



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Caracterización Bioquímica de las Neuronas
Intrínsecas del Ovario y su Relación con la Pérdida de
la Función Reproductiva. La Rata Como Modelo de
Estudio**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Juan Manuel Bravo Benítez

Codirectoras:

Dra. Carolina Morán Raya

Dra. Yolanda Cruz Gómez

Tlaxcala, Tlax.

Agosto, 2021



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Caracterización Bioquímica de las Neuronas
Intrínsecas del Ovario y su Relación con la
Pérdida de la Función Reproductiva. La Rata
Como Modelo de Estudio**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Juan Manuel Bravo Benítez

Comité Tutorial:

Dra. Carolina Morán Raya
Dra. Yolanda Cruz Gómez
Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio
Dr. Alfonso Daniel Diaz Fonseca

Tlaxcala, Tlax.

Agosto, 2021

Financiamiento

El presente trabajo de tesis doctoral se realizó en colaboración entre el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta y el Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, El Doctorado en Ciencias Biológicas está registrado en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional. Padrón Nacional de Posgrado (PNP). Se recibió apoyo del “Programa Nacional de Becas de Doctorado, CONACYT” JMBB772933/624536. El financiamiento del presente trabajo se realizó por CONACYT FC2016-01-231 y los Programas de Financiamiento de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla VIEP-3180.



**COORDINACIÓN DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Juan Manuel Bravo Benítez** realiza para la obtención del grado de **Doctor en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Caracterización Bioquímica de las neuronas intrínsecas del ovario y su relación con la pérdida de la función reproductiva. La rata como modelo de estudio”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., AGOSTO 3 DE 2021

DRA. ROSA ANGÉLICA LUCIO LUCIO

DRA. MARGARITA JUÁREZ ROMERO

DR. ALFONSO DANIEL DÍAZ FONSECA

DRA. NICTÉ XELHUANTZI ARREGUÍN

DR. CÉSAR FELICIANO PASTELÍN ROJAS



**COMITÉ ACADÉMICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Estimados Miembros del Comité Académico

Sirva este medio para describir el proceso de revisión de la Tesis Doctoral “Caracterización Bioquímica de las Neuronas Intrínsecas del Ovario y su Relación con la Pérdida de la Función Reproductiva. La Rata Como Modelo de Estudio”, realizada por el estudiante Juan Manuel Bravo Benítez para optar por su grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

El documento de la Tesis fue revisado por mí como Directora de Tesis, antes de presentarse en cada examen semestral, y posterior a los exámenes tutorales los miembros de su Comité Tutorial emitieron sus observaciones. De esta forma, la Tesis pasó por un proceso de revisión por varios profesores expertos en el tema. En el mes de Julio, el documento fue procesado con el programa Turnitin, evidenciando 11% de similitud total. Los textos detectados fueron corregidos por el estudiante. El 30 de Julio se volvió a procesar el documento y marcó 4% de texto con similitud. Examinando los detalles de la búsqueda se observó que las similitudes marcadas eran textos que tenía la cita correspondiente. Otras similitudes que se encontraron fueron en la sección de la metodología, correspondiendo a lenguaje común tales como microscopio de fluorescencia, neuronas, receptores, etc., por lo que esta similitud no podría ser considerada como plagio. Por lo anterior, confirmo que **el estudiante no incurrió en ninguna práctica no deseable** en la escritura de la tesis.

Sin más por el momento, reciban atentos saludos.

Cordialmente

Tlaxcala, Tlax., a 31 de julio de 2021



Dra. Yolanda Cruz Gómez
Directora de tesis

Agradecimientos

Al Posgrado del CTBC, UAT, por el apoyo durante los años que curse el doctorado, así como la oportunidad al aceptarme para poder desarrollarme profesionalmente y siempre guiarme para la culminación de mis estudios

Al CONACYT por todos los apoyos recibidos tanto de Becas como de Financiamiento al proyecto; Programa Nacional de Becas de Doctorado, CONACYT” JMBB772933/624536, CONACYT FC2016-01-231 y los Programas de Financiamiento de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla VIEP-3180.

Al Comité Tutorial; Dra. Carolina Morán Raya, Dra. Yolanda Cruz Gómez, Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio y Dr. Alfonso Daniel Díaz Fonseca por guiarme, sus consejos recibidos a lo largo de los últimos años, por haber aportado su conocimiento a mi formación, su ayuda para la realización del presente proyecto, por su esfuerzo, dedicación, sus conocimientos, sus orientaciones, su paciencia y su motivación que han sido fundamentales para mi formación como investigador.

Agradecimientos a Título Personal

A mi Directora y Amiga, la Dra. Carolina Morán Raya, por sus consejos, el apoyo recibido, no solo en lo académico, si no en lo personal, gracias a ella que me ha formado en todas las etapas académicas de mi vida profesional, aportando a lo largo de los últimos años, sus conocimientos, sus orientaciones, su paciencia y su motivación, sin ella no estaría finalizando esta etapa de mi vida, no hay palabras suficientes para poder decir todo el agradecimiento que le tengo, ni todo el cariño, así como el aprecio que siento por ella tanto por su persona como por el conocimiento que apporto para mi formación como investigador. Siendo la piedra angular de mi formación y del conocimiento adquirido a lo largo de todos mis años de estudiante a su lado.

De igual manera agradecer a la Dra. Yolanda Cruz Gómez por su visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, por su rectitud en su profesión como docente, por sus consejos, su conocimiento que me ayudaron enormemente para complementar mi formación como investigador y como estudiante, agradecerle la gran paciencia que tuvo conmigo, así como el estar siempre pendiente de mí para mejorar y ayudar a formarme como persona e investigador con la mejor calidad posible.

A la Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio y al Dr. Alfonso Daniel Díaz Fonseca, por acompañarme estos años con sus consejos y sugerencias que siempre han sido bien recibidas para poder formarme como investigador, así como sus aportaciones para la realización de la tesis, el acompañamiento en cada uno de los tutoriales y la ayuda en los momentos más importantes de mi formación.

A los miembros del jurado; Dr. Cesar Feliciano Pastelín Rojas, Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio, Dr. Alfonso Daniel Díaz Fonseca, Dra. Margarita Juárez Romero y Dra. Nicté Xelhuantzi Arreguín por su apoyo para la realización del examen de Doctorado.

A los miembros del Laboratorio de Aplicaciones Biomédicas por sus consejos y apoyo: a la Dra. Nancy Mirto, Dra. Alondra y la Biol. Esmeralda Rivera, por acompañarme en este viaje durante los últimos años, no solo como compañeros de Laboratorio si no como amigos,

Al director del Bioterio “Claude Bernard” de la BUAP, Dr. Francisco Ramos Collado y al personal de este por su apoyo en el cuidado y mantenimiento de los animales con los que se realizó este trabajo.

Al personal administrativo del CTBC: Socorro, Rebeca y Xóchitl por el apoyo y mantenerme durante estos años siempre con ánimo para poder concluir satisfactoriamente mis estudios.

A Dunia Jara Solenar por estar conmigo en los momentos más críticos, por su apoyo, su comprensión, su ayuda, su paciencia y poner todo su ser para verme concluir mis estudios de Doctorado, por su cariño en los últimos momentos de mi formación, por darme unos grandiosos días con su compañía y nunca dejar que me distraiga de mis metas.

A mi amiga: Belén Pérez por sus consejos, apoyo y motivación para continuar el día a día en el mundo de la ciencia.

A mi amiga Norma Castillo, la cual siempre me ha dado los ánimos y la fortaleza para continuar en cada aspecto de mi vida, ya sea personal o profesional, sus consejos, comentarios y regaños, siempre me han impulsado a ser mejor persona, mejor profesional y a dar lo mejor en cada momento de mi vida, tampoco existen palabras para agradecerle que siempre esta a mi lado en los momentos más difíciles, que ha pesar de la distancia y del tiempo en lugar de apartarnos nos unimos más para impulsarnos a lograr nuestros objetivos.

