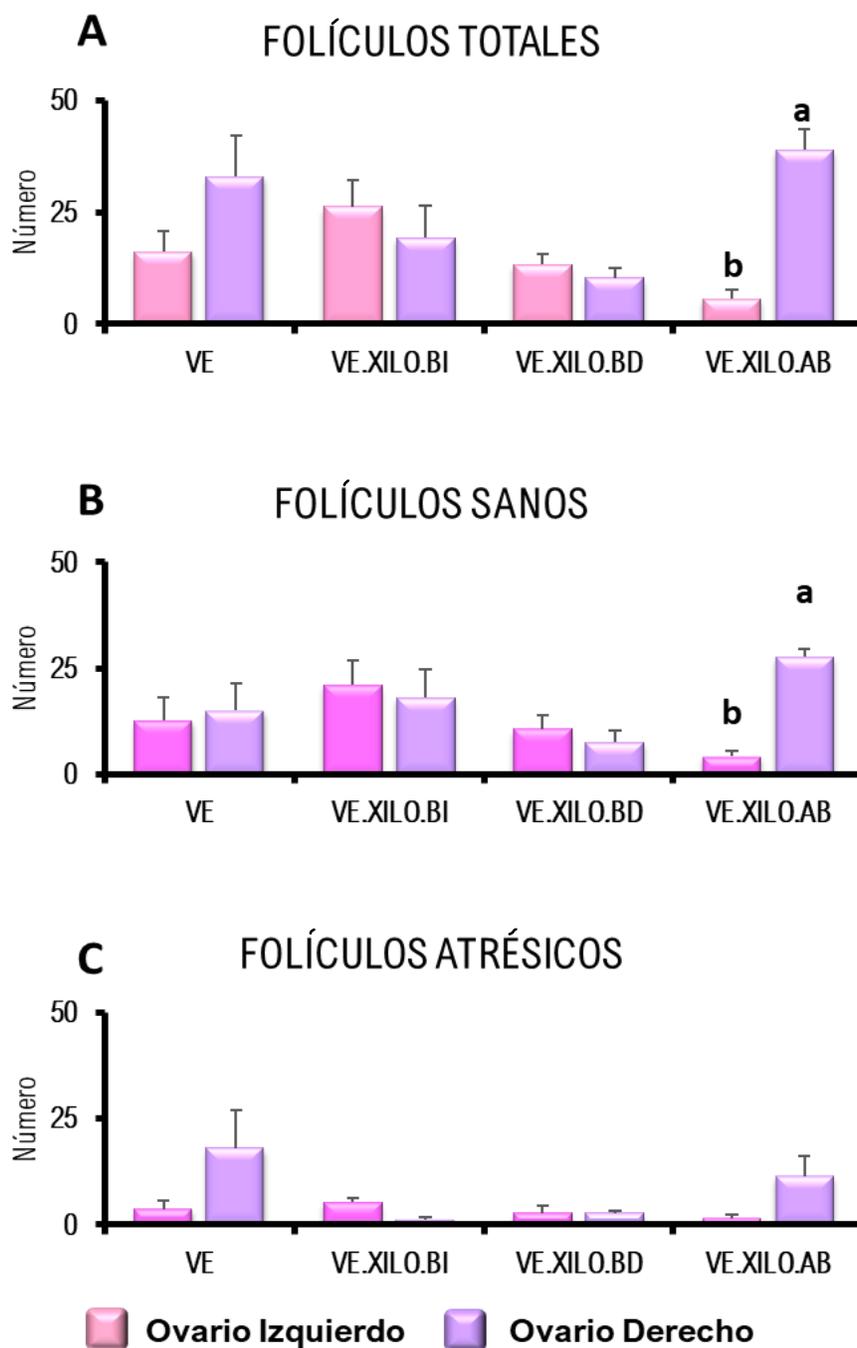


Figura 12. Media \pm eem del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo o derecho de ratas hembra sin tratamiento (ST), o inyectadas a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o Valerato de Estradiol (VE) y sometidas a los 60 días de edad a la microinyección en la bursa ovárica izquierda (BI), derecha (BD) o ambas (AB) con Xilocaina (XILO), sacrificadas al estro vaginal post cirugía.

❖ Dinámica Folicular

En animales previamente tratados con VE, la microinyección bilateral de xilocaína resultó en un menor número de folículos totales en el ovario izquierdo, respecto al grupo microinyectado en la bursa izquierda. Mientras que, el ovario derecho mostró un mayor número de folículos totales que su gónada izquierda (Figura 13 A). Un efecto similar se observó en el número de folículos sanos (Figura 13, B).

El número de folículos atrésicos no se modificó por ninguno de los tratamientos (Figura 13 C).



a < p 0.05 vs VE XILO AB (ovario izquierdo); b p<0.05 VE.XILO.BI (ovario izquierdo), Prueba Kruskal-Wallis, seguida de Dunn

Figura 13. Media \pm eem del número de folículos totales, sanos y atrésico en el ovario izquierdo o derecho de ratas hembra inyectadas a los 10 días de edad con Valerato de Estradiol (VE) y sometidas a los 60 días de edad a la microinyección en la bursa ovárica izquierda (BI), derecha (BD) o ambas (AB) con Xilocaina (XILO), sacrificadas al estro vaginal post cirugía.

En los grupos VE, la microinyección bilateral de xilocaína resulta en la disminución en el número de prequistes, con respecto a los animales inyectados sólo con VE; sin embargo, esta disminución, no fue estadísticamente significativa (Figura 14A). Un resultado similar fue observado en el número de quistes (Figura 14B).

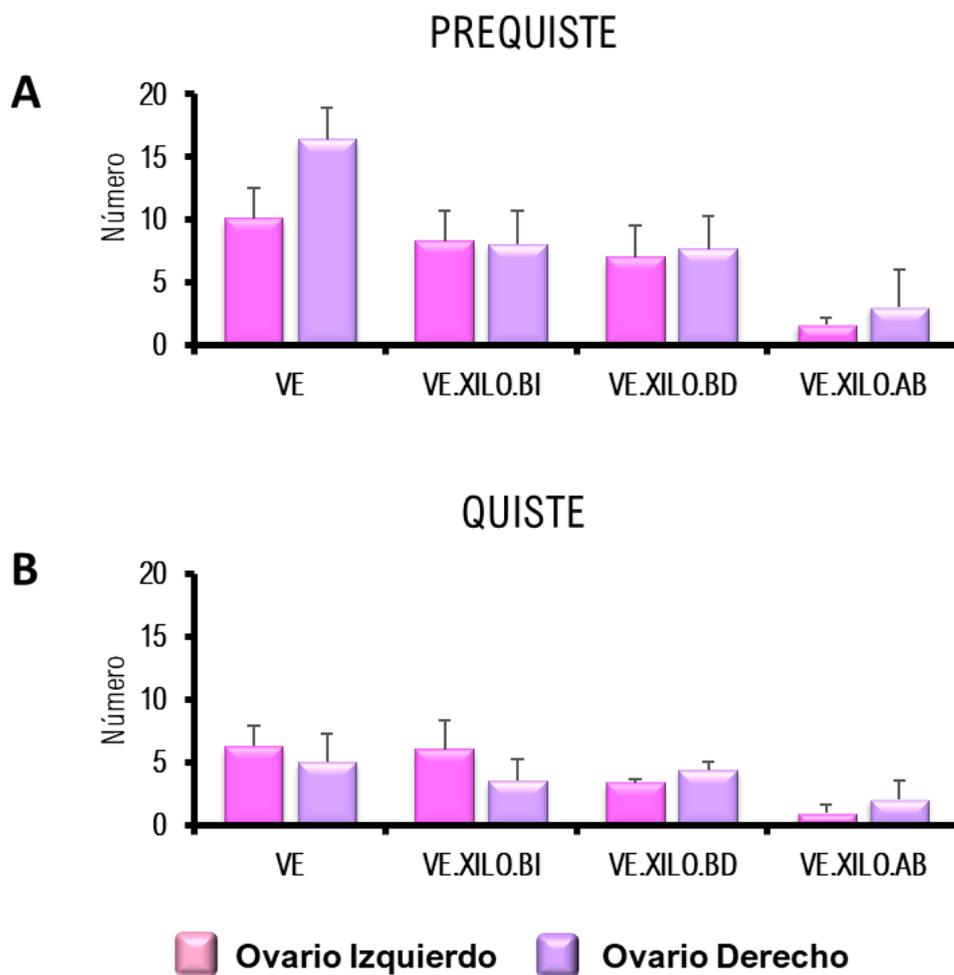
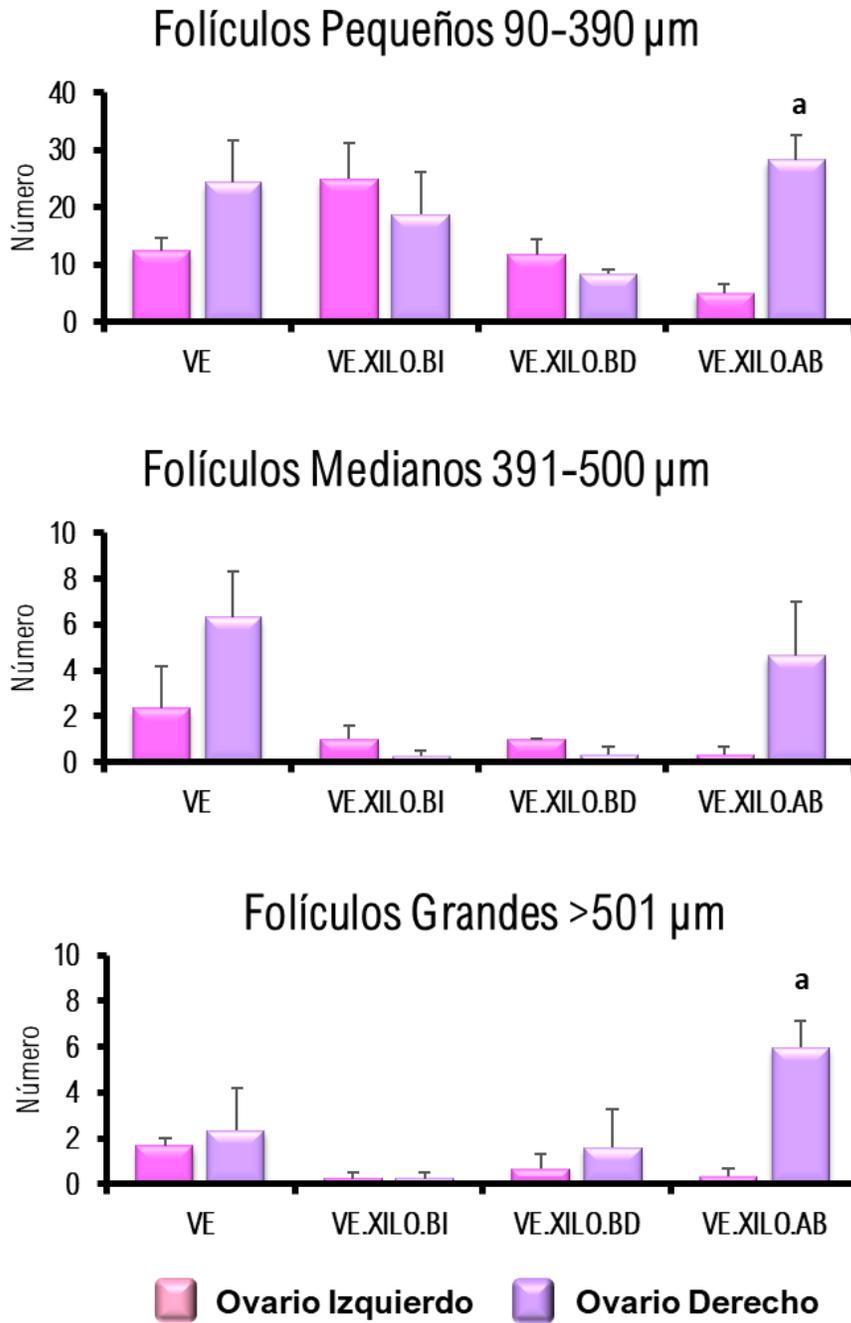


