



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

***CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA A NIVEL
TRANSCRIPCIONAL DE OVARIOS DE RATAS LONG EVANS EN
RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE VALERATO DE ESTRADIOL***

TESIS PARA OBTENER EL GRADO
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
BIOL. JOSÉ RICARDO MONTERROSAS SANTAMARÍA

DIRECTORAS DE TESIS

D. EN C. LORENA MILFLORES FLORES

D. EN C. BERENICE VENEGAS MENESES

DICIEMBRE 2020



El problema del físico es el problema de los orígenes y leyes naturales últimas. El problema del biólogo es el problema de la complejidad

Richard Dawkins

Agradecimientos institucionales

Agradezco al gobierno de México mediante CONACYT por el apoyo económico brindado para la realización de este proyecto. Número de becario: 922890

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

A la maestría en Ciencias Biológicas de la BUAP. (PNPC 005671)

Al laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP y al Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción del ICUAP, por las facilidades para realizar esta tesis.

A las doctoras Lorena Milflores Flores y Berenice Venegas Meneses quienes me brindaron todo su apoyo, confianza, solidaridad y dedicación para la culminación de este proyecto de forma exitosa.

A la Dra. Angelica Trujillo Hernández, Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta y Dra. Rosalina Reyes Luna por su tiempo y dedicación para revisar este trabajo y por sus valiosas aportaciones.

Al bioterio Claude Bernard de la BUAP, al M.V.Z. Francisco Ramos Collazo, y a la M.V.Z.

Al instituto de Fisiología Celular de la UNAM, y al Dr. Jorge Ramírez Salcedo para llevar a cabo el desarrollo de los microarreglos de expresión.

Resumen

El síndrome de ovario poliquístico es una enfermedad multifactorial que afecta entre el 5 y 10% de las mujeres en edad reproductiva, y es una de las principales causas de infertilidad femenina, por lo que es considerado un problema de salud pública.

El presente estudio evaluó los cambios de la expresión genética ovárica de ratas de la cepa Long Evans tratadas con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) en dos etapas reproductivas: etapa puberal a los cuarenta días de edad (Vh40 o VE40), y etapa adulta a los setenta días de edad (Vh70 o VE70).

Se evaluaron los parámetros de la función ovárica de los grupos experimentales. Los resultados muestran que el VE induce un adelanto en el inicio de la pubertad (14 ± 0.0 días) de los animales. En la etapa puberal el 66.6% de los animales presentan ovulación con una disminución del 8.5% en el número de ovocitos con respecto al grupo Vh, mientras que en la etapa adulta ninguno de los animales presenta ovulación. El peso de los ovarios fue menor, sin cambios en el peso de las glándulas adrenales de los animales tratados con VE en ambas etapas reproductivas. La evaluación de las hormonas esteroideas en suero de ratas tratadas con VE mostró un incremento en la concentración de estradiol, progesterona y testosterona, en ambas etapas reproductivas evaluadas.

En la etapa puberal, el análisis de la expresión de genes ováricos muestra 259 genes alterados, de los cuales 112 genes se encuentran desregulados a la baja y 147 genes se encuentran desregulados al alza. Los genes alterados participan en distintas vías de señalización en el ovario como la esteroidogénesis ovárica, la señalización de estradiol y la meiosis de los ovocitos.

En la etapa adulta, el análisis de la expresión de genes ováricos muestra 271 genes alterados, de los cuales 62 genes se encuentran desregulados a la baja y 209 al alza. Entre las vías de señalización ovárica en donde participan los genes alterados se encuentran aquellas relacionadas con la señalización del estradiol, la esteroidogénesis ovárica, la vía de señalización de la prolactina, las neurotrofinas y la progesterona.

Al realizar el enriquecimiento de los 259 y 271 genes alterados de cada etapa reproductiva se mostró que el gen *Gna 11* se encuentra alterado a la alza en ambas etapas reproductivas, el cual es responsable de la expresión de la subunidad alfa de las proteínas G, mientras que en la etapa puberal el gen *Pik3r2* se encuentra alterado a la alza y participa en la fosforilación del fosfatidilinositol; en la etapa adulta el gen *HSD17B12* se encuentra alterado a la alza el cual codifica para la enzima 17b-hidroxiesteroide deshidrogenasa que convierte la estrona a estradiol en el tejido ovárico, por lo que se sugiere que estos genes pudieran participar en el desarrollo del síndrome de ovario poliquístico.

El análisis de promotores de los genes *HSD17B12*, *Gna 11* y *Pik3r2*, indicó los sitios de unión para los receptores a hormonas esteroides, principalmente para el estradiol (receptores α y β) y para factores de transcripción que pueden actuar de forma indirecta en la regulación del gen, como lo son la proteína específica 1 (SP1), Yin Yang 1 (YY1), receptor a ácido retinoico α (RAR α), receptor para vitamina D (VDR), entre otros.

En conclusión, los ovarios tratados con VE en la etapa infantil presentan 19 genes alterados en la etapa puberal y 19 genes alterados en la etapa adulta, los cuales participan en vías metabólicas relacionadas con la esteroidogénesis ovárica, la síntesis de estradiol, la meiosis ovárica y la señalización de las neurotrofinas. En el presente estudio, el gen *Gna11* se encuentra sobreexpresado en ambas etapas reproductivas, lo cual pudiera sugerir el análisis de las vías de señalización en donde participen los receptores acoplados a proteínas G en ovarios de ratas tratadas con VE, como modelo de SOP.

Contenido

Agradecimientos institucionales	3
Resumen	4
Índice de figuras	7
Listado de tablas	9
Índice de abreviaturas	9
Introducción: El Síndrome de Ovario Poliquístico	12
Signos y síntomas del SOP	13
Criterios de diagnóstico	14
Prevalencia y etnicidad del SOP	15
Limitantes en el estudio del Síndrome de Ovario Poliquístico en humanos	16
El valorato de estradiol como modelo de inducción del Síndrome de Ovario Poliquístico en rata	19
Teorías del origen del SOP	22
Teoría genética	23
Regulación transcripcional de genes mediado por hormonas esteroides	25
Alteraciones a nivel hormonal	27
Teoría nerviosa del SOP	28
Teoría metabólica	32
Planteamiento del problema	35
Pregunta de investigación	35
Hipótesis	36
Objetivo general	36
Objetivos particulares	36
Material y métodos	37
Descripción del modelo de estudio	37
Manejo y cuidado del modelo de estudio	37
Inducción del SOP	38
Seguimiento de la AV y el ciclo estral por citología vaginal	39
Sacrificio de los animales	42
Cuantificación de hormonas esteroides	43
Extracción de RNA total	44
Microarreglo	44
Análisis de los genes	48
Análisis de promotores de genes alterados	49

Análisis estadístico	50
Resultados	51
Efecto del valerato de estradiol en el inicio de la pubertad.....	51
Efecto de la inducción del SOP con VE sobre el peso corporal de los animales en la etapa puberal y adulta.	52
Efecto temprano y tardío de la inducción del SOP con VE sobre la tasa de animales ovulantes y el número de ovocitos.	54
La inducción del SOP con VE en la etapa infantil disminuye el peso de los ovarios en la etapa puberal y adulta.	55
La inducción del SOP con VE en la etapa infantil no afecta el peso de las glándulas adrenales de las ratas en la etapa puberal y adulta.	56
Efecto del VE sobre la concentración de las hormonas progesterona, testosterona y estradiol en la etapa puberal y adulta.	57
Análisis de la expresión transcripcional de genes ováricos en el modelo de VE.....	59
Vías metabólicas o cascadas de señalización en las que participan los genes alterados de la etapa puberal (etapa temprana del SOP) relacionadas con la función ovárica.....	64
Vías metabólicas o cascadas de señalización en las que participan los genes alterados de la etapa adulta (etapa tardía del SOP) relacionadas con la función ovárica.....	70
Genes alterados en el modelo de SOP con VE en ambas etapas reproductivas.	81
Análisis de promotores de los genes alterados en el modelo de SOP con VE de ambas etapas reproductivas.....	84
<i>17BHSD12</i>	84
<i>Gna 11</i>	85
<i>Pik3r2</i>.....	86
Discusión	87
Conclusiones	99
Bibliografía.....	100

Índice de figuras

Figura 1: Estructura del Valerato de Estradiol.....	19
Figura 3: Niveles hormonales y cambios morfológicos en el ovario	40
Figura 4. Pasos para realizar el microarreglo.....	45
Figura 5. Ecuación para obtener el <i>z score</i>	46
Figura 6. Distribución de los valores del <i>z score</i>	47
Figura 7: Seguimiento del ciclo estral por grupo experimental	52

Figura 8. Peso corporal al momento del sacrificio de las ratas inducidas con SOP.....	53
Figura 9. Número de ovocitos liberados de ratas con SOP.....	54
Figura 10. Peso relativo de los ovarios de ratas con inducción de SOP.....	55
Figura 11. Peso relativo de las glándulas adrenales en ratas con inducción de SOP.	56
Figura 12: Concentración de hormonas esteroides en ratas con inducción de SOP	58
Figura 13. Distribución de spots por microarreglo.....	59
Figura 14. Frecuencia del número de genes por rango de z score (-2 hasta +2.....)	61
Figura 15. Genes alterados en el ovario de ratas tratadas con VE (40 días posnatal) que participan en la vía de síntesis del estradiol.....	66
Figura 16. Genes alterados en el ovario de ratas tratadas con VE (40 días posnatal) relacionadas con la acción del estradiol	67
Figura 17. Genes alterados en el ovario de ratas tratadas con VE (40 días posnatal) que participan en la vía de la liberación de GnRH..	68
Figura 18. Genes alterados en el ovario de ratas tratadas con VE (40 días posnatal) que participan en la vía de la meiosis de los ovocitos.....	68
Figura 19. Genes alterados en el ovario de ratas tratadas con VE (40 días posnatal) que participan en la vía ligada a la sinapsis de dopamina.....	69
Figura 20. Genes alterados de ovario de ratas tratadas con VE (40 días posnatal) que participan en la vía de la sinapsis de serotonina	69
Figura 21. Genes alterados en el ovario de ratas tratadas con VE (70 días posnatal) que participan en la vía de la esteroidogénesis..	74
Figura 22. Genes alterados en el ovario de ratas tratadas con VE (70 días posnatal) que participan en la vía de señalización del estradiol..	75
Figura 23. Genes alterados en el ovario de ratas tratadas con VE (70 días posnatal) que participan en la vía de la prolactina.....	76
Figura 24. Genes alterados en el ovario de ratas tratadas con VE (70 días posnatal) que participan en la vía de las neurotrofinas.....	77
Figura 25. Genes alterados en el ovario de ratas tratadas con VE (70 días posnatal) que participan en la maduración del ovocito..	78
Figura 26. Genes alterados en el ovario de ratas tratadas con VE (70 días posnatal) que participan en la vía de liberación de GnRH..	79
Figura 27. Genes alterados en el ovario de ratas tratadas con VE (70 días posnatal) la sinapsis dopaminérgica.	80

Figura 28. Regulación de genes por medio de las hormonas estradiol, progesterona y testosterona.....	84
Figura 29. Representación esquemática del promotor del gen 17BHS12.....	85
Figura 30. Representación esquemática del promotor del gen <i>Gna 11</i>	85
Figura 31. Representación esquemática del promotor del gen <i>Pik3r2</i>	86

Listado de tablas

Tabla 1: Efecto de los fármacos para la inducción de SOP en roedores.	18
Tabla 2. Grupos experimentales y tratamientos.....	38
Tabla 3. Inicio de la pubertad en los animales tratados con Vh y VE	51
Tabla 4. Número de genes agrupados por rango dentro de la escala del z score en ambos microarreglos.....	60
Tabla 5. Número de genes alterados en ratas con inducción de SOP con VE en cada etapa reproductiva.....	62
Tabla 6. Genes alterados en el tejido ovárico con inducción de SOP	63
Tabla 7. Genes alterados que participan en las vías metabólicas que regulan las funciones ováricas en la etapa puberal	65
Tabla 8. Genes alterados que participan en las vías metabólicas que regulan las funciones ováricas en la etapa adulta.	71
Tabla 9. Niveles de expresión de algunos genes posiblemente involucrados en la patogénesis del SOP.....	81

Índice de abreviaturas

Apertura Vaginal (AV)

Carné de identidad (ID)

Caspasa 9 (*CASP*)

Células Primordiales Germinales (PPG)

Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI)

Citocromo 11A (*P450scc*)

Dehidroepiandrosterona (DHEA)

Dehidroepiandrosterona (DHEA)

Endonucleasa de reparación de ADN 1 (XPF-1)

Estudios de Asociación del Genoma (GWAS).

Eukaryotic Promoter Database (EPD)

Factor de Crecimiento Neural (NGF)

Factor de Transcripción Ascendente 1 (USF1)

Fosfoinositol 3-quinasa (PI3K)

Globulina Fijadora de Hormonas Sexuales (SHBG)

Hidroxi-delta-5-esteroide deshidrogenasa (gen *HSD3B*)

Hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (*HSDL2*)

Hipotálamo-Adenohipófisis-Ovario (HAO)

Hormona Antimulleriana (AMH)

Hormona Folículo Estimulante (FSH)

Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH)

Hormona Luteinizante (LH)

índice de Masa Corporal (IMC)

NEIL2 (glicosilasa tipo Nei asociada a DNA)

Nervio del Plexo Ovárico (NPO)

Nervio Ovárico Superior (NOS)

Nervio Vago (NV)

Neurofibromina 1 (NF1)

Neuropéptido Y (NPY)

Péptido Vaso Intestinal (VIP)

Proteína Aguda Reguladora Esteroidogénica (*StAR*)

Proteína Cinasa Activada por Mitógenos (*MAPK*)

proteína específica 1 (SP1)

Proteína Morfogénica de Hueso (*BMP*)

Rat Genome Database [base de datos del genoma de rata] (RGD)

Receptor a Ácido Retinoico α (RAR α)

Receptor a estradiol alfa (*Era*)

Receptor a estradiol beta (*ERB*)

Receptor a insulina (INSR)

Receptor a la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (*GnRH-R*)

Receptor para vitamina D (VDR)

Serina Treonina Quinasa (AKT)

Sprague Dawley (SD)

Sustrato del Receptor a Insulina (IRS)

Tasa de Animales Ovulantes (TAO)

Valerato de Estradiol (VE)

Variabilidad de la frecuencia cardíaca (HRV)

Vehículo (Vh)

Yin Yang 1 (YY1)

Introducción: El Síndrome de Ovario Poliquístico

El Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) es una enfermedad multifactorial que afecta entre el 5-10% de las mujeres en edad reproductiva a nivel mundial, según los criterios de diagnóstico aplicados (Barber *et al.*, 2006). En México, se estima que entre el 6% y 10% de las mujeres en edad reproductiva padecen este síndrome, es considerado un problema de salud pública, y representa uno de los principales factores de la infertilidad femenina que no forma parte de los programas de la Secretaría de Salud Federal (Honorable Cámara de Diputados LXIV Legislatura, 2017).

El SOP fue descrito en 1935 por Stein y Leventhal como el síndrome de oligomenorrea; actualmente su estudio ha ido en aumento debido a la complejidad de su diagnóstico y a su relación con diversas manifestaciones clínicas asociadas con múltiples enfermedades (Azziz y Adashi, 2016, Lizneva *et al.*, 2016).

De acuerdo con los protocolos de Rotterdam, la sintomatología del SOP incluye hiperandrogenismo, hirsutismo, anovulación crónica, resistencia a la insulina, formación de quistes en el ovario y sobrepeso (Li *et al.*, 2017; Noroozadeh *et al.* 2017). Aunado a los signos ya descritos, algunas pacientes con SOP puede presentar amenorrea y oligomenorrea; sin embargo, se ha mostrado que a nivel mundial más del 70% de las mujeres que presentan esta sintomatología, no son diagnosticadas correctamente ya que depende de los criterios médicos aplicados (Abinaya *et al.*, 2019).

Entre los signos bioquímicos asociados a un cuadro clínico de SOP, se ha observado, un aumento en los niveles de testosterona libre y de la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), sin embargo, esto se ha asociado a la etnicidad y al índice de masa corporal de cada mujer (Farrell y Antoni, 2010).

El SOP es un reto para la salud pública ya que puede presentarse desde la adolescencia, hasta el final de la vida fértil, en el caso de las mujeres de distintas edades, se presentan fenotipos confundibles con otras enfermedades, especialmente es difícil diagnosticarlo en la adolescencia (Peña, *et al.*, 2020). Además, el SOP tiene una alta carga hereditaria, puesto que más del 70% de mujeres que son hijas de pacientes con SOP, desarrollan la enfermedad en algún momento de su vida fértil (Crisosto, *et al.*, 2019).

El tratamiento del SOP es variado debido a la múltiple variedad de fenotipos y cuadros clínicos presentados, por lo que se han buscado diferentes alternativas para intentar revertir los efectos de este y entender la fisiopatología del SOP (Hajishafiha *et al.*, 2013).

Signos y síntomas del SOP

El hiperandrogenismo es uno de los signos presentes del SOP, está definido como un exceso en los niveles de andrógenos como lo son la testosterona (T), androstenediona y dehidroepiandrosterona (DHEA) en el suero sanguíneo, lo cual contribuye al desarrollo del hirsutismo (Amiri *et al.*, 2019). El hirsutismo es definido como la aparición de vello púbico, axilar y facial en exceso, es característico en mujeres con SOP (aproximadamente 70% de los casos), se encuentra relacionado con el aumento en la síntesis de andrógenos a nivel gonadal (Condorelli *et al.*, 2017).

Los quistes ováricos surgen de folículos que no se desarrollan y forman estructuras duras en la túnica albugínea, con niveles abundantes de colágeno, lo cual les confiere una estructura fibrosa y más dura que el resto del tejido ovárico circundante (Rodgers *et al.*, 2019).

La anovulación es definida como la ausencia de ovocitos liberados por parte del ovario, consiste en el arresto de los folículos de un tamaño aproximado de 2-8mm de diámetro, lo cual evita su desarrollo y posterior liberación. En mujeres diagnosticadas con SOP la anovulación suele estar acompañada de niveles

elevados de hormona luteinizante (LH) y de andrógenos en sangre (Franks Mason, White y Willis, 1998; Franks, Stark y Hardy, 2008).

Criterios de diagnóstico

En 1990 el Instituto de Salud Nacional de los EE. UU (NHI por sus siglas en inglés) presentó su pauta de diagnóstico basado en tres criterios en orden de importancia y uno de los primeros fue la presencia del hiperandrogenismo o hiperandrogenemia, el segundo la oligo-ovulación o anovulación y el tercero la exclusión de enfermedades con sintomatología parecida, debido a la similitud con enfermedades como el síndrome de Cushing, la insuficiencia ovárica temprana, la enfermedad tiroidea o la formación de pólipos ováricos (Kudesia, y Copperman, 2020); dentro de los criterios del NHI existe un cuarto punto que hasta ese entonces resultaba controversial: la presencia de quistes en el ovario (Azziz, 2006, Goodarzi *et al.*,2011).

El protocolo de Rotterdam (Países Bajos, 2003) se dio tras la reunión de la Sociedad Europea para la Reproducción Humana y Embriología y la Sociedad Americana para la Medicina Reproductiva, donde se acordó modificar el criterio de NHI, agregando para el diagnóstico la presencia de anovulación crónica y la presencia de quistes en el ovario, así como descartar otras enfermedades con la finalidad de tener un diagnóstico más completo (The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2004).

La calidad del diagnóstico dependió de diversos factores que pudieron ayudar a dar un resultado concluyente, sin embargo, aún existen discrepancias debido a la presencia de varios fenotipos y cuadros clínicos dentro del SOP (Azziz, 2006). Así mismo, con los avances en el campo de la imagenología y de las técnicas moleculares se desarrollaron nuevos criterios más inclusivos para el diagnóstico del SOP (Franks, 2006).

En el 2006 la sociedad de exceso de andrógenos (AES) propuso los siguientes criterios para el diagnóstico del SOP, la presencia de hirsutismo e hiperandrogenismo, la oligo-ovulación acompañada de ovarios poliquísticos y la exclusión de desórdenes similares provocados por alteraciones en los niveles de andrógenos (Azziz *et al.*, 2009).

La aplicación de alguno de estos criterios en el diagnóstico, entre las diferentes países y regiones dio como resultado que las estadísticas fueran dispares en el número de incidencias, ya que presentaban distintos porcentajes que oscilan entre el 2% y el 26% de mujeres diagnosticadas con SOP (Trivax y Azziz, 2007).

Prevalencia y etnicidad del SOP

Existe una relación entre la etnicidad y la prevalencia del SOP que varía de acuerdo con el grupo racial al cual pertenezcan las mujeres con este síndrome, el cual varía entre el 5% y 15% respecto grupos; sin embargo, el mecanismo es complejo y no ha sido completamente estudiado, ya que entre grupos poblacionales existen múltiples factores que pueden causar esta variación como nivel socioeconómico, alimentación, educación y calidad de vida (Bozdogan *et al.*, 2016).

En la ciudad de Isfahán, en la República Islámica de Irán, se realizó el diagnóstico clínico de SOP en un grupo de mujeres cuyas edades oscilaban entre los 25 y 51 años, con cuadros clínicos que incluían: hirsutismo, anovulación e hiperandrogenismo. Para realizar el diagnóstico de SOP se utilizaron los tres criterios vigentes, y obtuvieron que si se utilizaba el criterio del NHI el 7% de las mujeres eran diagnosticadas con SOP, mientras que el 15.2% cumplían con el criterio de Rotterdam y el 7.2% con el criterio de la AES (Mehrabian *et al.*, 2011).

En mujeres de la población de Han en China, el criterio de diagnóstico de Rotterdam encontró que las mujeres presentaban un mayor índice de masa corporal (IMC), y que eran las mujeres obesas las que exhibían una mayor resistencia a la insulina respecto a las de peso normal diagnosticadas con SOP, con lo que concluyeron que

el 56.3% del fenotipo de SOP presentan obesidad y resistencia a la insulina al compararlas con mujeres de otras etnias (Li *et al.*, 2018).

Existe una tasa de prevalencia del SOP del 12% en mujeres universitarias malayas que presentan diversos fenotipos de la enfermedad, y en ellas fue poco común la presencia de oligomenorrea y anovulación. Estos resultados son similares a los porcentajes de mujeres asiáticas diagnosticadas con SOP en India, China y Sri Lanka (Dashti, *et al.*, 2019).

En las naciones occidentales, al tomar en cuenta los criterios de diagnóstico (NIH y Rotterdam) se ha encontrado una prevalencia del SOP menor al 10%, en Grecia del 6.8%, en Inglaterra del 8% y en España del 5%; en contraste las mujeres latinas y del caribe presentan tasas de prevalencia más altas respecto a poblaciones afroamericanas y caucásicas (Huddlestone *et al.*, 2010).

Por otro lado, se ha reportado una mayor prevalencia de SOP en mujeres mexicano-americanas entre 25 y 26 años (12.8%) respecto a mujeres caucásicas de Estados Unidos de América (6.6%) de la misma edad, aunado a ello se encontró una mayor prevalencia de resistencia a la insulina en las mujeres mexicanas, que, en mujeres blancas (Kauffman *et al.*, 2002).

En la población mexicana se ha encontrado una prevalencia del 6% del SOP en mujeres de entre 20 y 45 años, de acuerdo con los criterios de diagnóstico del NIH y de Rotterdam, con presencia de anovulación y la presencia de quistes ováricos en todas las pacientes, lo cual es consistente con las tasas de SOP en países del hemisferio norte; sin embargo, no concuerda lo reportado para mujeres mexicano-americanas (Moran *et al.*, 2010).

Limitantes en el estudio del Síndrome de Ovario Poliquístico en humanos

El SOP, es una enfermedad compleja, que ha sido abordada desde distintas teorías para explicar su etiología (Azziz, 2004). Estas teorías han sido desarrolladas y evaluadas en modelos animales experimentales mediante el uso de distintos

fármacos que permiten desarrollar las características del SOP (Shi y Vine, 2012, McNeil y Colin-Duncan, 2013).

El uso de animales para estudiar el SOP, se debe a que muchos mamíferos presentan patrones evolutivos conservados que permiten desarrollar modelos similares, en los cuales se permiten realizar estudios que no serían éticos en seres humanos y una aproximación más precisa a la patofisiología del síndrome (Stener-Victorin, *et al.*, 2020).

Se han desarrollado diferentes estrategias para estudiar algunas características del SOP, entre las cuales se encuentra la administración de andrógenos, estrógenos, anti-progestinas y la manipulación genética (Walters, Bertoldo, y Handelsman, 2020) en diferentes especies. Una de las herramientas más utilizadas para investigar el SOP en modelos experimentales, es la inducción del síndrome mediante la exposición prolongada a andrógenos, lo cual genera un desorden ovulatorio, y un crecimiento anormal de los folículos en la mayoría de los casos, provocando un fenotipo similar al de la enfermedad (Franks 2012).

Entre los modelos animales que se han utilizado para investigar el SOP se encuentra el primate *Macaca mulatta*, en el cual, se ha analizado el papel del hiperandrogenismo en el desarrollo del síndrome, con la finalidad de entender este signo en mujeres; sin embargo, existen limitantes en el uso de *M. mulatta* debido a su ciclo de vida relativamente largo (Abbott, Tarantal y Dumesic, 2009). Aunado al uso de primates para establecer un modelo de estudio del SOP, se han desarrollado paralelamente otros modelos con ovejas, que comparten la ventaja de ser animales monovulantes, pero su desventaja es su ciclo de vida, por lo que se han utilizado otros modelos alternativos (Franks, 2015).

Hasta la fecha, el modelo animal más utilizado para estudiar el SOP es el roedor (orden: Rodentia), que incluye a ratas y ratones de diferentes cepas, ya que son animales fáciles de manejar, dóciles y de rápido crecimiento, lo cual favorece el estudio del síndrome en periodos cortos de tiempo (McNeilly y Colin-Duncan, 2013).

Existen diferencias entre las ratas y los humanos, ya que los primeros presentan ciclos estrales y las mujeres el ciclo menstrual. Además, las ratas son poliovulantes puesto que liberan aproximadamente diez ovocitos cada cuatro o cinco días, mientras que las mujeres tienen un ovocito fértil aproximadamente cada veintiocho días; sin embargo, las ratas presentan la ventaja de que al desarrollar SOP logran mostrar casi todos los signos característicos de este síndrome (Franks, 2012, McNeilly y Colin-Duncan, 2013).

A pesar de las múltiples técnicas para desarrollar el SOP en modelos experimentales, no existe un modelo ideal para la inducción del SOP, por lo tanto la elección de un modelo dependerá en gran medida del aspecto que se desee estudiar, ya sea molecular, metabólico, fisiológico o epigenético (Maliqueo, Benrick y Stener-Victorin, 2014). En la tabla 1 se muestran los efectos de fármacos utilizados para la inducción del SOP en roedores en comparación con los signos presentes en mujeres con SOP.

Tabla 1: Efecto de los fármacos para la inducción de SOP en roedores. Modificado de Maliqueo, Benrick y Stener-Victorin, 2014.

	<i>H. sapiens</i>	Roedores (rodentia)		
Fenotipo humano y modelo experimental	SOP	VE	Letrozol	DHEA
Ciclos irregulares	Amenorrea y aciclicidad	Presencia de aciclicidad	Presencia de aciclicidad	Presencia de aciclicidad
Aumento de peso (g)	Aumento	Ausente	Aumento	Aumento
Atresia folicular (núm. de folículos)	Aumento	Aumento	Aumento	Aumento

Niveles de testosterona	Aumento	Aumento	Aumento	Aumento
Niveles de estradiol	Aumento	Aumento	Aumento	Disminución
Resistencia a la insulina	Aumento	Ausente	Aumento	Aumento
Estro permanente	-----	Presente	Ausente	Ausente

El valerato de estradiol como modelo de inducción del Síndrome de Ovario Poliquístico en rata

El valerato de estradiol (VE) (figura 1) es un éster sintético derivado del estradiol cuyo peso molecular es de 356.506 g/mol, es ocupado para el tratamiento de enfermedades asociadas a desórdenes hormonales (Noorafshan *et al.*, 2013). Tiene la capacidad de ser agonista del estradiol (E2), unirse a los receptores de estrógenos (ER α y ER β) y utilizar este mecanismo para la activación de cascadas de señalización relacionadas con el E2 (Canadian Institutes of Health Research, 2018).

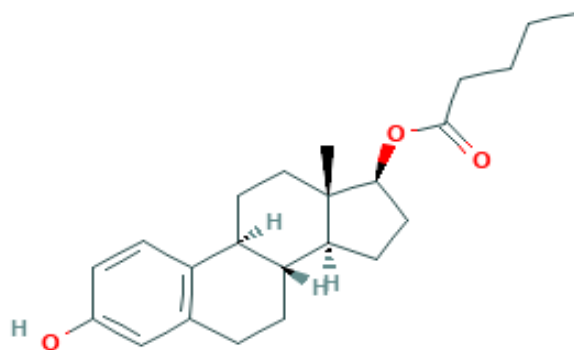


Figura 1: Estructura del Valerato de Estradiol, tomado de Canadian Institutes of Health Research, 2018.

Una de las ventajas del VE es que una sola administración del fármaco es suficiente para inducir el SOP en diferentes modelos animales, a diferencia de otros herramientas farmacológicas que requiere de un tratamiento crónico (Noorafshan, *et al.*, 2013). En un experimento se comprobó que una sola dosis de 2 mg de VE vía subcutánea es suficiente para inducir la condición de SOP en ratas juveniles después de ocho semanas a partir desde su administración (Brawer *et al.*, 1978).

Además, se ha demostrado que, en ratas hembra, el VE induce cambios a nivel hipotalámico, genera anovulación, disrupción en el ciclo estral y una cornificación vaginal persistente después de ocho semanas de su administración; aunado a ello los ovarios son pequeños, con presencia de quistes ováricos y folículos secundarios con una disminución en el número de capas de células de la granulosa; y ausencia de cuerpos lúteos (Brawer *et al.*, 1978).