A mis Amigo Pablo Cruz que siempre ha estado conmigo en todas las etapas de mi formación que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que, hasta ahora, seguimos siendo amigos.

A la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla** por ser una institución que permite lograr tus sueños, ya que me ha acompañado en mi formación profesional y personal por tantos años.

A la **Universidad Autónoma de Tlaxcala** por abrirme las puertas para realizar mis estudios de Doctorado.

Y, por último, pero no menos importante, a Raquel, Lety, Fausto, Alma, Joss y Othón por ser mis mejores amigos y estar siempre a mi lado en todos estos años de amistad.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por sus buenos deseos.

Dedicatoria:

Con todo mi cariño y mi amor a mis padres Manuel Bravo Orea y Luvia Benítez Hernández, que hacen todo lo posible en la vida para que logre alcanzar mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

A mi hermana Cinthya Bravo Benítez. Por qué siempre he contado con ella para todo.

A mis tíos Carlos Benítez Hernández y Oliva Cotino Nava, por siempre apoyarme y alentarme a terminar mis estudios, por ser la inspiración para subir cada escalón de mi formación profesional, siempre tendrán mi agradecimiento.

Resumen

Los ovarios son las gónadas femeninas en las cuales se llevan a cabo la ovogénesis, foliculogénesis y esteroidogénesis. Estas funciones disminuyen con el tiempo y se pierden a partir de la menopausia y con ello la fertilidad, sin embargo, la senescencia reproductiva en mamíferos ha sido poco estudiada. Las terminaciones nerviosas localizadas en los ovarios liberan neurotransmisores y neuropéptidos que influyen en la actividad de los tejidos ováricos. Su papel es regular los ciclos reproductivos, el desarrollo folicular, la ovulación y la esteroidogénesis. En la rata Wistar, la inervación intrínseca del ovario es provista por neuronas de soma multipolar alojadas principalmente en la médula ovárica. Los objetivos del presente trabajo fueron identificar si en los ovarios de ratas de la cepa CII ZV (Long Evans) existen neuronas intrínsecas, analizar sus características morfológicas, bioquímicas y su papel en el proceso de senescencia. Se utilizaron ratas hembra adultas de la cepa CII ZV de 3, 12 y 15 meses de edad, mantenidas en condiciones controladas de bioterio, las cuales fueron sacrificadas por perfusión intracardiaca. El tejido ovárico fue seccionado a 10µm de grosor a -20 °C. La identificación inmunohistoquímica de las neuronas intrínsecas se realizó utilizando los siguientes anticuerpos primarios: NeuN, β-tubulina y Tirosina hidroxilasa. Las observaciones y el análisis de la inmunorreactividad a los anticuerpos se realizaron con un microscopio de fluorescencia. Los resultados muestran que el número de neuronas ováricas varía significativamente dependiendo de la edad y de la estructura analizada. Alrededor de los folículos el pico máximo se presentó a los 12 meses (3 meses 16.9±2.8; 12 meses 23.6±4.3; 15 meses 6.1±0.9). En el cuerpo lúteo el pico de neuronas se presenta a los tres meses (3 meses 10.67±1.6; 12 meses 6.6±0.6; p<0.05 ANDEVA seguida de Tukey). De manera similar, en la glándula intersticial el número de neuronas fue mayor a los 3 meses (69.8±14.8) versus 12 meses (64.5±18.1 o 15 meses (47.5±20.2). El tamaño de las neuronas incrementó con la edad y el número de neuronas inmunorreactivas a TH coincidió con los valores descritos para las células NeuN/β-tubulina. Se propone que el incremento en el número de neuronas alrededor de los folículos ováricos a los 12 meses de edad estaría estrechamente relacionado con la pérdida de la función de las estructuras ováricas implicadas en la ovulación y síntesis de hormonas esteroides. Con la edad, estas neuronas presentan un cambio estructural, que está asociado con un área ovárica menor.

INDICE

1.	Introducción	2
1.1	Sistema Nervioso	2
1.2	Ganglios Nerviosos	4
1.3	Neurotransmisores	5
2.	Antecedentes	6
2.1	Estructura y Funciones del Ovario	6
2.2	Folículos Ováricos	7
2.3	El Ciclo Ovárico de la Rata	11
2.4	La Inervación Ovárica	13
2.5	Regulación de las Funciones Ováricas Vía el Sistema Nervioso	13
2.6	Senescencia de la Rata y Pérdida de la Función Reproductiva	16
3.	Justificación	18
4.	Hipótesis	20
5.	Objetivos	20
5.1	Objetivo General	20
5.2	Objetivos Particulares	20
6.	Metodología	20
6.1	Diseño Experimental	20
6.2	Procedimiento de la Autopsia y Fijación de los Ovarios por Perfusión Intracardiaca	20
6.3	Determinación de la Presencia de las Proteínas de β -tubulina, NeuN y Tirosina Hidroxilasa por Inmunohistoquímica	21
6.4	Análisis Estadístico	23
7.	Resultados	23
7.1	Análisis Morfológico	23
7.2	Determinación de la presencia de Tirosina Hidroxilasa	33
7.3	Evaluación Cuantitativa	35
8.	Discusión	38
9.	Conclusiones	44
10.	Perspectivas	44
11.	Referencias	46
12.	Publicaciones	58

1. Introducción

1.1 Sistema Nervioso

El sistema nervioso se puede dividir en dos grandes componentes: Sistema Nervioso Central (SNC) que incluye al encéfalo y médula espinal y Sistema Nervioso Periférico (SNP), el cual está constituido por nervios y ganglios. El SNP comprende al Sistema Nervioso Somático y Sistema Nervioso Autónomo (Marlena Koszykowska et al.) (Guyton, 2016; Purves, 2016; Silverthorn, 2019).

Para su estudio, el SNA se divide en sistema nervioso simpático y sistema nervioso parasimpático (Figura 1). La mayor parte de los órganos y sistemas de los vertebrados son inervados por fibras provenientes de ambas divisiones del SNA y su respuesta, en la mayoría de los órganos inervados, es antagónica (Bakewell, 1995; Gibbins et al., 2000; Gibbins & Morris, 2006; Thompson et al., 2019). Los nervios autónomos están constituidos por fibras eferentes que se originan en la asta lateral de la sustancia gris de la médula espinal (preganglionares) y hacen sinapsis en sus respectivos ganglios (postganglionares). De los ganglios autonómicos emergen fibras de neuronas posganglionares que se distribuyen en los órganos.

Las neuronas aferentes (transmiten información desde la periferia al SNC) son importantes para la sensación visceral y la actividad refleja. En los reflejos vasomotores y respiratorios, los receptores sensoriales barorreceptores y quimiorreceptores del seno carotídeo y arco aórtico son importantes en el control del ritmo cardíaco, presión sanguínea y actividad respiratoria. La información de las fibras aferentes es transportada al SNC por nervios que viajan junto a fibras autonómicas tales en nervios como el vago, el esplácnico o nervios pélvicos (Bakewell, 1995).

Las fibras eferentes autonómicas transportan los impulsos nerviosos hacia órganos diana tales como vísceras, glándulas y vasos sanguíneos. En contraste a las fibras eferentes motoras somáticas que están implicadas en el control de músculo estriado, cuyo axón forma uniones neuromusculares (Purves, 2016; Silverthorn, 2019).