Figura 14. Media \pm eem del número de prequistes y quistes en el ovario izquierdo o derecho de ratas hembra inyectadas a los 10 días de edad con Valerato de Estradiol (VE) y sometidas a los 60 días de edad a la microinyección en la bursa ovárica izquierda (BI), derecha (BD) o ambas (AB) con Xilocaína (XILO), sacrificadas al estro vaginal post cirugía.

De los tres grupos de folículos que clasificamos, en este estudio se observó un mayor número de folículos pequeños que medianos o grandes.

En los animales microinyectados con xilocaína en ambas bursas, el número de folículos pequeños y grandes fue mayor en la gónada derecha que en la izquierda (Figura 15 A).

El comportamiento de la dinámica folicular mostró que en los grupos VE y microinyectados con xilocaína en la bursa del ovario izquierdo o derecho, resulta en un menor número de folículos medianos y grandes, respecto al grupo VE. Un comportamiento similar se observó en la gónada izquierda de los animales VE microinyectados con xilocaína en ambas bursas, mientras que, el ovario derecho mantuvo un número mayor de estos folículos (Figura 15 A, B).



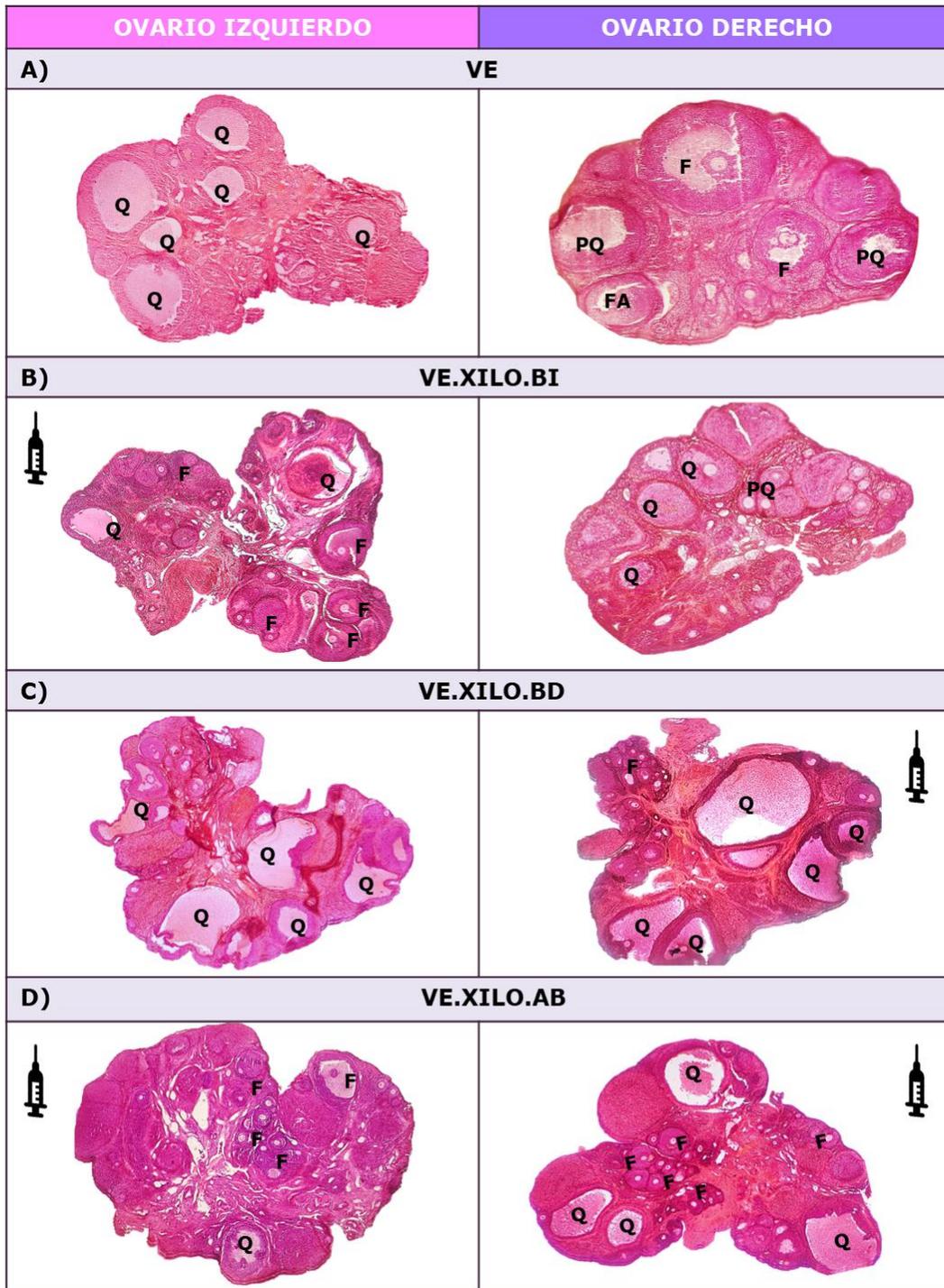
$\alpha < p 0.05$ vs VE XILO AB (ovario izquierdo), Prueba Kruskal-Wallis, seguida de Dunn

Figura 15. Media \pm eem del número de folículos pequeños, medianos y grandes en el ovario izquierdo o derecho de ratas hembra inyectadas a los 10 días de edad con Valerato de Estradiol (VE) y sometidas a los 60 días de edad a la microinyección con Xilocaína (XILO) en la bursa ovárica izquierda (BI), derecha (BD) o en ambas (AB) y sacrificadas al estro vaginal post cirugía.

❖ Histología Ovárica

En el grupo que fue tratado con VE, se observó una población dominante de estructuras quísticas y prequísticas, acompañado de un desarrollo folicular escaso (Cuadro 1. A)

Cuando los animales tratados con VE fueron microinyectados posteriormente en la bursa izquierda o derecha con xílocaína continuaron presentando quistes y prequistes (Cuadro 1. B y C). Sin embargo, el grupo que recibió la microinyección de xílocaína en ambas gónadas mostró una mayor presencia de folículos y una disminución en el número de quistes y prequistes (Cuadro 1. D).