Se ha demostrado que el VE provoca un aumento en el tono simpático de las fibras que inervan al ovario de ratas adultas, esto sucede después de un mes de su administración lo cual puede correlacionarse a un aumento en la actividad secretora de hormonas esteroideas, lo cual conlleva cambios a nivel hipotalámico (Luza, *et al.*, 1995). Estos cambios en el tono simpático se ven reflejados al aumentar la cantidad de neuronas noradrenérgicas presentes en el ovario, y al incrementar la actividad de la tirosina hidroxilasa, el incremento de la síntesis de NGF y la disminución de los receptores β 2-adrenérgicos (Manni, *et al.*, 2005).

En ratas SD tratadas con VE se observó la activación de neuronas catecolaminérgicas que inervan al ovario previo al desarrollo de quistes foliculares, lo cual contribuye al desarrollo del SOP (Lara, *et al.*, 1993).

El desarrollo de SOP con VE en ratas de la cepa Wistar-Kyoto mostró que después de siete semanas de su administración se produce hipertensión y un aumento en el tono simpático, aunado al incremento en el nivel de corticosteroides en sangre (Stener-Victorin, Ploj, Larsson y Holmång, 2005).

En ratas de la cepa Wistar se observa una disminución de la expresión del ARNm de *CYP19* implicado en la síntesis de hormonas esteroideas, pero no tiene efecto sobre la expresión del ARNm de proteína reguladora aguda esteroideogénica (*StAR*), involucrado en la translocación del colesterol hacia la membrana de la mitocondria (Aghaie *et al.*, 2018).

El estudio de Cruz-Neculpan (2011), menciona que la administración del VE debe de ser en los primeros días de nacimiento de la rata, debido a que los efectos serán permanentes y el modelo de SOP será inducido de forma correcta, sin embargo, si las ratas son inyectadas en días posteriores al día catorce postnatal los efectos del VE aminorarán, debido a que existe una ventana de recuperación donde los efectos del VE son transitorios y por tanto se restablecerá el ciclo estral y no se provocará la inducción con SOP ya que los niveles de andrógenos regresarán a condiciones normales (Cruz *et al.*, 2012). En la figura 2 se observa la lista de los efectos del VE en ratas.

Anovulación
Aumento del tono simpático
Disrupción del ciclo estral
Cornificación del epitelio vaginal
Folículos atrésicos
Quistes ováricos
Hiperandrogenismo



Figura 2: Efectos del valerato de estradiol, sobre *R. norvegicus* (Brawer *et al.*, 1978, Luza, *et al.*, 1995, Manni, *et al.*, 2005, Cruz, *et al.*, 2012)

Por lo anterior, el estudio con VE permite evaluar los aspectos nerviosos, inflamatorios, hormonales y genéticos (Dăneasă *et al.*, 2016) y tiene la ventaja de eliminar los aspectos metabólicos y metabolómicos como el aumento de peso y la resistencia a la insulina que pudieran interferir en la expresión de otros genes

involucrados en este síndrome, lo cual lo hace el modelo ideal para estudiar los aspectos moleculares (Dăneasă *et al.*, 2016).

Teorías del origen del SOP

El SOP es una enfermedad multifactorial cuyo origen es desconocido, aunado a ello se encuentra asociada a múltiples enfermedades cardiovasculares como la obesidad, y la diabetes mellitus tipo II. Por tanto, se han propuesto diferentes teorías sobre su origen, donde se ha tratado de relacionar el exceso de andrógenos y su relación con los factores genéticos, nerviosos, inmunes o una combinación de todos estos, ya sea en humanos o en modelos animales (Jahanfar y Eden, 1996).

Por tanto, algunas de las teorías que se han desarrollado son las siguientes:

- 1) **Teoría genética** en la cual se menciona que la expresión de genes es preponderante para el desarrollo del SOP y además de un componente hereditable, en conjunción a los factores epigenéticos, metabólicos y hormonales (De Leo *et al.*, 2016).
- 2) **Teoría hormonal:** Se propone que el incremento en los niveles de las hormonas LH y hormona folículo estimulante (FSH) es debido a un aumento en la actividad de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), lo cual conlleva a una mayor secreción de LH contribuyendo a la desregulación de la actividad ovárica (Reddy y Dasgupta, 2008, Maharaj y Amod, 2009).
- 3) **Teoría nerviosa:** El sistema nervioso autónomo y central juegan un papel preponderante en la regulación de la función ovárica y por tanto en el SOP, aunado a ello se ha demostrado un aumento en la actividad nerviosa simpática en los organismos que presentan SOP (Zangeneh *et al.* 2012).
- 4) **Teoría metabólica y resistencia a la insulina:** El aumento en los niveles de insulina provoca un aumento en la secreción de andrógenos a nivel ovárico, esto provoca el hiperandrogenismo y las enfermedades asociadas al SOP (Maharaj y Amod, 2009).

Teoría genética

En el desarrollo del SOP se han observado cambios en los niveles de expresión de genes que han sido estudiados mediante diversas técnicas moleculares que permiten conocer el aspecto genético de este síndrome.

Una de las técnicas para estudiar los cambios a nivel genético en el SOP son los estudios de asociación del genoma (GWAS). En mujeres europeas con SOP, se han encontrado polimorfismos en el gen *GATA4* que codifica un factor de transcripción de dedos de zinc que regula el desarrollo gonadal y la transcripción de genes esteroideogénicos, *NEIL2* que codifica a la endonucleasa Nei VIII-like 2, un miembro de una clase de ADN glicosilasas implicadas en la reparación del daño del ADN y *FSHB* que codifica el polipéptido beta de FSH20, un miembro de una familia de hormonas glicoproteicas que incluye LH, TSH y hCG, las cuales constan de una subunidad alfa común y una subunidad beta específica para cada hormona (Hayes *et al.*, 2015).

En un análisis de la expresión genética de cultivos celulares provenientes del cúmulo ovárico de mujeres sanas y otro de células cuyo origen fue de mujeres diagnosticadas con SOP, se encontraron genes alterados que participan en la síntesis de andrógenos como el gen que codifica a la enzima de escisión de cadena lateral de colesterol (*CYP11A*), esteroide 17-alfa-hidroxilasa (*CYP17*), hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (*HSDL2*) y la aromatasa *p450aro* (*CYP19A1*) (Haouzi *et al.*, 2012).

Las mujeres caucásicas australianas con SOP y que padecen obesidad presentan una mayor cantidad de leucocitos binucleados y aneuploidía en el cromosoma X lo cual aumenta el riesgo de infertilidad y de daño a nivel ovárico que puede contribuir a la patofisiología del síndrome (Moran *et al.*, 2008).

Se realizó un estudio de microarreglo de células de la teca de mujeres sanas y diagnosticadas con SOP donde se encontró la presencia de más de 345 genes alterados (2.3% de genes expresados en células de la teca) entre los cuales

destacan aquellos relacionados con la síntesis de andrógenos en el ovario como *CYP11A*, *CYP17* (Wood *et al.*, 2003).

Existe un aumento en la actividad del promotor de *CYP17* en un cultivo de células de la teca de mujeres con SOP respecto cultivos celulares provenientes de pacientes sanas. Este cambio en la expresión de *CYP17* se debe a un incremento en el nivel de andrógenos lo cual provoca un aumento en la actividad transcripcional, sin embargo, se desconocen las señales de transducción celular involucradas en este mecanismo (Wickenheisser *et al.*, 2000).

En mujeres tunecinas, existen cambios de un solo nucleótido en las secuencias de los receptores para estradiol ($ER\alpha$ y $ER\beta$), estas variaciones están fuertemente asociadas a la aparición de SOP y pueden ser un biomarcador de este en mujeres del norte de África (Douma *et al.*, 2020).

Existe una fuerte evidencia genética del síndrome que se ve reflejada en las vías de señalización que se encuentran alteradas durante el desarrollo del SOP, entre ellas aquellas que participan en el control de la esteroidogénesis, la acción de las hormonas esteroides, la acción y regulación de las gonadotropinas, secreción de insulina, la homeostasis energética y la inflamación crónica (Prapas *et al.*, 2009).

Además, el SOP se asocia a patrones hereditarios que están ligados a genes dominantes con penetración incompleta y que a su vez son modificados por patrones epigenéticos que pueden ocurrir durante el embarazo (Abbott, Barnett, Bruns y Dumesic, 2005).

Uno de los modelos más estudiados para evaluar el desarrollo del SOP, son los roedores, y a nivel genético se han encontrado alteraciones en la expresión de genes. En ratas hembra de la cepa Sprague Dawley (SD) tratadas con DHEA se presentó un aumento del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (*VEGF*), el cual favorece la formación de vasos sanguíneos y la formación de quistes en los ovarios y cuya inhibición causa una recuperación parcial de la función ovárica y la disminución de quistes (Abramovich *et al.*, 2012).

En ratas de la cepa SD y administradas con dihidrotestosterona (DHT) como método farmacéutico para inducir el SOP, se localizaron sobrepresados más de 573 genes los cuales se involucran con procesos de diferenciación, proliferación, control del ciclo celular, adhesión y angiogénesis; mientras que se encontró una desregulación a la baja de 430 genes relacionados con metabolismo de esteroides, lípidos, procesos de oxidación y reducción (Salilew-Wondim *et al.*, 2015).

Del mismo modo, en ratas que fueron expuestas a andrógenos en la fase prenatal para la inducción del SOP, se encontró que a los noventa días de edad existe un aumento en la expresión de los genes *CYP17*, *GATA6* y *StAR* que participan en la síntesis de hormonas esteroideas, específicamente testosterona, lo cual contribuye a la desregulación del ciclo estral y a la formación de quistes ováricos (Jahromi *et al.*, 2016).

En ratas SD tratadas con dehidroepiandrosterona se observó un aumento en los niveles de ARNm de los genes *Fas/FasL/Caspasa-8* que se encuentran involucradas en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo (Honma *et al.*, 2006).

Regulación transcripcional de genes mediado por hormonas esteroideas

Durante el desarrollo del SOP existen alteraciones en los niveles de las hormonas esteroideas como el E2, la progesterona (P) y la T que favorecen la patogénesis del síndrome (Li *et al.*, 2017; Noroozadeh, *et al.* 2017).

Las hormonas esteroideas regulan múltiples procesos fisiológicos en los organismos, como el crecimiento, el desarrollo, la diferenciación de tejidos y la regulación de genes, ésta última la llevan a cabo mediante la unión de las hormonas a su receptor nuclear modulando señales de forma directa o indirecta para ciertos genes específicos (Mangelsdorf *et al.*, 1995).

Existen seis tipos de receptores para hormonas esteroideas y son: los receptores ER α y ER β , el receptor de progesterona (PR), el receptor de andrógenos (AR), el

receptor de glucocorticoides (GR) y el receptor de mineralocorticoides (MR) (Li y DeMayo, 2018).

La regulación mediada por la unión del E2, la P y la T a sus receptores, se lleva a cabo por la unión de éste último a secuencias específicas en el ADN llamadas elementos de respuesta a hormonas (ERH), esta secuencia es variable de acuerdo con el receptor que la reconoce, en el caso de los receptores a progesterona y testosterona es AGAACAnnnTGTTCT (donde n es cualquier nucleótido) y en el caso de los receptores a E2 la secuencia que reconoce es AGGTCAnnnTGACCT (n es igual a cualquier nucleótido) (Weigel, 1996, Schwartz *et al.*, 2016, Li y DeMayo, 2018). Dado que también pueden unirse como homodímeros o heterodímeros por tanto su regulación tiene que ver con el receptor al que se une y a los genes que regula (Li y DeMayo, 2018).

Los receptores ER α y ER β se encuentran localizados normalmente en la membrana nuclear de células ováricas y de gonadotropos en el hipotálamo (receptor beta) y participan en el proceso de regulación de genes mediante la translocación al núcleo del complejo hormona (estradiol)-receptor activando la transcripción de varios genes involucrados en múltiples funciones relacionadas con procesos a nivel ovárico (Hewitt y Korach, 2018).

El PR se encuentra en el citosol está conformado por dos variantes proteicas nombradas PR-A de 94 kDa y PR-B de 114 kDa codificadas por el gen *Pgr*. Su función la lleva a cabo cuando el PR se une a su ligando e induce un cambio conformacional en los dímeros de la proteína y aumento de su fosforilación lo cual activa a factores de transcripción como los factores de activación AF1 y AF2 (Conneely *et al.*, 2003).

Finalmente, la T se une al AR que se encuentra a nivel ovárico en células de la teca y granulosa, donde es translocado al núcleo y se une a secuencias específicas en el ADN para regular la actividad transcripcional de varios genes como los factores de crecimiento tipo insulina (IGF) (Vendola *et al.*, 1999, Franks y Hardy, 2018).

Alteraciones a nivel hormonal

En mujeres con SOP, la regulación de la hormona GnRH está dada a nivel hipotálamo por Kisspeptina (codificada por *Kiss1*) la cual favorece su liberación hacia la adenohipófisis, donde se ha observado un incremento en los niveles de la GnRH y de su receptor (*GnRH1*). El incremento en el número de receptores *GnRH1* desencadenan un aumento en la síntesis y secreción de la LH, lo cual provoca un crecimiento acelerado en los folículos inmaduros y la inhibición de la apoptosis, lo cual deriva en atresia folicular y en la formación de quistes en el ovario (De Leo *et al.*, 2016, Palomba, 2018, Chaudhari *et al.*, 2018, Blasco *et al.*, 2018).

En mujeres diagnosticadas con SOP existe una disminución en los niveles de la hormona FSH, lo cual provoca una disminución en la actividad de la enzima aromatasa P450ar codificada por el gen (*CYP19A1*), lo que se traduce en una menor secreción de E2 y favorece la anovulación (Stewart y Sohrabji, 2020).

La hormona anti-Mülleriana (AMH) es una hormona secretada por las células de la granulosa que participa en el desarrollo folicular. En mujeres caucásicas diagnosticadas con SOP, se ha observado que existe un incremento en la expresión de AMH y que existe una variación en los niveles de esta hormona en los distintos fenotipos del síndrome (Sova *et al.*, 2019). En ratas que presentan un fenotipo de SOP se ha encontrado que existen niveles elevados de la hormona AMH, además de un gran número de folículos inmaduros por lo que algunos autores han sugerido que la AMH puede ser un marcador para esta enfermedad (Visser *et al.*, 2006, Homburg y Crawford, 2014, Du *et al.*, 2016).

Hasta el momento se ha analizado que en mujeres que presentan como antecedente el tener madres diagnosticadas con SOP y que iniciaron la pubertad, presentan un incremento en los niveles de la hormona AHM, lo que conlleva a un aumento en los niveles de la LH y a una mayor probabilidad de padecer SOP durante la etapa adulta, lo anterior, sostiene que existe una correlación entre la AMH y los niveles de la LH que puede favorecer el hiperandrogenismo (Crisosto *et al.*, 2019).

En ratas con SOP inducido con anti-progestina RU486 se encontró una alta expresión de neuronas positivas a kisspeptina en el núcleo arcuato en el hipotálamo, lo cual parece contribuir a la desregulación del eje Hipotálamo-Adenohipófisis-Ovario (HAO), favoreciendo un incremento en los niveles de la LH durante el desarrollo del SOP (Kondo *et al.*, 2016). El incremento de la LH contribuye a una mayor cantidad de andrógenos en el suero sanguíneo, los cuales son producidos por las células de la teca, y permiten la activación de la enzima CYP17 encargada de la síntesis de andrógenos, lo anterior causa una desregulación en el eje HAO mediante la disrupción en la retroalimentación positiva y negativa por parte de E2 (Nelson *et al.*, 1999, Catteau-Jonard y Dewailly, 2012, Krishnan y Muthusami, 2017).

En ratones con SOP inducido mediante la administración de la hormona LH presentan un fenotipo de ovario poliquístico, incremento en los niveles de testosterona y estradiol, además presentan una fase lútea persistente e infertilidad (Risma *et al.*, 1995).

Teoría nerviosa del SOP

El sistema nervioso autónomo juega un papel clave en el desarrollo del SOP. De acuerdo con Lansdown y Rees (2012), proponen que, dada la alta prevalencia de resistencia a la insulina, la obesidad y la apnea obstructiva del sueño en pacientes con SOP los cuales son trastornos que están íntimamente relacionados con la acción del sistema nervioso autónomo, se ha planteado que la actividad nerviosa simpática puede estar aumentada, y que dicha excitación puede desempeñar un papel en la patogenia o progresión del síndrome.

Existen estudios en los cuales se ha demostrado que las mujeres con SOP, presentan un aumento en el tono simpático, al analizar la concentración de catecolaminas y sus metabolitos como el ácido homovanílico urinario reducido (HVA) y el aumento del 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol en plasma y orina (Paradisi *et al.*, 1989). Además, en mujeres sanas y con SOP se comparó la variabilidad de la frecuencia cardíaca (HRV) y la recuperación de la frecuencia cardíaca (HRR) después de realizar ejercicio, esto como medida indirecta de la función autónoma

del sistema nervioso simpático en el corazón, y encontraron que las mujeres con SOP presentan cambios en su función cardíaca respecto a las mujeres sanas (Yildirim *et al.*, 2006, Tekin *et al.*, 2008).

Sverrisdóttir *et al.* 2008 examinó un grupo de veinte mujeres con SOP emparejadas por edad e índice de masa corporal con dieciocho mujeres sanas. La actividad del nervio simpático ya sea expresada como frecuencia de estallido o incidencia de estallido, aumentó notablemente en las mujeres con SOP en comparación con los controles. La actividad del nervio simpático del músculo posganglionar eferente (MSNA) se correlacionó positivamente con la testosterona total y libre y, menos con los niveles de colesterol en el grupo de SOP. Por el contrario, no hubo evidencia de una relación entre MSNA y la obesidad central, los niveles de insulina o resistencia a la insulina. Por tanto, los autores especularon que, debido a que el hiperandrogenismo puede reflejar la gravedad del SOP, la relación entre la MSNA y la testosterona puede indicar que el grado de simpatoexcitación se relaciona con la gravedad del síndrome.

El factor de crecimiento neural (NGF) es crítico para el funcionamiento del sistema nervioso autónomo, ya que participa en el mantenimiento de las fibras nerviosas, especialmente en aquellas que transmiten noradrenalina como neurotransmisor (Zangeneh *et al.*, 2016). La producción de NGF ovárico también aumenta en mujeres con SOP. Dissen y cols. 2009 recolectaron células de la granulosa y líquido folicular de aspirados foliculares de mujeres con y sin SOP sometidas a fertilización *in vitro*. Los niveles de NGF aumentaron en el líquido folicular y el medio acondicionado de células de la granulosa, en mujeres con SOP en comparación con los controles. Los autores procedieron a sobreexpresar selectivamente NGF en células tecales / intersticiales de ovario, generando ratones transgénicos que llevan el gen NGF bajo el control del promotor 17- α hidroxilasa / C17-20 liasa. Los ratones transgénicos tenían una mayor densidad de fibras nerviosas positivas a la tirosina hidroxilasa en el ovario, lo que refleja que la inervación simpática incrementa la producción de andrógenos en respuesta a la actividad de la FSH y una mayor prevalencia de quistes foliculares después de aumentos sostenidos de LH.

La mayor densidad neural simpática respalda los hallazgos de Heider y cols. 2001, quienes encontraron una mayor densidad de fibras catecolaminérgicas en los ovarios poliquísticos humanos en comparación con los controles. Estos estudios sugieren que la hiperactividad simpática y el exceso de NGF ovárico juegan un papel importante en la morfología de SOP.

Además, la elevación de los niveles de NGF en suero conllevan a una disminución en la maduración de los ovocitos mediante la inhibición de la glucólisis en las células del cumulo ovárico, debido a una interrupción de la comunicación entre los ovocitos y las células del cumulo ovárico, este incremento favorece la formación de quistes y un aumento en el nivel de la hormona LH (Dissen *et al.*, 2009, Zhai *et al.*, 2018).

Por otra parte, se evaluó la concentración del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en el plasma de mujeres sanas en edad reproductiva contra mujeres con diagnóstico confirmado de SOP, y encontraron que en mujeres con SOP existe una concentración mayor de BDNF en suero respecto a mujeres sanas, posiblemente como respuesta a un incremento en los niveles de LH (Russo *et al.*, 2012).

En un modelo de rata con inducción de SOP por VE, se encontró que la presión arterial sistólica media fue más alta en los animales tratados que en los controles no tratados. El grupo tratado también tuvo una mayor expresión de ARNm de los receptores α_{1a} -adrenérgicos en el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN) y niveles más bajos de ARNm de los receptores α_{2a} -adrenérgicos (un receptor simpatoinhibidor) en el PVN y la médula suprarrenal, lo que coincide con una mayor actividad simpática (Stener-Victorin *et al.*, 2000). Otros estudios que utilizan el mismo modelo para generar SOP han demostrado que la actividad noradrenérgica en las terminaciones nerviosas del hipotálamo anterior aumenta (Luza *et al.* 1995). Además, el flujo de salida simpático ovárico aumenta en ratas tratadas con VE, acompañado de una regulación a la baja del tejido intersticial de células tecaes de los receptores beta adrenérgicos y precede al desarrollo de quistes (Lara *et al.* 1993) lo que implica que la activación simpática puede tener un papel principal en la patogénesis del SOP. Las consecuencias funcionales de esta hiperactividad

simpática incluyen un incremento de la respuesta a P y andrógenos a la gonadotropina coriónica humana (HCG) y a un agonista de los receptores β -adrenérgicos, que se revierten mediante la sección del nervio ovárico superior (NOS) (Barria *et al.*, 1993). Estudios posteriores demostraron que la activación simpática ovárica en ratas tratadas con estradiol se acompañó de un aumento de la síntesis intraovárica del NGF y a su receptor de baja afinidad (Lara *et al.* 2000). Las células progenitoras neurales productoras de NGF inyectadas en el ovario de ratas jóvenes alteraron la dinámica folicular ovárica y aumentaron los niveles de androstenediona (Dissen *et al.* 2000), lo que sugiere que la sobreproducción de NGF puede iniciar una patología ovárica. El tratamiento repetido de electroacupuntura, que reduce la hiperactividad simpática, redujo los niveles de NGF ovárico a los valores de los controles tratados sin VE (Stener-Victorin *et al.* 2000) acompañado de una expresión reducida de los receptores α_1 , α_2 y β_2 -adrenérgicos (Manni *et al.* 2005). La denervación de las fibras noradrenérgicas previo al desarrollo del SOP en ratas tratadas con VE, previene el bloqueo de la ovulación y restaura la función ovárica pero no se logra revertir el hiperandrogenismo gonadal (Espinoza *et al.*, 2018).

En este sentido, el bloqueo del receptor β -adrenérgico en animales tratados con VE, favorece la restauración de la ovulación, previene la formación de quistes ováricos, y reduce los niveles de P, T y E2 (Venegas *et al.*, 2019). En ratas tratadas con DHT, se obtuvo que la electro-acupuntura de baja frecuencia dirigida a fibras catecolaminérgicas y el ejercicio pueden favorecer la reducción del RNA mensajero de los genes como el receptor β_3 -adrenérgico (*ADRB3*), el *NGF*, y el neuropéptido Y (*NPY*), cuya expresión se encuentra sobreexpresada en el desarrollo del síndrome y que son considerados marcadores de la actividad simpática a nivel ovario (Mannerås *et al.*, 2009), estos estudios comprueban que el factor nervioso incide sobre el desarrollo del SOP.

Por otra parte, en el modelo de ratas con SOP inducido con VE, se ha comprobado que la denervación del nervio vago (NV), permite la restauración de la ovulación en ambos ovarios, por tanto, se sugiere que el papel del NV es preponderante en el

desarrollo y persistencia del SOP (Hernández, *et al.*, 2013). Así como la denervación bilateral del NOS en ratas con inducción de SOP, restaura la ovulación, los niveles de E2 y T previos al desarrollo del síndrome (Morales-Ledesma *et al.*, 2010).

Teoría metabólica

Alrededor del 60% de mujeres diagnosticadas con SOP, presentan resistencia a la insulina, esto es considerado como un signo dependiente de esta enfermedad. La resistencia a la insulina consiste en un aumento de los niveles de expresión de esta hormona, que tiene un efecto a nivel ovárico (De Leo *et al.*, 2016). El aumento en los niveles de insulina favorece la síntesis de andrógenos, específicamente de T (De Leo *et al.*, 2016).

En pacientes con diagnóstico de SOP y con un índice de masa corporal aumentado, se ha encontrado un incremento en los niveles del factor de transcripción Ying-Yang 1 (YY1), el cual está relacionado con la resistencia a la insulina en células de la granulosa, debido a que puede activar múltiples cascadas de señalización involucradas en procesos inflamatorios, unión a proteínas de la matriz extracelular y la regulación de la apoptosis mediante la regulación de dieciocho genes (Wang *et al.*, 2019).

En mujeres con sobrepeso, hay un incremento del tejido adiposo, este aumento puede afectar la función reproductiva en mujeres con SOP, debido a que, en el tejido adiposo, hay presencia de enzimas aromatasas que contribuyen de forma endocrina al aumento en la síntesis de andrógenos y E2. Las mujeres con aumento del tejido central y aumento de la grasa visceral generalmente muestran niveles más altos de disfunción metabólica. (Kaplowitz *et al.*, 2001, Rojas *et al.*, 2014).

Otro de los aspectos más estudiados es la hormona leptina, la cual se encuentra relacionada al consumo de alimentos y balance energético, en mujeres con SOP y sobrepeso se ha evaluado el papel de esta hormona en el desarrollo de este síndrome principalmente la relación con la insulina y el hiperandrogenismo; sin embargo, no existen estudios concluyentes que puedan demostrar una correlación

entre los niveles de insulina y de leptina en pacientes con SOP y sobrepeso (Jahanfar *et al.*, 2004, Nasrat *et al.*,2015).

Del mismo modo, se sabe que las mujeres diagnosticadas con SOP, tienen una mayor posibilidad de desarrollar síndrome metabólico lo cual está asociado a un mayor riesgo de accidentes cardiovasculares, y enfermedades subyacentes como dislipidemia e hipertensión (Cussons, Stuckey y Watts, 2007).

Existe una prevalencia de del 43% de mujeres con SOP que presentan síndrome metabólico, lo cual aumenta el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y presentan *acanthosis nigricans* asociado a la resistencia a la insulina (Teimuraz, *et al.*, 2005).

La DHT es un andrógeno producto de la esteroidogénesis que está presente en las mujeres, y que se ha utilizado en modelos experimentales para inducir el SOP. Mujeres con altos niveles de DHT presentan obesidad e hipertrofia de adipocitos, en el caso de ratones tratados con DHT en la etapa prepuberal desarrollaron el SOP en la etapa puberal sin embargo, solo presentan aspectos metabólicos como son la hipertrofia de adipocitos y un aumento en los niveles de colesterol y ovarios poliquísticos, pero no se muestran un aumento en los niveles de la hormona LH (Caldwell, *et al.*, 2014).

Las dietas hipercalóricas en ratas prepuberales favorecen el desarrollo del SOP, sin embargo, al desarrollarlo, las ratas presentan solo los aspectos metabólicos del síndrome, como obesidad y resistencia a la insulina, además de cambios en la morfología ovárica (Patel y Shah, 2018). Además se ha observado que este tipo de dieta, junto con el inhibidor de la aromatasa llamado letrozol son capaces de inducir un fenotipo de SOP en ratas de la cepa SD y que generan un modelo de estudio que presenta aumento de la insulina, un incremento en el peso corporal, niveles elevados de T, insulina y un aumento en el metabolismo de lípidos, lo cual conlleva una disminución en la fosforilación de las proteínas como: receptor a insulina (INSR), sustrato del receptor a insulina (IRS), fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), serina treonina quinasa (AKT), y las proteínas de la vía MAPK: ERK1, ERK2, lo cual favorece la resistencia a la insulina en este síndrome (Xu, *et al.*,2020).

La resistencia a la insulina ha sido evaluada como un blanco potencial que explique la patofisiología del SOP. En mujeres con SOP se ha demostrado que la administración de fármacos como la metformina (sensibilizador de la insulina), favorecen la ovulación y restaura la función ovárica (Velazquez *et al.*, 1994). Se ha observado que la estimulación con metformina en células de la granulosa ovárica de ratas reduce la concentración de E2 y P además de reducir la concentración de las enzimas hidroxidelta-5-esteroide deshidrogenasa (gen *HSD3B*), de los citocromos CYP11A1 y la aromatasa CYP19A en condiciones basales y en presencia de estimulación por FSH (Tosca *et al.*, 2006).

Los estudios en modelos experimentales se basan en su mayoría en abatir la resistencia a la insulina y evaluar nuevos tratamientos para aminorar estos aspectos como son la combinación de metformina con exenatida, cuyo blanco molecular en ratas es la vía AMPK α -SIRT1 con lo que logran parcialmente restaurar la función ovárica (Tao *et al.*, 2019).

Planteamiento del problema

El SOP es el trastorno endocrino más común en mujeres en edad reproductiva, con una prevalencia entre 5% y 10% a nivel mundial dependiendo de los criterios de diagnóstico aplicados. El SOP constituye un problema de salud pública en varios países, debido a la carencia de información y falta de acceso a los sistemas de salud; además se desconoce su etiología y por tanto se complica entender el desarrollo de este síndrome.

Se sabe que durante el desarrollo del SOP se observan cambios a nivel nervioso, epigenético, metabólico y genético, estos cambios ocurren en las mujeres desde la concepción hasta el final de la vida fértil; sin embargo, se conoce poco sobre la participación de los genes en el desarrollo del SOP, por ello este estudio analizó la expresión de genes a nivel transcripcional involucrados en el desarrollo del SOP en el modelo de *Rattus norvegicus* tratado con VE en dos etapas de la vida reproductiva: el inicio de la pubertad (40 días postnatal) y la etapa adulta (70 días postnatal) lo cual permitirá obtener un panorama de los genes que participan de forma activa en el modelo de VE y poder extrapolarlo a la patofisiología del SOP en humanos, con lo cual este trabajo contribuye a la búsqueda de genes que pueden ser utilizados en un futuro para entender el papel de estos en el desarrollo del SOP.

Pregunta de investigación

En el modelo de rata, ¿cuáles son los genes que se encuentran diferencialmente expresados y que participan en el hiperandrogenismo, anovulación y formación de quistes ováricos en la etapa temprana y tardía del SOP inducido con VE?