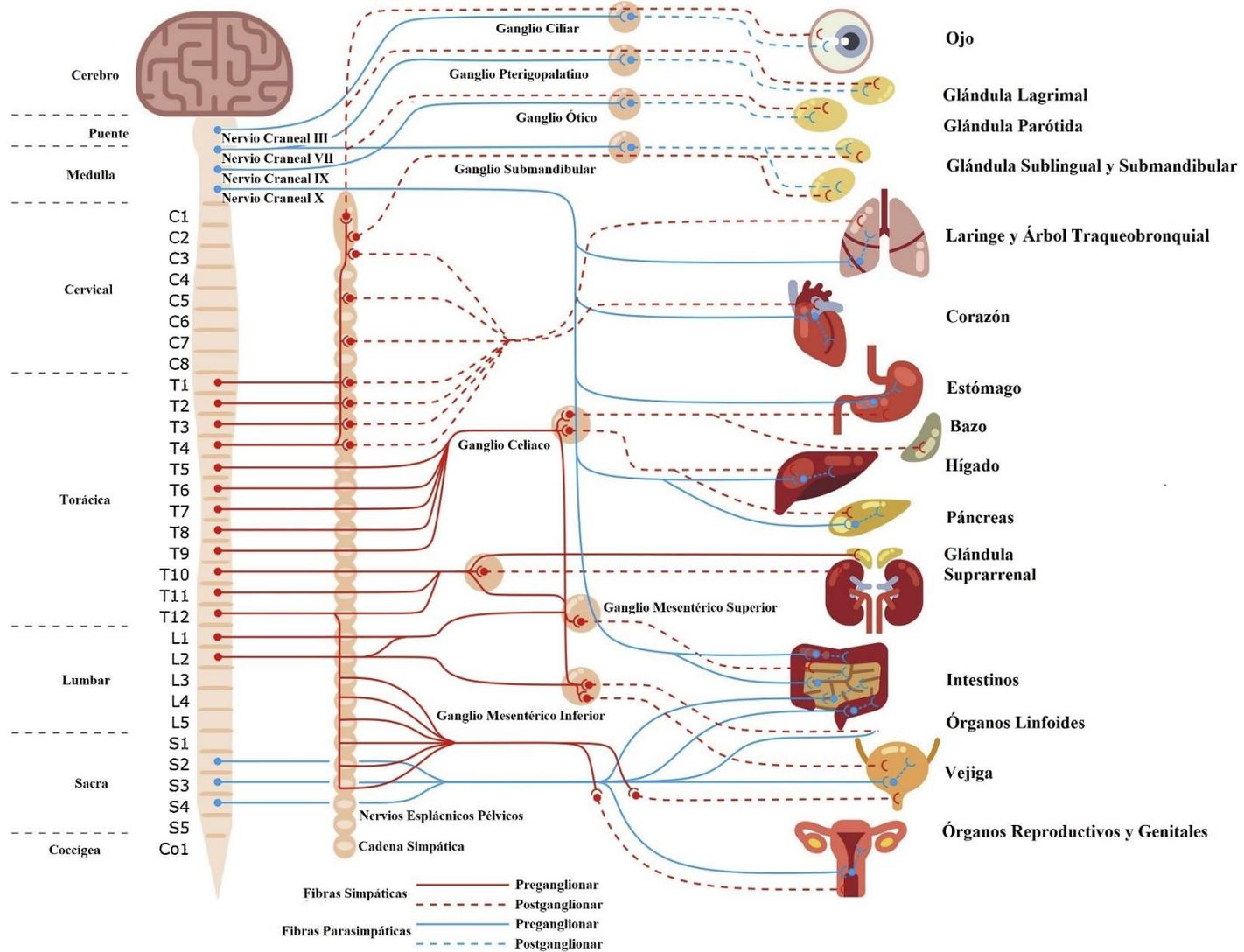


Figura 1. Esquema que muestra la división simpática (líneas rojas) y parasimpática (líneas azules) del sistema nervioso autónomo. Cervicales (C), torácicas (T), lumbares (L), sacras (S) y coxígeas (C3) (Modificado de Thompson et. al. 2019).

1.2 Ganglios Nerviosos

Los ganglios del sistema nervioso periférico están constituidos por cúmulos de cuerpos neuronales (25-50 μm). También contienen células granulares pequeñas llamadas células intensamente fluorescentes (SIF), células gliales (células de Schwann y células satélite), células vasculares, mastocitos y fibroblastos (Furness, 2015; Gabella, 2004; Gibbins et al., 2000; Purves, 2016; Silverthorn, 2019). En los ganglios se presentan numerosas uniones de adhesión entre neuronas y células satelitales (Furness, 2015; Gabella, 2004).

En mamíferos, el sistema nervioso autónomo está organizado en grupos de ganglios que pueden ser subdivididos en ganglios paravertebrales, ganglios prevertebrales, ganglios paraviscerales y ganglios intramurales (Figura 2). Los ganglios paravertebrales y prevertebrales son parte del sistema simpático, cuyas neuronas preganglionares están localizadas en los segmentos torácicos y lumbares de la médula espinal. Los ganglios paraviscerales son parasimpáticos y surgen de los segmentos cervicales y sacros de la médula espinal. Las neuronas posganglionares son activadas por los axones de las neuronas preganglionares cuyos cuerpos celulares están localizados en la médula espinal. Así, en el sistema visceral existe una sinapsis en el ganglio autónomo entre la neurona eferente del sistema nervioso central y la que inervará al órgano diana en la periferia (Furness, 2015; Gabella, 2004; Kandel, 2013) (Figura 2).

Algunas fibras preganglionares pasan a través de los ganglios simpáticos y de las ramas de los nervios espláncnicos para establecer sinapsis en los ganglios prevertebrales tales como el ganglio celíaco y los ganglios mesentéricos superior e inferior. Las neuronas de estos ganglios inervan a los órganos digestivos accesorios, incluidos el páncreas, el hígado, y también proporcionan inervación simpática a los riñones, vejiga urinaria y órganos reproductivos (Purves, 2016; Silverthorn, 2019). Los ganglios simpáticos se encuentran a lo largo de la cadena simpática (ganglio paravertebral) y el plexo abdominal (ganglio prevertebral). Los ganglios de la cadena simpática se encuentran en gran medida en posición paravertebral con sus interconexiones verticales, los cuales están localizados de forma bilateral. En los mamíferos esta cadena simpática presenta un ganglio por segmento en las regiones torácicas, lumbar y sacra (Furness, 2015; Gabella, 2004).