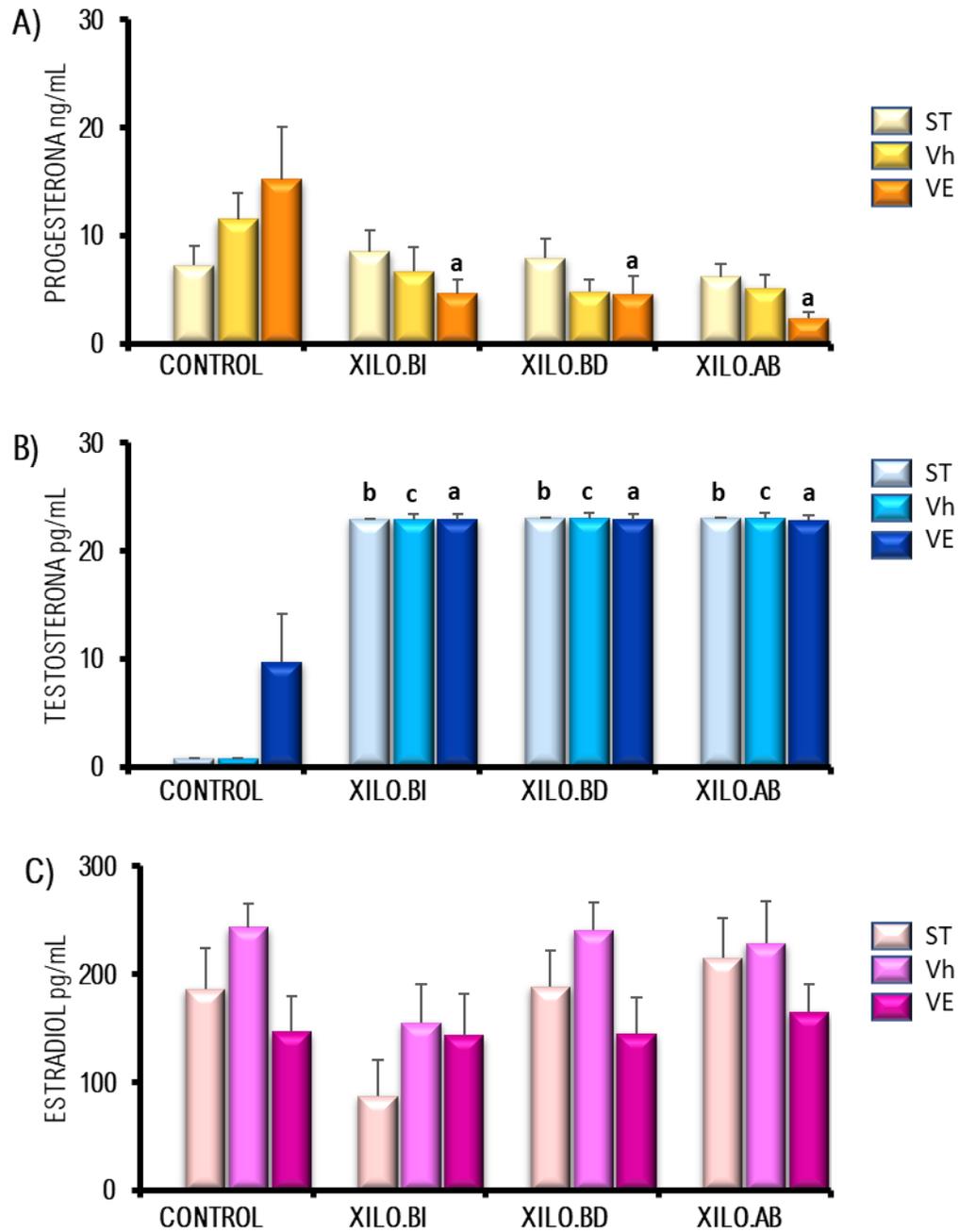
Cuadro 1. Fotomicrografías a un aumento de 40x de ovario de ratas hembra inyectadas a los 10 días de edad con (A) Valerato de Estradiol (VE) y sometidas a los 60 días de edad a la microinyección con Xilocáina (XILO) en (B) la bursa ovárica izquierda (BI), (C) derecha (BD) o (D) ambas (AB) y sacrificadas al estro vaginal post cirugía. Cortes teñidos con H-E, donde F: folículo, FA: folículo atrésico, PQ: Prequiste y Q: Quiste.

❖ Concentración de Hormonas Esteroides

En animales sin tratamiento farmacológico previo o en aquellos inyectados con Vh, la microinyección de xilocaína no modificó la concentración de progesterona. En animales inyectados con VE la microinyección unilateral o bilateral de xilocaína resultó en una menor concentración de la hormona, respecto al grupo VE control (Figura 16 A).

La microinyección unilateral o bilateral de xilocaína, en animales sin tratamiento o inyectados con Vh o VE, resultó en una mayor concentración de testosterona, en comparación con sus respectivos grupos control (Figura 16 B).

La concentración de estradiol no se modificó de manera significativa por ninguno de los procedimientos experimentales (Figura 16 C).



a $p < 0.05$ vs VE control; b $p < 0.05$ vs ST control; c $p < 0.05$ vs Vh control. Prueba de ANDEVA, seguida de la prueba de Tukey-Kramer

Figura 16. Media \pm eem de la concentración de Progesterona (ng/mL), Testosterona (pg/mL) y Estradiol (pg/mL) en ratas sin tratamiento o inyectadas a los 10 días de edad con valerato de estradiol (VE) o aceite de sésamo (Vh) y sometidas a los 60 días de edad a la microinyección con Xilocaina (XILO) en la bursa ovárica izquierda (BI), derecha (BD) o en ambas (AB) y sacrificadas al estro vaginal post cirugía.

❖ Peso de Órganos

No se observaron cambios en cuanto al peso corporal, el peso del útero, en ninguno de los grupos experimentales.

El grupo sin tratamiento y microinyectado con xilocaína en la bursa derecha, dio como resultado un aumento en la masa ovárica, respecto a su grupo testigo. Por otro lado, la inyección de VE resultó en una menor masa ovárica en comparación con los animales inyectados sólo con Vh (Cuadro 2).

Cuadro 2. Media \pm eem del peso corporal y del peso relativo (mg/100g de peso corporal) de la masa ovárica, peso del útero y masa adrenal de ratas hembra sin tratamiento (ST), o inyectadas a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o Valerato de Estradiol (VE) y sometidas a los 60 días de edad a la microinyección en la bursa ovárica izquierda (BI), derecha (BD) o ambas (AB) con Xilocaína (XILO), sacrificadas al estro vaginal post cirugía.

Grupo	Peso Corporal	Masa Ovárica	Peso Útero
ST	188.8 \pm 4.4	26.7 \pm 0.4	176.5 \pm 3.2
ST. XILO.BI	204.8 \pm 5.6	35.6 \pm 1.8	157.3 \pm 6.9
ST. XILO.BD	211.2 \pm 6.1	36.7 \pm 1.7 ^a	176.3 \pm 8.8
ST. XILO.AB	215.5 \pm 3.9	34.13 \pm 2.4	169.2 \pm 11.5
Vh	190 \pm 8.4	33.2 \pm 2.2	157.8 \pm 8.9
Vh.XILO.BI	191.4 \pm 7.3	31.0 \pm 1.5	151.1 \pm 6.8
Vh.XILO.BD	200.3 \pm 5.8	37.5 \pm 1.6	172.3 \pm 9.3
Vh.XILO.AB	193.4 \pm 5.2	34.66 \pm 1.7	171.5 \pm 8.6
VE	199.1 \pm 5.1	22.3 \pm 2.1 ^b	112.7 \pm 9.4
VE. XILO.BI	210.0 \pm 5.1	23.3 \pm 2.4	127.2 \pm 6.6
VE. XILO.BD	213 \pm 4.6	20.9 \pm 1.7	117.9 \pm 11.4
VE. XILO.AB	210.0 \pm 5.1	23.3 \pm 2.4	127.2 \pm 6.6

a p<0.05 vs ST, b p<0.05 vs Vh (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer)

El peso del timo fue mayor en los animales sin tratamiento y microinyección de xilocaína en la bursa derecha, respecto a los animales microinyectados en la bursa izquierda o aquellos sin tratamiento. Un efecto contrario se observó

cuando la microinyección se realizó en ambas bolsas, ya que el peso del timo fue menor (Cuadro 3).

Los animales inyectados solo con VE presentaron una menor masa adrenal que los inyectados con el Vh. La masa adrenal fue mayor en aquellos animales tratados con VE y microinyectados en ambas bolsas con xilocaína, con respecto al grupo tratado sólo con VE (Cuadro 3).

Por otro lado, el peso del timo en los animales tratados con VE y microinyectados en la bolsa derecha fue mayor, en comparación al grupo VE y microinyectado en la bolsa izquierda o en ambas bolsas (cuadro 3).

Cuadro 3. Media \pm eem del peso relativo (mg/100g de peso corporal) de la masa adrenal, peso del bazo y del timo de ratas hembra sin tratamiento (ST), o inyectadas a los 10 días de edad con vehículo (Vh) o Valerato de Estradiol (VE) y sometidas a los 60 días de edad a la microinyección en la bolsa ovárica izquierda (BI), derecha (BD) o ambas (AB) con Xilocaína (XILO), sacrificadas al estro vaginal post cirugía

Grupo	Masa Adrenal	Peso Bazo	Peso Timo
ST	23.6 \pm 0.3	204 \pm 1.4	179.5 \pm 2.7
ST. XILO.BI	25.1 \pm 1.8	216.9 \pm 4.3	175.1 \pm 8.7
ST. XILO.BD	29.2 \pm 1.0	216.4 \pm 5.8	370.4 \pm 13.4 c,d
ST. XILO.AB	25.9 \pm 1.3	204.6 \pm 9.1	117.5 \pm 7.4 c,d
Vh	35.5 \pm 8.0	221.5 \pm 12.4	165.8 \pm 10.2
Vh. XILO.BI	31.7 \pm 1.2	220.9 \pm 11.8	167.3 \pm 6.1
Vh. XILO.BD	28.1 \pm 1.7	227.5 \pm 20.4	176 \pm 38
Vh. XILO.AB	30.7 \pm 1.1	236.3 \pm 8.1	162.1 \pm 6.3
VE	21.0 \pm 0.8 a	214.5 \pm 6.8	189.2 \pm 6.9
VE. XILO.BI	29.3 \pm 1.9	241.8 \pm 12.5	163.8 \pm 6
VE. XILO.BD	28.5 \pm 2.2	209.9 \pm 2	222.6 \pm 27.9 e
VE. XILO.AB	29.3 \pm 1.9 b	236.3 \pm 8.1	162.1 \pm 6.3 f

a p<0.05 vs Vh, **b** p< vs VE, **c** p<0.05 vs ST, **d** p<0.05 vs ST.XILO.BI, **e** p<0.05 vs VE.XILO.BI, **f** p<0.05 vs VE.XILO.BD (Prueba de ANDEVA seguida por Tukey-Kramer)

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que en nuestro modelo, la condición del SOPQ no se revierte de manera significativa ante el adormecimiento de las señales nerviosas que recibe y envía el ovario, ya que después de la inyección unilateral o bilateral con xilocaína, los animales siguen presentando hiperandrogenismo y quistes en los ovarios. Estas evidencias nos permiten sugerir que la inervación es sólo uno de los factores implicados en la persistencia y desarrollo de la fisiopatología.