Hipótesis

Si en la rata hembra infantil se induce farmacológicamente el SOP con VE, en la etapa puberal y adulta se altera la expresión de genes ováricos que participan en el desarrollo del síndrome: hiperandrogenismo, anovulación y formación de quistes ováricos.

Objetivo general

Identificar los genes que se encuentran diferencialmente expresados y que participan en el hiperandrogenismo, anovulación y formación de quistes ováricos en la etapa temprana y tardía del SOP inducido con VE.

Objetivos particulares

- Analizar los genes ováricos de rata que se encuentran diferencialmente expresados en la etapa temprana (40 días postnatal) y tardía (70 días postnatal) del SOP inducido con VE.
- Comparar los transcriptomas de los ovarios de ratas en la etapa temprana y tardía del SOP, en el modelo de VE.
- Identificar los genes del ovario que encuentran alterados a nivel transcripcional en la etapa temprana y tardía del SOP que participan en el hiperandrogenismo ovárico, anovulación y formación de quistes ováricos.

- Identificar los elementos de respuesta de las hormonas esteroideas en las regiones promotoras de los genes *17bHSD12*, *Gna 11* y *Pik3r2* mediante estudios *in silico*.

Material y métodos

Descripción del modelo de estudio

La rata Long Evans es una cepa desarrollada en 1915. Se trata de una cepa de la especie *Rattus norvegicus* Berkenhout que es resultado de la cruce entre ratas Wistar femeninas y ratas masculinas negras silvestres. Tras varias filiales del entrecruzamiento entre estas, se obtuvo este modelo de estudio que se caracteriza por ser un animal blanco con manchas negras alrededor de su cuerpo que ocasionalmente pueden ser cafés (McCabe y Thorne, 1976; River, 2016).

Manejo y cuidado del modelo de estudio

Para el presente proyecto se solicitaron 17 hembras primigestas, provenientes del bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla a cargo del M.V.Z. Francisco Ramos Collazo con cédula profesional: 6519572. El número del proyecto aprobado por el CICUAL fue el 0636.

El manejo de los animales de laboratorio posterior a la aprobación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) se realizó de acuerdo con las normas establecidas por la Ley Mexicana de Protección Animal para el Uso de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999,

Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio).

Las ratas gestantes fueron colocadas en cajas individuales, en condiciones controladas, con 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad y una temperatura de 22 ± 2 °C. Los animales tuvieron acceso a agua y alimento *ad libitum* durante el desarrollo del experimento. Se consideró al día de nacimiento de las crías como el día cero de edad y las ratas fueron sexadas al día cinco posnatal.

Inducción del SOP

Las ratas hembra fueron seleccionadas al azar y se formaron dos grupos experimentales con una *n* de 12 individuos por grupo. A los 10 días postnatal cada animal (*n*=12) recibió una inyección intramuscular de 2.0 mg de VE disuelto en 0.1 mL de aceite de sésamo (AS), mientras que el grupo vehículo (Vh, *n*=12) recibió una inyección de 0.1 mL de AS, siguiendo el procedimiento establecido por Brawer *et al.*, (1978).

Tabla 2. Grupos experimentales y tratamientos			
Grupo	Número de individuos	Tratamiento	Fecha del sacrificio (días después nacimiento)
Vh 40 días	6	0.1 mL de AS	A los 40 días de edad en estro vaginal
VE 40 días	6	2.0 mg de VE disuelto en 0.1 mL de AS	A los 40 días de edad en estro vaginal

Vh 70 días	6	0.1 mL de AS	A los 70 días de edad en estro vaginal
VE 70 días	6	2.0 mg de VE disuelto en 0.1 mL de AS	A los 70 días de edad en estro vaginal
VE: Valerato de estradiol; Vh: Vehículo; AS: Aceite de sésamo			

Posterior a la inyección, los animales fueron colocados en camadas de seis individuos por caja (cinco hembras y un macho), los cuales tuvieron contacto con la madre hasta los 24 días de edad. Posterior al destete los animales tuvieron acceso a agua y alimento *ad libitum* y fueron mantenidos en las mismas condiciones ambientales (14 h luz / 10 h oscuridad; 22.0 ± 2.0 °C). Los animales Vh y tratados con VE fueron sacrificados en dos diferentes etapas reproductivas: la etapa puberal (40 días postnatal), y en la etapa adulta (70 días postnatal) como se muestra en la tabla 2.

Seguimiento de la AV y el ciclo estral por citología vaginal

En roedores, la AV se ha utilizado como un índice del inicio de la pubertad ya que ocurre próxima al momento de la primera ovulación. Posterior a la inyección de AS o VE, las ratas fueron monitoreadas diariamente hasta el momento de la apertura vaginal (AV), una vez ocurrido este hecho se procedió con la toma de la citología vaginal por un periodo de siete días entre las 9:00 y 11:00 am, al final de este periodo se suspendió la toma de la citología vaginal y se reanudó dos semanas previo al sacrificio de los animales.

El ciclo estral está caracterizado por tener cuatro etapas llamadas proestro, diestro I, diestro II y proestro con una duración promedio de 4 a 5 días por ciclo, en el cual se ha demostrado que el inicio de la ovulación se da en el proestro y final del diestro (Marcondes, Bianchi y Tanno, 2002).

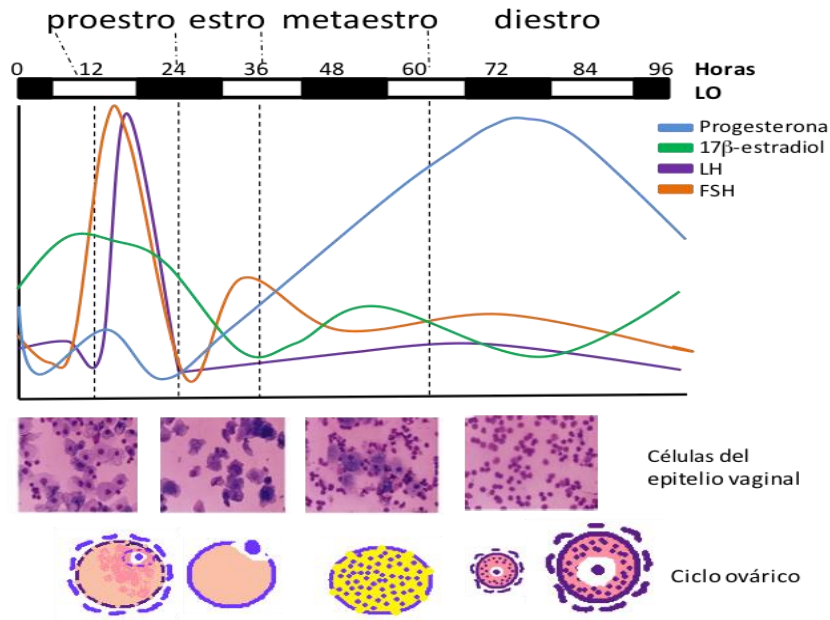


Figura 3: Niveles hormonales y cambios morfológicos en el ovario durante el ciclo estral, tomado de Juárez-Tapia y Miranda-Anaya, 2016.

La toma de la citología vaginal se realizó con ayuda de un asa bacteriológica estéril, la cual fue colocada al interior de la vagina de la rata. El exudado vaginal fue colocado en un portaobjetos que posteriormente fue teñido con hematoxilina-eosina. El portaobjetos fue colocado en un microscopio de campo claro y se observó la morfología celular para determinar el día del ciclo estral en que se encontraba el animal: diestro-1, diestro-2, proestro y diestro.

Durante el ciclo estral se observan cambios a nivel citológico que son reflejo del nivel hormonal de la rata. La citología vaginal del diestro se caracteriza por presentar células epiteliales descamadas, en el proestro el signo es la presencia de leucocitos,

mientras que el proestro se caracteriza por presentar células epiteliales nucleadas (McLean *et al.*, 2012, Juárez-Tapia y Miranda-Anaya, 2016) (figura 3).

Los niveles hormonales dentro del ciclo estral se presentan de la siguiente manera: Diestro-1: Durante esta fase las concentraciones plasmáticas de LH, FSH, bajas y presentan pequeñas fluctuaciones cíclicas. La concentración de estrógenos es baja en la mañana de ese día y comienza a incrementar en la tarde, mientras que la de P presenta un aumento entre las 10:00 del diestro-1 y las 01.00 del diestro-2 (Smith y cols. 1975). En el ovario se observan folículos en todas las etapas de crecimiento, excepto folículos preovulatorios. El epitelio vaginal está formado la membrana basal y 2-3 capas de células epiteliales unidas a la membrana basal; la citología vaginal revela la presencia de algunas células epiteliales nucleadas, leucocitos polimorfonucleados y moco (Freeman,2006; Goldman, 2007).

Diestro-2: Durante la tarde de este día, las concentraciones plasmáticas de FSH, LH y prolactina se mantienen bajas, la concentración plasmática de P es menor que en el diestro-1 y la de estrógenos sigue aumentando lentamente. Las células del epitelio vaginal aumentan su proliferación; la citología vaginal presenta gran cantidad de leucocitos polimorfonucleados con escasa cantidad de células epiteliales. La acción creciente de los estrógenos sobre el útero resulta en un aumento en la irrigación sanguínea y proliferan las células que forman las capas del epitelio uterino (Freeman,2006; Goldman, 2007).

Proestro: La citología vaginal del proestro, es caracterizado por una completa ausencia de leucocitos y predominancia de células epiteliales nucleadas. Las concentraciones plasmáticas de estrógenos continúan en aumento gradual hasta alcanzar su máxima concentración, seguido de su caída en la tarde (“pico” preovulatorio de estrógenos). Por su parte, durante la mañana del proestro, las concentraciones de FSH, LH y prolactina se mantienen bajas; cuando se produce la caída brusca de estrógenos, las concentraciones plasmáticas de prolactina y P se incrementan rápidamente hasta alcanzar un máximo en la tarde del proestro (picos preovulatorios de prolactina y P) seguidas de una disminución que alcanza un mínimo en las primeras horas del día del estro. En la tarde del proestro la

concentración plasmática de LH empiezan a aumentar y alcanzan su nivel máximo entre las 17:00 y 19:00 h de ese día (pico preovulatorio de LH). El rápido surgimiento de LH induce la ruptura folicular y la ovulación. La secreción de FSH es muy similar a la LH, inicia su incremento desde la tarde del proestro. Aunque los niveles de FSH y LH declinan a sus niveles basales al mismo tiempo, durante la madrugada del estro se produce un aumento secundario de FSH que culmina en la mañana del estro (Freeman, 2006; Goldman, 2007).

Estro: Las concentraciones plasmáticas de estrógenos, P, LH y prolactina disminuyen al mínimo (concentraciones hormonales basales), pero no la de FSH, que alcanza un segundo “pico” en la madrugada de este día. Las capas del epitelio vaginal entran en regresión, produciéndose una descamación generalizada que en la citología vaginal se hace evidente por la presencia de gran cantidad de células cornificadas sin núcleo. Las células escamosas son el resultado de la maduración de las células nucleadas debido a que las células aumentan la síntesis de queratina, este proceso sucede en todos los epitelios poli estratificados planos. Durante las primeras horas de este día se produce la ovulación; si ocurre la fertilización de los ovocitos, la concentración plasmática de progesterona se mantiene alta asegurando así el implante de los huevos y su desarrollo. De no ocurrir la fertilización, la caída de la concentración plasmática de progesterona en el día del diestro-2, ocasiona una rápida regresión de las capas del endometrio uterino, el líquido de extravasación acumulado en la luz del útero es liberado y la serie de eventos endocrinos se reinician (Freeman, 2006; Goldman, 2007).

Sacrificio de los animales

El sacrificio de los animales se realizó a los 40 o 70 días postnatal dependiendo del grupo experimental (Tabla 2). Previo al sacrificio se corroboró que los animales presentaran un estro vaginal en la citología vaginal e inmediatamente fueron pesados en una balanza granataria. El sacrificio de los animales se realizó entre las 9:00 y 11:00 h por decapitación. La sangre del tronco fue obtenida y centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos, el suero fue separado y colocado en un tubo de

polipropileno de 1.5 mL y almacenado a -70 °C hasta la cuantificación de las hormonas esteroideas. Los oviductos fueron disecados y con ayuda de un estereomicroscopio se cuantificó el número de ovocitos liberados (Venegas *et al.*,2015). Los ovarios, las glándulas adrenales y el útero fueron disecados y pesados en una balanza analítica. El ovario derecho fue guardado en condiciones asépticas en un tubo de polipropileno de 1.5 mL e inmediatamente almacenado a -70 °C hasta la extracción del RNA total.

Cuantificación de hormonas esteroideas

La cuantificación de las hormonas esteroideas en suero se realizó por la técnica de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA).

La prueba de ELISA se basa en la unión competitiva de antígenos específicos a anticuerpos presentes en el fondo de una base sólida, esta unión da una medida cuantitativa sobre la cantidad de antígeno presente. Se cuantificó la concentración de P, T, E2 por ELISA mediante el uso de los kits correspondientes de la marca Labor Diagnostika Nord, progesterona (no. de catálogo AR E-8700), testosterona (AR E-8000) y estradiol (AR E-8800).

Para la cuantificación de las hormonas P y E2 se adicionaron 25µL de suero, en tanto para la T se agregaron 10 µL de suero, en tubos de polipropileno con el respectivo anticuerpo para las hormonas evaluadas, es decir anti-estradiol, anti-progesterona y anti-testosterona. Las muestras se incubaron por dos horas con agitación para el E2, y una hora para P y T, posteriormente las muestras fueron lavadas y se incubaron en oscuridad para a la postre ser medidas en términos cuantitativos, la determinación de la cantidad de E2 presente está determinada en pg/mL, para la T y P la evaluación está medida en ng/mL.

Los coeficientes intra-ensayo para estradiol fueron los siguientes: CV (%) 6.1- 3.2, interensayo estradiol CV (%) 7.0-7.1, progesterona intra-ensayo CV (%) 9.9-4.6, inter ensayo 7.6-6.0 y para testosterona intra ensayo CV (%) 6.50-11.07 e inter ensayo 11.3-9.3.

Extracción de RNA total

El ovario derecho de cada animal por grupo experimental (n=6) se mantuvieron en condiciones asépticas, libres de RNAsas y resguardados a -70 °C; se lisaron de forma mecánica mediante la homogenización del tejido, utilizando nitrógeno líquido a -196.5°C para obtener un polvo blanquecino. La extracción de ARN se llevó a cabo por el método de fenol y el kit Quick-RNA™ Miniprep Kit de Zymo Research™ (número de catálogo R1055) en un pool de seis ovarios por cada grupo experimental.

Posteriormente el ARN total se cuantificó por espectrofotometría y se comprobó su integridad mediante un gel de agarosa al 1%, que a la postre fue visualizado en un transiluminador UV – M20V de la marca UVP.

El ARN total (30 microgramos por grupo) fue precipitado con acetato de sodio (3M, pH 5.28) y etanol absoluto frío a un volumen de 50 µL de agua DEPC y fue almacenado a -70 °C durante 24 h para posteriormente ser transportado en frío en condiciones libres de RNAsas a la Unidad de Microarreglos de DNA a cargo del Dr. Jorge Ramírez Salcedo y dependiente del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), donde se utilizó la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) la cual consiste en hacer un PCR utilizando como templado ARNm y obtener ADN complementario (cDNA) como amplificado, que fue usado para hibridarse con una sonda utilizada como marcador y realizar el microarreglo.

Microarreglo

El microarreglo de expresión es una herramienta molecular que permite el análisis del nivel de expresión de los genes, se basa en el principio de evaluar el estado de la expresión de los genes en una condición determinada, se utiliza principalmente para la búsqueda de biomarcadores y en la práctica clínica (Tarca, Romero y Drahici, 2006).

Se realizaron dos microarreglos de dos vías en el cual se evaluaron dos condiciones: el ARN del grupo control (Vh40) contra el grupo experimental (VE40) y el segundo microarreglo donde se evaluó el grupo control (Vh70) contra el grupo experimental VE70, (figura 4).

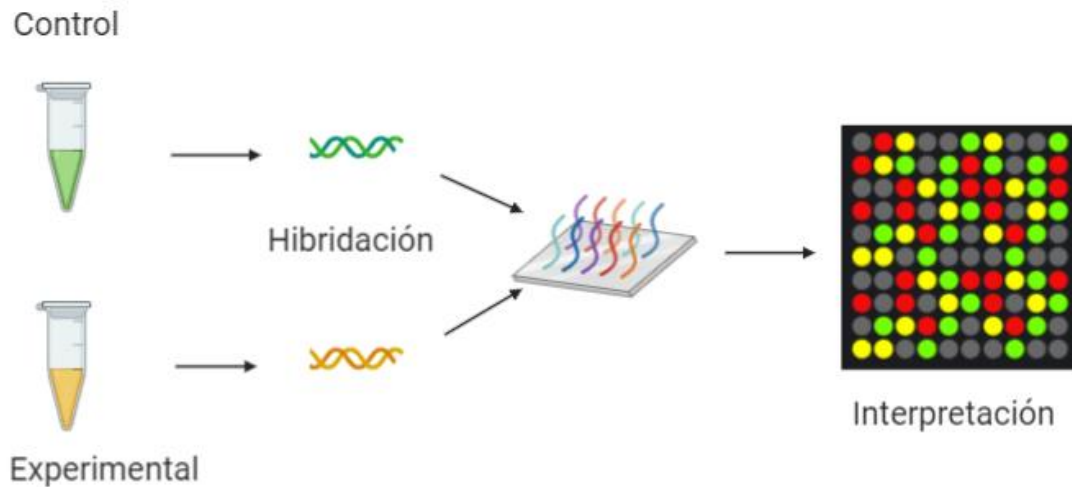


Figura 4. Pasos para realizar el microarreglo. Modificado de Tarca, Romero y Draghici, 2006)

De acuerdo con el diseño del microarreglo, el ARN del grupo Vh40 fue hibridado con el fluoróforo Alexa Fluor 555 (Thermo Fisher) mientras que el ARN del grupo VE40 fue hibridado con el fluoróforo Alexa Fluor 647(Thermo Fisher), lo mismo sucedió para el microarreglo del grupo experimental de 70 días. En ambos microarreglos se obtuvo una relación entre el grupo control y el experimental para dar como resultado a los genes alterados.

Una vez hibridados los microarreglos, se obtuvo una imagen fluorescente, la cual siguió el principio de la cuantificación de niveles de expresión, para ello se tomó la fluorescencia medida en cada ubicación de la secuencia (también llamado pool) y se realizó una lectura. Esta fluorescencia fue proporcional a la cantidad de ARNm hibridado por pozo (Cheadle *et al.*, 2003).

La normalización de los datos se puede dar por varios métodos, uno de los más usados es el uso del *z score*, el cual es definido como la distribución normal y abarca un rango entre 0 y 1. La gráfica de su función de densidad tiene una forma acampanada y es simétrica respecto de un determinado parámetro. Esta curva se conoce como campana de Gauss ("Distribución Normal Z", s.f.).

El método utilizado por medio del *z score* consiste en corregir internamente los datos, tomando en cuenta la hibridación única y los valores de hibridación para genes individuales. Se expresan como una unidad de desviación estándar a partir de la media normalizada de cero, es decir, se toman los datos de las intensidades en 'crudo' y son transformados mediante el logaritmo base diez. Posteriormente, los puntajes *z* se calculan restando la intensidad promedio general del gen (dentro de un solo experimento) de los datos de intensidad sin procesar para cada gen, y dividiendo ese resultado por la desviación estándar de todas las intensidades medidas, utilizando la siguiente ecuación (figura 5).

$$Z \text{ score} = \frac{\text{Intensidad } G - \text{media de la intensidad } G1 \dots Gn}{\text{Desviación estandar } G1 \dots Gn}$$

Figura 5. Ecuación para obtener el *z score* de cada uno de los genes, donde *G* representa cualquier gen del microarreglo y *G1...Gn* representa la medida agregada de todos los genes. Tomado de Cheadle *et al.*, 2003.

Una vez obtenido el valor de los *z score* de cada uno de los genes, se puede deducir que un radio ± 1.96 ($P=0.05$) se toma como significativo, aunque la observación empírica ha mostrado resultados consistentes con valores de la relación *Z* de ± 1.50 o más (Cheadle *et al.*, 2003).

Basados en esta inferencia los resultados de los genes se obtuvieron a partir de dos cortes del *z score* (1.5 y 2) en función de los grupos VE40 y VE70, sin embargo, para este trabajo solo se contemplaron aquellos genes con un *z score* mayor a 2 en

el extremo de los positivos dentro del eje de las abscisas y los genes con un z score menor a -2 en el extremo negativo del eje x.

Estos genes mayores a 2 fueron considerados como genes alterados a la alza, mientras aquellos que presentaron un z score menor a -2 fueron considerados como genes desregulados a la baja. Genes que se encuentren en el rango entre ± 1.99 y ± 1.5 son considerados alterados, pero se puede solo inferir que lo están en un 75% de probabilidad. Aunado a ello los genes que presenten un z score donde el rango entre -0.9 y +0.9 son genes cuya expresión sea normal en ambas condiciones, genes que presenten un z score que oscile entre -1 y -1.5 y entre 1 y 1.5 serán catalogados como genes que presentan una leve tendencia a la baja o a la alta, según corresponda estos no son estadísticamente diferentes respecto a los genes de entre -0.99 y 1 que ocupan el rango de genes expresados normalmente en ambas condiciones (figura 6).

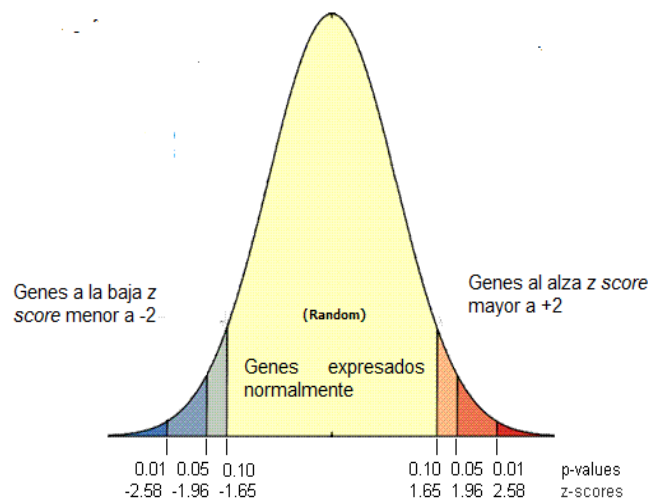


Figura 6. Distribución de los valores del z score. Se observa la campana donde se ubican los valores del z score, entre estos intervalos se encuentran los valores individuales de cada gen de ambos microarreglos. (imagen libre de internet).

Análisis de los genes

Una vez que se obtuvieron los genes alterados, fueron agrupados y clasificados por función molecular basados en el valor del *z score* para ello se utilizó el software Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (disponible en (<https://david.ncicrf.gov/gene2gene.jsp>)). Específicamente se hizo uso de las herramientas de anotación funcional y para ello se cargaron en una lista los carne de identidad (ID's) o también llamados números de acceso de cada uno de los genes alterados, esta lista fue convertida para que el programa DAVID pudiera identificarlos dentro de su base de datos.

Una vez cargada la lista de genes se obtuvo mediante la enciclopedia de Kyoto de genes y genomas (programa KEGG) disponible en (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) las vías metabólicas alteradas en las que participan los genes alterados con un *Z score* +/- 2, la información generada por KEGG se muestra como una serie de 'cartas' que contienen grandes grupos de genes que participan en determinada función biológica.

Se analizaron cada una de las cartas arrojadas por el programa DAVID, seleccionando aquellas que tuvieran una relación directa con los procesos biológicos llevados a cabo en el ovario, posteriormente se descartaron genes que participasen en procesos distintos y cuyas cartas tuvieran una astringencia o 'rigurosidad' superior a 0.7, en una escala nominal de 0.005 a 0.99. Esto con la finalidad de delimitar la significancia biológica de que el gen se encuentre alterado, es decir, cuanto más sea excluyente el valor de la rigurosidad aparecerán menos grupos funcionales y por tanto una mayor cantidad de genes que podrían ser tomados como irrelevantes o de poca importancia.

Los resultados de DAVID y KEGG fueron contrastados con la base de datos llamada The Rat Genome Database (RGD) [disponible en <https://rgd.mcw.edu/>] y el programa Gen bank del National Institute for Biotechnology Information (NCBI) [disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>] en la cual se obtuvo el papel biológico de cada uno de los genes, estos datos fueron cotejados de forma manual

entre estas herramientas disponibles para obtener una información más sólida en cuanto al papel de cada gen durante el desarrollo del SOP.

Posteriormente se utilizó el software *Gene Ontology* disponible en (<http://geneontology.org/>) con el cual se realizó el mapeo del proceso biológico mediante el uso de la probabilidad estadística con un 95% de confianza, donde aquellos genes que tuvieran una probabilidad igual o menor a $p=0.05$ tienen mayor relevancia biológica de manera homóloga a lo presentado por KEGG, lo cual permitió corroborar la información generada por RGD, NCBI y DAVID.

A continuación, se complementó la revisión bibliográfica creando una base de datos, donde se incluyeron las reseñas sobre cada gen, su función, y participación en el síndrome de ovario poliquístico, y se hizo énfasis en aquellos genes que la literatura ha mostrado que participan en la función ovárica.

Análisis de promotores de genes alterados

Como parte complementaria a nuestra investigación se realizó el análisis *in silico* de los promotores de algunos genes involucrados en el proceso de desarrollo del SOP en rata, para ello se realizó lo siguiente:

El programa Ensembl© (disponible en: <https://www.ensembl.org/index.html>) fue ocupado para descargar la secuencia completa de los genes de *Rattus norvegicus* en un formato FASTA compatible con Microsoft Word™. Con este programa obtuvimos la secuencia de nucleótidos correspondiente a cada gen.

Para la búsqueda de promotores dentro de cada uno de los genes se recurrió a la herramienta llamada Eukaryotic Promoter Database (EPD) la cual identifica posibles promotores reportados en la literatura o mediante una predicción secuencias de ADN específicas donde se pueda localizar el promotor dentro de la secuencia de nucleótidos (disponible en <http://epd.vital-it.ch/index.php>).

La búsqueda de posibles factores de transcripción se realizó con el programa TRANSFAC™ el cual se encuentra disponible en: <http://gene-regulation.com/pub/programs.html#pmatch>, el programa PROMO, disponible en

http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3 se utilizó como método para comprobar los datos obtenidos sobre los elementos de respuesta, este programa utiliza una matriz de datos basada en la versión 8.3 de TRANSFAC™.

Análisis estadístico

Se realizaron análisis comparativos entre los grupos de ratas para cada tratamiento. El peso corporal, el peso de los ovarios y las adrenales fueron analizados con una prueba *t de student* con un índice de confianza del 95% y se utilizó el programa *Graphpad Prism* versión 6.0.

La tasa de animales ovulantes (TAO) se analizó con la prueba de probabilidad exacta de Fisher. El número de ovocitos se analizó por medio de la prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba U Mann-Whitney.

La concentración de las hormonas esteroides fue analizada utilizando una ANOVA 1 vía y una prueba de Dunns post hoc, con un índice de confianza del 95% y se utilizó el programa *Graphpad Prism* versión 6.0.

Resultados

Efecto del valerato de estradiol en el inicio de la pubertad.

En roedores, la AV se ha utilizado como un índice del inicio de la pubertad ya que ocurre próxima al momento de la primera ovulación. La AV del grupo Vh (n=12) se presentó en el día 42.3 ± 0.7 postnatal, mientras que en el grupo VE (n=12) se presentó al día 14.0 ± 0.0 (tabla 3).

Tabla 3. Inicio de la pubertad en los animales tratados con Vh y VE		
Grupo experimental	Número de animales	AV + SEM
Vh	12	41.05 ± 0.47 días postnatal
VE	12	$14.0 \pm 0.00^*$ días postnatal

*p<0.05; Vh: Vehículo (aceite de sésamo); VE: valerato de estradiol (2 mg/0.1 mL s.c. a los 10 días postnatal); SEM: error estándar de la media.

Debido a que el grupo Vh40 fue sacrificado al primer estro vaginal no se realizó el seguimiento del ciclo estral. El grupo Vh70 presentó en promedio 5 ± 1 ciclos estrales regulares de cuatro días (diestro-1, diestro-2, proestro y estro). El grupo VE40 y VE70, presentaron ciclos estrales irregulares (cero ciclos durante el periodo estudiado) con presencia de diestros y estros persistentes. En la figura 7 se observa el número de ciclos estrales en promedio por grupo experimental.

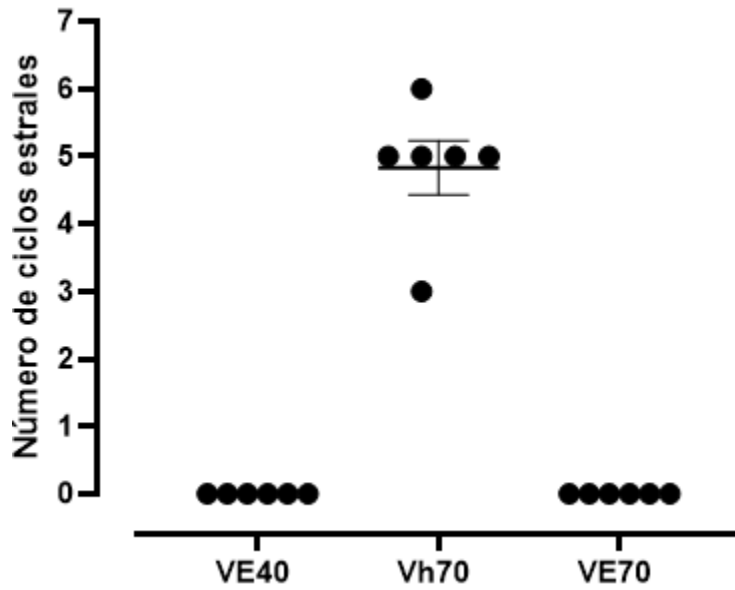


Figura 7: Seguimiento del ciclo estral por grupo experimental. Cada spot representa a un individuo \pm SEM de cada uno de los grupos experimentales Vh 70, VE (40 y 70 días) (n=6) El grupo Vh 40 no fue presentado ya que no se realizó seguimiento del ciclo estral. Para el gráfico fueron considerados ciclos estrales regulares.