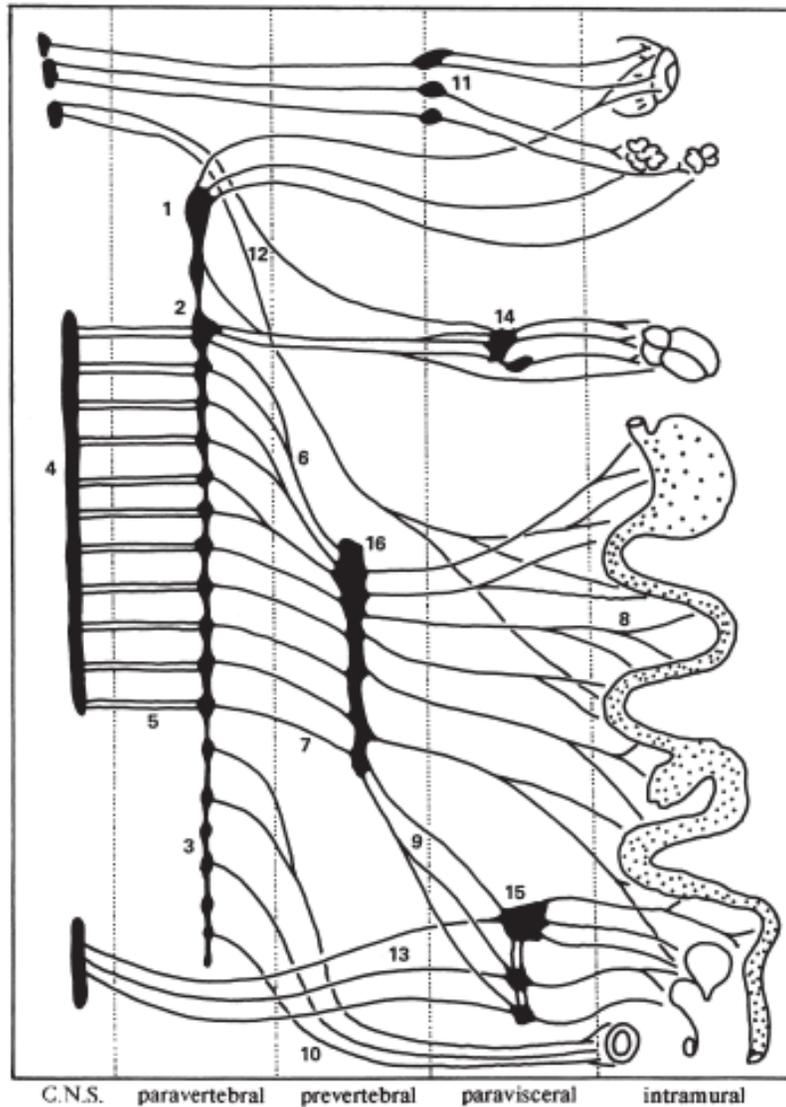


Figura 2. Representación esquemática de los principales grupos de ganglios autonómicos. Los números indican la posición topográfica de los principales nervios autonómicos y de algunos ganglios individuales: 1, ganglio cervical superior; 2, ganglio estrellado; 3, ganglio simpático lumbar; 4, columna intermediolateral en la espina dorsal toracolumbar; 5, ramas comunicantes; 6, nervios esplecnotorácicos; 7, nervios esplácnicos lumbares; 8, nervios mesentéricos; 9, nervio hipogástrico; 10, nervios perivesiculares; 11, ganglios esfenopalatinos; 12, nervio vago; 13, nervios pélvicos; 14, ganglios cardiacos; 15, ganglios pélvicos; 16, ganglios prevertebrales (Modificado de Gabella, 2004).

1.3 Neurotransmisores

Las neuronas del sistema nervioso se comunican entre sí mediante mensajeros químicos llamados neurotransmisores, los cuales se agrupan principalmente en tres categorías basadas en el tamaño de la molécula: a) los neuropéptidos que son moléculas relativamente grandes compuestas de tres a 36 aminoácidos; b) los aminoácidos, como el glutamato y el GABA y c)

los transmisores, acetilcolina (ACh), serotonina e histamina, son mucho más pequeñas que los neuropéptidos y, por lo tanto, se les denomina neurotransmisores de molécula pequeña. Entre éstos, las aminas biógenas, que son dopamina, noradrenalina (NA), adrenalina, serotonina e histamina, presentan propiedades químicas y acciones postsinápticas similares, aunque las particularidades de síntesis, empaquetamiento, liberación y eliminación difieren para cada neurotransmisor (Guyton, 2016; Purves, 2016; Silverthorn, 2019). Estas aminas biógenas regulan muchas funciones encefálicas y también se encuentran en estado activo en el sistema nervioso periférico. Las aminas biógenas están implicadas en una gama tan amplia de eventos, desde las funciones homeostáticas centrales hasta fenómenos cognitivos como la atención. La característica principal de las catecolaminas es el anillo de benceno hidroxilado (Guyton, 2016; Purves, 2016; Silverthorn, 2019).

El sistema colinérgico ha sido vinculado al control motor a nivel periférico y central. La ACh interviene también en diversas respuestas autónomas, y es el neurotransmisor de las neuronas preganglionares del sistema nervioso autónomo en sus ramas simpáticas y parasimpáticas, así como de las sinapsis posganglionares del parasimpático. La NA es el neurotransmisor de las fibras postganglionares simpáticas, en general se encargan de la vasoconstricción y la relajación de los órganos periféricos que inervan. Además de los neurotransmisores también intervienen en la transmisión nerviosa ganglionar muchos otros péptidos como la sustancia P, las encefalinas, la somatostatina, el péptido intestinal vasoactivo (VIP), el adenosín trifosfato (ATP), el óxido nítrico (NO), los que actúan como moduladores (Ropper et al., 2019). Los neurotransmisores también pueden ser liberados por neuronas intrínsecas al interior de órganos diana tales como el ovario, ya que se han reportado concentraciones de estos mismos a su interior.

2. Antecedentes

2.1 Estructura y Funciones del Ovario

Anatómicamente los ovarios están constituidos de una médula y una corteza. La médula se compone de tejido conectivo por el que ingresan vasos sanguíneos y linfáticos que irrigan la glándula y distribuyen los nutrientes celulares necesarios para su adecuada actividad. También hay nervios que transportan información aferente y eferente que regula el funcionamiento ovárico (Gori et al., 2016). En la corteza ovárica se encuentran los principales componentes

anatómicos y funcionales de la glándula: el compartimento folicular con folículos en distintos estadios de desarrollo; el compartimento lúteal constituido por cuerpos lúteos frescos y viejos y una glándula intersticial que separa a los compartimentos anteriores y que se forma de los folículos que han degenerado y por los cuerpos lúteos que han dejado de funcionar (Cabero et al., 2013; Gori et al., 2016). Otra clase de células de la corteza ovárica son las intersticiales que están presentes a lo largo de la vida de la hembra (Williams & Erickson, 2000).

La superficie del ovario contiene una capa de células cúbicas que se encuentran sobre una membrana basal. Esta capa, llamada el epitelio germinal o capa serosa, se une a la pared corporal por medio del ligamento suspensorio. Detrás del epitelio seroso se haya una capa de tejido conectivo denso llamada túnica albugínea (Figura 3) (Cabero et al., 2013; Gori et al., 2016). Las funciones ováricas como la ovogénesis, foliculogénesis y esteroidogénesis se llevan a cabo en la corteza ovárica y son reguladas por los sistemas endocrino y nervioso. Por ejemplo, se ha mostrado que el desarrollo folicular depende de complejas influencias hormonales y nerviosas que se convierten en acciones paracrinas y autocrinas en los tejidos ováricos. Por ejemplo, las células ováricas se encuentran bajo el control de las hormonas del eje hipotálamo-hipófisis tales como la GnRH y las hormonas gonadotrópicas y mediante la inervación sensorial y autonómica (D'Albora et al., 2002). Así mismo, el factor de crecimiento neural (NGF) sintetizado por células del ovario es considerado como un componente del sistema intragonadal que influye en la función ovárica (D'Albora et al., 2002).

2.2 Folículos Ováricos

Los folículos están incrustados en el tejido conectivo laxo de la corteza ovárica, por dentro de la túnica albugínea. Cada folículo exhibe un carácter citológico especializado que se relaciona con su fase de desarrollo. Hay dos clases principales de folículos: 1) Los folículos que “no crecen” también llamados folículos primordiales y que constituyen del 90 al 95 por ciento de los folículos ováricos en la mayor parte de la vida de la hembra, y 2) los folículos en crecimiento.

Cuando el folículo primordial inicia el crecimiento, su orientación, el tamaño y su posición relativa cambian en el ovario.

Los folículos en crecimiento se pueden dividir en cinco clases: primaria, secundaria, terciaria, Graaf y atrésicos (Banerjee et al., 2014; Bulun, 2011; Dumesic & Richards, 2013; Finch, 2014; Nichols et al., 2005) (Figura 4).