En el presente estudio, se observó que, en animales sin tratamiento farmacológico previo, la microinyección unilateral de xilocaína no modificó la respuesta ovulatoria. Resultados semejantes fueron reportados por el grupo de Domínguez (1998), cuando la microinyección de xilocaína se realizó en la bursa derecha o en ambas bursas de ratas adultas en el día del proestro. Los autores sugieren que estos resultados se deben a que existen otros mecanismos que se encargan de cerrar el circuito de regulación necesario para que se presente la ovulación, como puede ser el caso de las gonadotropinas. Por otro lado, nuestros resultados muestran que, sólo el 40% de los animales microinyectados en ambas bursas con xilocaína ovuló, esta diferencia puede deberse al día en el cual se llevó a cabo la cirugía, ya que en nuestro estudio la xilocaína se inyectó a los 60 días de edad del animal, sin considerar una etapa específica del ciclo estral, mientras que en el estudio de Domínguez (1998), la microinyección de xilocaína se realizó en la tarde del proestro, etapa en la cual se presenta el pico preovulatorio de LH, el cual desencadena todos los mecanismos que favorecen la liberación del óvulo.

En ratas prepúber, la sección unilateral del NOS resulta en una disminución en el número de ovocitos liberados por la gónada denervada y en una respuesta compensadora por la gónada inervada (Morales y col., 1993). Evidencias que permitieron sugerir la existencia de una comunicación intraovárica (Morales y col., 1993). Por otro lado, Domínguez y colaboradores (1998), señalan que esta comunicación que regula el proceso ovulatorio inicia en el ovario izquierdo y se transmite al ovario derecho. Idea que se ve apoyada por el hecho de que en ratas adultas cíclicas, la microinyección de xilocaína en la bursa izquierda y solución salina en la bursa derecha, disminuye el número de ovocitos liberados por ambos ovarios. A su vez, ambas gónadas se comunican con el SNC a través de los nervios periféricos. Así, el SNC manda señales neurales a los ovarios vía el NOS, el cual modula la respuesta de los folículos ováricos a las gonadotropinas, lo que resulta en la ovulación (Chávez y col., 1994; Domínguez y col., 1998; Moran y col., 2004).

Se tiene evidencia de que los órganos endocrinos pareados no son idénticos en su función, así como en su control, y que los mecanismos neuroendocrinos que regulan la ovulación no ocurren de la misma manera para el ovario izquierdo que para el derecho (Chávez y col., 1987; Domínguez y col., 1989). Lo que podría explicar porque en nuestro estudio, el bloqueo de las señales nerviosas desde la gónada izquierda resulta en la disminución del porcentaje de animales ovulantes. Sin embargo, hasta el momento no contamos con evidencias que nos permitan explicar los efectos que tiene el Vh sobre la respuesta ovulatoria.

Nuestros animales con SOPQ mostraron un bloqueó en la ovulación. Resultados semejantes se han reportado por otros grupos de investigación (Rosa-E-Silva y col., 2003). Lara y colaboradores (2000), muestran que la inyección intraperitoneal de VE induce en el ovario un incremento en la concentración del Factor de Crecimiento Neural (NGF) y de su receptor de

baja afinidad p-75. La unión de NGF con su receptor a nivel ovárico, activa una cascada de señalización que viaja de manera retrógrada a través del NOS a centros superiores como el GCMS, donde incrementa la expresión de la enzima TH, enzima limitante en la síntesis de catecolaminas, como resultado final de este mecanismo incrementa la concentración de NA, la cual viaja por el NOS hasta el ovario y provoca el desarrollo de quistes, ausencia de ovulación y alta secreción de andrógenos. Sin descartar, que el VE actúe a nivel hipotalámico modificando la pulsatilidad de la GnRH y por ende la secreción de LH y FSH, tal y como lo reporta Brawer y colaboradores (1986). Cabe resaltar que las alteraciones reproductivas que provoca la administración de VE son semejantes a los reportados en mujeres con SOPQ; por lo que el modelo de inducción del SOPQ con VE, es uno de los más utilizados.

Partiendo del hecho de que en los animales con VE se presenta una hiperactividad noradrenérgica que llega al ovario por vías simpáticas, se decidió microinyectar xilocaína, en la bursa ovárica, en ratas previamente tratadas con VE, a fin de atenuar la señal nerviosa y favorecer el restablecimiento de las funciones ováricas. Al respecto, mostramos que en los animales con SOPQ, la microinyección con xilocaína en la bursa izquierda resulta en el 60% de animales ovulantes por el ovario derecho y 40% por el izquierdo. Mientras que, con la microinyección de xilocaína en la bursa derecha sólo el 37% de los animales ovulan. Estos resultados son semejantes a lo reportado por Morales-Ledesma y colaboradores (2010), quienes mostraron que, en animales con el síndrome, la sección unilateral del NOS favorece la ovulación de la gónada intacta, mientras que el ovario denervado libera un menor número de ovocitos, respecto al ovario inervado. Estos resultados permitieron a los autores sugerir que el SOPQ además de ser el resultado de una mayor actividad en la inervación simpática proveniente del NOS, también se encuentra regulado por otros factores nerviosos, tal como el

nervio vago. Linares y colaboradores (2013) mostraron que en ratas con SOPQ, la vagotomía uni o bilateral restablece la tasa de animales ovulantes por ambos ovarios, por lo que se sugiere que el nervio vago está estrechamente relacionado con el desarrollo y la persistencia del SOPQ inducido por VE. Es posible que los resultados observados en el presente estudios se deban a la asimetría que existe en las conexiones neurales que llegan a los ovarios (Chávez y col., 1994; Klein y Burden, 1988). En apoyo a esta interpretación Klein y Burden 1988 mostraron con el uso de true blue (un trazador retrógrado) que en ratas adultas existe un mayor número de fibras que se proyectan desde el GMS hacia el ovario derecho, en comparación con el ovario izquierdo. Sin descartar que la información que transcurre por el nervio vago presente cierto grado de asimetría, tal y como ha sido sugerido por Chávez y col., 1989; Cruz y col., 1986, ya que en ratas adultas sin la patología, la vagotomía unilateral derecha no modifica la respuesta ovulatoria y la vagotomía izquierda resulta en la disminución del porcentaje de animales ovulantes, por lo que sugieren que es indispensable la presencia del nervio vago izquierdo para que se presente la ovulación de manera exitosa, mientras que la información que viaja por el vago derecho parece no participar en la regulación de dicho evento.

Se ha reportado que la sección bilateral del NOS en animales con el síndrome, logra una recuperación de la ovulación por ambos ovarios, evidenciado por la presencia de cuerpos lúteos (Barria y col., 1993; Morales-Ledesma y col., 2010; Rosa-E-Silva y col., 2003). Este mismo resultado reportó Espinoza y colaboradores (2018) donde, en animales con SOPQ, inducido a los 14 días de edad con VE, la denervación farmacológica a los 68 días de edad con monosulfato de guanetidina (GTD, una herramienta farmacológica que destruye solo fibras noradrenérgicas), resultó en el restablecimiento de la ovulación. Un efecto similar se observa en ratas adultas, inyectadas con VE, sometidas a 12 tratamientos de electroacupuntura de baja frecuencia dos días

después de la inyección del VE. En estos animales disminuyó la concentración de NGF y se acompañó del restablecimiento de la ovulación; evidenciado por la presencia de cuerpos lúteos observados en la histología ovárica (Stener-Victorin y col., 2000). En nuestro estudio, los animales con SOPQ sometidos a la microinyección bilateral de xilocaína mostraron un 57% de ovulación por la gónada izquierda y un 14% por la derecha. Dado que la xilocaína actúa sobre las señales aferentes y eferentes de los ovarios, es decir sobre el NOS y el NV, es posible que nuestros resultados se expliquen por el hecho de que la xilocaína interrumpe las señales neuroendocrinas que frenan la ovulación en el animal con SOPQ, y posiblemente la comunicación entre las gónadas, lo que da como resultado el restablecimiento parcial de la ovulación en estos animales. Por otra parte, no descartamos la existencia de factores intrínsecos que estén regulando el desarrollo y persistencia del síndrome en estos animales.

Diversos grupos de investigación han reportado que en ratas en etapa adulta (Brawer y col., 1986; Lara y col., 2000; Luna y col., 2012) o prepuber (Rosa-E-Silva y col., 2003), una sola dosis de VE provoca una reducción en la población de folículos totales y preovulatorios, esto se acompaña de una mayor presencia de folículos pre-antrales, antrales y atrésicos; así como la presencia de prequistes y quistes. Lara y colaboradores (1993), sugieren que estos cambios son consecuencia de alteraciones en la homeostasis de las catecolaminas ováricas que, se ha observado, comienzan antes del desarrollo de quistes y persiste incluso después de su formación.