Efecto de la inducción del SOP con VE sobre el peso corporal de los animales en la etapa puberal y adulta.

El peso corporal de los animales del grupo Vh40 fue de 100.3 ± 2.41 g y del grupo VE40 fue de 118.5 ± 3.47 g. Se observa que a los 40 días el grupo VE40 tiene un mayor peso corporal respecto al grupo Vh40 y al realizar la prueba t de student se observa que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0003$) (figura 8).

El peso corporal de los animales del grupo Vh70 fue de 198.1 ± 4.27 g, mientras que del grupo VE70 fue de 187.0 ± 7.06 g. No hubo diferencia significativa en el peso de los animales de los dos grupos experimentales ($p=0.1709$, figura 8).

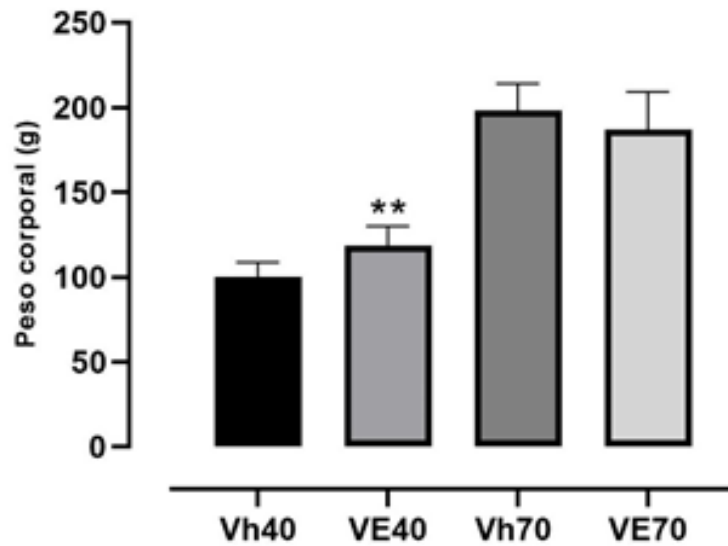


Figura 8. Peso corporal al momento del sacrificio de las ratas inducidas con SOP. Media \pm SEM del peso corporal de los animales del grupo vehículo (Vh40 y 70) y valerato de estradiol (VE40 y70). Prueba *t de student* de muestras independientes ** $p < 0.05$ (Vh vs VE40 y VE70 vs Vh70).

Efecto temprano y tardío de la inducción del SOP con VE sobre la tasa de animales ovulantes y el número de ovocitos.

En la etapa puberal, la tasa de animales ovulantes (TAO) para el grupo Vh40 fue 6/6 al igual que para el grupo VE40 6/6. En la etapa adulta la TAO para el grupo Vh70 fue 6/6 mientras que para el grupo VE70 fue 0/6. Hubo diferencia significativa entre el grupo Vh70 respecto al grupo VE 70 ($p < 0.001$).

Al comparar el número de ovocitos liberados de cada grupo experimental se encontró que no hubo diferencia significativa entre los animales del grupo Vh40 (10.83 ± 0.41 ovocitos) con respecto al grupo VE40 (9.91 ± 0.55 ovocitos, $p = 0.1841$), el grupo Vh70 liberó 12.79 ± 0.70 ovocitos y el grupo VE no presentó ovulación ($p = 0.0001$) figura 9.

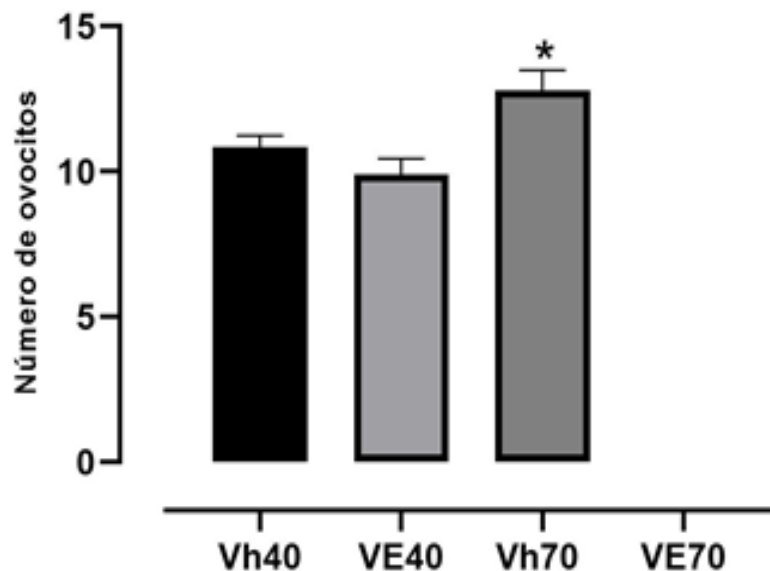


Figura 9. Número de ovocitos liberados de ratas con SOP. La gráfica muestra la media \pm SEM del número de ovocitos liberados del grupo Vh y VE sacrificados a los 40 días postnatal, y del grupo Vh y VE sacrificado a los 70 días postnatal. El conteo de ovocitos se realizó en las ratas que presentaban estro vaginal. Prueba *t-student* $p < 0.05$ (Vh40 vs VE40 y VE70 vs Vh70).

La inducción del SOP con VE en la etapa infantil disminuye el peso de los ovarios en la etapa puberal y adulta.

En la etapa puberal, el grupo Vh40 tiene un promedio del 14.46 ± 0.97 mg del peso relativo del ovario izquierdo mientras que el ovario derecho es de 14.26 ± 0.963 mg. En el grupo VE40 el promedio del peso relativo del ovario izquierdo es de 11.54 ± 1.259 mg, mientras que del ovario derecho es de 11.06 ± 1.17 mg. El peso de los ovarios del grupo Vh40 es mayor respecto al peso de los ovarios del grupo VE40. No hubo diferencia significativa en el ovario izquierdo del grupo Vh40 respecto al grupo VE40 ($p = 0.0782$). Existe una diferencia significativa entre el ovario derecho del grupo VE40 respecto al ovario derecho del grupo Vh40 $p = 0.0454$ (figura 10A y 10B).

En la etapa adulta, el grupo Vh70 tiene un promedio de 17.64 ± 0.70 mg del peso relativo del ovario izquierdo mientras que del ovario derecho es de 18.33 ± 0.83 mg. Para el caso del grupo VE70 el promedio del peso relativo del ovario izquierdo es de 10.88 ± 1.3 mg mientras que para el ovario derecho es de 9.949 ± 1.16 mg. El peso de lo ovarios es mayor en el grupo Vh70 respecto al grupo VE70. Existe una diferencia significativa en el peso de los ovarios izquierdos ($p = 0.0001$) y derechos ($p = 0.0001$) del grupo VE70 respecto al grupo Vh70 (figura 10 A y 10 B).

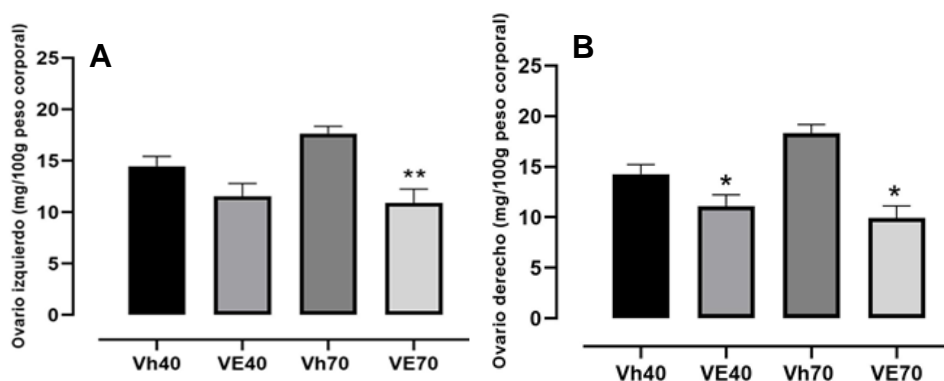


Figura 10. Peso relativo de los ovarios de ratas con inducción de SOP. La gráfica muestra la media \pm SEM del peso relativo de los ovarios izquierdos (A) y de los ovarios derechos (B) de las ratas del grupo Vh y VE sacrificadas a los 40 y 70 días de edad respectivamente. Prueba *t de student* de muestras independientes (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ Vh40 vs VE40 y VE70 vs Vh70).

La inducción del SOP con VE en la etapa infantil no afecta el peso de las glándulas adrenales de las ratas en la etapa puberal y adulta.

En la etapa puberal, el grupo Vh40 tiene un peso relativo promedio de 17.21 ± 1.58 mg en la adrenal izquierda (figura 11A) mientras que la adrenal derecha tiene un promedio de 16.85 ± 1.80 mg (figura 11 B). En el caso del grupo VE40 se muestra que la adrenal izquierda tiene un peso promedio de 18.57 ± 1.64 mg (figura 11A) y para la adrenal derecha es de 17.51 ± 1.74 mg (figura 11 B). No existe diferencia significativa en el peso de las adrenales izquierdas ($p=0.5571$) ni derechas ($p=0.7961$) de los grupos Vh40 y VE40.

En la etapa adulta, el grupo Vh70 tiene un peso relativo promedio de 16.52 ± 1.49 mg en la adrenal izquierda (figura 11A) mientras que la adrenal derecha tiene un promedio de 15.42 ± 1.12 mg (figura 11B). En el caso del grupo VE70 la adrenal izquierda tiene un promedio de 13.61 ± 1.275 mg (figura 11A) y la adrenal derecha es de 12.61 ± 1.080 mg (figura 11 B). No existe diferencia significativa en el peso de las adrenales izquierdas ($p=0.1741$), ni derechas ($p=0.0944$) de los grupos Vh70 y VE70.

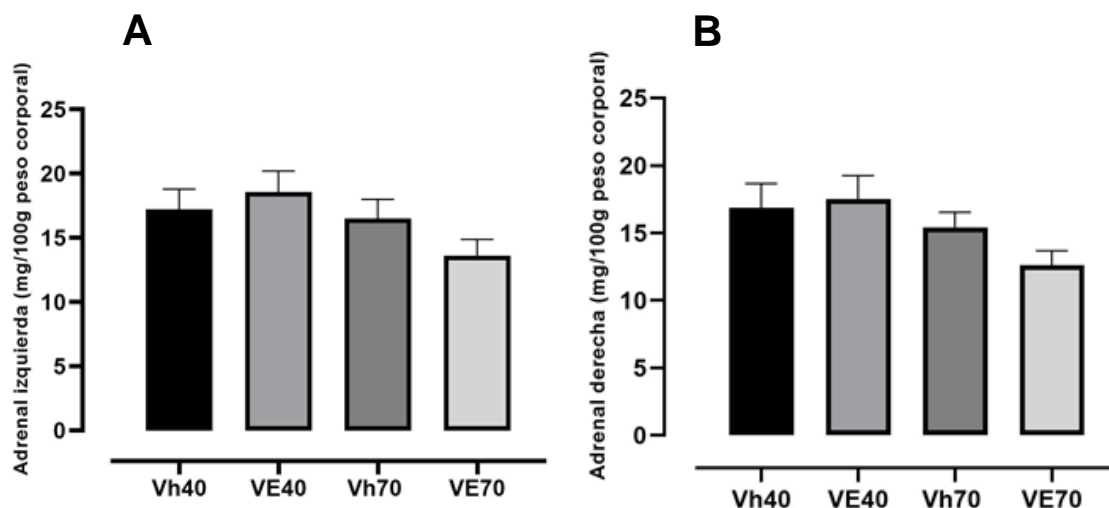


Figura 11 Peso relativo de las glándulas adrenales en ratas con inducción de SOP. La gráfica muestra la media \pm SEM del peso relativo de las glándulas adrenales izquierda (A) y derecha (B) de las ratas del grupo Vh o VE y sacrificadas a los 40 o 70 días de edad. No hubo diferencia significativa.

Efecto del VE sobre la concentración de las hormonas progesterona, testosterona y estradiol en la etapa puberal y adulta.

La concentración de progesterona en suero para el grupo Vh40 fue de 22.4 ± 4.02 ng/mL, para el grupo VE40 fue de 16.02 ± 2.48 ng / mL. En cuanto al grupo Vh70 se tiene una concentración de 55.26 ± 6.29 ng / mL y para el grupo VE70 la concentración fue de 37.48 ± 5.26 ng / mL. El análisis estadístico mostró diferencia significativa entre la concentración de progesterona del grupo Vh40 vs. Vh70 ($p = 0.0005$), así como del grupo VE40 vs. Vh70 ($p < 0.0001$), y entre el grupo VE40 vs. VE70 ($p = 0.0296$). No hubo diferencia estadística entre el grupo Vh40 vs. VE40 ($p = 0.1837$) y Vh70 vs. VE70 ($p = 0.0628$) (figura 12A).

La concentración de testosterona en el suero fue de 0.067 ± 0.01 ng / mL para el grupo Vh40, de 0.260 ± 0.05 ng / mL para el grupo VE40, de 0.048 ± 0.01 ng / mL para el grupo Vh70 y de 0.180 ± 0.04 ng / mL para el grupo VE70. El análisis estadístico mostró diferencia significativa entre la concentración de testosterona del grupo Vh40 vs. VE40 ($p = 0.0013$), así como del grupo VE40 vs. Vh70 ($p = 0.0002$), y entre el grupo Vh70 vs. VE70 ($p = 0.0449$). No hubo diferencia estadística entre el grupo Vh40 vs. Vh70 ($p = 0.971$) y VE40 vs. VE70 ($p = 0.382$) (figura 12B).

Con respecto a la concentración de estradiol en el suero fue de 9.82 ± 2.23 pg / mL para el grupo Vh40, de 21.42 ± 3.40 pg / mL para el grupo VE40, de 2.32 ± 0.10 pg / mL para el grupo Vh70 y de 16.67 ± 1.64 pg / mL para el grupo VE70. El análisis estadístico mostró diferencia significativa entre la concentración de estradiol del grupo Vh40 vs. VE40 ($p = 0.0067$), así como del grupo VE40 vs. Vh70 ($P < 0.0001$), y entre el grupo Vh70 vs. VE70 ($p = 0.0005$). No hubo diferencia estadística entre el grupo Vh40 vs. Vh70 ($p = 0.1134$) y VE40 vs. VE70 ($p = 0.4213$) (figura 12C).

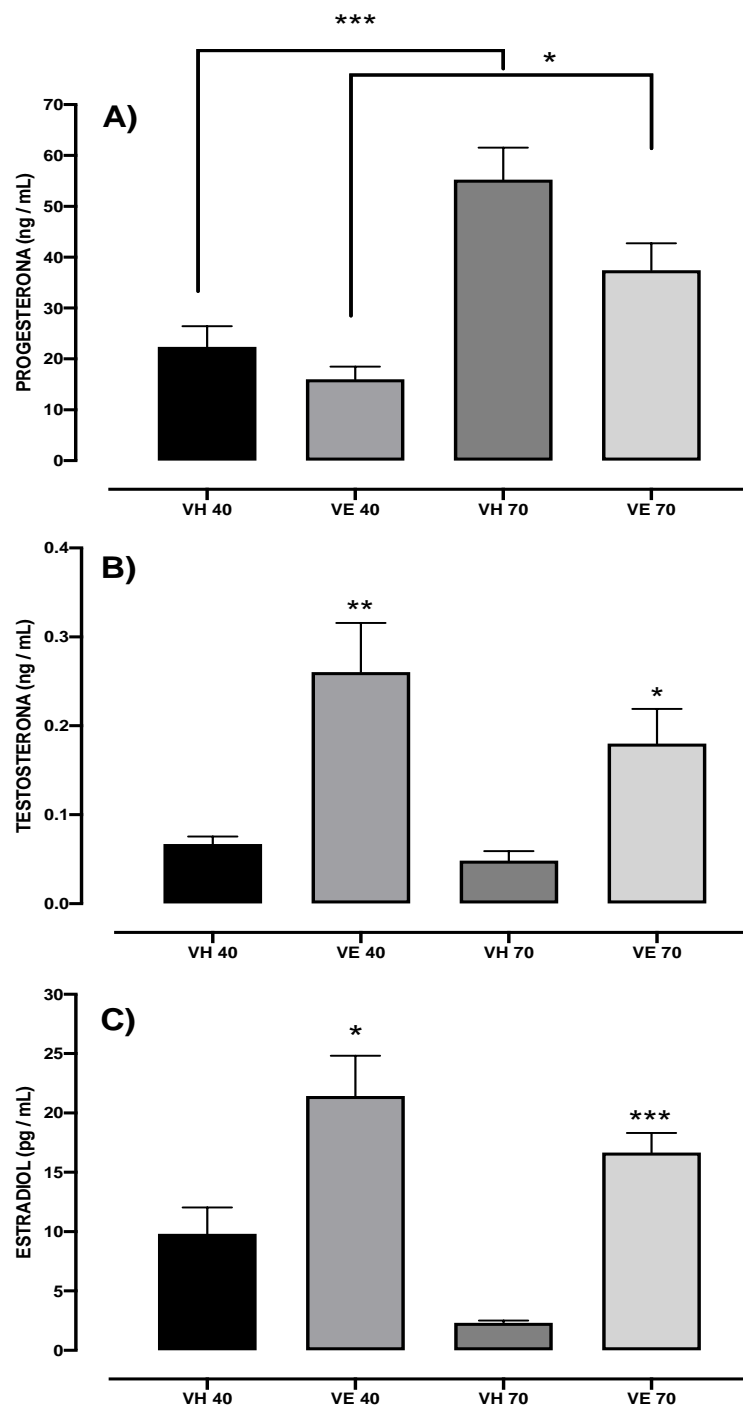


Figura 12: Concentración de hormonas esteroides en ratas con inducción de SOP. La gráfica muestra la media \pm SEM de la concentración de progesterona (A), testosterona (B) y estradiol (C) en suero de animales inyectados con vehículo (Vh) o valerato de estradiol (VE) a los 10 días de edad y sacrificados a los 40 y 70 días de edad en la etapa de estro vaginal * $p < 0.05$ vs Vh40 o Vh70.

Análisis de la expresión transcripcional de genes ováricos en el modelo de VE.

Se presentan las imágenes de los microarreglos de la etapa puberal y adulta después de ser hibridados y revelados (figura 13). En amarillo se presentan los genes expresados normalmente, en rojo los genes sobreexpresados y en verde los reprimidos.

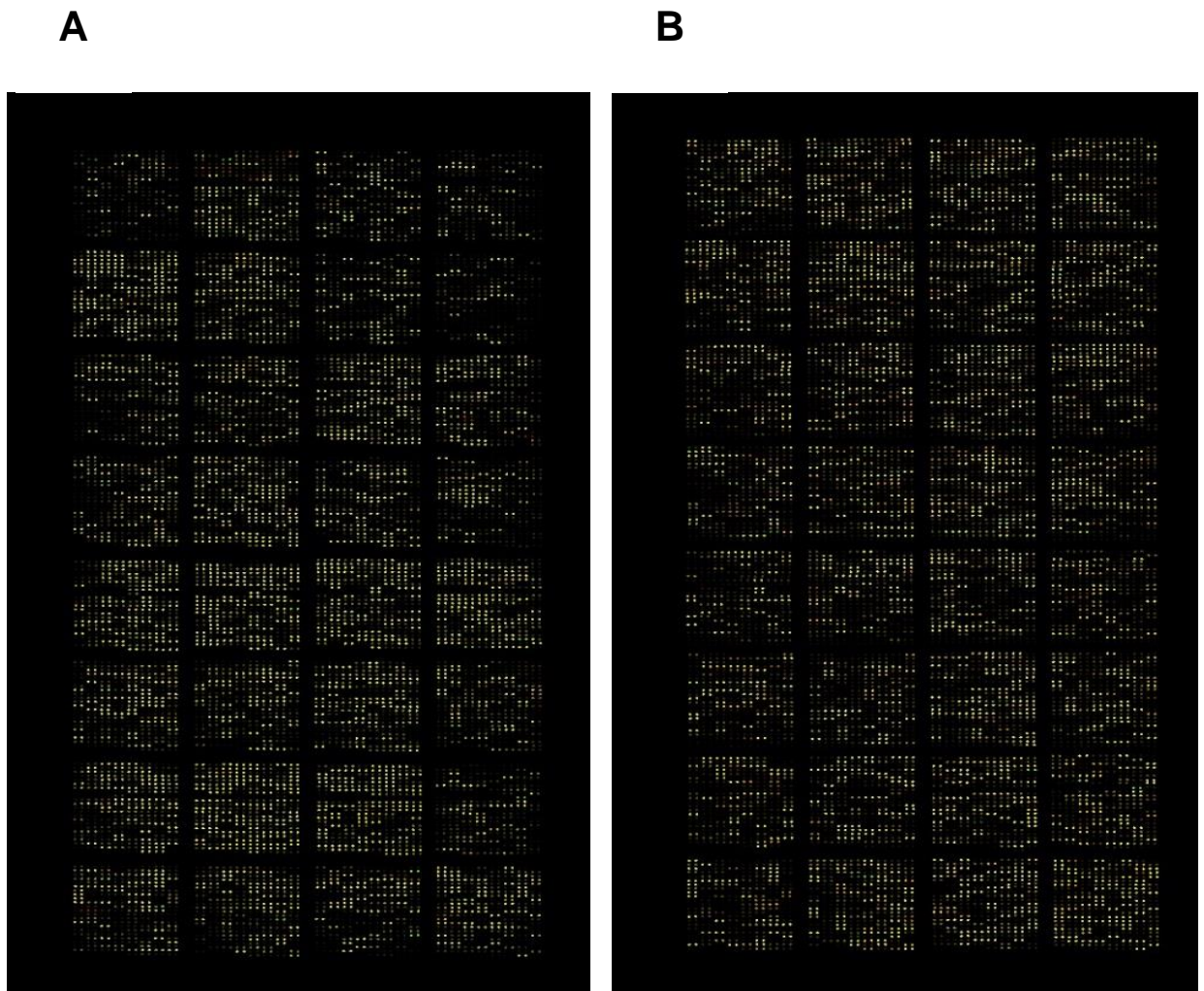


Figura 13 Distribución de spots por microarreglo. En A) se presenta el microarreglo de la etapa puberal (40 días posnatal) al comparar el ARN total de los ovarios de ratas tratadas con Vh o VE a los 10 días postnatal, en B) se presenta el microarreglo de la etapa adulta (70 días posnatal) al comparar el ARN total de los ovarios de las ratas tratadas con Vh o VE a los 10 días postnatal.

En cada microarreglo se hibridaron 5,538 genes, los cuales fueron distribuidos en siete conjuntos de acuerdo con su valor de z score (tabla 4). Al obtener los microarreglos se obtuvo un histograma sobre la tendencia de los genes alterados, basado en la relación entre los grupos Vh y VE tanto de 40 como 70 días, lo cual permitió conocer si existe un patrón en el cambio en la expresión de los genes entre la etapa puberal (etapa temprana del SOP) y la etapa adulta (etapa tardía del SOP).

Tabla 4. Número de genes agrupados por rango dentro de la escala del z score en ambos microarreglos		
Rango por z score	Edad puberal (40 días)	Edad adulta (70 días)
Genes ≤ 2	112	62
Genes entre -1.99 y -1.5	141	160
Genes entre -1.49 y -1.0	451	521
Genes entre -0.99 y +0.99	4098	3958
Genes entre +1.0 y +1.499	406	406
Genes entre +1.5 y +1.99	186	247
Genes $\geq +2$	147	209

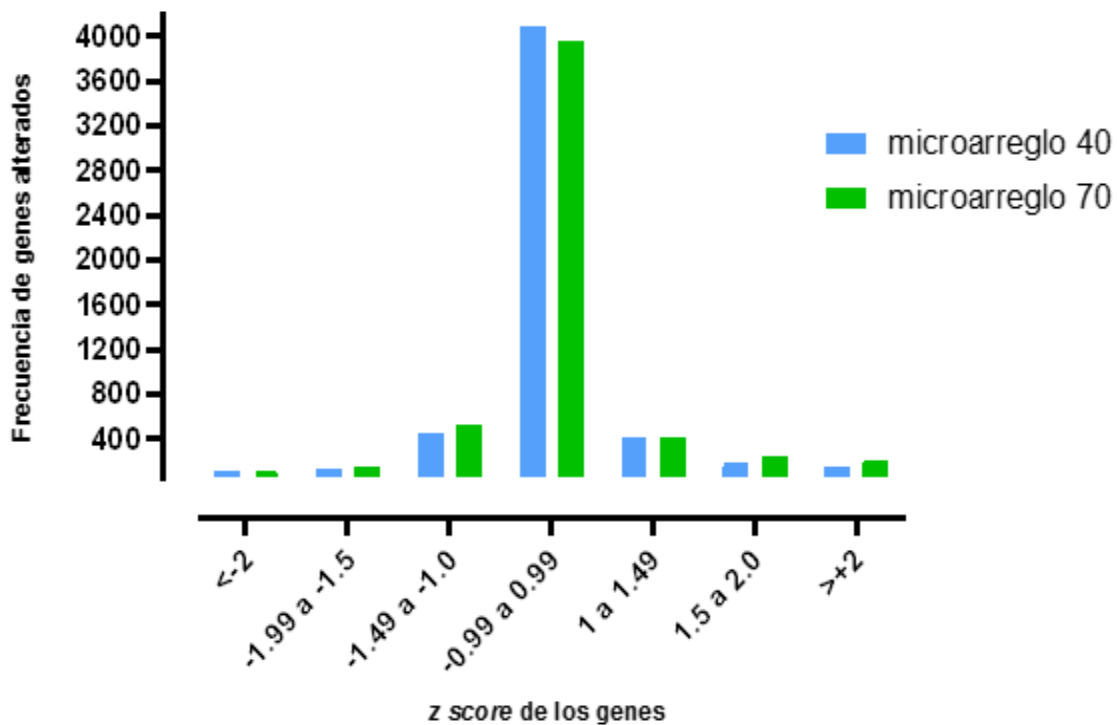


Figura 14. Frecuencia del número de genes por rango de z score (-2 hasta +2) de los microarreglos en la etapa puberal (40 días) y etapa adulta (70 días).

La figura 14 muestra la distribución de los genes, basado en su z score. El 70% de los genes ováricos se expresan de manera normal en la etapa puberal y adulta (4098 genes a los 40 días postnatal y 3958 genes a los 70 días postnatal) de la inducción del SOP, lo cual indica que no hay cambios en su expresión transcripcional, y una menor cantidad (741 genes reprimidos y 739 genes sobreexpresados a los 40 días postnatal; 743 genes reprimidos y 862 genes sobreexpresados a los 70 días postnatal) hacia los extremos, indicando que una menor cantidad de genes se encuentran alterados a la alza y a la baja.

Los resultados indican que hay una diferencia significativa al comparar la suma de genes alterados (z score de -2.0 a -1.0 y de +1.0 a +2.0) entre la etapa puberal con respecto a la etapa adulta (prueba de Fisher $p = 0.0365$), sin embargo, no hay cambios estadísticamente significativos en los genes sobreexpresados o reprimidos en ambas etapas reproductivas (ANOVA de dos vías $p = 0.5107$).

Al tomar el z score mayor o menor a dos, se encontró que de los 5538 genes analizados en el ovario de ratas en la etapa puberal, 112 genes (2.05 %) se encontraron reprimidos y 147 genes (2.65 %) sobreexpresados, mientras que en la etapa adulta 62 genes (1.12 %) están reprimidos y 209 genes (3.78 %) están sobreexpresados (tabla 5). En la etapa adulta hay una mayor cantidad de genes sobreexpresados y una menor cantidad de genes reprimidos respecto a la etapa puberal. El análisis estadístico muestra diferencia significativa al comparar los genes reprimidos y sobreexpresados de la etapa adulta respecto a la etapa puberal (prueba de Fisher $p = 0.0001$).

Tabla 5. Número de genes alterados en ratas con inducción de SOP con VE en cada etapa reproductiva.

Grupo	Etapa puberal (40 días postnatal)	Etapa adulta (70 días postnatal)
Genes ≤ -2 (reprimidos)	112	62*
Genes $\geq +2$ (sobreexpresados)	147	209*
Total	259	271

Prueba de Fisher * $p < 0.0001$

En la tabla 6 se presentan los genes que tuvieron el valor de z score más alto, es decir, los genes que matemáticamente muestran una mayor expresión o represión basada en su valor numérico, pero que no necesariamente se encuentran asociados a vías de señalización que estén relacionadas con procesos a nivel ovárico, sin embargo, no se descarta su participación en la patogénesis del SOP.

Tabla 6. Genes alterados en el tejido ovárico con inducción de SOP

Gen	Etap puberal	Etap adult a	Función
<i>Il12a</i>	-5.7776	-0.0973	Citotoxicidad y cascada de citocinas
<i>HIBADH</i>	-5.5052	-0.7406	Proceso catabólico de la valina
<i>Smstr28</i>	-5.2544	1.1180	Desarrollo cerebral
<i>Pbp</i>	-5.1477	0.5375	Vía de señalización Raf / Mek / Erk
<i>Rpl36a</i>	-5.1281	0.1407	Componente estructural del ribosoma
<i>Ppp1ca</i>	4.85279	0.8384	Vía biosintética del glucógeno
<i>Nup153</i>	4.8501	0.2978	Transporte del RNA mensajero
<i>Chak</i>	4.5245	1.1616	Transporte de iones de calcio
<i>Ttl</i>	4.1172	-0.6448	Tubulina tirosina ligasa
<i>Agpat4</i>	3.9917	0.2066	Metabolismo de glicerolípidos
<i>Arf3</i>	-1.3805	-3.4658	Transporte de vesículas entre Golgi y el Retículo
<i>capn8</i>	-0.4858	-3.3117	Endopeptidasa dependiente de calcio
<i>Arnt1</i>	0.6085	-3.0042	Factor inducible de hipoxia
<i>Pcolce</i>	-0.4444	-2.8519	Factor inhibidor de leucemia
<i>Itih4</i>	-0.7414	-2.8161	Actividad inhibidora de endopeptidasa
<i>Chrn4</i>	0.6864	3.9086	Actividad inhibidora de acetilcolina
<i>Arhgef9</i>	0.3507	3.6572	Intercambio de guanil-nucleótidos de Rho
<i>Atp5g3</i>	0.1520	3.6166	Asociado a Alzheimer
<i>Gusb</i>	1.7076	3.5510	Vía metabólica de la porfiria
<i>Rln1</i>	0.0909	3.509	Asociado a proteínas G y adenilato ciclasa

Vías metabólicas o cascadas de señalización en las que participan los genes alterados de la etapa puberal (etapa temprana del SOP) relacionadas con la función ovárica.