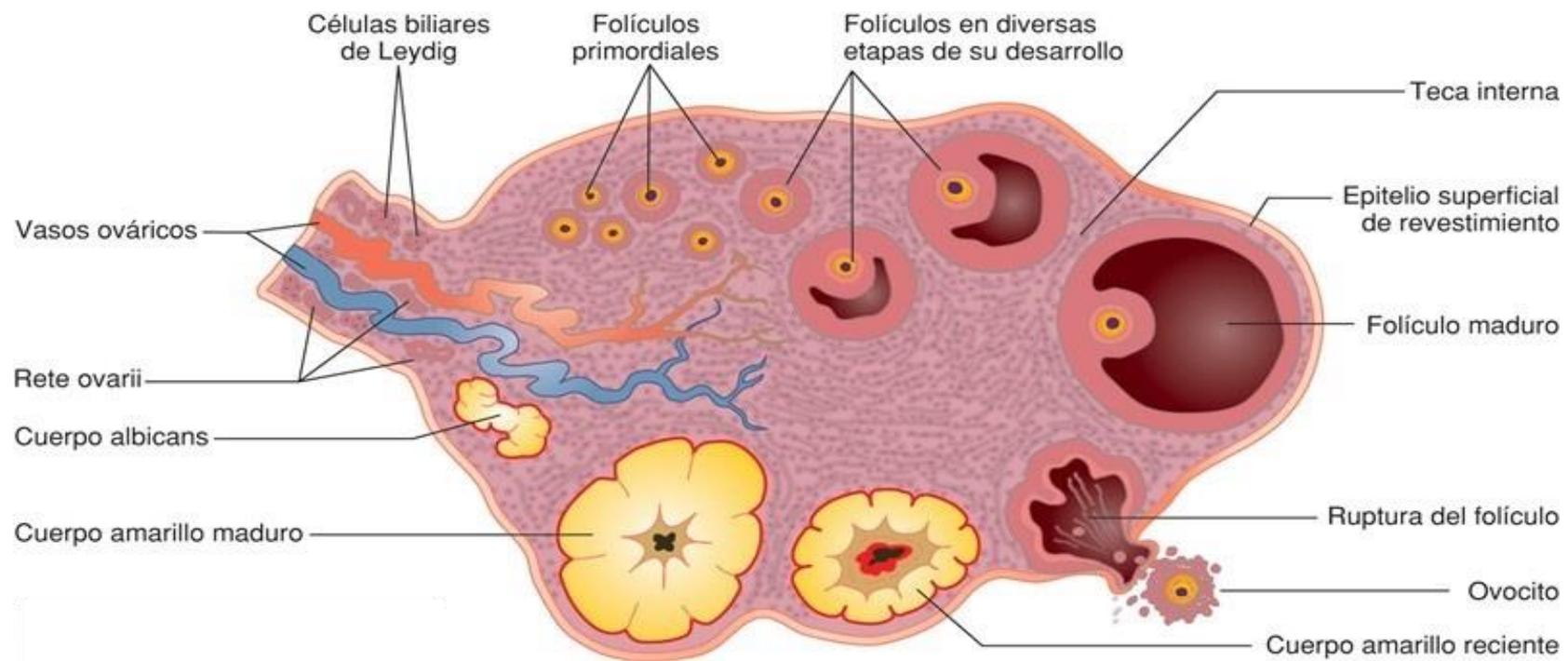


Figura 3.- Esquema que muestra los principales compartimentos anatómicos del ovario en los mamíferos (Modificado de Gori, 2016).

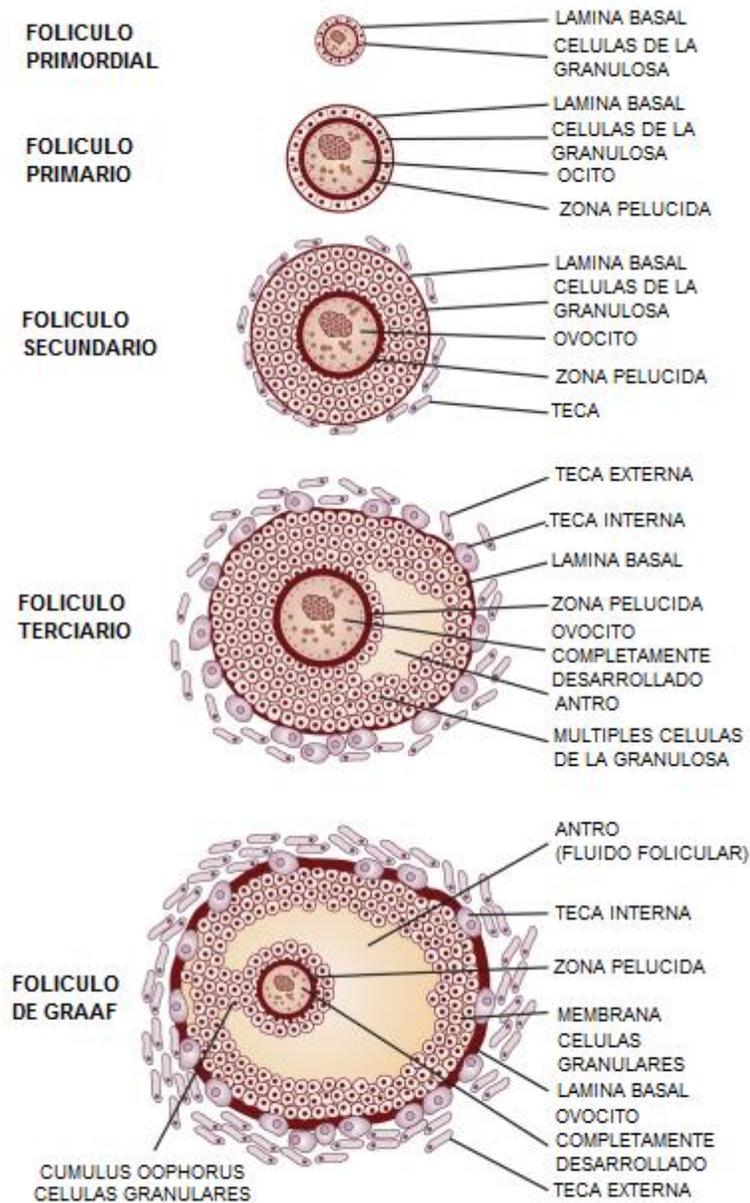


Figura 4. Esquema que muestra el desarrollo y las distintas etapas del crecimiento de los folículos ováricos. A lo largo del desarrollo folicular los principales compartimentos sufren cambios graduales que se caracterizan por la proliferación de las células de la granulosa y de la teca. Además de la aparición del antro al iniciarse el desarrollo el ovocito abandona su estado en dictioteno de la profase I y continúa su diferenciación hasta culminar la segunda división meiótica solamente si es fertilizado por el espermatozoide (Modificado de Bulun, 2011).

2.3 El Ciclo Ovárico de la Rata

La etapa fértil de la vida de las hembras de mamífero se caracteriza por cambios periódicos en la secreción de hormonas hipofisarias que resultan en el crecimiento, la maduración y la liberación de ovocitos fértiles, así como en cambios en la conducta sexual que asegura la receptividad durante la etapa ovulatoria. La conducta sexual rítmica que presentan las hembras se llama ciclo estral y durante una de sus etapas se lleva a cabo la ovulación. Mucho de lo que se conoce de la ovulación espontánea está basado en el conocimiento del ciclo estral de la rata, la cual tiene una duración de 4 a 5 días y es regulado por factores endógenos, particularmente por la interacción del eje Hipotalámico-Hipófisis-Ovario. El ciclo estral también puede ser influenciado por factores exógenos como la luz, la temperatura y las sustancias químicas percibidas por el sentido del olfato. A partir del análisis de los cambios que se presentan en el epitelio vaginal, para su estudio el ciclo estral de la rata se divide en Metaestro o Diestro 1, Diestro 2, Proestro y Estro (Smith et al., 1975; Williams & Erickson, 2000). Durante esas etapas las concentraciones sanguíneas de hormonas ováricas e hipofisarias varían (Figura 5).