En animales con SOPQ, se ha mostrado que la eliminación del tono noradrenérgico elevado, por la sección quirúrgica del NOS revierte el desarrollo de quistes foliculares y reactiva el desarrollo folicular (Morales-Ledesma y col., 2010; Sotomayor-Zarate y col., 2008). Un efecto similar fue reportado por Venegas y colaboradores (2019), quienes mostraron que, en

animales con síndrome, el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos por la microinyección de propanolol en la bursa ovárica previene el desarrollo de quistes ováricos, y en la histología ovárica se mostró desarrollo folicular y presencia de CL. Es probable que, en nuestros animales con VE, la microinyección bilateral de xilocaína haya logrado restablecer la homeostasis catecolaminérgica en la gónada derecha, ya que en este ovario se observó un mayor número de folículos totales sanos, acompañado de una menor presencia de prequistes, Mientras que, en la gónada izquierda se observó un menor número de folículos totales y sanos. Es posible que esta respuesta se deba a la diferencia en la afinidad de las gónadas ante la activación de los receptores β -adrenérgicos, así como a las asimetrías que existen en los diferentes niveles del eje hipotálamo, hipófisis, gónada. En apoyo a esta interpretación hay estudios que indican la existencia de asimetrías tanto bioquímicas como funcionales en diversas estructuras cerebrales que se encuentran involucradas en el control de las funciones ováricas (Gerendai y Hala'sz, 1997).

Arteaga-López y colaboradores (2003), mostraron que a lo largo del ciclo estral la expresión del ARNm del receptor de estrógenos alfa, del receptor de estrógenos beta y del GnRH es asimétrica, entre el lado izquierdo y derecho de las áreas preóptica e hipotalámica anterior. Otra evidencia que apoya esta asimetría a nivel cerebral es el trabajo de Gerendai y colaboradores (1978), donde en ratas hembra observaron que la concentración de GnRH en el hipotálamo es mayor en el área derecha que en la izquierda. Tóth y colaboradores (2008) utilizaron ratas adultas inoculadas con el virus de la pseudorabia, y mediante la técnica de rastreo transneuronal viral dual caracterizaron la inervación de los ovarios. Los resultados mostraron que existe un mayor número de conexiones neurales transináptica entre el ovario izquierdo y áreas del cerebro (medula ventrolateral, núcleos vagales, regiones noradrenérgicas A1 y A5, diencéfalo, entre otros) que el ovario derecho con estas mismas zonas del cerebro. Por lo que, los presentes datos proporcionan

evidencias neuromorfológicas sobre la asimetría de la inervación supraespinal de los ovarios, indicando conexiones transinápticas más intensas entre el cerebro y el ovario izquierdo, que entre el cerebro y la gónada derecha.

Por otro lado, se ha reportado que la mayoría de las fibras nerviosas que viajan por el NOS y el NPO e inervan los ovarios, surgen del GCMS, uno de los principales componentes neurales donde se lleva a cabo el relevo de información que regula las funciones ováricas y cuyo componente principal son neuronas noradrenérgicas (Baljet y Drukker, 1979; Domínguez y Riboni, 1971), las cuales se encuentran inervando de forma asimétrica a las gónadas. Morán y colaboradores (2005) mostraron que en ratas adultas la inyección unilateral de true blue, un trazador retrogrado, resulta cuatro días después de la manipulación, en el marcaje asimétrico de las neuronas del GCMS, ya que cuando el trazador se inyecta en la bursa izquierda se observa marca en el GCMS izquierdo y derecho, mientras que cuando se realiza en la bursa derecha sólo se marcan las neuronas del GCMS derecho. Estos resultados permiten sugerir la existencia de una asimetría en la actividad de las conexiones neuronales entre los ovarios y los GCMS.

Existe evidencia que sugiere que el inicio del SOPQ se debe al aumento en la concentración de andrógenos, resultado de una desregulación a nivel de los diferentes centros que forman parte del eje hipotálamo, hipófisis, gónada (Rosenfield y col., 1990). La administración de una dosis de 2mg de VE en ratas en etapa infantil (Morales-Ledesma y col., 2010; Rosa E-Silva y col., 2003) o adulta (Brawer y col., 1978) produce alteraciones neuroendocrinas que culminan en una falla reproductiva durante la edad adulta; una de ellas es la falta de ovulación, acompañada de alteraciones en el perfil hormonal y presencia de quistes foliculares.

En nuestros animales con SOPQ, la concentración de progesterona no se modificó, la de testosterona aumento al igual que la de estradiol. Estos resultados muestran que nuestros animales presentan una condición de hiperandrogenismo, tal y como ha sido mostrado por otros autores (Barria y col., 1993; Morales-Ledesma y col., 2010; Sotomayor-Zarate, 2008). Los autores sugieren que el incremento en la testosterona podría ser atribuido a la alta presencia de atresia folicular y a la presencia de quistes ováricos.

Una de las hipótesis sobre el origen del SOPQ es la hiperactividad en la información nerviosa que llega a los ovarios vía el NOS y el nervio vago. En el modelo del SOPQ, inducido con VE, la sección unilateral o bilateral del NOS en ratas de 24 días de edad (Morales y col., 2010; Rosa-E-Silva y col., 2003) o 71 (Barria y col., 1993) resulta en el restablecimiento de las concentraciones de hormonas esteroides ováricas. En el presente estudio, la microinyección unilateral o bilateral de xilocaína en ratas con SOPQ, inducido por el tratamiento con VE, disminuyó las concentraciones de progesterona, lo que permite sugerir que el NOS juega un papel estimulante en la regulación de la secreción de progesterona, sin descartar que a nivel del folículo ovárico se presente una alteración en el sistema enzimático involucrado en la síntesis de progesterona a partir de la pregnenolona, tal y como lo ha sugerido Espinoza (2010).

Linares y colaboradores (2013) mostraron que en ratas con SOPQ la sección unilateral o bilateral del nervio vago, resulta en un incremento en la concentración de testosterona; por lo que se sugiere que la información parasimpática juega un papel de tipo inhibitorio sobre la secreción de esta hormona. Por otro lado, el grupo de Espinoza (2018) reportó que en ratas tratadas con VE a los 14 días de edad y sometidas a una denervación catecolaminérgica desde el día 70 al 90 de vida, por la administración de GTD, la concentración de testosterona permaneció alta en esto animales. Los

autores sugieren que este efecto se debe a la presencia de estructuras prequísticas y quísticas observada en la histología de estos animales. Estos resultados nos permiten explicar el aumento en la concentración de testosterona observada en nuestros grupos experimentales con SOPQ y tratados unilateral o bilateralmente con la xilocaína, sin descartar que el efecto de adormecimiento que tiene el anestésico sobre la conducción de señales nerviosas haya interferido con la regulación que la inervación tiene sobre la regulación de la actividad esteroidogénica de la gónada. Por otro lado, es posible que la xilocaína inhiba la actividad de las enzimas que regulan el metabolismo de la testosterona, ya que, la xilocaína bloquea tanto la iniciación como la conducción de los impulsos nerviosos al disminuir la permeabilidad de la membrana neuronal a los iones, lo que interrumpe la prolongación del potencial de acción (Ochoa-Anaya y col., 2017). La vía mediada por PKA/AMPC es la principal cascada de señalización que inicia el proceso esteroidogénico, sin embargo, hay evidencia de la participación de otras vías independientes de AMPC, una de ellas se encuentra mediada por iones de cloruro y Ca^{++} (Gómez-Chang y col., 2012).

Brawer y colaboradores (1978) reportaron que a las 2 semanas posteriores de la inyección con VE la concentración de estradiol se mantiene elevada incluso 8 semanas después del tratamiento. Los autores sugirieron que, en el animal con la fisiopatología, las concentraciones de estradiol son producidas por el ovario, ya que el VE desaparece varias semanas después de su administración. Aunado a esto, trabajos realizados en nuestro laboratorio han reportado el mismo comportamiento en la concentración de estradiol al inyectar una sola dosis VE a ratas en etapa infantil (Linares y col., 2013; Morales-Ledesma y col., 2010), el cual se ha visto en otros trabajos experimentales que afecta tanto al hipotálamo como al ovario de forma permanente (Sotomayor y col., 2011). Cuando éstos animales son sometidos a una denervación bilateral del nervio vago los niveles de estradiol continúan altos. Lo que permitió sugerir que la

inervación del tipo parasimpática desempeña un papel inhibitorio en la secreción de esta hormona. Caso contrario se observa cuando se les realiza la sección del NOS, donde la concentración del estradiol se ve disminuida (Morales-Ledesma y col., 2010; Rosa-E-Silva y col., 2003).

Las concentraciones de estradiol en un animal sin la patología van de los 3 a los 10 pg/mL (Brawer y col., 1978). En nuestros animales con SOPQ, la concentración de estradiol incremento a razón de 14 a 16 veces, respecto a un animal sin la patología y se mantuvo elevada incluso en aquellos animales tratados con la xilocaína. Por lo que sugerimos que nuestros animales presentan un patrón de hipersecreción esteroideogénica como resultado de la inhibición de las señales neurales por la microinyección bursal de xilocaína que regulan la actividad de las enzimas involucradas en la biosíntesis de los esteroides.