Se analizaron las vías metabólicas o cascadas de señalización en donde participan los genes alterados de la etapa puberal, y que están relacionados con los procesos de la función ovárica que pudieran contribuir en el desarrollo del SOP en el modelo del VE.

De los 259 genes alterados en la etapa puberal, el programa DAVID identificó el ID de 133 genes (61.6 %) y se realizó un análisis funcional de las vías con ayuda del programa KEGG con una permisividad del 70%, donde se encontró que los genes alterados intervienen en 127 vías metabólicas o de señalización.

A partir de las vías metabólicas y de señalización propuestas por el programa, se hizo un análisis de aquellas que participan en las funciones del ovario, y como resultado se obtuvo que solo seis participan de forma directa e indirecta (tabla 7).

Entre las vías alteradas se encuentran aquellas en donde se sintetiza (figura 15) y actúa el estradiol (figura 16), genes alterados relacionados con factores hormonales como la liberación de GnRH (figura 17), genes que participan en la maduración de los ovocitos (figura 18), sinapsis dopaminérgica (figura 19) y serotoninérgica (figura 20).

Tabla 7. Genes alterados que participan en las vías metabólicas que regulan las funciones ováricas en la etapa puberal.

Vía metabólica	Genes alterados y función molecular
Esteroidogénesis ovárica	<i>Bmp 15</i> (↓) proceso de maduración de folículos <i>Igf1r</i> (↑) receptor a insulina
Estradiol	<i>Gabbr1</i> (↑) receptor GABA acoplado a proteína G <i>Gnai2</i> (↑) participa en la vía de señalización de acetilcolina <i>Grm1</i> (↓) unión al receptor de E2
Liberación de GnRH	<i>Cacna1c</i> (↓) participa en la sinapsis, canal de Ca ²⁺ <i>Mmp14</i> (↓) participa en la liberación de GnRH <i>Gna 11</i> (↑) vía de señalización de acetilcolina
Meiosis de ovocitos	<i>Ppp2cb</i> (↓) vía de señalización de dopamina <i>Igf1r</i> (↑) receptor a insulina <i>Ppp1ca</i> (↑) Vía de señalización de AMPK
Sinapsis de serotonina	<i>Htr1a</i> (↓) receptor de serotonina acoplado a la proteína G <i>Cacna1c</i> (↓) participa en la sinapsis, canal de Ca ²⁺ <i>Maob</i> (↓) regulación negativa de la secreción de serotonina <i>Htr3a</i> (↑) canal dependiente de serotonina <i>Gnai2</i> (↑) participa en la vía de señalización de acetilcolina <i>Ddc</i> (↑) vía biosintética de catecolaminas
Sinapsis dopaminérgica	<i>Maob</i> (↓) regulación negativa de la secreción de serotonina <i>Ppp2cb</i> (↓) vía de señalización de dopamina <i>Cacna1c</i> (↓) participa en la sinapsis, canal de Ca ²⁺ <i>Gnai2</i> (↑) participa en la vía de señalización de acetilcolina <i>Ddc</i> (↑) actividad descarboxilasa <i>Ppp1ca</i> (↑) Vía de señalización de AMPK
El símbolo (↓) significa que el gen está reprimido, mientras que (↑) significa que el gen está sobreexpresado.	

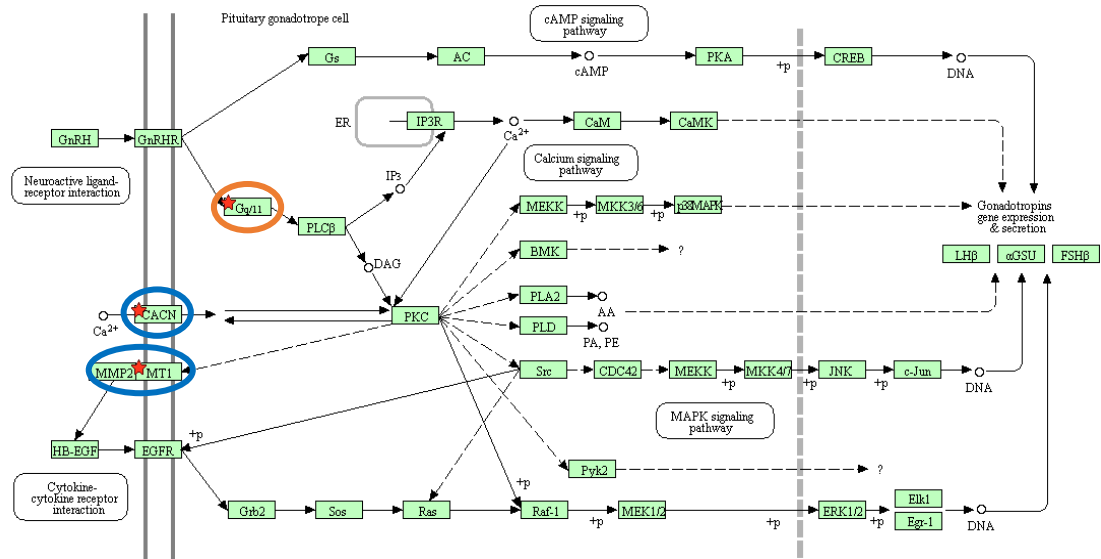


Figura 17. Genes alterados en el ovario de ratas tratadas con VE (40 días posnatal) que participan en la vía de la liberación de GnRH. En el esquema se muestran los productos de los genes (recuadro verde), en asterisco rojo y elipse azul se muestran los genes reprimidos y en asterisco rojo y elipse naranja los genes sobreexpresados. Las flechas continuas muestran la activación de la cascada y las discontinuas son los efectos indirectos.

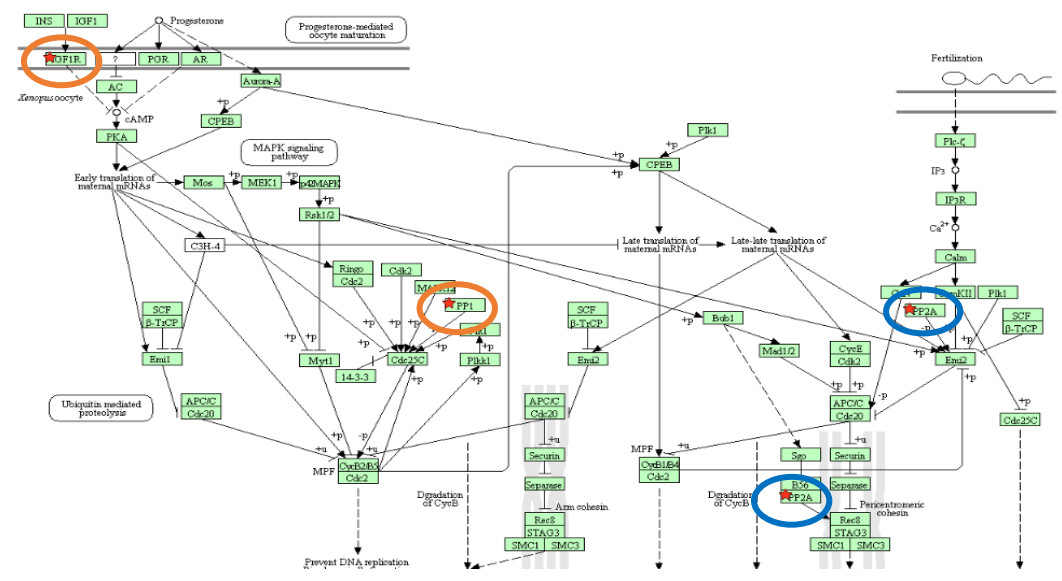


Figura 18. Genes alterados en el ovario de ratas tratadas con VE (40 días posnatal) que participan en la vía de la meiosis de los ovocitos. En el esquema se muestran los productos de los genes (recuadro verde), en asterisco rojo y elipse azul se muestran los genes reprimidos y en asterisco rojo y elipse naranja los genes sobreexpresados. Las flechas continuas muestran la activación de la cascada y las discontinuas son los efectos indirectos.

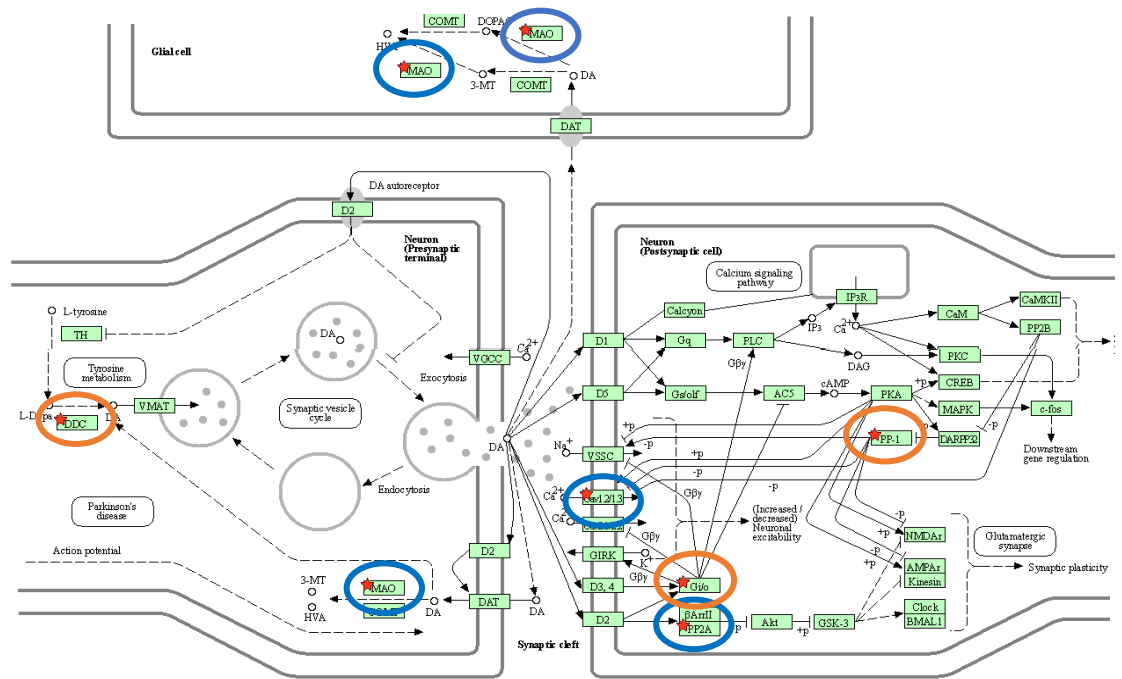


Figura 19. Genes alterados en el ovario de ratas tratadas con VE (40 días posnatal) que participan en la vía ligada a la sinapsis de dopamina. En el esquema se muestran los productos de los genes (recuadro verde), en asterisco rojo y elipse azul se muestran los genes reprimidos y en asterisco rojo y elipse naranja los genes sobreexpresados. Las flechas continuas muestran la activación de la cascada y las discontinuas son los efectos indirectos.

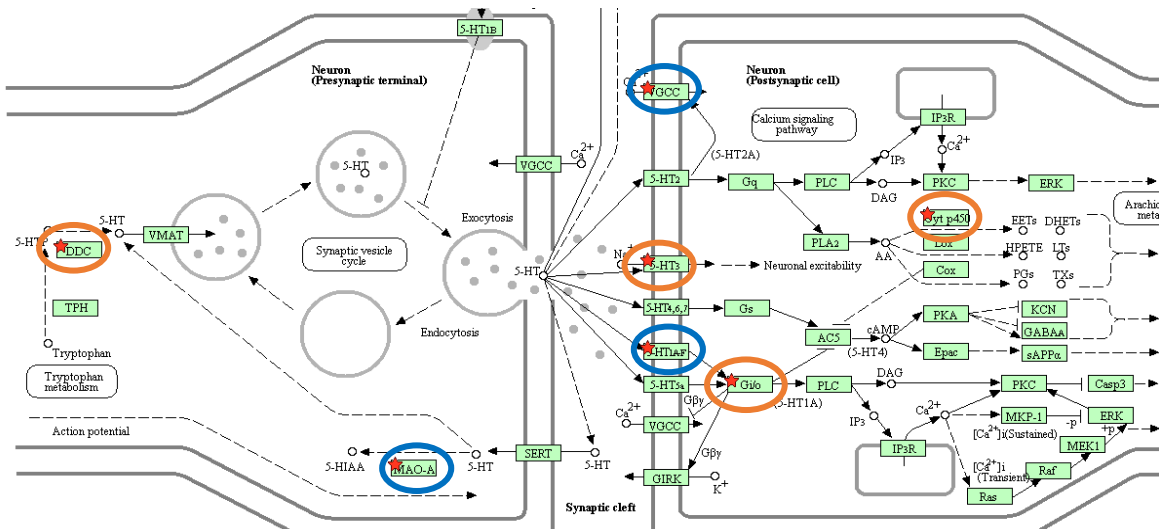


Figura 20. Genes alterados de ovario de ratas tratadas con VE (40 días posnatal) que participan en la vía de la sinapsis de serotonina. En el esquema se muestran los productos de los genes (recuadro verde), en asterisco rojo y elipse azul se muestran los genes reprimidos y en asterisco rojo y elipse naranja los genes sobreexpresados. Las flechas continuas muestran la activación de la cascada y las discontinuas son los efectos indirectos.

Los genes que se encuentran reprimidos en la etapa temprana del SOP en el modelo de VE y que participan en vías de señalización relacionadas con el ovario son: el gen *Bmp15* que codifica para la proteína morfogenética ósea 15 (BMP-15) y que participa en la maduración y desarrollo folicular asociada a la vía de señalización de la síntesis del estradiol (figura 16); el gen *Grm1* que codifica para el receptor metabotrópico a glutamato 1 (mGluR1a) que participa la vía de señalización del E2 (figura 16); el gen *Cacna1c* que codifica para la subunidad alfa 1 del canal de calcio dependiente de voltaje (CACN) y que participa en la vía de señalización para la liberación de GnRH (figura 17); el gen *Mmp14* que codifica para la metalopeptidasa de matriz 14 (MT1-MMP2) y que participa en la vía de liberación de GnRH (figura 17); el gen *Ppp2cb* que codifica para la subunidad catalítica beta de la proteína fosfatasa 2 (PP-2) y que participa en la vía de señalización de la meiosis de los ovocitos (figura 18) y la sinapsis de la dopamina (figura 19); el gen *Htr1a* que codifica para el receptor 1A de la 5-hidroxitriptamina (5-HT₁) y que participa en la sinapsis serotoninérgica (figura 20); y el gen *Maob* que codifica para la monoamino oxidasa B (MAO_B) que participa en el metabolismo de la dopamina (figura 19) y serotonina (figura 20).

Vías metabólicas o cascadas de señalización en las que participan los genes alterados de la etapa adulta (etapa tardía del SOP) relacionadas con la función ovárica.

Se analizaron las vías metabólicas o cascadas de señalización en donde participan los genes alterados de la etapa adulta y que están relacionados con los procesos de la función ovárica que pudieran contribuir en el desarrollo del SOP en el modelo del VE.

De los 271 genes alterados en la etapa puberal, se generó una lista que fue cargada en el programa DAVID y se realizó un análisis funcional de las vías con ayuda del programa KEGG con una permisividad del 70%, donde se encontró que los genes alterados intervienen en 131 vías metabólicas o de señalización.

Tabla 8. Genes alterados que participan en las vías metabólicas que regulan las funciones ováricas en la etapa adulta.

Vía metabólica	Genes alterados y función molecular
Esteroidogénesis	<i>17BHSD12</i> (↑) síntesis de estradiol
Vía del estradiol	<i>Gnai3</i> (↑) factor de crecimiento epidérmico <i>Calm2</i> (↓) vía de señalización dependiente de calcio <i>Hspa2</i> (↑) Vía de degradación asociada al retículo endoplásmico <i>Pik3r2</i> (↑) fosforilación de fosfatidilinositol
Vía de señalización de prolactina	<i>Ccnd1</i> (↑) respuesta a la corticosterona <i>Lhcgr</i> (↑) receptor a la hormona LH <i>Mapk10</i> (↑) fosforilación de JUN <i>Pik3r2</i> (↑) fosforilación de fosfatidilinositol
Vía de señalización de neurotrofinas	<i>Pdpk1</i> (↑) unión al receptor de insulina <i>Sh2b1</i> (↑) vía del sistema de leptina <i>Cam2ka</i> (↑) vía de señalización dependiente de calcio <i>Calm2</i> (↓) Señalización de AMPK <i>Mapk10</i> (↑) fosforilación de JUN, cinasa <i>Ntrk1</i> (↑) proteína quinasa activada por mitógeno <i>Pik3r2</i> (↑) Participa en la fosforilación de fosfatidilinositol <i>Sort1</i> (↑) vía de señalización del factor neurotrófico
Vía de señalización que participa en la maduración del ovocito	<i>Gnai3</i> (↑) factor de crecimiento epidérmico <i>Pik3r2</i> (↑) fosforilación de fosfatidilinositol <i>Mapk10</i> (↑) fosforilación de JUN, cinasa
Vía de la GnRH	<i>Cam2ka</i> (↑) vía de señalización dependiente de calcio <i>Calm2</i> (↓) señalización de AMPK <i>Gna11</i> (↑) vía de señalización de acetilcolina <i>Mapk10</i> (↑) fosforilación de JUN, cinasa
Sinapsis dopaminérgica	<i>Gnai3</i> (↑) vía de señalización de neuroregulina <i>Gnb2</i> (↑) actividad reguladora del canal de calcio

	<p><i>Cam2ka</i> (↑) señalización de AMPK</p> <p><i>Calm2</i> (↓) señalización de AMPK</p> <p><i>Comt</i> (↑) deficiencia de dopamina beta-hidroxilasa</p> <p><i>Cacna1a</i> (↑) participa en la sinapsis, canal de Ca²⁺</p> <p><i>Mapk10</i> (↑) fosforilación de JUN, cinasa</p>
Sinapsis de GABA y serotonina	<p><i>Gnai3</i> (↑) vía de señalización de neuroregulina</p> <p><i>Gnb2</i> (↑) actividad reguladora de los canales de calcio.</p> <p><i>Cacna1a</i> (↑) participa en la sinapsis, canal de Ca²⁺</p>
<p>El símbolo (↓) significa que el gen esta reprimido, mientras que (↑) significa que el gen está sobreexpresado.</p>	

A partir de las vías metabólicas y de señalización propuestas por el programa, se hizo un análisis de aquellas que participan en las funciones del ovario, y como resultado se obtuvo que solo nueve participan de forma directa e indirecta (tabla 8).

Entre las vías alteradas en donde participan los genes alterados se encuentran la esteroidogénesis (figura 21), señalización del E2 (figura 22), vía de señalización de la prolactina (figura 23), vía de señalización de las neurotrofinas (figura 24), vía de señalización de la maduración del ovocito (figura 25), vía de señalización de la liberación de GnRH (figura 26), sinapsis dopaminérgica (figura 27), GABAérgica y serotoninérgica.

En la etapa adulta se encuentra sobreexpresado el gen *Hsd17b12* que codifica a la enzima 17-β hidroxisteroide deshidrogenasa 12 (17BHSD12) y que participa en la esteroidogénesis ovárica (figura 21); el gen *Gnai2* que codifica para la subunidad alfa i2 de las proteínas G (Gi/o) y que participa en la vía de señalización del E2 (figura 22) y la sinapsis dopaminérgica (figura 27); el gen *Hspa2* que codifica para el miembro 2 de la familia de proteínas de choque térmico A (HSP70) y que participa con la vía de señalización del E2 (figura 22); el gen *Pik3r2* que codifica para subunidad 2 reguladora de fosfoinositido-3-quinasa (PI3K) y que participa en la señalización del estradiol (figura 22), prolactina (figura 23), neurotrofinas (figura 24) y maduración del ovocito (figura 25); el gen *Ccnd1* que codifica para la proteína

ciclina D1 y que participa en la vía de señalización de la prolactina (figura 23); el gen *LHcgr* que codifica para el receptor de la hormona LH o coriogonadotropina (LH-R) y que está relacionada con la vía de señalización de la prolactina (figura 23); el gen *Mapk10* que codifica para la proteína quinasa 10 activada por mitógenos (MAPK) y que participa en la vía de maduración del ovocito (figura 25) y en la sinapsis dopaminérgica (figura 27); el gen *Pdk1* que codifica para la proteína quinasa-1 dependiente de 3-fosfoinositido (PDK) y que participa de señalización de las neurotrofinas (figura 24); el gen *Sh2b1* que codifica para la proteína adaptadora SH2B1 y que participa en la vía de señalización de las neurotrofinas (figura 24); el gen *Cam2ka* que codifica para la proteína quinasa II alfa dependiente de calcio / calmodulina (CAMK) y que participa de señalización de las neurotrofinas (figura 24), liberación de GnRH (figura 26) y sinapsis dopaminérgica (figura 27); el gen *Ntrk1* que codifica para receptor neurotrófico tirosina quinasa 1 (TrkA) y que participa de señalización de las neurotrofinas (figura 24); el gen *Sort1* que codifica para sortilina 1 (TrkA) y que participa de señalización de las neurotrofinas asociada con la apoptosis (figura 24); el gen *Gna11* que codifica para la subunidad alfa 11 de las proteínas G (Gq/11) y que participa en la vía de liberación de GnRH (figura 26); el gen *Gnb2* que codifica para la subunidad de la proteína G beta 2 (G) y que participa en la maduración del ovocito mediada por progesterona (figura 25); el gen *Comt* que codifica para la catecol-O-metiltransferasa (COMT) y que participa en la sinapsis dopaminérgica (figura 27); y el gen *Cacna1a* que codifica para la subunidad alfa1 A del canal dependiente de voltaje de calcio (Cav2.1) y que participa en la sinapsis dopaminérgica (figura 27).

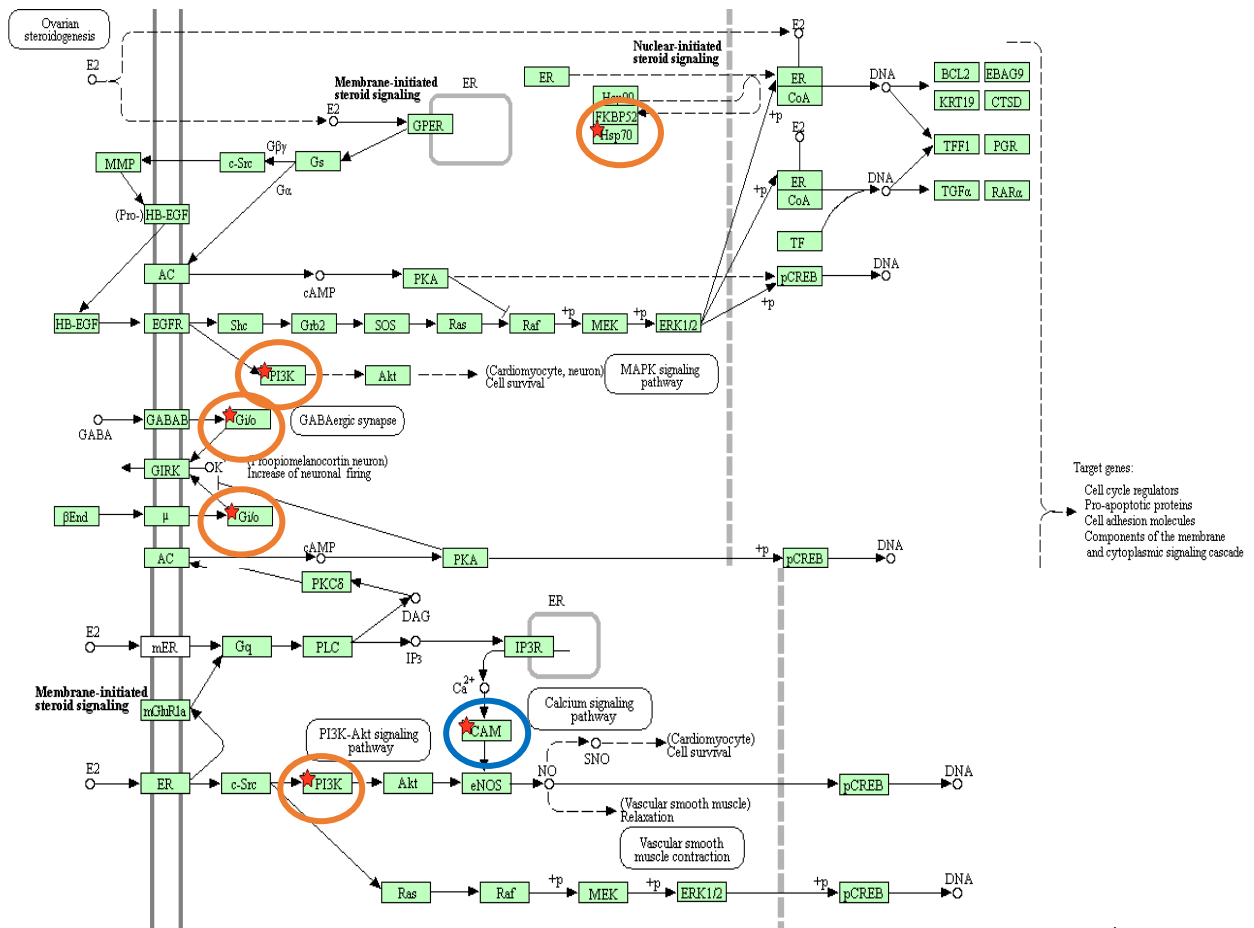


Figura 22. Genes alterados en el ovario de ratas tratadas con VE (70 días posnatal) que participan en la vía de señalización del estradiol. En el esquema se muestran los productos de los genes (recuadro verde), en asterisco rojo y elipse azul se muestran los genes reprimidos y en asterisco rojo y elipse naranja los genes sobreexpresados. Las flechas continuas muestran la activación de la cascada y las discontinuas son los efectos indirectos.

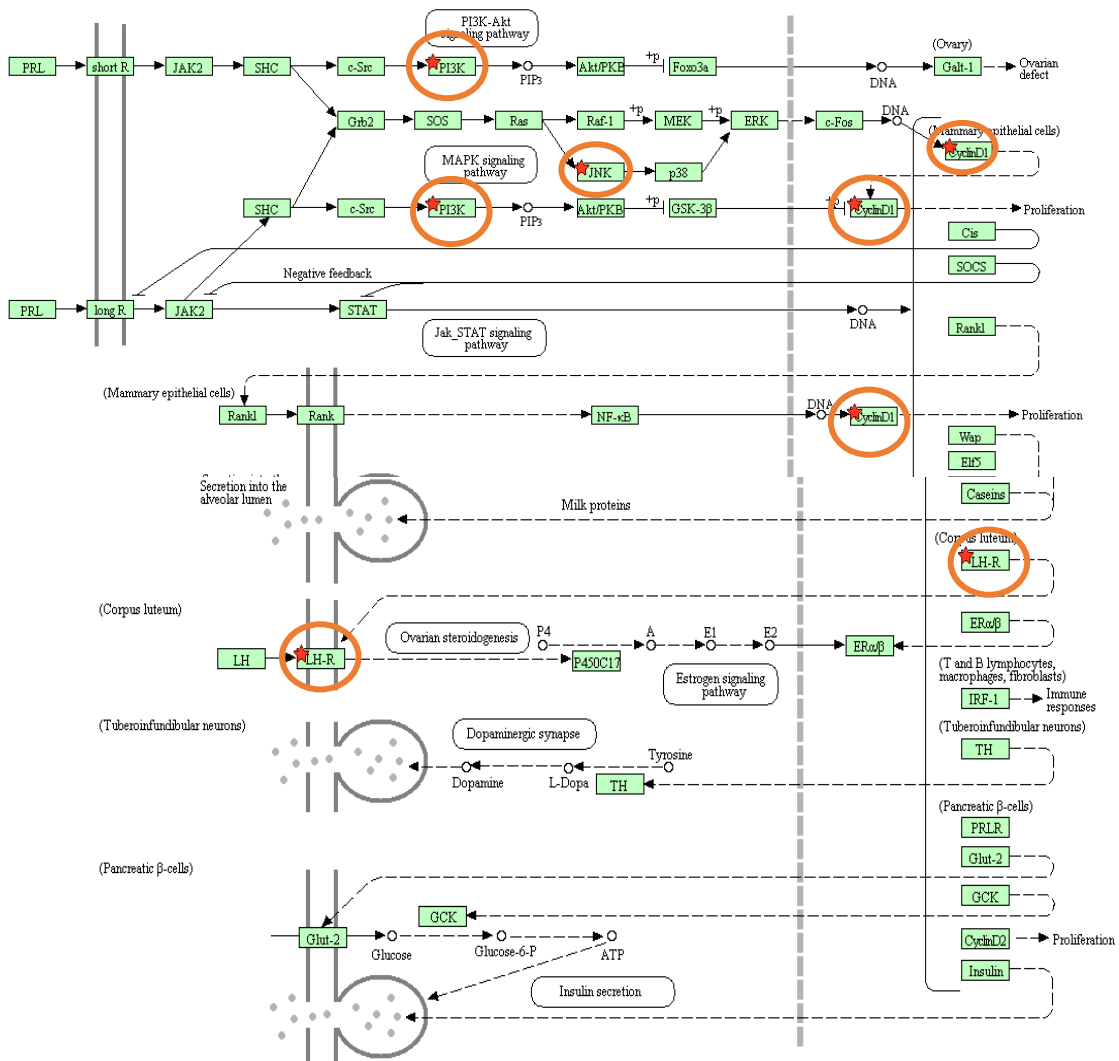


Figura 23. Genes alterados en el ovario de ratas tratadas con VE (70 días posnatal) que participan en la vía de la prolactina. En el esquema se muestran los productos de los genes (recuadro verde), en asterisco rojo y elipse azul se muestran los genes reprimidos y en asterisco rojo y elipse naranja los genes sobreexpresados. Las flechas continuas muestran la activación de la cascada y las discontinuas son los efectos indirectos.