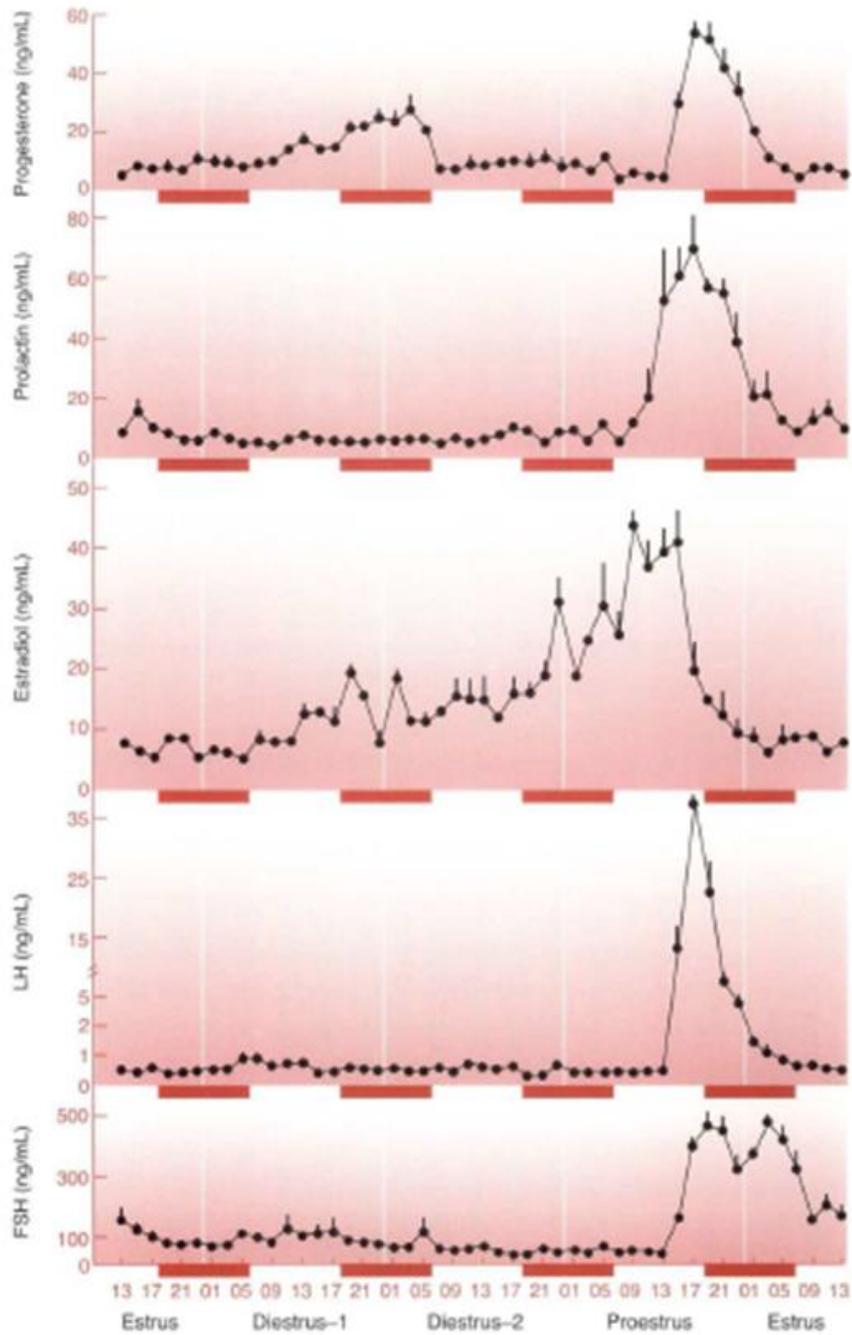


Figura 5. Perfiles hormonales de los 4 días del ciclo estral de la rata hembra. Las barras rojas y blancas indican luz y oscuridad respectivamente (Modificado de Smith et al., 1975).

2.4 La Inervación Ovárica

La inervación extrínseca del ovario incluye componentes autonómicos y sensoriales que llegan a los ovarios por medio del nervio ovárico superior (NOS) y el nervio del plexo ovárico (NPO) (Aguado, 2002; Baljet & Drukker, 1979). Las terminales de dichos nervios liberan al interior del ovario diversos neurotransmisores entre los que se encuentran la NA y el VIP, que han sido considerados como reguladores de esteroidogénesis y del desarrollo folicular temprano (Dissen et al., 2003; Hsueh et al., 1984; Mayerhofer et al., 1997). El NOS es una rama del plexo celiaco, sus cuerpos celulares están presentes en los segmentos espinales, lumbosacros (de T7 a L2 y de T10 al L3) y en los ganglios paravertebrales. Dicho nervio transita por el borde del ligamento suspensorio (Klein & Burden, 1988; Lawrence & Burden, 1980), el cual ocupa un pliegue en el peritoneo y se inserta cerca del lado ventral de la última costilla (Klein & Burden, 1988; Lawrence & Burden, 1980). El NOS inerva al ovario, oviducto y caudalmente a la musculatura del útero. Además, se considera la principal vía relacionada con la esteroidogénesis ovárica (Aguado & Ojeda, 1984; Burden, 1985; Vok, 1995).

El NPO está formado por axones adrenérgicos cubiertos por una matriz de colágeno que reviste a la arteria y a la vena ovárica. Es una rama del plexo aórtico y renal. Las fibras del plexo ovárico inervan a los oviductos, al ligamento ancho y se proyectan al interior del ovario junto con la arteria ovárica (Klein & Burden, 1988). Las fibras aferentes que inervan al ovario se originan en el ganglio de la raíz dorsal T10 mientras que los que inervan a los oviductos corresponden a los segmentos T11, T12 y L1 (Baljet & Drukker, 1979; Lawrence & Burden, 1980). El NPO proyecta sus fibras principalmente a la vasculatura del ovario (Klein & Burden, 1988; Lawrence & Burden, 1980; Uchida & Kagitani, 2015).

2.5 Regulación de las Funciones Ováricas Vía el Sistema Nervioso

La arquitectura del tejido ovárico está en constante remodelación estructural y funcional, los cambios ocurren en estrecha proximidad temporal y espacial. Estos eventos incluyen la proliferación y diferenciación celular, por ejemplo, en el crecimiento del folículo, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo. La inhibición o estimulación del desarrollo folicular y la esteroidogénesis es modulada por mecanismos centrales y periféricos. El primero está asociado a la liberación de gonadotropinas, estimulada por el hipotálamo; mientras que el segundo se relaciona con influencia nerviosa directa. En diferentes modelos animales y en condiciones

fisiológicas, ACh (Lakomy et al., 1982) así como NO (Masuda et al., 2001) y VIP (Bruno et al., 2011) regulan la esteroidogénesis ovárica dependiendo de la etapa del ciclo estral. Como se mencionó antes se ha estudiado la inervación extrínseca del ovario, pero poco se sabe de su inervación intrínseca. La inervación intrínseca se ha estudiado en diferentes órganos y sistemas. Por ejemplo, en el sistema entérico se han encontrado neuronas intrínsecas en las capas que rodean a los intestinos relacionándolas con la motilidad (Anetsberger et al., 2018), la producción de mucosa y bilis (Hao et al., 2020). La inervación intrínseca del ovario se ha descrito en especies como el *emu* (*Dromaius novaehollandiae*), donde existen cuerpos neuronales con un núcleo prominente que se encuentran arreglados a manera de clústeres (Gilbert, 1969; Madekurozwa, 2008). En otros mamíferos también se han identificado estructuras nerviosas, células y fibras, por ejemplo, al interior del ovario de cerdas (Jana et al., 2015). En la mujer se han descrito neuronas intraováricas utilizando marcadores anti-human p75-NGFR, evidenciando células con un núcleo prominente alrededor de los folículos, de la médula, de la corteza ovárica y en cuerpos lúteos, sin que estos penetren al interior de ellos (Anesetti et al., 2001). En roedores se han identificado neuronas en el ovario de las ratas de la cepa Wistar utilizando marcadores morfogénicos como NeuN (así como factores de crecimiento nervioso y para TH). Se han observado neuronas multipolares alojadas principalmente en la médula ovárica, durante la edad neonatal hasta la edad adulta joven. Sin embargo, no se han encontrado en animales de la cepa Sprague-Dawley (D'Albora & Barcia, 1996; D'Albora et al., 2000).

Estudios recientes han evidenciado que en el ovario de algunas especies las terminales nerviosas están en estrecha relación con los folículos primordiales y en desarrollo, pero nunca penetran a las células de la granulosa ni tampoco al cuerpo lúteo. Así, en la cerda las fibras nerviosas intraováricas parasimpáticas del ovario se encuentran alrededor de los folículos preantrales y antrales, del cuerpo lúteo, de los vasos sanguíneos y de la glándula intersticial. Dichas fibras expresan ACh y sus co-transmisores: óxido nítrico, VIP, somatostatina, sustancia P y galanina (Jana et al., 2018).