Se ha observado que en los ovarios de roedores inyectados con VE hay una disminución en el tamaño de las gónadas, lo que se ha atribuido a la reducción en la población de folículos secundarios, la presencia de quistes foliculares y un adelgazamiento de las capas de la granulosa y engrosamiento de la capa de las células de la teca, las cuales producen altas concentraciones de andrógenos (Brawer y col., 1986). Anesetti y Chávez-Genaro (2016), mostraron que ratas Wistar expuestas a altas concentraciones de un andrógeno como la testosterona presentan quistes, ausencia de cuerpos lúteos y menor peso ovárico. Es posible que la disminución de la masa ovárica observada en nuestros animales tratados con VE pueda deberse a los cambios morfológicos que causa este fármaco en la arquitectura del ovario. Por otro lado, hasta el momento no hay reportes que permitan explicar el aumento de la masa ovárica observada en los animales sin tratamiento y microinyectados unilateralmente con xilocaína en la bursa derecha, se necesitaran de más estudios para esclarecer este efecto.

Estudios realizados por Sotomayor-Zárate y colaboradores (2008) muestran que la administración de VE en ratas neonatas sacrificadas a los 61 días de edad, no modifica la masa adrenal, pero si se produce una mayor concentración de las catecolaminas de origen adrenal. Los autores sugieren que este efecto podría ser resultado de un incremento en la actividad de la TH en células de la médula suprarrenal, como se ha reportado cuando se estimula la síntesis de catecolaminas mediante contaminantes ambientales de naturaleza estrogénica (Willoughby y col., 2005; Yanagihara y col.,2005). Nuestros animales con VE mostraron una disminución en la masa adrenal cuando la microinyección de xilocaína se aplicó de manera bilateral. Sin embargo, la microinyección en la bursa izquierda aumento la masa adrenal. Estos resultados posiblemente estén relacionados con la actividad catecolaminérgica que se está generando a nivel adrenal.

El timo, es una glándula fundamental en el desarrollo y diferenciación de los linfocitos T. En los mamíferos, está compuesto por dos lóbulos y se localiza en la región media del tórax (Baraña, 2009). Su función inmunológica es elaborar glóbulos blancos, los cuales se encargan de proteger al cuerpo contra infecciones, por otro lado; el timo contiene un tipo de células llamadas Kulchitsky, las cuales tienen la capacidad de liberar hormonas como la timopoyetina y la Timulina. Por otra parte, el timo a nivel de la hipófisis estimula la liberación de la hormona del crecimiento, LH, FSH y prolactina, y en la glándula suprarrenal, estimula la acción de ACTH (Thapa y Farber, 2019). En nuestros resultados el peso del timo se vio disminuido en el grupo sólo microinyectado con xilocaína en ambas bolsas, esta disminución se observó también en el grupo tratado con VE y microinyectado con xilocaína en ambas bolsas. Varios estudios señalan que el timo es un órgano muy vulnerable a la atrofia cuando es expuesto a diferentes estímulos, como

hormonas, agentes inmunosupresores o productos químicos del medio externo (Ashwell y col., 2000; Drela, 2006).

Existen evidencias de la interrelación entre los sistemas endocrino, inmunológico e incluso con el sistema nervioso (Barañaño, 2009). Estudios realizados por Grossman y Roselle en 1983, reportaron que, cuando se realiza una gonadectomía en ratas hembra, se observa un aumento en la respuesta inmune, acompañado de un aumento en el tamaño del bazo y del timo, lo cual es revertido al administrar un reemplazo hormonal con estradiol. Otro trabajo de Grossman en 1984, en animales castrados y posteriormente tratados con estradiol o testosterona, observaron que mantenían un tamaño de timo normal, ya que, si bien el tratamiento con estradiol o testosterona disminuía el peso del timo por destrucción de los linfocitos, se producía un aumento en el tejido conectivo y adiposo. Asimismo, en ratas macho demostró que, al momento de retirar el aporte hormonal esteroideo por una castración, aumentaba significativamente el tamaño del timo y el número de linfocitos periféricos. Resultados que permitieron sugerir que existe una regulación del sistema inmunitario mediada por la interacción de una red de hormonas, donde posiblemente el estradiol o la testosterona tengan una participación sobre la función e incluso el tamaño del timo. Si partimos de esta idea, es probable que el aumento del timo observado en nuestros grupos sin tratamiento y VE, ambos microinyectados con xilocaína en la bursa derecha, se deba a las altas concentraciones de testosterona y estradiol observadas en estos animales.

Con los resultados del presente estudio, se observa que la disminución de las señales aferentes y eferentes, entre los ovarios y el sistema nervioso central, por la microinyección de xilocaína en la bursa ovárica, no revierte de manera significativa las características del SOPQ, tal como el hiperandrogenismo, la oligo-anovulación y la condición quística de las gónadas. Es probable que

factores ajenos a la inervación que recibe el ovario estén participando en la persistencia del síndrome. Ya que, con la microinyección de xilocaína en la bursa izquierda o derecha, solo el ovario derecho es quien presenta un incremento en el porcentaje de animales ovulantes y en el número de ovocitos liberado. En el caso de la microinyección bilateral, solo el ovario izquierdo es quien responde, disminuyendo incluso la presencia de quistes y prequistes. Por tal razón, sugerimos que existen factores intrínsecos de la gónada que participan en conjunto con la inervación en el mantenimiento y persistencia del SOPQ.

MODELO

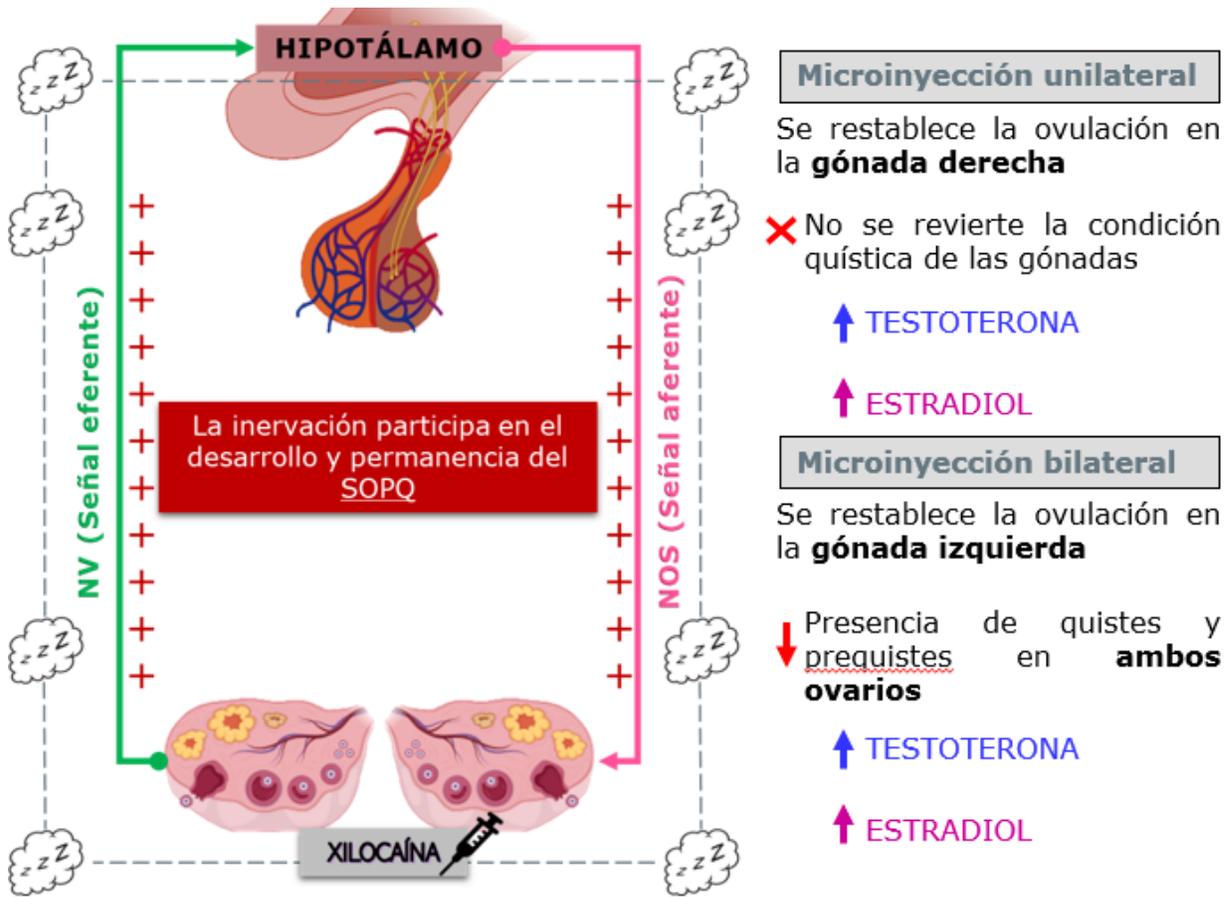


Figura 17. ++++ Representa la participación de la inervación simpática y parasimpática en el desarrollo del SOPQ. **NV**: Nervio Vago, **NOS**: Nervio Ovárico Superior. → Representa la inervación parasimpática, →, Representa la inervación simpática, - - - Representa las señales nerviosas adormecida por efecto de la microinyección bursal con xilocaína (ver página siguiente)

En la figura 17 se muestra que en un animal con SOPQ, la inervación simpática (flecha rosa) señal aferente, así como la inervación parasimpática (flecha verde) señal eferente, juegan un papel importante en la regulación del desarrollo y persistencia del síndrome. Cuando estas señales son anestesiadas por el efecto de la microinyección con xilocaína a nivel de la bursa (línea punteada en color gris), de manera unilateral o bilateral, el restablecimiento en las funciones ováricas se da de forma parcial, ya que la microinyección unilateral izquierda o derecha solo restablece la ovulación en la gónada derecha. Y cuando ambos ovarios reciben la microinyección con el anestésico, solo el ovario izquierdo responde, la presencia de quistes y prequistes disminuye en ambos ovarios. Sin embargo, el adormecimiento de las señales no logra restablecer la condición hiperandrogénica. Se propone la posibilidad de que existan mecanismos intrínsecos de los ovarios que estén regulando el mantenimiento y persistencia del SOPQ.