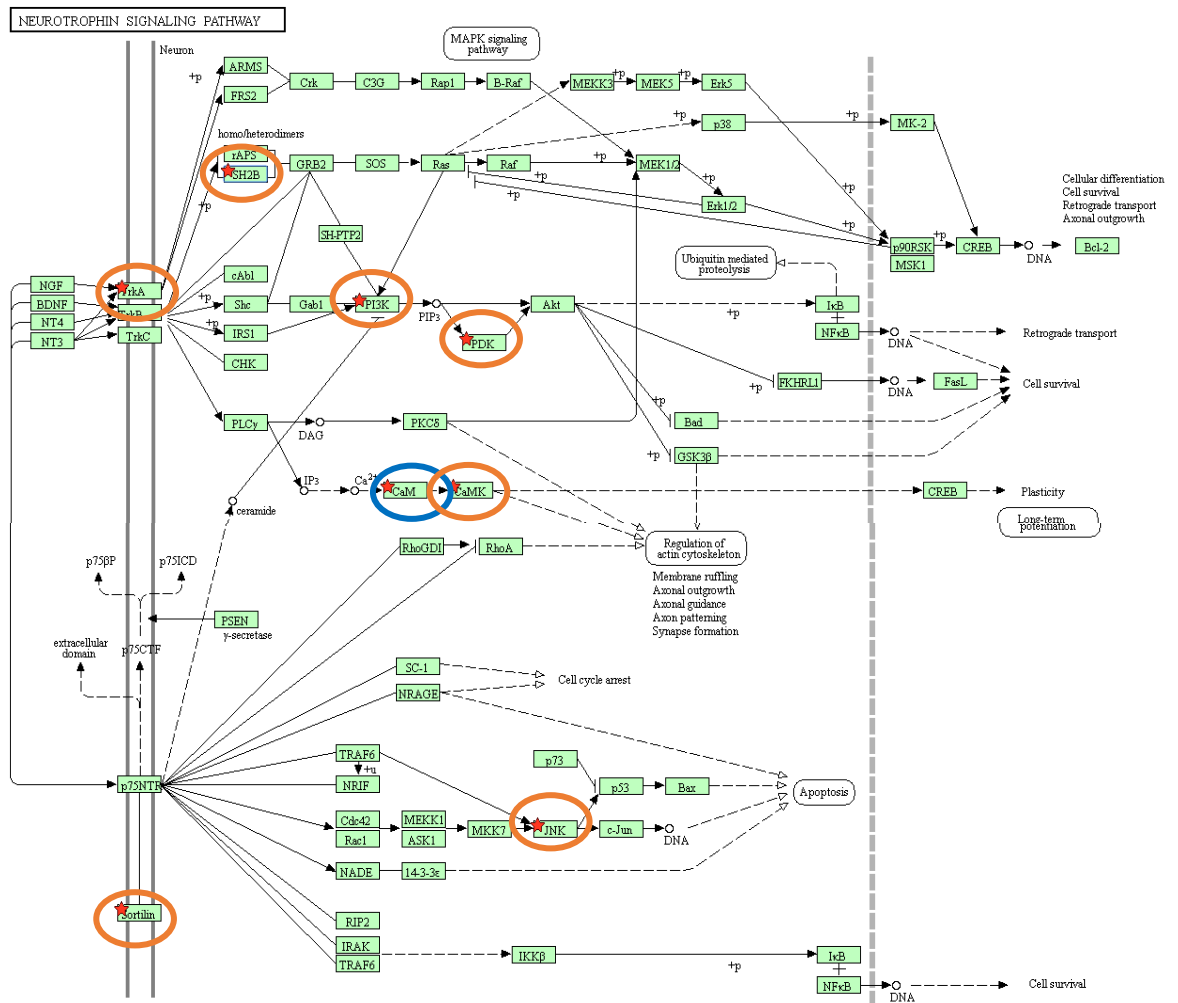


Figura 24. Genes alterados en el ovario de ratas tratadas con VE (70 días posnatal) que participan en la vía de las neurotrofinas. En el esquema se muestran los productos de los genes (recuadro verde), en asterisco rojo y elipse azul se muestran los genes reprimidos y en asterisco rojo y elipse naranja los genes sobreexpresados. Las flechas continuas muestran la activación de la cascada y las discontinuas son los efectos indirectos.

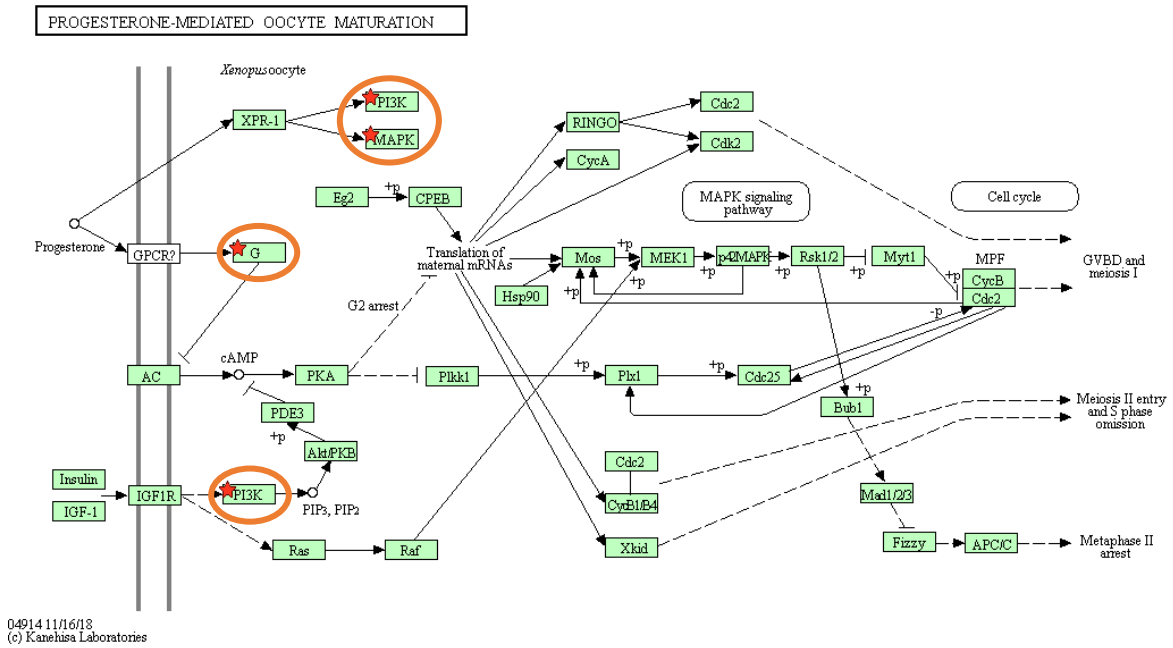


Figura 25. Genes alterados en el ovario de ratas tratadas con VE (70 días posnatal) que participan en la maduración del ovocito. En el esquema se muestran los productos de los genes (recuadro verde), en asterisco rojo y elipse azul se muestran los genes reprimidos y en asterisco rojo y elipse naranja los genes sobreexpresados. Las flechas continuas muestran la activación de la cascada y las discontinuas son los efectos indirectos.

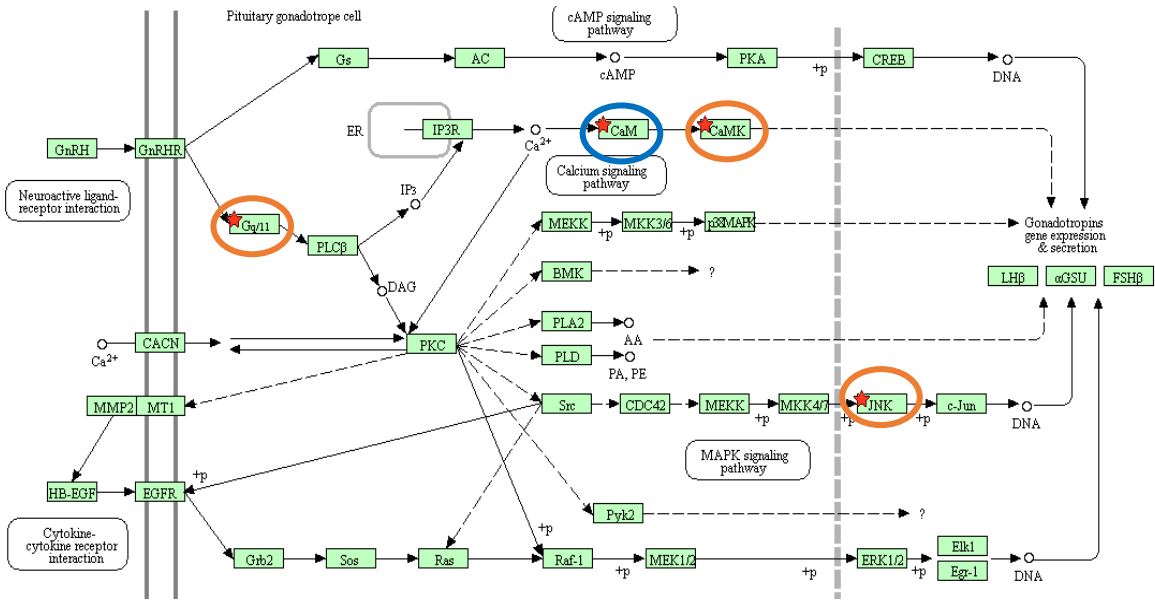


Figura 26. Genes alterados en el ovario de ratas tratadas con VE (70 días posnatal) que participan en la vía de liberación de GnRH. En el esquema se muestran los productos de los genes (recuadro verde), en asterisco rojo y elipse azul se muestran los genes reprimidos y en asterisco rojo y elipse naranja los genes sobreexpresados. Las flechas continuas muestran la activación de la cascada y las discontinuas son los efectos indirectos.

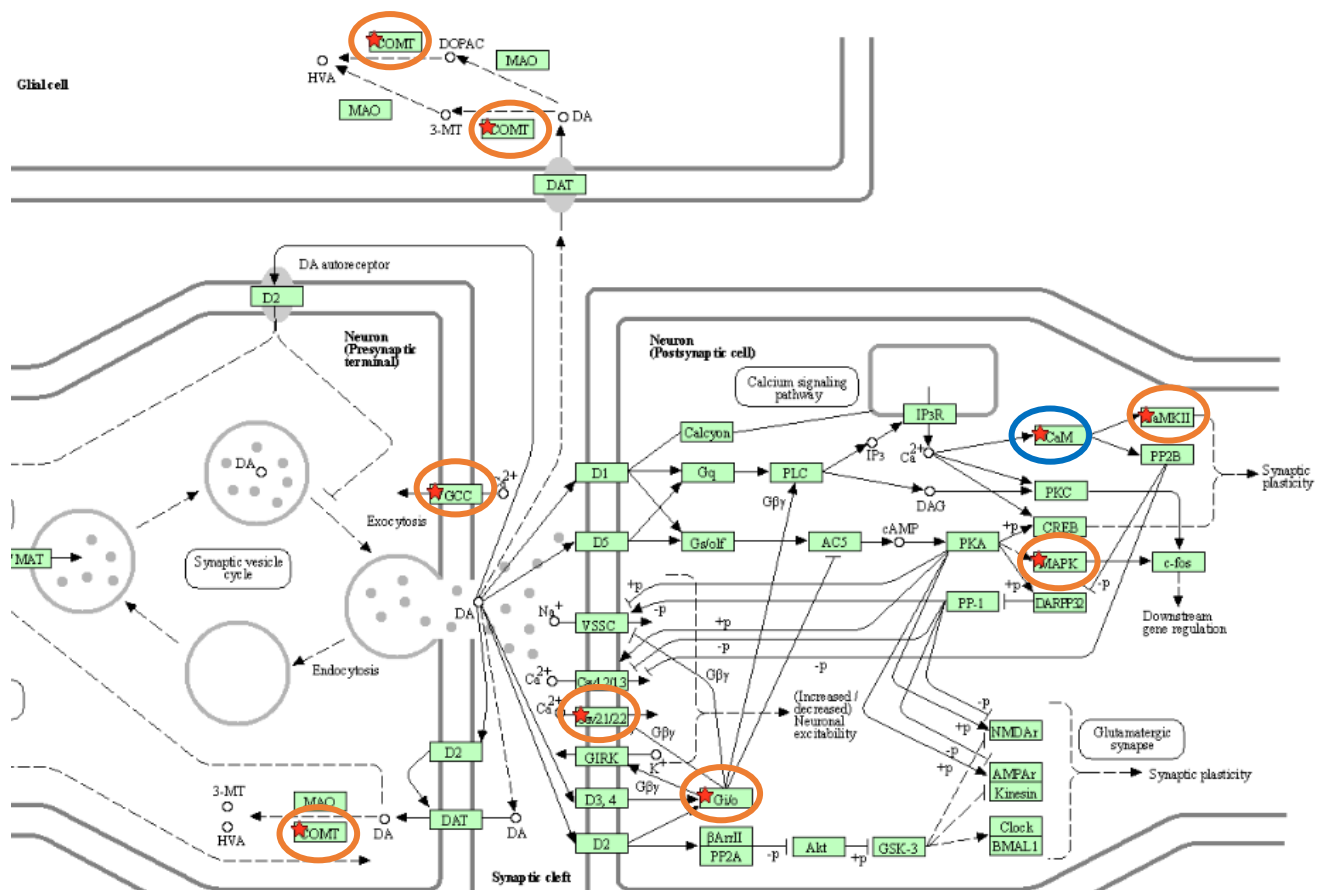


Figura 27. Genes alterados en el ovario de ratas tratadas con VE (70 días posnatal) la sinapsis dopaminérgica. En el esquema se muestran los productos de los genes (recuadro verde), en asterisco rojo y elipse azul se muestran los genes reprimidos y en asterisco rojo y elipse naranja los genes sobreexpresados. Las flechas continuas muestran la activación de la cascada y las discontinuas son los efectos indirectos.

Genes alterados en el modelo de SOP con VE en ambas etapas reproductivas.

Se analizó la diferencia en la expresión de los genes alterados en los animales puberales y adultos. Se tomaron en cuenta aquellos genes alterados que se mantuvieron sobreexpresados o reprimidos en ambas etapas reproductivas o que tuvieron un cambio significativo de una etapa a otra. Los cambios en la expresión de los genes en ambas etapas reproductivas permite inferir cuales pudieran estar asociados con el desarrollo del SOP en el modelo de VE (tabla 9).

Tabla 9. Niveles de expresión de algunos genes posiblemente involucrados en la patogénesis del SOP				
Gen	M. 40	M. 70	Función	Posible hipótesis
<i>Ppp2cb</i>	-4.9714	-0.8001	Vía de señalización de dopamina	Nerviosa
<i>Xbp1</i>	-4.2208	-2.0966	Síntesis de serotonina y reducción de E2 en la granulosa ovárica	Nerviosa/hormonal
<i>Trhr</i>	-3.2084	-2.0034	Receptor a las hormonas tiroides	Hormonal
<i>Calm2</i>	-0.8861	-2.3065	Vía de la calmodulina	nerviosa
<i>Ntrk 1</i>	-0.2234	2.7027	Receptor a neurotrofinas	Nerviosa
<i>Comt</i>	-0.0912	2.3401	Deficiencia de dopamina beta hidroxilasa	Nerviosa
<i>Hsd17b12</i>	-0.0671	3.1833	Síntesis de estradiol a partir de estrona	Hormonal
<i>Gnb2</i>	0.4710	2.1406	Actividad reguladora del canal de calcio	Genética
<i>Camp2k</i>	0.5272	2.2232	Vía del factor de crecimiento transformante beta	Genética
<i>Sh2b</i>	0.5330	2.2275	Vía del Factor de Crecimiento Neural	Nerviosa
<i>lepr</i>	0.6203	-2.3077	Receptor a leptina	Metabólica

<i>Pik3r2</i>	0.6943	2.2217	Vía del estradiol	Hormonal
<i>Hspa2</i>	0.7781	3.4643	Regulación positiva de ATPasas relacionadas a canales de calcio	Genética
<i>LHGCr</i>	0.8330	3.0226	Receptor a la hormona luteinizante	Hormonal
<i>Sort1</i>	0.9060	2.7428	Vía de señalización del factor de crecimiento neural	Nerviosa
<i>Snap25</i>	1.1766	2.3081	Vía de secreción de insulina	Metabólica
<i>Wbp2</i>	1.5181	2.6562	Actividad de coactivador y respuesta a estrógeno	Genético/hormonal
<i>Has2</i>	1.9871	2.1289	Sintetasa de hialuronato	Genética
<i>Gna 11</i>	2.1370	2.5029	Vía de señalización de acetilcolina a través de receptores de acetilcolina muscarínicos	Nerviosa
<i>Ccnd1</i>	2.3593	2.8939	Vía de respuesta a corticoesteroides	Hormonal
<i>Gabbr1</i>	2.6134	1.9439	Subunidad 1 del receptor a GABA	Nerviosa
<i>Ddc</i>	2.9018	1.5881	Dopa descarboxilasa	Nerviosa

Se analizó la diferencia en la expresión de los genes alterados en los animales puberales y adultos. Se tomaron en cuenta aquellos genes alterados que se mantuvieron sobreexpresados o reprimidos en ambas etapas reproductivas o que tuvieron un cambio significativo de una etapa a otra. Los cambios en la expresión de los genes en ambas etapas reproductivas permite inferir cuales pudieran estar asociados con el desarrollo del SOP en el modelo de VE (tabla 9).

Se observó que el gen *Ppp2cb* que estaba reprimido en la etapa puberal, regresó a su valores de expresión transcripcional normales en la etapa adulta. Los genes sobreexpresados en ambas etapas reproductivas fueron: *Gna11*, *Ccnd1*, *Gabbr1* y *Ddc*. Los genes reprimidos en ambas etapas reproductivas fueron *Xbp1* que codifica para la proteína de unión a caja X involucrada en la síntesis de E2 y *Trhr* que codifica

al receptor de la hormona liberadora de la tirotrópina. Los genes que se expresaron de manera normal en la etapa puberal y que se sobreexpresaron en la etapa adulta (etapa tardía del SOP) fueron *Ntrk1*, *Comt*, *Hsd17b12*, *Gnb2*, *Camp2k*, *Sh2b*, *Pik3r2*, *Hspa2*, *LHgc*, *Sort1*, *Snap25*, *Wbp2* y *Has2*. Los genes que se expresaron de manera normal en la etapa puberal y que se reprimieron en la etapa adulta fueron *Calm2* y *Lepr* que codifica para el receptor a leptina.

Los genes que se seleccionaron para realizar los estudios *in silico* fueron los siguientes.

- *17βHSD12*
- *Gna 11*
- *Pik3r2*

Los estudios *in silico* de estos genes, se realizaron con la finalidad de entender el mecanismo por el cual las hormonas esteroideas E2, P y T, pueden ejercer un efecto sobre la actividad a nivel promotor de los genes mencionados ya que estas hormonas tienen la capacidad de regular ciertos grupos de genes (figura 28). Estos cambios a nivel promotor pueden favorecer el proceso de desarrollo y patogénesis del SOP en el modelo estudiado.

El papel de los productos de los genes seleccionados puede influir en las cascadas de señalización que pueden afectar procesos fundamentales que favorezcan la aparición de los signos y síntomas del SOP en nuestro modelo, dando una pauta de cuales son aquellos genes que puedan en un futuro ser partícipes de tratamientos o utilizados como moléculas blanco que sean compartidas entre humanos y roedores con la finalidad de revertir su efecto en el SOP.

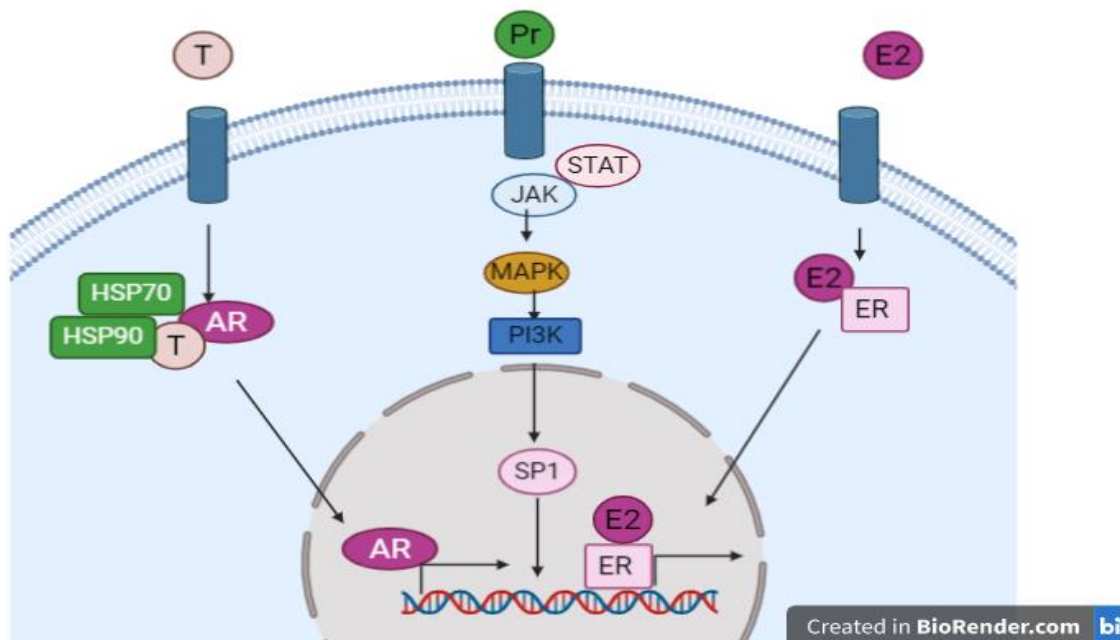


Figura 28. Regulación de genes por medio de las hormonas estradiol, progesterona y testosterona. Tomado de (Connelly *et al.*, 2003, Franks y Hardy, 2018, Hewitt y Korach, 2018).

Análisis de promotores de los genes alterados en el modelo de SOP con VE de ambas etapas reproductivas.

17BHSD12

Para identificar a la región promotora del gen *17BHSD12* se utilizó el programa EPD, posteriormente se identificaron los elementos de respuesta que participan en la regulación transcripcional del gen, sobre todo aquellos que son reconocidos por los receptores nucleares o factores de transcripción que responden a hormonas esteroides ya sea de manera directa o indirecta.

Para este promotor se identificaron elementos de respuesta a los receptores α y β de estradiol, pero no para los receptores de progesterona y testosterona, sin embargo, se localizaron sitios de unión para factores de transcripción que pueden participar de forma indirecta en la regulación transcripcional del gen *17 β HSD12*,

entre ellos tenemos a la proteína específica 1 (SP1), Yin Yang 1 (YY1), receptor a ácido retinoico α (RAR α), factor de transcripción ascendente 1 (USF1) Figura 29.

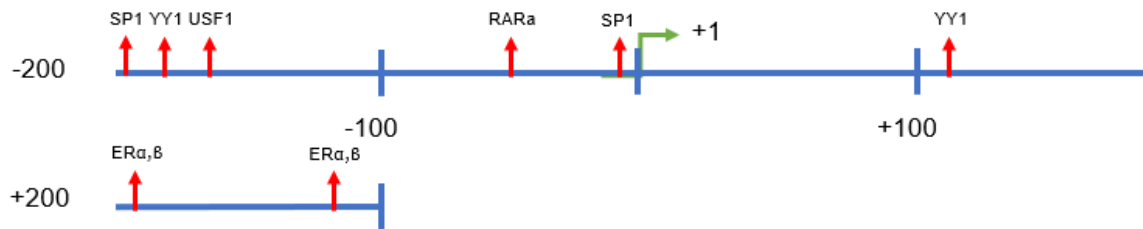


Figura 29. Representación esquemática del promotor del gen 17BHS12, mostrando los elementos de respuesta probables a las hormonas esteroides (estradiol, progesterona y testosterona), el posible sitio de inicio de la transcripción se marca en una flecha verde. Los nucleótidos fueron numerados a partir del sitio +1.

Gna 11

Para identificar el promotor del gen *Gna 11* se utilizó el programa EPD, una vez que se localizó, se identificaron los elementos de respuesta que participan en la regulación transcripcional del gen, con un énfasis a aquellos que son reconocidos por receptores nucleares y por factores de transcripción que presentan una respuesta a estradiol, progesterona y testosterona, ya sea de forma directa o indirecta.

Para este promotor se identificaron elementos de respuesta a los receptores α y β de estradiol, pero no se localizaron para los receptores de progesterona y testosterona, aunque también se localizaron elementos de respuesta al receptor de

Figura 30. Representación esquemática del promotor del gen *Gna 11*, donde se muestran los probables elementos de respuesta a las hormonas esteroides (estradiol, progesterona y testosterona), el posible sitio de inicio de la transcripción se marca en una flecha verde. Los nucleótidos fueron numerados a partir del sitio +1.

glucocorticoides. Por otro lado, se identificaron sitios de unión para factores de transcripción que pueden participar de forma indirecta en la regulación transcripcional de *Gna 11* como lo son: receptor para vitamina D (VDR), SP1, Neurofibromina 1 (NF1), Endonucleasa de reparación de ADN 1 (XPF-1), y el complejo AP2 α .

Pik3r2

El programa EPD localizó la región promotora del gen *Pik3r2*, ulteriormente se localizaron los elementos de respuesta que pueden participar en la regulación transcripcional del gen, con un énfasis en aquellos que son reconocidos por receptores nucleares o factores de transcripción que responden de manera directa o indirecta en respuesta a las hormonas estradiol, progesterona y testosterona.

En el promotor no se identificaron elementos de respuesta a ninguno de los receptores de las hormonas esteroides, pero, se localizaron sitios de unión a factores de transcripción que pueden participar de forma indirecta en la regulación transcripcional del gen *Pik3r2* como lo son VDR, SP1, RxR α y de YY1. Cabe resaltar la presencia de un sitio INR rio arriba de la región del promotor basal (figura 31)

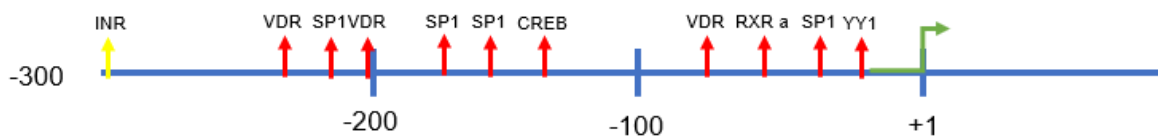


Figura 31. Representación esquemática del promotor del gen *Pik3r2* donde se muestran los probables elementos de respuesta a las hormonas esteroides (estradiol, progesterona y testosterona), el posible sitio de inicio de la transcripción se marca en una flecha verde. Los nucleótidos fueron numerados a partir del sitio +1.

Discusión

El síndrome de ovario poliquístico es una enfermedad compleja que afecta a un porcentaje de entre el 5 y 15% por ciento de la población femenina en edad fértil, (Shi y Vine, 2012), se han caracterizado distintos modelos experimentales entre los cuales se encuentran los roedores (Tarantal y Dumesic, 2009, Franks, 2012, McNeilly y Colin-Duncan, 2013).

El VE es un fármaco utilizado para inducir el fenotipo del SOP (Brawer, 1978) en roedores, el cual se caracteriza por un incremento en la actividad nerviosa simpática, hiperandrogenismo gonadal, cambios en el ciclo estral y anovulación (Mesbah, *et al.*, 2011).

En el pasado diversos estudios han revelado los efectos del VE a nivel nervioso, donde se ha encontrado un incremento en la actividad de las fibras catecolaminérgicas que tienen como órgano diana el ovario, estos estudios soportan la teoría del papel preponderante del sistema nervioso parasimpático sobre la inducción y mantenimiento del SOP además de cómo puede ser una condición reversible en roedores mediante técnicas quirúrgicas y farmacológicas (Mannerås *et al.*, 2009, Morales-Ledesma, *et al.* 2010, Hernández, *et al.*, 2013, Espinoza, *et al.*, 2018, Venegas, *et al.*, 2019).

Sin embargo, existen pocos estudios a nivel genético sobre los efectos del VE en la inducción del SOP en *R. norvegicus*. Es por ello por lo que en este trabajo se evaluaron los efectos del VE a nivel genético en dos etapas postnatales de ratas, siendo establecido el estudio a los 40 días de edad (pubertad) y 70 días de edad (madurez sexual).

Posterior a la administración de 0.2 mg de VE disueltos en 0.1 ml de aceite de sésamo (Brawer, 1978, Ojeda, *et al.*,1988).) a los 10 de edad, se logró establecer una disrupción en el ciclo estral que comenzó 4 días después de la administración del VE con la llegada de la AV. Esta disrupción en el ciclo estral fue observada mediante la cornificación del epitelio vaginal, tanto en los grupos VE40 como VE70.

La disrupción en la citología vaginal ha sido reportada (Brawer, 1978, Picut, *et al.*, 2015), sin embargo, cabe resaltar que los resultados presentados en este trabajo concuerdan con el seguimiento de la citología vaginal en ratas tratadas con VE realizado por Cruz Neculpán (2011) donde se observó que después de la administración de VE existe una alternancia entre diestros y estros vaginales, pero ello dependerá de la dosis y del momento de administración del fármaco.

Es decir, entre más temprana sea la administración de VE, más severos son los daños a nivel hipotalámico que facilitan el establecimiento del modelo experimental, en nuestro trabajo logramos el establecimiento del modelo experimental, sin embargo, desconocemos como el VE afecto la expresión de genes a una edad tan temprana debido a que durante los primeros días de la vida postnatal de las ratas aún existen cambios genéticos que permiten el desarrollo completo de las estructuras a nivel hipotálamo y ovario (Picut, *et al.*, 2015).

Por tanto, desconocemos si la edad de administración de VE a nuestro modelo experimental a la edad de 10 días conlleva una expresión distinta de los genes, que si esta hubiera sido en una edad ya sea mayor o menor en la vida de la rata, como lo menciona Cruz Neculpán (2011). Sin embargo, este estudio se centró en un modelo mayormente utilizado para llevar a cabo la administración de VE.