En el curso de estados patológicos de los ovarios de cerdas adultas (hiperestrogenismo), la cantidad de fibras nerviosas parasimpáticas disminuyen al interior del ovario, afectando los patrones de inervación colinérgica (cambios en la distribución o número de fibras nerviosas que contiene VACHT, nNOS y VIP) modificando sus funciones (Jana et al., 2018). Las

catecolaminas, el sistema colinérgico y los neuropéptidos participan en la regulación del flujo sanguíneo del ovario (Aguado et al., 1982). Además, intervienen en las funciones ováricas mediante receptores localizados en las membranas de las células foliculares. Dichos receptores pueden ser activados o inhibidos mediante fármacos agonistas o antagonistas, y modifican la liberación de los esteroides ováricos (Gerendai & Halász, 1997). También parecen participar en la aparición de la pubertad ya que en ratas prepúberes, la estimulación β -adrenérgica aumenta hasta 11 veces la concentración de 17- β -estradiol debido al rápido crecimiento folicular. Incluso, se ha sugerido que el efecto de la estimulación vía nerviosa en la liberación de progesterona supera el efecto producido por la LH (De Bortoli et al., 1998). Algunos grupos de investigación han mostrado la participación de las neuronas extrínsecas en patologías como en el síndrome del ovario poliquístico (Acuna et al., 2009; Chavez-Genaro et al., 2007; Cruz et al., 2017). Han propuesto que la inervación noradrenérgica intrínseca exacerbada está asociada a la pérdida de la función reproductiva en las ratas senescentes, similar a lo que ocurre en el animal con tal síndrome. Otros autores han observado que la pérdida en el número de los folículos viables está asociada a la creciente concentración de noradrenalina (NA) en el ovario de la rata (Chavez-Genaro et al., 2007). En ratas, el incremento en el tono simpático de los ovarios produce quistes, acompañados de degeneración folicular a partir de los 10 meses, siendo que a los 14 meses, el número de quistes es significativamente mayor (Acuna et al., 2009). La presencia de quistes estaría relacionada con el aumento en la concentración intraovárica de NA. Sin embargo, no se conoce la fuente de este aumento exacerbado de NA al interior del ovario, ya que en el ganglio celiaco (principal relevo neuronal entre el sistema nervioso central y los ovarios) la concentración de NA no incrementa en la senescencia. En ese ganglio la NA más bien disminuye conforme avanza la edad; por lo que su aumento podría estar dado por otras vías como la inervación intrínseca, la cual no ha sido estudiada ni descrita en la etapa senescente (Acuna et al., 2009; Banerjee et al., 2014; Chavez-Genaro et al., 2007; Dumesic & Richards, 2013; Venegas-Meneses et al., 2015). Al igual que en la mujer y la mona Rhesus, las ratas poseen fuentes de catecolaminas intraováricas (D'Albora et al., 2000; Mayerhofer et al., 1998). La ACh es uno de los neurotransmisores más ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y periférico. Este neurotransmisor también es producido por células no neuronales en varios órganos. Sus acciones están mediadas por receptores nicotínicos y muscarínicos.-(Beckmann &

Lips, 2014; Fritz et al., 1999; Fujii et al., 2017; Wessler & Kirkpatrick, 2017). En el ovario, las células de la granulosa son productores y diana de ACh (Mayerhofer & Fritz, 2002; Mayerhofer & Kunz, 2005). Estudios con células granulosa humanas de pacientes sometidos a fertilización in vitro, muestran que la ACh regula la viabilidad y proliferación celular. Además, los estudios en ratones indican que la hormona foliculoestimulante (FSH) estimula la producción de ACh por las células de la granulosa. Por lo tanto, ACh podría participar en la mediación de acciones de FSH en el compartimento avascular del ovario (Mayerhofer et al., 2006). Estudios en el cuerpo lúteo bovino mostraron una acción trófica de ACh en el ovario, incrementando la viabilidad celular a través de la prevención la muerte celular inducida por TNF/IFNG (tumor necrosis factor alpha/interferón gamma) en cultivos de CL (Al-Zi'abi et al., 2009). En ratas, la administración de un bloqueador de acetilcolinesterasa aplicado localmente en la bursa ovárica aumentó los niveles de ACh dentro del ovario y promovió específicamente el paso de los folículos preantrales hasta la etapa antral temprana (Mayerhofer et al., 1998). Además, el tratamiento mejoró significativamente los resultados de la maduración antral del folículo, la ovulación y la fertilidad.

En la cerda, las fibras nerviosas parasimpáticas intraováricas expresan ACh y sus co-transmisores: óxido nítrico, VIP, somatostatina, sustancia P y galanina, las cuales se encuentran involucradas en la regulación de las funciones ováricas bajo condiciones fisiológicas. En esta especie el óxido nítrico regula la esteroidogénesis y la contractilidad de las arterias ováricas. Similarmente, la somatostatina está involucrada en el crecimiento y desarrollo folicular en ratas y ratones (Jana et al., 2018). En el curso de estados patológicos de los ovarios de cerdas adultas (hiperestrogenismo), la cantidad de fibras nerviosas simpáticas disminuyen, afectando los patrones de inervación colinérgica (cambios en la distribución o número de fibras nerviosas que contiene VAcHT, nNOS y VIP) al interior del ovario, modificando sus funciones (Jana et al., 2018).

2.6 Senescencia de la Rata y Pérdida de la Función Reproductiva

El estudio de la arquitectura del tejido ovárico muestra que éste se encuentra bajo constante remodelación estructural y funcional, en función de la edad del animal. Dichos eventos incluyen la proliferación, diferenciación y muerte celular, por ejemplo, en el crecimiento del folículo, la ovulación, formación del cuerpo lúteo y de quistes. Los trabajos

sobre senescencia en el ovario muestran que conforme avanza la edad del animal hay modificaciones en la arquitectura ovárica, principalmente a partir de los seis meses que es cuando empiezan a aparecer pequeños quistes, hasta la edad de 14 meses donde hay una disminución del área ocupada por la médula y la presencia de un gran número de quistes de tamaño prominente que ocupan la mayor parte de la corteza ovárica (Acuna et al., 2009). La senescencia reproductiva de los mamíferos es un proceso poco estudiado, sin embargo, es de vital importancia entender los procesos por los cuales se pierde la función ovárica. La pérdida de las células germinales ováricas inicia tempranamente en los mamíferos, con una caída exponencial de folículos a través de un proceso de atresia folicular, en asociación con el inicio del periodo de fecundidad en la etapa de la vida media. A partir de entonces, tanto en roedores como en humanos se presenta una disminución de ovocitos viables. Estos procesos pueden analizarse desde la perspectiva endócrina del eje hipotálamo- hipófisis- gónadas; empezando con la incapacidad de los esteroides ováricos para inducir en el hipotálamo la producción de GnRH y de las gonadotropinas por la hipófisis.

Algunos autores han mostrado que cuando la reserva de folículos en el ovario de la mujer baja a alrededor de mil folículos ya no se puede mantener la retroalimentación hormonal con el hipotálamo y es cuando las mujeres entran a la menopausia (aproximadamente a los 51 años) (Cruz et al., 2017; te Velde et al., 1998). Otros autores han estudiado la senescencia en modelos animales, por ejemplo, a la edad de 10 meses las ratas de la cepa Sprague Dawley y Wistar presentan disminución del número de folículos y modificaciones en su ciclo estral (Acuna et al., 2009; Peng & Huang, 1972), esta reducción continúa hasta los 12 meses de edad entrando en periodos subfértiles e infértiles, conforme avanza la edad de los animales (Acuna et al., 2009; Chavez-Genaro et al., 2007).