Conclusiones

- En el animal **sin SOPQ**:
 - El adormecimiento unilateral o bilateral de las señales que recibe el ovario no modifica ni el número de ovocitos liberados, ni el porcentaje de animales ovulantes, por lo que, al parecer, además de la inervación, existen otros mecanismos u otras vías capaces de concluir el “circuito” que regula la ovulación.
 - Es posible que la xilocaína inhiba la actividad de las enzimas que regulan el metabolismo de las hormonas esteroides, ello explicaría el incremento en la concentración de testosterona y estradiol observada en los animales microinyectados unilateral o bilateralmente con el anestésico.

- En el animal **con SOPQ**:
 - La microinyección unilateral o bilateral de xilocaína revierte la anovulación de manera parcial y ello depende del ovario microinyectado, por lo que sugerimos que es posible que las señales neurales regulen mecanismos extrínsecos e intrínsecos de los ovarios que permiten el mantenimiento y persistencia de la fisiopatología.
 - La dinámica folicular y la disminución en la presencia de estructuras quísticas y prequísticas, se ve favorecida cuando la microinyección bursal se realiza de forma bilateral en animales con SOPQ, por lo que es posible que al aplicar de esa manera el anestésico se logre restablecer la homeostasis catecolaminérgica en la gónada derecha.

- La microinyección unilateral o bilateral de xilocaína, no consigue revertir el hiperandrogenismo en animales con el síndrome, por lo que es probable que la información nerviosa sea sólo uno de los factores que favorezcan el mantenimiento de la fisiopatología.

REFERENCIAS

1. Aguado LI, Ojeda SR. (1986). "Prepubertal rat ovary: hormonal modulation of beta adrenergic receptors and of progesterone response to adrenergic stimulation". *Biology of Reproduction*. 34(1):45-50.
2. Anesetti G., Chávez-Gnaro R. (2015), Neonatal testosterone exposure induces early development of follicular cysts followed by sympathetic ovarian hyperinnervation. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(11): 1753-1761.
3. Arteaga-Lopez PR, Domínguez R, Cerbón MA, Mendoza-Rodriguez CA, Cruz ME. 2003. Differential mRNA expression of a and b estrogen receptor isoforms and GnRH in the left and right side of the preoptic and anterior hypothalamic area during the estrous cycle of the rat. *Endocrine* 21:251-260
4. Ashwell, J. D., Lu, F. W., & Vacchio, M. S. (2000). Glucocorticoids in T cell development and function. *Annual review of immunology*, 18, 309-345. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.309>
5. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF. (2006). "Positions statement: Criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: An androgen". *Excess Society guideline. J Clin Endocrinol Metab*. 91: 4237-4245.
6. Baljet B, Drukker J. (1980). The Extrinsic Innervation of the Pelvic Organs the Female Rat". *Acta Anat*. 107;241-267
7. Barañao I. R. (2009). *Hormonas sexuales y respuestas inmunológicas*. Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME-CONICET
8. Bao B, & Garverick, H. (1998). "Expression of steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review". *J. Anim. Sci*. 76(7):1903-21.
9. Berne RM, Levy MN. (2006). "Fisiología" 4a Edición. Editorial Elsevier, Science. Madrid. Pp:50-52.

10. Brawer JR, Naftolin F, Martin J, Sonnenschein C. (1978). Effects of a single injection of Estradiol Valerate on the Hypothalamic Arcuate Nucleus and on Reproductive Function in the Female Rat. *Endocrinology* 107: 274-279
11. Bremer M, Andrew A. (2010) "Polycystic ovary syndrome in the pediatric population" *Metabolic Syndrome and Related Disorders*. 8:5 375-394.
12. Burden HW. (1985). "The adrenergic innervation of mammalian ovaries," in *Catecholamines as Hormone Regulators* En: Ben-Jonathan N., Bahr, J. Weiner, R. (Ed.), Nueva York, Raven Press. Pp: 261-278.
13. Byskov A. (1974) "Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary" *J Reprod Fertil*. 37(2):277-285.
14. Carabatsos MJ, Sellito C, Goodenough DA, Albertini DF. (2002) "Oocyte granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence". *Developmental Biology*. 226:167-179.
15. Cardona F Elkin, Pacheco M, Giraldo L. (2003). *Anestesiología para médicos generales*. Medellín Colombia: Universidad de Antioquia.
16. Carson RS, Findlay JK, Burger HG, Trounson AO. (1979). "Gonadotropin receptors of the ovine ovarian follicle during follicular growth and atresia". *Biol Reprod*. 21:75-87.
17. Chang GE, Larrea F & Martínez F. (2012). "Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis". *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 15 (1):24-36.
18. Checa V, Espinos J, Matorras R. (2007). "Síndrome de ovario poliquístico". *Médica Panamericana*. Buenos Aires. Pp:12-20
19. Chedrese J. (2003). "Regulación autocrina y paracrina del desarrollo folicular I: Efectos de los esteroides". *Rev Col Cienc Pec*.16:171-18.
20. Cruz M.E., Chávez R., Domínguez R. (1986) Ovulación, follicular growth and ovarian reactivity to exogenous gonadotropins in adult rats with unilateral or bilateral section of the vagi nerve de *Investigación Clínica*. 38(2):167-171
21. Curry T, Dean DD, Woessner JF, and LeMaire WJ. (1985). "The extraction of a collagenase associated with ovulation in the rat". *Biol. Reprod*. 33: 981-991.

22. Díaz BN. (2004). "Bioquímica Básica de las hormonas Esteroideas; Biología y Clínica del Cáncer". Departamento de Bioquímica y Fisiología. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. *Biocáncer* 2: 1-22
23. Dissen G y Ojeda S. (1999). "Ovarian innervation". En: Knobil E, Neill J (Eds). *Encyclopedia of reproduction*. Academic press.USA. 3: 583-589.
24. Domínguez R, Chávez R, Cruz MA. (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: 161-190.
25. Domínguez R y Cruz-Morales S. (2011). "The ovarian innervation participates in the regulation of ovarian functions". *Endocrinology and Metabolic Syndrome* S4:001. Pp: 2-10. doi:10.4172/2161-1017.S4-001.
26. Domínguez R., Riboni L., (1971). Failure of ovulation in autografted ovary of hemispayed rat. *Neuroendocrinology*, 7(3): 164-170
27. Drela N. (2006). Xenobiotic-induced alterations in thymocyte development. *APMIS*, 114(6), 399-419. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2006.apm_343.x
28. Dumesic D, Lobo R. (2013). "Cancer risk and PCOS". *Steroids*. 78(8):782-5.
29. Dunaif A. (1997). "Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: Mechanism and implications for pathogenesis". *Endocr Rev*.18:774-80.
30. Espey L. (1999). Ovulation. En: Knobil E, Neill, J. Editores. *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press. Vol. 3. Pp 605-614
31. Espinoza JA (2010). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
32. Espinoza JA, Alvarado W, Venegas B, Dominguez R, Morales-Ledesma L. (2018). Pharmacological sympathetic denervation prevents the development of polycystic ovarian syndrome in rats injected with estradiol valerate. *Reprod Biol Endocrinol*. 16(1):86.
33. Eynard AR, Valentich A. y Rovasio A. (2008). "Histología y embriología del ser humano: Bases moleculares". Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. Pp:500-505, 519-528

34. Flores FL, Velasco C, Pardo MC, Pérez-Martínez M. (2005). "Apoptosis y atresia Folicular: Un binomio esencial en el desarrollo ovárico". *Veterinaria México*. 36:87-101.
35. Franks S, Mason H, White D, Willis D. (1996). "Mechanisms of anovulation in polycystic ovary syndrome". En: Filicori M, Flamigni C. (Eds.). *The ovary: Regulation, Dysfunction and Treatment*. Ed. Elsevier. Amsterdam.183-186.
36. Garther P, Hiatt L. (2007) "Texto Atlas de Histología". 3ª edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Pp: 218-225.
37. Gerendai I., Halasz B. (1978). Neural participation in ovarian control. *Trends in Neurosciences*, 1(4): 87-88
38. Goldfien A, Monroe SE. (2000). "Ovarios". En: Greenspan F S, Strewler G J. Editores. *Endocrinología Básica y Clínica*. 4ª edición. Ed. El Manual Moderno. Cap. 13. Pp:497-554.
39. Gómez-Chang, Erika, Larrea, Fernando, & Martínez-Montes, Federico. (2012). Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 15(1), 24-36.
40. Goodarzi M, Dumesic D, Chazenbalk G, Azziz R. (2011). "Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis". *Nat Rev Endocrinol*. 7(4):219-231.
41. Greenwald GS. (1989). "Temporal and topographic changes in ADN synthesis after induced follicular atresia". *Biol Reprod*. 41:175-18.
42. Greiner M, Paredes A, Araya V, Lara H. (2005). "Role of stress and sympathetic innervation in development of polycystic ovary syndrome". *Endocrine*. 28(3):319-324.
43. Grossman CJ, Roselle GA. The interrelationship of the HPG-thymic axis and immune system regulation. *J Steroid Biochem* 1983; 19(1B):461-467
44. Guyton AC, Hall JE. (2001). *Fisiología Femenina antes de la Gestación Hormonas Femeninas*. En: *Tratado de Fisiología Médica*. 10ª edición. Editorial McGraw-Hill interamericana. México. Cap. 81. Pp 1117-1133
45. 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. Philadelphia; E.U.A