Al momento del sacrificio se evaluaron los caracteres morfológicos de cada uno de los grupos experimentales, resaltando que al evaluar el peso vivo de los animales existe una diferencia en el peso de los animales VE40 y Vh40, siendo los del grupo VE mayores respecto a su contraparte, sin embargo, esta diferencia entre los pesos puede ser atribuible a condiciones metabólicas y genéticas intrínsecas de las ratas

del grupo VE, ya que de acuerdo con Maliqueo, Benrick y Stener-Victorin, (2014) el VE no favorece el aumento de peso durante el proceso de inducción del SOP o a un efecto temporal de este fármaco en nuestro modelo de estudio dado que esta diferencia de pesos se revierte a los 70 días de edad, siendo pesos relativamente iguales entre los grupos Vh70 y VE70.

La tasa de animales ovulantes fue establecida como un parámetro de la ovulación, en este aspecto los animales del grupo Vh40 presentaron una tasa de ovulación consistente con la literatura sobre el efecto nulo del aceite de sésamo. En cuanto a su contraparte el grupo VE40 presentó ovulación y una disrupción en el ciclo estral, lo cual nos da indicios de que no existe un efecto concluyente del VE en nuestro modelo, lo cual podría indicar que existe cierta resistencia del organismo a la inducción del SOP, por medio del VE, y por tanto pudieran tener tasas ovulatorias espontáneas a lo largo del proceso de inducción del SOP de acuerdo con lo mencionado por Cruz Neculpán (2011). Por tanto, queda dilucidar como se dan los cambios a nivel ovárico inducidos por el VE y en qué edad cesa la ovulación en respuesta a este fármaco.

El grupo Vh70 presentó ovulación, a diferencia del grupo VE donde se reportó que los animales no presentaron ovulación acompañada de una disrupción en el ciclo estral, caracterizado por la cornificación del epitelio vaginal, además de incremento en los niveles de hormonas esteroides T, E2 y P4 lo cual coincide con lo reportado por Brawer, 1978, Brawer y Muñoz, 1986, Ojeda *et al*, 1988).

El peso de los ovarios fue uno de los parámetros tomados para ser evaluados, en el caso entre los grupos Vh40 y VE40 se observa un peso del ovario izquierdo sin diferencias significativas entre ambos, pero en el caso de los ovarios derechos, el tamaño del ovario del grupo VE40 es significativamente menor respecto a su contraparte del grupo Vh concordando con lo reportado por (Brawer, Munoz, y Farookhi, 1986), también se observa que este efecto del VE es replicado en otras especies del orden rodentia como lo demostrado por Amini *et al*. (2016).

Sin embargo, al evaluar el tamaño del peso ovárico respecto a otros modelos experimentales encontramos que de acuerdo con Hossain, *et al*. (2013) existe

también una disminución del peso ovárico al administrar dihidrotestosterona, provocando una disminución gradual en el tiempo, pero no se conoce completamente el porqué sucede y si tiene una relación directa con una mayor cantidad de quistes ováricos que se forman durante el SOP, sin embargo, el cambio en el peso ovárico parece variar de acuerdo al fármaco utilizado. En el trabajo de Kim *et al.* (2018) la administración diaria de DHEA en ratas prepuberales favorece un aumento en el tamaño ovárico, debido a la presencia de quistes.

Este efecto parece repetirse en los ovarios de los grupos Vh70 y VE70 donde los ovarios presentan una diferencia estadísticamente significativa. Los ovarios del grupo VE70 son menores en tamaño a su contraparte del grupo control, esto puede ser atribuido a la anovulación y formación de quistes en los ovarios, los cuales pudieron disminuir su volumen, en comparación a ovarios funcionales.

Además, se hipotetiza que esta disminución del peso ovario en este modelo en particular se deba al papel que puedan desempeñar las fibras catecolaminérgicas que tienen llegan al ovario, sin embargo, se debe profundizar más en este modelo de estudio para entender el proceso de disminución de peso en los ovarios tratados con VE. Finalmente, a los 70 días de edad esta disminución del peso ovárico concuerda con el trabajo de Amini *et al.* (2016) donde existe una disminución del peso ovárico conforme avanza el tiempo, esta disminución afecta la función ovárica y las tasas de ovulación.

Al evaluar las glándulas adrenales que participan en el proceso de esteroidogenesis independiente de FSH y LH, se encontró que las adrenales de todos los grupos permanecieron sin diferencias estadísticamente significativas, lo cual nos dio como resultado de que el efecto del VE no es a nivel sistémico, sino que afecta solamente a los ovarios, lo cual corresponde a los resultados presentados por Stener-Victorin, Ploj, Larsson y Holmäng (2005).

Al evaluar la concentración de las hormonas esteroides, tomamos en cuenta que los niveles de expresión de E2, T y P4 se encuentran ligados entre sí, ya que estas hormonas se sintetizan en las células de la teca y la granulosa en una serie de pasos enzimáticos en cascada (Mooradian *et al.*, 1987; Miller, 2002).

En el caso de la hormona progesterona encontramos que existe un aumento en el grupo Vh70, y que existe también un incremento en su contraparte de VE70 días, este comportamiento está reflejado a los 40 días en ambos grupos, sugiriendo como la literatura lo menciona que existen cambios sustanciales en la síntesis de progesterona y por ende, algo sucede a nivel genético que cambia el proceso de esteroidogénesis, sin embargo, poco sabemos de qué puede ocurrir en la rata durante el periodo puberal, el aumento de progesterona tiene efectos sobre la implantación del ovocito fecundado, (Bancroft, 2009).

Sin embargo, ¿este cambio puede inhibir la respuesta de algunos genes relacionados a este proceso?, debido a la gran cantidad de elementos de respuesta que son participes de su vía de señalización como AF1 y AF2, (Conneely *et al.*, 2003)., en ratas se han reportado cambios en los niveles de expresión de P4 en ratas tratadas con VE, notificando un cambio en el modelo a la edad adulta (Fakhroddin, *et al.*, 2015). Por tanto, no podemos concluir el efecto de la P4 en el SOP en nuestro modelo, sin caracterizar a la totalidad todos los genes de dicha vía.

La concentración de testosterona comprueba el hiperandrogenismo gonadal propuesto por diversos autores (Brawer, 1978, Brawer y Muñoz, 1986) y respaldado por diversos autores donde se sabe que existe un aumento, en los niveles de testosterona tanto en humanos como en modelos animales.

El aumento de testosterona en suero fue consistente con lo reportado previamente, tanto en nuestro grupo experimental de 40 y de 70 días, este aumento de testosterona favorece la desregulación de los mecanismos endocrinos de control de la ovulación y que favorece el hiperandrogenismo gonadal, sin embargo, en nuestro trabajo encontramos que a los 40 días de edad este aumento, lejos de hacer una disrupción en la ovulación, permitió este proceso. No obstante, desconocemos los mecanismos que permiten la ovulación en la etapa puberal (40 días) y como la inhiben a los 70 días.

Sugerimos profundizar en el estudio de los cambios a nivel genético que permiten este proceso y como se ven afectados a lo largo del tiempo, y nos deja con interrogantes como ¿cómo se dan estos cambios que permitieron la ovulación en

40 días, pero no en 70? Que mecanismo es aquel que pudiera regular el proceso del hiperandrogenismo, ¿a qué escala actúa? Y cuando comienza su activación, aunado a ello se sugiere que pudiera tratarse de un hiperandrogenismo funcional (Morreale, *et al.*, 2005) como se sugiere en algunos casos debido a que nuestros animales de 40 días si ovularon, entonces podremos sugerir que el hiperandrogenismo disfuncional no se da en las primeras etapas de la pubertad, en nuestro modelo, sino que puede ser que este surja en etapas más adultas. Esto se corresponde con los aumentos en la expresión de genes en ambos microarreglos, sin embargo, desconocemos si algún gen desregulado tenga una mayor influencia sobre la síntesis de las hormonas esteroides.

En nuestro trabajo se observa un incremento, en concentración de E2 en el grupo Vh40, esto se cree pueda deberse al inicio de la pubertad y por ende el comienzo de la activación del eje HAO que comienza con la retroalimentación positiva y negativa que regula el funcionamiento de este, esta hormona participa además en la liberación del ovocito competente (Hillier y Tetsuka, 1997). Sin embargo, hacia los 70 días su expresión en el grupo control disminuye, porque el feedback de estradiol está bien regulado, sin embargo, en los grupos de VE de 40 y 70 días se observa un aumento en los niveles de E2, siendo este más pronunciado a los cuarenta días, lo cual desconocemos si pudiera darse debido a un intento del eje por restablecer la funcionalidad del mismo, a los 70 días podemos correlacionarlo con el aumento en la expresión de los genes que se encargan de su síntesis, pero no podemos aun conocer si existen otros genes involucrados en el aumento de E2 y como el microambiente celular en condiciones de SOP favorece su liberación.

El análisis del microarreglo de expresión de 40 días (Vh40 vs VE40) muestra un total de 259 genes que no se expresan de forma normal en esta etapa, siendo que 112 genes se encuentran desregulados a la baja y 147 se encuentran desregulados al alza. Estos genes pertenecen a distintas vías de señalización entre las cuales se incluyen esteroidogénesis ovárica, señalización de estradiol y meiosis de ovocitos.

En el caso de los genes que presentaron una desregulación a la baja se encuentran genes que como *Il12a* (Rat Genome Database, s.f) que participa en procesos

inflamatorios y con señalización dependiente de citocinas, *Rpl36a* (Rat Genome Database, s.f) que es un componente estructural en la estructura del ribosoma, en tanto los genes cuya expresión al alza fue más aberrante incluye a *Ppp1ca* involucrado en la vía biosintética del glucógeno, *Ttl* involucrado en los procesos de actividad de tirosina ligasa (Rat Genome Database, s.f) . En nuestro estudio estos genes no parecieran tener una relación fisiológica a los procesos fisiológicos en el ovario y no existe información que los asocie al SOP, pero de manera interesante estos genes presentan el score más alterado, lo cual podría indicarnos que existen cambios a nivel ovárico que no han sido reportados de forma directa debido a la carencia de una posible relación entre estos procesos y SOP, entonces a manera de perspectiva, debemos de buscar una relación de estos cambios en la expresión genética y nuestro modelo de estudio, así como evaluar el papel regulatorio del E2 sobre estos genes.

En el caso de los genes alterados al alza, se encuentran algunos que participan en una serie de procesos metabólicos que no se encuentran relacionados con aquellos que participan a nivel ovárico como lo son genes que participan en vías de señalización asociadas a Parkinson, Huntington, Alzheimer, no obstante, esta discrepancia no contradice la función biológica, sino que puede ser atribuida a la forma en el que programa DAVID estructura su matriz de datos.

Sin embargo, DAVID del mismo modo nos mostró vías que están asociadas de una forma importante con los procesos llevados a nivel ovárico.

En el caso del microarreglo de 40 días, tenemos procesos metabólicos, como la esteroidogénesis ovárica, vía de señalización del estradiol, meiosis de ovocitos, sinapsis de dopamina y de serotonina, así como genes que participan en la vía de la liberación de GnRH, lo cual es un resultado bastante interesante porque se sabe que esta hormona actúa a nivel hipotálamo, sin embargo, existen reportes de expresión de GnRH a nivel ovárico (Gründker, y Emons, 2003) y del papel que ejerce en cáncer de ovario, aunado a ello, no está alterado el nivel de expresión de GnRH sino de genes que participan en su vía de señalización como *Gna 11*

consistente de la subunidad alfa de las proteínas G que juega un papel fundamental en las vías de señalización en múltiples procesos.

Sin embargo al realizar el análisis de los genes que componen esta vía podemos observar que el VE causo un aumento en la expresión de *Igf1r* en las células de la teca de las ratas sacrificadas a los 40 días de edad, lo cual es importante porque se sabe que un aumento en la insulina circundante en sangre estimula a su receptor en el ovario favoreciendo la síntesis de andrógenos (Maharaj y Amod, 2009). Sin embargo, este proceso no se replica a los 70 días de edad.

El gen *Bmp15* es uno de los genes asociados a procesos de recubrimiento folicular durante las primeras etapas de vida del modelo estudiado, sin embargo, su expresión se ve desregulada a la baja en las primeras etapas del desarrollo de SOP en nuestro modelo, concordando con los trabajos de Wei *et al.*, (2014). Sin embargo, la expresión de *Bmp15* no tiene cambios en su expresión a los 70 días de edad.

En cuanto al microarreglo de 70 días se encontró que existe un total de 271 genes alterados, de los cuales 62 genes se encuentran desregulados a la baja y 209 al alza. Entre las vías de señalización alteradas se encuentran aquellas relacionadas con la vía de señalización de estradiol, esteroidogénesis ovárica, vía de señalización de prolactina, neurotrofinas y progesterona.

En el segundo microarreglo de expresión observamos vías de señalización como la esteroidogénesis que se encuentran alteradas, sin embargo, no pudimos mapear completo el panorama de este proceso debido a las limitantes de nuestro microarreglo de expresión.

En este proceso encontramos una alteración marcada en *Hsd17b12* (o también llamado 17 β HSD12) uno de los objetivos de este trabajo presenta un incremento en su nivel de expresión solo en el segundo microarreglo, lo cual puede indicar un aumento en la síntesis de estradiol a partir de la estrona, promovido por un aumento en el nivel de expresión de andrógenos, es decir, se sugiere que este aumento en

la expresión este dado en respuesta al aumento en la síntesis de andrógenos en la teca.

Sin embargo, para aseverar un cambio en la síntesis de andrógenos, podremos utilizar biomarcadores que nos estén indicando cambios en el nivel de la expresión de las enzimas de la vía de la esteroidogénesis.

Uno de los genes que se pueden sugerir en este estudio es el receptor al factor de crecimiento neural, el gen *Ntrk1* expresado a nivel ovárico, debido a que se sabe que un incremento en el nivel de NGF en suero influye sobre la expresión de su receptor (Zhai *et al.*, 2018), este aumento de los niveles de NGF influyen notablemente sobre la expresión del receptor de LH (Dissen *et al.*, 2009), este efecto solo puede ser medido en nuestro microarreglo por los elevados niveles de *ntrk1* y de *Lhgcr* por lo cual asumimos que estos genes pueden ser considerados marcadores genéticos consistentes con los reportes sobre la inducción del SOP. La consecuencia del aumento de NGF, y LH en el ovario debe ser consistente con un aumento en los niveles de andrógenos y una disrupción en el ciclo estral.

La selección de los genes candidatos para realizar el análisis in silico se basó en el nivel de alteración de los genes, la vía de señalización en la que participan y la astringencia señalada por el programa DAVID, entre menor sea la astringencia mayor es el papel del gen evaluado. Es por ello que se propusieron los genes *Hsd17b12* que participa en el proceso de esteroidogénesis, *gna 11* es la subunidad alfa de las proteínas G y *pik3r2* que participa como segundo mensajero.

Finalmente se realizó el análisis de los promotores de los genes seleccionados, debido a que basados en los cambios que el estradiol puede inducir al unirse a su receptor puede facilitar la expresión o represión de algunos genes como oxitocina en ratas, del mismo modo se conoce que las hormonas esteroideas tienen la capacidad de regular la actividad de ciertos genes (Manna, *et al.*, 2009). Lo cual fundamenta que los genes alterados en nuestro modelo de VE se deban a cambios en la expresión de hormonas esteroideas que a su vez inciden como elementos regulatorios de la transcripción de algunos genes, en este caso participando en la patogénesis y patofisiología del SOP.

Para el caso del primer gen propuesto *Hsd17b12* se analizó una posible región promotora de 1,000 pares base, dentro de la secuencia analizada encontramos que no hay presencia de cajas TATA, por tanto, su regulación a nivel de promotor debe ser por medio de otro elemento de respuesta, para este caso solo se encontró una secuencia iniciadora, pero alejada del posible promotor proximal.

Además de ello se encontraron elementos de respuesta a YY1, RAR alfa, y SP1 los cuales se ha observado que son elementos de respuesta a estradiol (Gómez-Chang, *et al.*, 2012) esto da una pauta sobre como los efectos de la administración de una dosis de estradiol puede incidir en cambios a nivel hipotalámico, morfológico y sobre todo genético que repercuten en nuestro modelo favoreciendo la aparición del síndrome.

Sin embargo, existen pocos estudios sobre la regulación transcripcional de este gen, lo cual es interesante debido al papel que desempeña en el proceso de esteroidogenesis donde se encarga del paso final de la conversión de estrona a estradiol y dentro de su secuencia promotora tiene elementos de respuesta a los receptores de estradiol alfa y beta, lo cual podría indicar un posible proceso de regulación por estradiol, que pudiera estar siendo activado en momentos donde se registra una gran concentración de su precursor hormonal, es decir la testosterona, esto como una manera compensatoria para tratar de revertir el desarrollo del SOP en las ratas adultas, es por ello que se propone que se debe de encontrar la serie de elementos que pudieran regular la actividad de este gen,, tanto en condiciones normales como en el caso del SOP.

El segundo gen que se seleccionó, *Gna11* es un gen cuyo papel se puede ver ligado a las proteínas G, fundamentales en varios procesos de señalización celular, en el caso del promotor se encontró un solo promotor, carente de caja TATA y con la presencia de 4 sitios INR y una caja GC, sin embargo, al revisar en la literatura se ha caracterizado un elemento de respuesta que regula su actividad en humanos, específicamente en la línea celular HEK, sugiriendo que el elemento que regula su transcripción es el elemento de respuesta al crecimiento temprano 1 (EGR-1) reportado por Klenke, Siffert, y Frey (2013), sin embargo, a pesar, de la homología

entre las secuencias de más del 95%, dicho elemento de respuesta no fue localizado por el programa TRANSFAC.

A pesar de ello, localizamos posibles sitios de unión a factores de transcripción como YY1, SP1, y de respuesta a glucocorticoides, aunado a ello la presencia de dos elementos de respuesta a ER alfa y beta, sin embargo, en el caso de este gen se desconoce cuál podría ser el elemento que lo regule en rata, y debido a su tasa de expresión aumentada en los dos microarreglos, no podríamos inferir que sucede con su regulación y como el VE afecta su función. Pero proponemos la búsqueda del elemento que regula su actividad transcripcional para tratar de entender cuál es el elemento que lo regula y poder elucidar como se ve afectado en el desarrollo del SOP.

El tercer gen para el cual se realizó el análisis del promotor fue el gen *pik3r2* el cual presento ausencia de cajas TATA, sin embargo, presento cinco secuencias iniciadoras en los 1,000 pb analizados, este presenta un primer exón bastante pequeño, pero es reconocido por el programa EPD como el promotor. En cuanto al análisis de los elementos de respuesta que se encuentran asociados a este promotor encontramos que son elementos como SP1 y CREB, los cuales pueden ser regulados por hormonas esteroideas, (Manna, *et al.*, 2009), pero a pesar de esto, son elementos repetitivos dentro de la secuencia y poco se conoce sobre su regulación, aunque se sabe que está presente en varios tipos de cáncer en humanos se desconoce su papel en otras enfermedades como el SOP, es por ello que se propone investigar más su efecto en el SOP, y como puede contribuir al establecimiento de esta enfermedad en un modelo tratado con VE.

Nuestra pregunta de investigación menciona que existen cambios en entre dos etapas de la vida de la rata entre 40 y 70 días, en un modelo de SOP inducido farmacológicamente con VE, hasta este punto podemos observar que existen serias variaciones en la expresión de genes entre las dos etapas, lo cual puede aseverar un fuerte componente genético en el desarrollo del SOP, pero esta expresión diferenciada, entre ambos microarreglos debe ser influenciada por señales extrínsecas, se sabe del aumento en el tono simpático en modelos de VE en ratas,

así como la desregulación del eje hipotálamo-adenohipófisis-ovario pero aún se desconocen los aspectos metabólicos y como la conjunción de todos los factores llevan a un resultado concreto que nos permitirá entender la etiología del SOP.

Es por ello que las propuestas sobre las causas del origen del SOP, al menos en nuestro modelo necesitarán una correlación más fuerte o la búsqueda de un elemento clave en el cual converjan todas las hipótesis que permitan entender el proceso, es claro que este elemento no es único, sino una conjunción de factores y mecanismos moleculares activados en distintos estadios de la vida, comenzando probablemente en la etapa infantil temprana hasta el final de la madurez reproductiva.

Por tanto, estos cambios en la expresión genética, si inciden sobre procesos relacionados a la actividad ovárica, y esto se ve acentuado mayormente en el microarreglo de 70 días, donde al ser animales en edad reproductiva se observan alteraciones en las vías metabólicas que inciden directamente sobre los procesos de ovulación, foliculogénesis y esteroidogénesis.

Esta diferencia es marcada con el microarreglo de 40 días, pero es atribuible a que es una edad donde los individuos de este grupo aún no han alcanzado la madurez, ni la funcionalidad de las estructuras reproductivas a pesar, de haber sido estimulados a nivel hipotalámico por el valerato de estradiol, estos animales de este grupo, si muestran alteraciones relacionadas con los procesos de maduración folicular, sin embargo, al momento del sacrificio presentaron ovulación, lo cual puede ser atribuible a que el daño ocasionado por el VE no era tan severo para la edad en la cual fue administrado.

Conclusiones

- 1) El modelo de VE en rata produce anovulación en la etapa tardía (70 días posnatal) de la inducción del SOP.
- 2) Las ratas con inyección de VE presentan hiperandrogenismo y una alta concentración de estradiol a partir de la etapa temprana (40 días posnatal) y se mantiene hasta la etapa tardía (70 días posnatal) de la inducción del SOP.
- 3) En la etapa tardía los grupos experimentales presentan un incremento en la concentración de progesterona.
- 4) Los genes más alterados en el microarreglo de 40 días son *HIBADH* (↓), *Smstr28* (↓), así como *Ppp1ca* (↑) y *Nup153* (↑),
- 5) Los genes más alterados en el microarreglo de 70 días son *Arf3* (↓) y *capn8* (↓), *Chrnb4* (↑) y *Arhgef9* (↑),
- 6) Los genes *17beta HSD12*, *Pik3r2* y *Gna11* participan en vías de señalización que se encuentran directamente involucradas en el hiperandrogenismo gonadal en ambas etapas evaluadas.

Bibliografía

1. Abbott, D. H., Tarantal, A. F., y Dumesic, D. A. (2009). Fetal, infant, adolescent and adult phenotypes of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female rhesus monkeys. *American Journal of Primatology*, 71(9), 776–784. <https://doi.org/10.1002/ajp.20679>
2. Abbott, D., Barnett, D., Bruns, C., y Dumesic, D. (2005). Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Human Reproduction Update*, 11(4), 357-374. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi013>
3. Abinaya, S., Siva, D., Sabitha, R., y Achiraman, S. (2019). An overview of hyperandrogenism in PCOS and the perspective underlying factors. *Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 05(01), 179–186. <https://doi.org/10.26479/2019.0501.18>
4. Abramovich, D., Irusta, G., Bas, D., Cataldi, N. I., Parborell, F., y Tesone, M. (2012). Angiopoietins/TIE2 System and VEGF Are Involved in Ovarian Function in a DHEA Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology*, 153(7), 3446–3456. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1105>
5. Amini, L., Tehranian, N., Movahedin, M., Ramezani Tehrani, F., & Soltanghoreae, H. (2016). Polycystic Ovary Morphology (PCOM) in Estradiol Valerate Treated Mouse Model. *International Journal of Women's Health and Reproduction Sciences*, 4(1), 13-17. <https://doi.org/10.15296/ijwhr.2016.04>
6. Amiri, M, Bidhendi Yarandi, R, Nahidi, F, Tohidi, M, Ramezani Tehrani, F. The relationship between clinical and biochemical characteristics and quality of life in patients with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2019; 90: 129– 137. <https://doi.org/10.1111/cen.13858>

7. Azziz, R. (2004). PCOS: a diagnostic challenge. *Reproductive BioMedicine Online*, 8(6), 644-648. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61644-6](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61644-6)
8. Azziz, R. (2006). Diagnosis of Polycystic Ovarian Syndrome: The Rotterdam Criteria Are Premature. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(3), 781–785. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-2153>
9. Azziz, R., Carmina, E., Dewailly, D., Diamanti-Kandarakis, E., Escobar-Morreale, H. F., Futterweit, W., . . . Witchel, S. F. (2009). The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertility and Sterility*, 91(2), 456–488. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.06.035>
10. Azziz, R., y Adashi, E. Y. (2016). Stein and Leventhal: 80 years on. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 214(2), 247-257. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.12.013>
11. Bancroft, J. (2009). *Human Sexuality and Its Problems* (3rd ed.). <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-05161-6.X0001-8>
12. Barber, T. M., McCarthy, M. I., Wass, J. A. H., y Franks, S. (2006). Obesity and polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology*, 65(2), 137–145. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02587.x>
13. Blasco, V., Pinto, F. M., Fernández-Atucha, A., Prados, N., Tena-Sempere, M., Fernández-Sánchez, M., y Candenás, L. (2018). Altered expression of the kisspeptin/KISS1R and neurokinin B/NK3R systems in mural granulosa and cumulus cells of patients with polycystic ovarian syndrome. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(1), 113–120. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1338-7>
14. Bozdag, G., Mumusoglu, S., Zengin, D., Karabulut, E., & Yildiz, B. O. (2016). The prevalence and phenotypic features of polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 31(12), 2841–2855. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew218>
15. Brawer, J. R., Munoz, M., & Farookhi, R. (1986). Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biology of reproduction*, 35(3), 647–655. <https://doi.org/10.1095/biolreprod35.3.647>
16. Brawer, J. R., Naftolin, F., Martin, J., y Sonnenschein, C. (1978). Effects of a Single Injection of Estradiol Valerate on the Hypothalamic Arcuate Nucleus and on Reproductive Function in the Female Rat*. *Endocrinology*, 103(2), 501–512. <https://doi.org/10.1210/endo-103-2-501>

17. Caldwell, A. S., Middleton, L. J., Jimenez, M., Desai, R., McMahon, A. C., Allan, C. M., Handelsman, D. J., & Walters, K. A. (2014). Characterization of reproductive, metabolic, and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse
18. Canadian Institutes of Health Research. (2018a, enero 12). Estradiol valerate - DrugBank. Recuperado 20 de noviembre de 2019, de <https://www.drugbank.ca/drugs/DB13956>
19. Catteau-Jonard, S., y Dewailly, D. (2012). Pathophysiology of Polycystic Ovary Syndrome: The Role of Hyperandrogenism. *Frontiers of Hormone Research*, , 22–27. <https://doi.org/10.1159/000341679>
20. Chaudhari, N., Dawalbhakta, M., & Nampoothiri, L. (2018). GnRH dysregulation in polycystic ovarian syndrome (PCOS) is a manifestation of an altered neurotransmitter profile. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0354-x>
21. Cheadle C, Vawter MP, Freed WJ, Becker KG. Analysis of microarray data using Z score transformation. *J Mol Diagn*. 2003;5(2):73-81. doi:10.1016/S1525-1578(10)60455-2
22. Condorelli, R. A., Calogero, A. E., Di Mauro, M., Mongioi', L. M., Cannarella, R., Rosta, G., y La Vignera, S. (2017). Androgen excess and metabolic disorders in women with PCOS: beyond the body mass index. *Journal of Endocrinological Investigation*, 41(4), 383-388. <https://doi.org/10.1007/s40618-017-0762-3>
23. Conneely, O. M., Mulac-Jericevic, B., & Lydon, J. P. (2003). Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids*, 68(10-13), 771-778. [https://doi.org/10.1016/s0039-128x\(03\)00126-0](https://doi.org/10.1016/s0039-128x(03)00126-0)
24. Crisosto, N., Ladrón de Guevara, A., Echiburú, B., Maliqueo, M., Cavada, G., Codner, E., . . . Sir-Petermann, T. (2019). Higher luteinizing hormone levels associated with antimüllerian hormone in postmenarchal daughters of women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 111(2), 381–388. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.10.011>
25. Cruz- Neculpan, Gonzalo. (2011). Efecto De La Exposicion A Estradiol Sobre La Funcion Reproductiva En La Rata: Cambios Tempranos En La Expresion Genica Y Participacion Del Factor De Crecimiento Nervioso. Recuperado de <http://repositorio.conicyt.cl/handle/10533/185815>

26. Cruz, G., Barra, R., González, D., Sotomayor-Zárate, R., y Lara, H. E. (2012). Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats. *Fertility and Sterility*, 98(5), 1283-1290. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.1060>
27. Cussons, A. J., Stuckey, B. G. A., y Watts, G. F. (2007). Metabolic syndrome and cardiometabolic risk in PCOS. *Current Diabetes Reports*, 7(1), 66-73. <https://doi.org/10.1007/s11892-007-0012-8>
28. Dăneasă, A., Cucolaș, C., Lenghel, L. M., Olteanu, D., Orăsan, R., y Filip, G. A. (2016). Letrozole vs estradiol valerate induced PCOS in rats: glycemic, oxidative and inflammatory status assessment. *reproduction*, 151(4), 401–409. <https://doi.org/10.1530/rep-15-0352>
29. Daneri, C., Orozco, A. V., Bronzi, D., Mohn, C., Rastrilla, A. M., y Sosa, Z. Y. (2013). Involvement of the ganglion cholinergic receptors in gonadotropin-releasing hormone, catecholamines, and progesterone release in the rat ovary. *Fertility and Sterility*, 99(7), 2062-2070. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.02.037>
30. Dashti S, Abdul Latiff L, Abdul Hamid H, Saini SM, Shah Abu Bakar A, Amirah Inani Binti Sabri N, Ismail M, Jafarzadeh Esfehiani A. Prevalence of Polycystic Ovary Syndrome among Malaysian Female University Staff. *Journal of Midwifery and Reproductive Health*. 2019; 7(1): 1560-1568. DOI: 10.22038/jmrh.2018.30370.1329
31. De Leo, V., Musacchio, M. C., Cappelli, V., Massaro, M. G., Morgante, G., y Petraglia, F. (2016a). Genetic, hormonal and metabolic aspects of PCOS: an update. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0173-x>
32. Dissen, G. A., Garcia-Rudaz, C., Paredes, A., Mayer, C., Mayerhofer, A., y Ojeda, S. R. (2009). Excessive Ovarian Production of Nerve Growth Factor Facilitates Development of Cystic Ovarian Morphology in Mice and Is a Feature of Polycystic Ovarian Syndrome in Humans. *Endocrinology*, 150(6), 2906-2914. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1575>
33. Dissen, GA & Lara, H & Leyton, Victor y Paredes, Alfonso y Hill, D & Costa, M y Martinez Serrano, Alberto & Ojeda, Sergio. (2000). Intraovarian Excess of Nerve Growth Factor Increases Androgen Secretion and Disrupts Estrous Cyclicity in the Rat 1. *Endocrinology*. 141. 1073-82. 10.1210/endo.141.3.7396.
34. Douma, Z., Dallel, M., Bahia, W., Ben Salem, A., Hachani Ben Ali, F., Almawi, W. Y., ... Mahjoub, T. (2020). Association of estrogen receptor gene variants (ESR1 and