46. Heider U, Pedal I, Spanel-Borowski K. (2001). "Increase in nerve fibers and loss of mast cells in polycystic and postmenopausal ovaries". *Fertil Steril.* 75(6):1141-7.
47. Hernández ER, Jiménez JL, Payne DW, Adashi EY. (1988). "Adrenergic regulation of ovarian androgen biosynthesis is mediated via β 2-adrenergic theca interstitial cell recognition sites". *Endocrinology.* 122:1592-1602.
48. Hirshfield AN. (1989). "Rescue of atretic follicles in vitro and in vivo". *Biol Reprod.* 40:181-190.
49. Hirshfield AN y Midgley AR. (1978). "Morphometric analysis of follicular development in the rat". *Biol Reprod.* 19:597-60.
50. Hollindrake E, Abreu A, Maifeld M, Van Voorhis B, Dokras A. (2007). "Increased risk of depressive disorders in women with polycystic ovary syndrome". *Fertil Steril.* 87(6):1369-76.
51. Inés Barañao, R. (2009). Hormonas sexuales y respuestas inmunológicas. *SAEGRE, Volumen XVI (No 2), Revista Bioreview*
52. Klein C y Burden H. (1988). "Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary". *Neuroscience Letters.* 85:217-222.
53. Lara HE, Dissen G, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler J. (2000). "An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low-affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat". *Endocrinology.* 141(3):1059-72.
54. Lara HE, Dorfman M, Venegas M, Luza SM, Luna SL, Mayerhofer A. (2002). "Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: studies on norepinephrine release". *Microsc. Res. Tech.* 59:495-502.
55. Lara H, Ferruz JI, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR. (1993). "Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome". *Endocrinology.* 133:2690-2695.
56. Linares R, Hernández D, Morán C, Chavira R, Cárdenas, Domínguez R, Morales-Ledesma L. (2013). "Unilateral or bilateral vagotomy induces ovulation in both ovaries of rats with polycystic ovarian syndrome". *Reprod Biol Endocrinol.* 11:68.

57. Linares R, Rosas G, Vieyra E, Ramírez DA, Guerrero YA, Morán C, Domínguez R, Morales-Ledesma L. (2017). "In rats with the polycystic ovary syndrome, the monoaminergic activity in the celiac superior mesenteric ganglion depends on the vagal innervation". *Australasian Medical Journal*. 10:304-31.
58. Lobo R, Carmina E. (2000). "The Importance of diagnosing the polycystic ovary syndrome". *Ann Inter Med*. 132(12):989-993.
59. Luna SL, Neuman S, Aguilera J, Brown DI, Lara HE. (2012). In vivo beta-adrenergic blockade by propranolol prevents isoproterenol-induced polycystic ovary in adult rats. *Horm Metab Res*. 44(9):676-81
60. Morales L, Chávez R & Domínguez R (1993). Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve. *Medical Science Research* 21 15-17.
61. Morales-Ledesma L, Linares R, Rosas G, Morán C, Chavira R, Cárdenas M, Domínguez R. (2010). "Unilateral sectioning of the superior ovarian nerve of rats with polycystic ovarian syndrome restores ovulation in the innervated ovary". *Reprod. Biol. Endocrinol*. 8:99.
62. Morán C. (2005). Tesis de Doctorado. UNAM, Universidad Veracruzana.
63. Morán V C. (2006). "Síndrome de ovario poliquístico". En: Lombardía PJ, Fernández P M. Editores. *Ginecología y reproducción humana. Especialistas en ginecología y obstetricia México* Art. 35:313-318.
64. Ochoa-Anaya, G., Aguirre-Ibarra, C. P., & Franco-Cabrera, M. (2017). Lidocaína: Aspectos generales y nuevas implicaciones en la inflamación. *Revista Mexicana de Anestesiología*, Vol. 40(NO.3), 220-225.
65. 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.
66. Ramírez HD. (2011) "¿La participación del nervio ovárico superior en la regulación de la ovulación y la esteroidogénesis depende del ciclo circádico?. La rata adulta como modelo de estudio". Tesis de maestría en Ciencias biológicas (Biología experimental). UNAM. FES Zaragoza.

67. Rodríguez Carranza Rodolfo. (2005). "Vademécum Académico de Medicamentos. Granada, España: McGraw-Hill/Interamericana.
68. Rosa-E-Silva A, Guimaraes M,A. Padmanabhan V y Lara H.E (2003) "Prepuberal Administration of Estradiol Valerate Disrupts Cyclicity and Leads to Cystic Ovarian Morphology During Adult Life in the Rat: Role of Sympathetic Innervation". *Endocrinology*. 144: 4289-4297.
69. Rosales-Torres AM, Avalos-Rodríguez A, Vergara-Onofre M, Hernández Pérez O, Ballesteros LM, García-Macedo R. (2000). "Multiparametric study of atresia in ewe antral follicles: Histology, flow cytometry, internucleosomal ADN fragmentation and lysosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid". *Molec Reprod Develop*. 55:270-28.
70. Rosenfield RL, Barnes RB, Cara JF, Lucky AW. Dysregulation of cytochrome P450c17 alpha as the cause of polycystic ovarian syndrome. *Fertil Steril*. 1990;53:785-791.
71. Ross M y Pawlina W. (2015). "Sistema genital femenino" En: Ross, M. Pawlina W. *Histología. Texto y Atlas: Correlación con biología molecular y celular*. 7° edición. Madrid. Editorial Médica Panamericana. Pp:898-912.
72. Salas M, Torrero C, Pulido S, Pérez H. (1991). "Acciones neurotrópicas de las hormonas tiroideas durante la ontogenia neural". En: *Ontogenia Neural, Aspectos corporativos y mecanismos de regulación*. Pp 177-198
73. Sánchez-Criado JE. (1999). "Fisiología del ovario". En: Tresguerres JA. Ed. *Fisiología Humana*. 2da. Edición. Ed. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid. Pp:1020-1032.
74. Sharma RK. (2000). "Follicular atresia in goat: A review". *Indian J Anim Sci*. 70:1035-1046.
75. Silverthorn DU, Ober WC, Garrison CW, Silverthorn AC & Johnson BR. (2008). "Fisiología humana: Un enfoque integrado". 4a. edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. Pp: 837-844
76. Smith CL. (1999), Estrogens, Overview. En: Knobil E, Neill JD (Eds). *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press. San Diego Vol. 2. Pp.119-126
77. Smith White S y Ojeda SR. (1981). "Changes in ovarian luteinizing (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) receptor content and in gonadotropin-induced ornithine

- decarboxylase activity during prepubertal and pubertal development of the rat". *Endocrinology*. 109:152-161.
78. 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.
79. Sotomayor-Zárate R, Tiszavari M, Cruz G, Lara HE (2011) Neonatal exposure to single doses of estradiol or testosterone programs ovarian follicular development modified hypothalamic neurotransmitters and causes polycystic ovary during adulthood in the rat. *Fertil Steril*, 96(6): 1490-1496
80. Thapa P, Farber DL (2019). The Role of the Thymus in the Immune Response. *Thorac Surg Clin*. May;29(2):123-131. doi: 10.1016/j.thorsurg.2018.12.001. Epub 2019 Mar 7.
81. Tilly JL, Kowalski KI, Schomberg DW, Hsueh AJW. (1992). "Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase". *Endocrinology*. 131:1670-1676.
82. Tóth I. E, Wiesel O, Boldogkoi Z, Bálint K, Tapaszi Z y Gerendai I. (2007). "Predominance of supaspinal innervation of the left ovary". *Microscopy Research Technique* 70: 710-718
83. Treguerres JA. (2003) "Fisiología humana". 2ª edición. Ed. McGraw-Hill. Pp. 1036-1048.
84. Treguerres JA y Castillo C. (2005). "Fisiología del Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario" En: Treguerres JA (Eds). *Fisiología Humana* 3ra edición. Editorial McGraw-Hill. Madrid. España Cap. 79. Pp. 107-118.
85. Valencia I. (2002). "Reproducción Humana e Infertilidad". Centro Médico de Infertilidad y esterilidad. Impresora Boutique Creativa.
86. Venegas B, De León Y, Rosas G, Espinoza A, Morán C, Domínguez R & Morales-Ledesma L. (2019). "In rats with estradiol valerate-induced polycystic ovary syndrome,

- the acute blockade of ovarian β -adrenoreceptors improve ovulation". *Reproductive Biology and Endocrinology*. 17(95):1-10.
87. Yanagihara N, Toyohira Y, Ueno S, Tsutsui M, Utsunomiya K, Liu M, Tanaka K (2005). Stimulation of catecholamine synthesis by environmental estrogenic pollutants. *Endocrinology*; 146:265–272.
88. Yen SSC. (2001).” Síndrome del ovario poliquístico: Anovulación crónica Hiperandrogénica”. En: Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RL, editores. *Endocrinología de la reproducción fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. 4ta. Edición. Ed. Médica panamericana. Pp. 465-510.
89. Wartenberg H. (1982). Development of the early human ovary and role of the mesonephros in the differentiation of the cortex. *Anat, Embryol. (Berli,)*, 253-280
90. Willoughby KN, Sarkar AJ, Boyadjieva NI, Sarkar DK (2005). Neonatally administered tert-octylphenol affects onset of puberty and reproductive development in female rats. *Endocrine*; 26:161–168.