- ESR2) with polycystic ovary syndrome in Tunisia. *Gene*, 144560. doi: 10.1016/j.gene.2020.144560
35. Du, D.-F., Li, X.-L., & Zheng, S.-H. (2016). Expression of anti-Müllerian hormone in two rat models of polycystic ovary syndrome. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 42(12), 1761-1767. <https://doi.org/10.1111/jog.13118>
 36. Elisabet Stener-Victorin, Vasantha Padmanabhan, Kirsty A Walters, Rebecca E Campbell, Anna Benrick, Paolo Giacobini, Daniel A Dumesic, David H Abbott, Animal Models to Understand the Etiology and Pathophysiology of Polycystic Ovary Syndrome, *Endocrine Reviews*, Volume 41, Issue 4, August 2020, Pages 538–576, <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa010>
 37. Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M, San Millán JL. The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev.* 2005;26(2):251-282. doi:10.1210/er.2004-0004
 38. Espinoza, J.A., Alvarado, W., Venegas, B. et al. Pharmacological sympathetic denervation prevents the development of polycystic ovarian syndrome in rats injected with estradiol valerate. *Reprod Biol Endocrinol* 16, 86 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0400-8>
 39. Farrell, K., & Antoni, M. H. (2010). Insulin resistance, obesity, inflammation, and depression in polycystic ovary syndrome: biobehavioral mechanisms and interventions. *Fertility and Sterility*, 94(5), 1565-1574. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.03.081>
 40. Febri, R. R., Wiweko, B., Hanifah, N., Sholihah, A. M., Iffanolida, P. A., Mutia, K., ... Hestiantoro, A. (2018). BAX/BCL-2 expression in granulosa cells was not altered in patients with polycystic ovary syndrome. *Journal of Physics: Conference Series*, 1073, 032048. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1073/3/032048>
 41. Franks, S. (2012a). Animal Models and the Developmental Origins of Polycystic Ovary Syndrome: Increasing Evidence for the Role of Androgens in Programming Reproductive and Metabolic Dysfunction. *Endocrinology*, 153(6), 2536–2538. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1366>
 42. Franks, S. (2015). Can Animal Models of PCOS Help Point the Way Towards Early and Effective Therapeutic Intervention in Women With the Syndrome? *Endocrinology*, 156(7), 2371–2373. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1420>
 43. Franks, S., & Hardy, K. (2018). Androgen Action in the Ovary. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00452>

44. Franks, S., Mason, H., White, D., & Willis, D. (1998). Etiology of Anovulation in Polycystic Ovary Syndrome. *Steroids*, 63(5-6), 306–307. [https://doi.org/10.1016/s0039-128x\(98\)00035-x](https://doi.org/10.1016/s0039-128x(98)00035-x)
45. Franks, S., Stark, J., & Hardy, K. (2008). Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction Update*, 14(4), 367–378. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn015>
46. Gómez-Chang E, Larrea F, Martínez-Montes F. (2012) Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *TIP Rev Esp Cienc Quim Biol*. 15(1):24-36.
47. Goodarzi, M. O., Dumesic, D. A., Chazenbalk, G., & Azziz, R. (2011). Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(4), 219–231. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.217>
48. Gründker, C., & Emons, G. (2003). Role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in ovarian cancer. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 1, 65. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-65>
49. Hajishafiha, M., Dehghan, M., Kiarang, N., Sadegh-Asadi, N., Shayegh, S. N., & Ghasemi-Rad, M. (2013). Combined letrozole and clomiphene versus letrozole and clomiphene alone in infertile patients with polycystic ovary syndrome. *Drug design, development and therapy*, 7, 1427–1431. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S50972>
50. Haouzi, D., Assou, S., Monzo, C., Vincens, C., Dechaud, H., & Hamamah, S. (2012). Altered gene expression profile in cumulus cells of mature MII oocytes from patients with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*, 27(12), 3523-3530. <https://doi.org/10.1093/humrep/des325>
51. Hayes, M. G., Urbanek, M., Ehrmann, D. A., Armstrong, L. L., Lee, J. Y., Sisk, R., . . . Dunaif, A. (2015). Genome-wide association of polycystic ovary syndrome implicates alterations in gonadotropin secretion in European ancestry populations. *Nature Communications*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms8502>
52. Heider, U., Pedal, I., & Spaniel-Borowski, K. (2001). Increase in nerve fibers and loss of mast cells in polycystic and postmenopausal ovaries. *Fertility and Sterility*, 75(6), 1141-1147. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(01\)01805-2](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(01)01805-2)
53. Herian, M., Luck, M. R., & Grzesiak, M. (2018). The influence of testosterone on the expression and function of vitamin D(3) receptor (VDR) protein in the porcine ovarian follicle. *Physiological research*, 67(3), 515–519. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933762>

54. Hewitt, S. C., y Korach, K. S. (2018). Estrogen Receptors: New Directions in the New Millennium. *Endocrine Reviews*, 39(5), 664-675. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00087>
55. Hillier, S. G., y Tetsuka, M. (1997). Role of androgens in follicle maturation and atresia. *Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 11(2), 249-260. [https://doi.org/10.1016/s0950-3552\(97\)80036-3](https://doi.org/10.1016/s0950-3552(97)80036-3)
56. Homburg, R., & Crawford, G. (2014). The role of AMH in anovulation associated with PCOS: a hypothesis. *Human Reproduction*, 29(6), 1117-1121. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu076>
57. Honnma, H., Endo, T., Henmi, H., Nagasawa, K., Baba, T., Yamazaki, K., . . . Saito, T. (2006). Altered expression of Fas/Fas ligand/caspase 8 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in atretic follicles within dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries in rats. *Apoptosis*, 11(9), 1525–1533. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-9148-2>
58. Honorable Cámara de Diputados LXIV Legislatura. (2017, 31 julio). Entre 6 y 10 por ciento de las mexicanas padece Síndrome del Ovario Poliquístico. Recuperado 11 octubre, 2018, de <http://www5.diputados.gob.mx/index.php/esl/Comunicacion/Boletines/2017/Julio/31/3888-Entre-6-y-10-por-ciento-de-las-mexicanas-padece-Sindrome-del-Ovario-Poliquistico>
59. Hossain, M., Cao, M., Wang, Q., Kim, J., Schellander, K., Tesfaye, D., & Tsang, B. K. (2013). Altered expression of miRNAs in a dihydrotestosterone-induced rat PCOS model. *Journal of Ovarian Research*, 6(1), 36. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-6-36>
60. Huddleston, H. G., Cedars, M. I., Sohn, S. H., Giudice, L. C., & Fujimoto, V. Y. (2010). Racial and ethnic disparities in reproductive endocrinology and infertility. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 202(5), 413–419. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2009.12.020>
61. Jahanfar, S., Maleki, H., Mosavi, A., y Jahanfar, M. (2004). Leptin and its association with polycystic ovary syndrome: a twin study. *Gynecological Endocrinology*, 18(6), 327-334. <https://doi.org/10.1080/09513590410001667256>
62. Jahromi, M. S., Tehrani, F. R., Noroozadeh, M., Zarkesh, M., Ghasemi, A., y Zadeh-Vakili, A. (2016). Elevated expression of steroidogenesis pathway genes; CYP17,

- GATA6 and StAR in prenatally androgenized rats. *Gene*, 593(1), 167–171. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.07.067>
63. James R. Brawer, Michael Munoz, Riaz Farookhi, Development of the Polycystic Ovarian Condition (PCO) in the Estradiol Valerate-Treated Rat, *Biology of Reproduction*, Volume 35, Issue 3, 1 October 1986, Pages 647–655, <https://doi.org/10.1095/biolreprod35.3.647>
64. Juárez-Tapia, C. R., y Miranda-Anaya, M. (2016). El reloj circadiano ovárico: un secundero en la fisiología de la reproducción. *Entreciencias: Diálogos en la Sociedad del Conocimiento*, 4(10). <https://doi.org/10.21933/j.edsc.2016.10.183>
65. Kaplowitz, P. B., Slora, E. J., Wasserman, R. C., Pedlow, S. E., & Herman-Giddens, M. E. (2001). Earlier onset of puberty in girls: relation to increased body mass index and race. *Pediatrics*, 108(2), 347–353. <https://doi.org/10.1542/peds.108.2.347>
66. Kauffman, R. P., Baker, V. M., DiMarino, P., Gimpel, T., & Castracane, V. (2002). Polycystic ovarian syndrome and insulin resistance in white and Mexican American women: A comparison of two distinct populations. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 187(5), 1362–1369. <https://doi.org/10.1067/mob.2002.126650>
67. Kim, E.-J., Jang, M., Choi, J. H., Park, K. S., & Cho, I.-H. (2018). An Improved Dehydroepiandrosterone-Induced Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Post-pubertal Improve PCOS's Features. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 1-7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00735>
68. Klenke, S., Siffert, W. y Frey, U.H. (2013), Cloning and Characterization of the GNA11 Promoter and its Regulation by Early Growth Response 1. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 113: 316-324. doi:10.1111/bcpt.12100
69. Klenke, S., Tan, S., Hahn, S., Mann, K., Hauner, H., Manthey, I., ... Frey, U. H. (2010). A functional GNAQ promoter haplotype is associated with altered Gq expression and with insulin resistance and obesity in women with polycystic ovary syndrome. *Pharmacogenetics and Genomics*, 20(8), 476–484. doi:10.1097/fpc.0b013e32833b7497
70. Kondo, M., Osuka, S., Iwase, A., Nakahara, T., Saito, A., Bayasula, Nakamura, T., Goto, M., Kotani, T., & Kikkawa, F. (2016). Increase of kisspeptin-positive cells in the hypothalamus of a rat model of polycystic ovary syndrome. *Metabolic Brain Disease*, 31(3), 673-681. <https://doi.org/10.1007/s11011-016-9807-0>

71. Krishnan, A., & Muthusami, S. (2017). Hormonal alterations in PCOS and its influence on bone metabolism. *Journal of Endocrinology*, 232(2), 99–113. <https://doi.org/10.1530/joe-16-0405>
72. Kudesia, R., & Copperman, A. B. (2020). Polycystic Ovary Syndrome. *Obstetrics and Gynecology*, 280–290. doi:10.1002/9781119450047.ch35
- Lansdown, A., & Rees, D. A. (2012). The sympathetic nervous system in polycystic ovary syndrome: a novel therapeutic target? *Clinical Endocrinology*, 77(6), 791-801. <https://doi.org/10.1111/cen.12003>
73. Lara, H E, Ferruz, J L. Luza,S. Bustamante D A. Borges Y, Ojeda S R. Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome, *Endocrinology*, Volume 133, Issue 6, 1 December 1993, Pages 2690–2695, <https://doi.org/10.1210/en.133.6.2690>
74. Li, C., Chen, L., Zhao, Y., Chen, S., Fu, L., Jiang, Y., ... Zhou, X. (2017). Altered expression of miRNAs in the uterus from a letrozole-induced rat PCOS model. *Gene*, 598, 20-26. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.10.033>
75. Li, M., Zhou, T., Gao, Y., Zhang, N., y Li, J. (2007). Ultrastructure and Estrogen Regulation of the Lymphatic Stomata of Ovarian Bursa in Mice. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 290(10), 1195-1202. <https://doi.org/10.1002/ar.20583>
76. Li, R., & DeMayo, F. J. (2018a). Steroid Receptors Classical. *Encyclopedia of Reproduction*, 142-157. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.64635-4>
77. Li, W., Chen, Q., Xie, Y., Hu, J., Yang, S., & Lin, M. (2018). Prevalence and degree of insulin resistance in Chinese Han women with PCOS: Results from euglycemic-hyperinsulinemic clamps. *Clinical Endocrinology*, 90(1), 138–144. <https://doi.org/10.1111/cen.13860>
78. Linares, R., Hernández, D., Morán, C., Chavira, R., Cárdenas, M., Domínguez, R., & Morales-Ledesma, L. (2013). Unilateral or bilateral vagotomy induces ovulation in both ovaries of rats with polycystic ovarian syndrome. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 11, 68. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-68>
79. Luza, S. M., Lizama, L., Burgos, R. A., & Lara, H. E. (1995). Hypothalamic changes in norepinephrine release in rats with estradiol valerate-induced polycystic ovaries. *Biology of reproduction*, 52(2), 398–404. <https://doi.org/10.1095/biolreprod52.2.398>
<https://doi.org/10.26479/2019.0501.18>

80. Luza, S. M., Lizama, L., Burgos, R. A., y Lara, H. E. (1995). Hypothalamic Changes in Norepinephrine Release in Rats With Estradiol Valerate-Induced Polycystic Ovaries1. *Biology of Reproduction*, 52(2), 398–404. <https://doi.org/10.1095/biolreprod52.2.398>
81. Maharaj, S., & Amod, A. (2009). Polycystic ovary syndrome. *Journal of Endocrinology, Metabolism and Diabetes of South Africa*, 14(2), 86-95. <https://doi.org/10.1080/22201009.2009.10872199>
82. Maliqueo, M., Benrick, A., y Stener-Victorin, E. (2014). Rodent Models of Polycystic Ovary Syndrome: Phenotypic Presentation, Pathophysiology, and the Effects of Different Interventions. *Seminars in Reproductive Medicine*, 32(03), 183–193. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1371090>
83. Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., & Evans, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83(6), 835–839. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90199-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90199-x)
84. Manna, P.R., Dyson, M.T. y Stocco, D.M. (2009). Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. *Mol. Hum. Reprod.* 15, 321-333
85. Manni, L., Lundeberg, T., Holmång, A., Aloe, L., y Stener-Victorin, E. (2005). Effect of electro-acupuncture on ovarian expression of alpha (1)- and beta (2)-adrenoceptors, and p75 neurotrophin receptors in rats with steroid-induced polycystic ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3(1), 21. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-21>
86. Marcondes F. K., Bianchi, F. J., y Tanno, A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, 62(4a), 609-614. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842002000400008>
87. Martin J. Kelly, Oline K. Rønnekleiv, Minireview: Neural Signaling of Estradiol in the Hypothalamus, *Molecular Endocrinology*, Volume 29, Issue 5, 1 May 2015, Pages 645–657, <https://doi.org/10.1210/me.2014-1397>
88. Maynard, R. L., y Downes, N. (2019). *Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research (2^a ed.)*. Amsterdam, Países Bajos: Elsevier Science.
89. McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S., & Bennett, S. A. (2012). Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse

- Estrous Cycle Staging Identification. *Journal of Visualized Experiments*, (67).
<https://doi.org/10.3791/4389>
90. McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S., y Bennett, S. A. (2012). Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. *Journal of Visualized Experiments*, (67).
<https://doi.org/10.3791/4389>
91. McNeilly, A. S., & Colin Duncan, W. (2013). Rodent models of polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 373(1-2), 2–7.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.10.007>
92. Mehrabian, F., Khani, B., Kelishadi, R., y Kermani, N. (2011). The prevalence of metabolic syndrome and insulin resistance according to the phenotypic subgroups of polycystic ovary syndrome in a representative sample of Iranian females. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 16(6), 763–769.
93. Mesbah F, Moslem M, Vojdani Z, Mirkhani H. Estradiol Valerate-induced Polycystic Ovary Syndrome: An Animal Model Study. *Armaghane danesh*. (2011); 15 (4) :325-334 URL: <http://armaghani.yums.ac.ir/article-1-449-en.html>
94. Mesbah, Fakhroddin y Moslem, Mohsen y Vojdani, Zahra y Mirkhani, Hossein. (2015). Does metformin improve in vitro maturation and ultrastructure of oocytes retrieved from estradiol valerate polycystic ovary syndrome-induced rats. *Journal of Ovarian Research*. 8. 10.1186/s13048-015-0203-x.
95. Michael Guccione, Sharon Silbiger, Jun Lei, and Joel Neugarten (2002). Estradiol upregulates mesangial cell MMP-2 activity via the transcription factor AP-2. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2002 282:1, F164-F169
96. Miller, W. L. (2002a). Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 198(1-2), 7-14. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(02\)00363-5](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(02)00363-5)
97. Mooradian, A. D., Morley, J. E., & Korenman, S. G. (1987). Biological Actions of Androgens. *Endocrine Reviews*, 8(1), 1-28. <https://doi.org/10.1210/edrv-8-1-1>
98. Morales-Ledesma, L., Linares, R., Rosas, G., Morán, C., Chavira, R., Cárdenas, M., & Domínguez, R. (2010). Unilateral sectioning of the superior ovarian nerve of rats with polycystic ovarian syndrome restores ovulation in the innervated ovary. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 8, 99.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-99>

99. Moran, C., Tena, G., Moran, S., Ruiz, P., Reyna, R., & Duque, X. (2010). Prevalence of Polycystic Ovary Syndrome and Related Disorders in Mexican Women. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 69(4), 274–280. <https://doi.org/10.1159/000277640>
100. Moran, L. J., Noakes, M., Clifton, P. M., Norman, R. J., y Fenech, M. F. (2008). Genome instability is increased in lymphocytes of women with polycystic ovary syndrome and is correlated with insulin resistance. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 639(1-2), 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.11.007>
101. Nelson, V. L., Legro, R. S., Strauss, J. F., y McAllister, J. M. (1999). Augmented Androgen Production Is a Stable Steroidogenic Phenotype of Propagated Theca Cells from Polycystic Ovaries. *Molecular Endocrinology*, 13(6), 946–957. <https://doi.org/10.1210/mend.13.6.0311>
102. Noorafshan, A., Ahmadi, M., Mesbah, S., y Karbalay-Doust, S. (2013). Stereological study of the effects of letrozole and estradiol valerate treatment on the ovary of rats. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 40(3), 115. <https://doi.org/10.5653/cerm.2013.40.3.115>
103. Noroozadeh, M., Behboudi-Gandevani, S., Zadeh-Vakili, A., y Ramezani Tehrani, F. (2017). Hormone-induced rat model of polycystic ovary syndrome: A systematic review. *Life Sciences*, 191, 259-272. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.10.020>
104. Ojeda SR, Urbanski HF. Puberty in the Rat. In: Knobil E, et al., editors. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press; New York: 1988. pp. 1699–1737
105. Palomba, S. (2018). *Infertility in Women with Polycystic Ovary Syndrome* (1.a ed., Vol. 1). Springer Publishing.
106. Paradisi, R., Grossi, G., Venturoli, S. et al. (1989) Evidence for a hypothalamic alteration of catecholamine metabolism in polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology (Oxford)*, 29, 317–326.
107. Patel, R., & Shah, G. (2018). High-fat diet exposure from pre-pubertal age induces polycystic ovary syndrome (PCOS) in rats. *Reproduction*, 155(2), 139-149. <https://doi.org/10.1530/rep-17-0584>
108. Peña, A.S., Witchel, S.F., Hoeger, K.M. et al. Adolescent polycystic ovary syndrome according to the international evidence-based guideline. *BMC Med* 18, 72 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01516-x>

109. Picut, C. A., Dixon, D., Simons, M. L., Stump, D. G., Parker, G. A., y Remick, A. K. (2015). Postnatal ovary development in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. *Toxicologic pathology*, 43(3), 343–353. <https://doi.org/10.1177/0192623314544380>
110. Prapas, N., Karkanaki, A., Prapas, I., Kalogiannidis, I., Katsikis, I., & Panidis, D. (2009). Genetics of polycystic ovary syndrome. *Hippokratia*, 13(4), 216–223.
111. R. J. Rodgers, L. Suturina, D. Lizneva, M.J. Davies, K. Hummitzsch, H. F. Irving-Rodgers, S. A. Robertson, Is polycystic ovary syndrome a 20th Century phenomenon?, *Medical Hypotheses*, Volume 124,2019, Pages 31-34,<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2019.01.019>
112. Rat Genome Database. (s. f.). Rat Genome Database - Home. Recuperado 25 de septiembre de 2020, de <https://rgd.mcw.edu/wg/>
113. Reddy, B., y Dasgupta, S. (2008). Present status of understanding on the genetic etiology of polycystic ovary syndrome. *Journal of Postgraduate Medicine*, 54(2), 115. <https://doi.org/10.4103/0022-3859.40778>
114. Risma, K. A., Clay, C. M., Nett, T. M., Wagner, T., Yun, J., & Nilson, J. H. (1995). Targeted overexpression of luteinizing hormone in transgenic mice leads to infertility, polycystic ovaries, and ovarian tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(5), 1322-1326. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1322>
115. Rojas, J., Chávez, M., Olivar, L., Rojas, M., Morillo, J., Mejías, J., ... Bermúdez, V. (2014). Polycystic Ovary Syndrome, Insulin Resistance, and Obesity: Navigating the Pathophysiologic Labyrinth. *International Journal of Reproductive Medicine*, 2014, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2014/719050>
116. Rosenfield, R. L., y Ehrmann, D. A. (2016). The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian Hyperandrogenism Revisited. *Endocrine reviews*, 37(5), 467–520. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1104>
117. Rotinen, M., Celay, J., Alonso, M. M., Arrazola, A., Encio, I., & Villar, J. (2009). Estradiol induces type 8 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression: crosstalk between estrogen receptor alpha and C/EBPbeta. *The Journal of endocrinology*, 200(1), 85–92. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0134>
118. Russo, N., Russo, M., Daino, D., Bucci, F., Pluchino, N., Casarosa, E., ... Genazzani, A. R. (2012). Polycystic ovary syndrome: brain-derived neurotrophic

- factor (BDNF) plasma and follicular fluid levels. *Gynecological Endocrinology*, 28(4), 241-244. <https://doi.org/10.3109/09513590.2011.613969>
119. Safe, S. (2001). Transcriptional activation of genes by 17 β -estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitamins & Hormones*, 231-252. [https://doi.org/10.1016/s0083-6729\(01\)62006-5](https://doi.org/10.1016/s0083-6729(01)62006-5)
 120. Salilew-Wondim, D., Wang, Q., Tesfaye, D., Schellander, K., Hoelker, M., Hossain, M. M., & Tsang, B. K. (2015). Polycystic ovarian syndrome is accompanied by repression of gene signatures associated with biosynthesis and metabolism of steroids, cholesterol and lipids. *Journal of Ovarian Research*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13048-015-0151-5>
 121. Schwartz, N., Verma, A., Bivens, C. B., Schwartz, Z., & Boyan, B. D. (2016). Rapid steroid hormone actions via membrane receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(9), 2289-2298. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.06.004>
 122. Shi, D., & Vine, D. F. (2012). Animal models of polycystic ovary syndrome: a focused review of rodent models in relationship to clinical phenotypes and cardiometabolic risk. *Fertility and Sterility*, 98(1), 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.04.006>
 123. Singh, K. B. (2005). Persistent estrus rat models of polycystic ovary disease: an update. *Fertility and Sterility*, 84, 1228–1234. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.06.01
 124. Sova, H., Unkila-Kallio, L., Tiitinen, A., Hippeläinen, M., Perheentupa, A., Tinkanen, H., . . . Morin-Papunen, L. (2019). Hormone profiling, including anti-Müllerian hormone (AMH), for the diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS) and characterization of PCOS phenotypes. *Gynecological Endocrinology*, 1–6. <https://doi.org/10.1080/09513590.2018.1559807>
 125. Stener-Victorin, E., Ploj, K., Larsson, B., y Holmäng, A. (2005a). Rats with steroid-induced polycystic ovaries develop hypertension and increased sympathetic nervous system activity. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3(1), 44. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-44>
 126. Stewart, C. E., & Sohrabji, F. (2020). Gonadal Hormones and Stroke Risk: PCOS as a Case Study. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 100853. doi:10.1016/j.yfrne.2020.100853
 127. Sverrisdóttir, Y. B., Mogren, T., Kataoka, J., Janson, P. O., & Stener-Victorin, E. (2008). Is polycystic ovary syndrome associated with high sympathetic nerve

- activity and size at birth? *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 294(3), E576-E581. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00725.2007>
128. Teimuraz Apridonidze, Paulina A. Essah, Maria J. Luorno, John E. Nestler, Prevalence and Characteristics of the Metabolic Syndrome in Women with Polycystic Ovary Syndrome, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 90, Issue 4, 1 April 2005, Pages 1929–1935, <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1045>
129. Tekin, G., Tekin, A., Kilic, Arslan, E.B. et al. (2008) Altered autonomic neural control of the cardiovascular system in polycystic ovary syndrome. *International Journal of Cardiology*, 130, 49–55.
130. The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2004. (2004). Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 81(1), 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.10.004>
131. Tosca, L., Solnais, P., Ferré, P., Fougelle, F., & Dupont, J. (2006). Metformin-Induced Stimulation of Adenosine 5' Monophosphate-Activated Protein Kinase (PRKA) Impairs Progesterone Secretion in Rat Granulosa Cells. *Biology of Reproduction*, 75(3), 342-351. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.050831>
132. Trivax, B., y Azziz, R. (2007). Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 50(1), 168–177. <https://doi.org/10.1097/grf.0b013e31802f351b>
133. Velazquez, E. M., Mendoza, S., Hamer, T., Sosa, F., & Glueck, C. J. (1994). Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy. *Metabolism*, 43(5), 647-654. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(94\)90209-7](https://doi.org/10.1016/0026-0495(94)90209-7)
134. Vendola, K., Zhou, J., Wang, J., & A. Bondy, C. (1999). Androgens promote insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-I receptor gene expression in the primate ovary. *Human Reproduction*, 14(9), 2328-2332. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.9.2328>
135. Venegas, B., De León Gordillo, L.Y., Rosas, G. et al. In rats with estradiol valerate-induced polycystic ovary syndrome, the acute blockade of ovarian β -adrenoreceptors improve ovulation. *Reprod Biol Endocrinol* 17, 95 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0539-y>

136. Venegas-Meneses B, Padilla JF, Juárez CE, et al. Effects of ovarian dopaminergic receptors on ovulation. *Endocrine*. 2015;50(3):783-796. doi:10.1007/s12020-015-0636-4
137. Visser, J. A., de Jong, F. H., Laven, J. S. E., & Themmen, A. P. N. (2006). Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction*, 131(1), 1-9. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00529>
138. Walters, K. A., Bertoldo, M. J., & Handelsman, D. J. (2018). *Evidence from animal models on the pathogenesis of PCOS. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 32(3), 271–281. doi:10.1016/j.beem.2018.03.008
139. Wang, Wanxue and Jieru, Zhu and Tao, Li and Aiping, Qin and Zhengping, Tian and Jiamiao, Zhang and Yiran, Xie and Zheyun, Li and Jianping, Ou and Yihua, Yang, Transcription Factor Yin Yang 1 Involves in Insulin Resistance-Polycystic Ovarian Syndrome by Regulating Sex Hormone Synthesis and Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway (March 15, 2019). Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3353362>
140. Wei, L. N., Huang, R., Li, L. L., Fang, C., Li, Y., y Liang, X. Y. (2014). Reduced and delayed expression of GDF9 and BMP15 in ovarian tissues from women with polycystic ovary syndrome. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 31(11), 1483–1490. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0319-8>
141. Weigel, N. L. (1996). Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochemical Journal*, 319(3), 657-667. <https://doi.org/10.1042/bj3190657>
142. Wickenheisser, J. K., Quinn, P. G., Nelson, V. L., Legro, R. S., Strauss, J. F., y McAllister., J. M. (2000). Differential Activity of the Cytochrome P450 17 α -Hydroxylase and Steroidogenic Acute Regulatory Protein Gene Promoters in Normal and Polycystic Ovary Syndrome Theca Cells¹. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(6), 2304-2311. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.6.6631>
143. Wood, J. R., Nelson, V. L., Ho, C., Jansen, E., Wang, C. Y., Urbanek, M., ... Strauss, J. F. (2003). The Molecular Phenotype of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Theca Cells and New Candidate PCOS Genes Defined by Microarray Analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(29), 26380-26390. <https://doi.org/10.1074/jbc.m300688200>
144. Xu, J., Dun, J., Yang, J., Zhang, J., Lin, Q., Huang, M., Ji, F., Huang, L., You, X., & Lin, Y. (2020). Letrozole Rat Model Mimics Human Polycystic Ovarian

Syndrome and Changes in Insulin Signal Pathways. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 26, e923073. <https://doi.org/10.12659/MSM.923073>

145. Yildirim, A., Aybar, F., Kabakci, G. et al. (2006) Heart rate variability in young women with polycystic ovary syndrome. *Annals of Noninvasive Electrocardiology*, 11, 306–312. 75
146. You-Hong Cheng, Ayse Imir, Takashi Suzuki, Veysel Fenkci, Bertan Yilmaz, Hironobu Sasano, Serdar E. Bulun, SP1 and SP3 Mediate Progesterone-Dependent Induction of the 17beta Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Gene in Human Endometrium, *Biology of Reproduction*, Volume 75, Issue 4, 1 October 2006, Pages 605–614, <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.051912>
147. Zangeneh, F. Z., Naghizadeh, M. M., Bagheri, M., y Jafarabadi, M. (2016). Are CRH & NGF as psychoneuroimmune regulators in women with polycystic ovary syndrome? *Gynecological Endocrinology*, 33(3), 227-233. <https://doi.org/10.1080/09513590.2016.1250152>
148. Zangeneh, F. Z., Naghizadeh, M. M., Minaee, B., y Aminee, F. (2012). PCOS & sympathetic outcome: Role of the central and peripheral nervous system in ovarian function of rat. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5, 26-32.
149. Zhai, Y., Yao, G., Rao, F., Wang, Y., Song, X., & Sun, F. (2018). Excessive nerve growth factor impairs bidirectional communication between the oocyte and cumulus cells resulting in reduced oocyte competence. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0349-7>