La pérdida en el número de folículos viables está asociada con el fin de la función reproductiva; proceso que también es asociado a una concentración creciente de NA en el ovario de la rata. Experimentalmente se ha inducido un incremento en el tono simpático de los ovarios y se puede observar una relación entre la concentración de catecolaminas y formación de quistes, acompañado de la degeneración folicular (Acuna et al., 2009; Chavez-Genaro et al., 2007). Recientemente se ha reportado un incremento en la concentración de NA ovárica y cambios a la baja en el número de folículos, así como el tamaño de los ovarios conforme aumenta la edad

del animal (Acuna et al., 2009; Banerjee et al., 2014; Dumesic & Richards, 2013; Venegas-Meneses et al., 2015).

Por otro lado, se ha buscado determinar si VIP o NA son capaces de actuar sobre folículos primarios para facilitar el proceso de diferenciación molecular que conduce a la dependencia de las gonadotropinas, sugiriendo que los nervios ováricos, actuando a través de neurotransmisores acoplados al sistema generador de cAMP, contribuyen al proceso de diferenciación mediante el cual los folículos primarios recién formados adquieren receptores de FSH y capacidad de respuesta a la FSH. Los folículos que comienzan a crecer en regiones ováricas más densamente inervadas pueden tener una ventaja selectiva sobre aquellos que no están expuestos a señales dependientes de AMPc activadas por neurotransmisores y, por lo tanto, tal vez estén sometidos más rápidamente al control de las gonadotropinas (Mayerhofer et al., 1997).

Por otra parte, se ha visto que la expresión de kisspeptina (Wessler & Kirkpatrick, 2017), que es un neuropéptido propuesto como regulador de los efectos de la inervación simpática del ovario, incrementó en ratas de 10 y 12 meses de edad, en comparación con ratas de 6 meses de edad. Se sugiere que la kisspeptina intraovárica participa negativamente en unión al receptor de FSH, lo que indica un papel local en la regulación de desarrollo folicular y ovulación durante la pérdida de la función reproductiva (Fernandois et al., 2016). Al igual que en el ser humano y el mono rhesus, las ratas poseen fuentes de catecolaminas intraováricas como describe D'albora (D'Albora et al., 2000), ya que se han encontrado marcas inmunorreactivas a marcadores neuronales (NeuN), así como factores de crecimiento nervioso) y para TH; por otra parte, se ha visto que el RNAm de TH y DBH se expresa en el ovario de la mona Rhesus (Mayerhofer et al., 1998).

3. Justificación

Diversos estudios han postulado que en las terminales nerviosas localizadas en los ovarios se liberan neurotransmisores y neuropéptidos que influyen en la actividad de los tejidos ováricos cuyo papel sería de tipo regulador en la esteroidogénesis y el desarrollo folicular (Dissen et al., 2003; Dominguez et al., 1988; Dominguez & Riboni, 1971; Hsueh et al., 1984; Mayerhofer et al., 1997). Así mismo, se ha mostrado que en las membranas de las células foliculares existen receptores adrenérgicos y que el empleo de fármacos agonistas o antagonistas

modifica la liberación de los esteroides ováricos (Gerendai et al., 1995; Ojeda & Lara, 1989). La inervación intrínseca del ovario es provista por neuronas con soma multipolar alojadas dentro de este órgano, principalmente en la médula ovárica (D'Albora et al., 2000). **Los estudios de la inervación de las gónadas permiten conocer la influencia del sistema nervioso sobre su funcionamiento y las patologías asociadas.** Algunos grupos de investigación han mostrado la participación de las neuronas extrínsecas en patologías como el Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP). También se ha propuesto que la inervación catecolaminérgica intrínseca exacerbada está asociada a la pérdida de la función reproductiva en las ratas senescentes, similar a lo que ocurre en el animal con el SOP, sin embargo, no se ha estudiado el papel de los neurotransmisores de las neuronas intrínsecas del ovario en la etapa senescente. En nuestro laboratorio hemos analizado la organización de los circuitos nerviosos extrínsecos del ovario de la rata CII-ZV adulta. Nuestros resultados han mostrado variación en la relación entre los ovarios izquierdo y derecho con las neuronas de los ganglios celiaco y mesentérico-superior durante las fases ciclo estral. También hemos localizado a las neuronas sensoriales que inervan al ovario en el ganglio de la raíz dorsal (T10-T12) (Cruz, 2015), las cuales también presentan variaciones en función de la etapa del ciclo estral. Al respecto consideramos que el cambio de neurotransmisor de las neuronas puede ser el resultado de efectos directos de las hormonas esteroides sobre estas células. Es conocido que las neuronas simpática y parasimpática que inervan al ovario expresan receptores a estrógenos, así al igual que neuronas de los ganglios sensoriales de animales adultos. El tratamiento a largo plazo con 17β -estradiol reduce la población de estas neuronas (Jana et al., 2012; Jana et al., 2013; M. Koszykowska et al., 2011). Dado que uno de los objetivos de nuestro laboratorio es conocer **la inervación de las gónadas femeninas y su influencia sobre su funcionamiento y patologías asociadas,** en el presente trabajo analizamos si existen neuronas intrínsecas en el ovario de ratas Long Evans (CII-ZV) e identificamos la naturaleza bioquímica de estas neuronas a lo largo de la etapa reproductiva de las hembras hasta la etapa de vida senescente.

4. Hipótesis

Las neuronas intrínsecas del ovario de ratas jóvenes presentan características morfométricas y bioquímicas diferentes a las de las ratas senescentes, en estas últimas aumenta la biosíntesis de neurotransmisores.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Caracterizar morfométrica y bioquímicamente a las neuronas intrínsecas de los ovarios de ratas adultas jóvenes y senescentes.

5.2 Objetivos Particulares

- Determinar en ratas adultas de 3, 12 y 15 meses de edad el número de neuronas intrínsecas en las estructuras anatómico-funcionales del ovario de acuerdo con su distribución.
- Caracterizar la morfometría de las neuronas intrínsecas del ovario de ratas adultas de 3, 12 y 15 meses de edad utilizando marcadores neuronales NeuN y β -tubulina III.
- Cuantificar el número de neuronas noradrenérgicas del ovario en ratas adultas de 3, 12 y 15 meses de edad.

6. Metodología

6.1 Diseño Experimental

Se utilizaron ratas Long Evans (CII ZV) de 3-5, 12 y 15 meses de edad (n= 4 animales por grupo). Los animales de 3-5 meses fueron considerados como animales jóvenes y fueron ratas en estro que presentaron tres ciclos consecutivos de cuatro días de duración (estro, diestro 1, diestro 2 y proestro). Todos los animales fueron mantenidos en condiciones de iluminación controlada (14 h luz/10 h oscuridad) con libre acceso al agua y al alimento. A todos los animales se les registro citología vaginal por medio de frotis de la piel de la vagina diariamente entre las 09:00 y 10:00 h. Los animales de 12 y 15 meses presentaron estro continuo

6.2 Procedimiento de la Necropsia y Fijación de los Ovarios por Perfusión Intracardiaca

Entre las 09:00 y 10:00 h, los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal (80 mg/kg) de pentobarbital sódico (Anestosal; Smith Kline Norden de México). Antes de iniciar la perfusión, se verificó que el animal estuviera bien anestesiado e inmóvil. Se

colocó y fijo al animal anestesiado sobre una base de acero inoxidable (la bandeja estaba inclinada levemente sobre el agujero colector para llenar el recipiente de recolección de desechos biológicos de la perfusión), se pellizco al nivel del esternón para levantar la piel sobre el cartílago, sujetando con pinza hemostática y se realizó la incisión con tijeras de cirugía una línea longitudinal que abarcó las regiones torácica y abdominal. Posteriormente, se cortó el cartílago del esternón y el músculo del diafragma hasta la región abdominal, de modo que quedaron expuestas las vísceras (pulmones, corazón e intestinos). Posteriormente se removieron las membranas que unen el corazón con otros órganos pericárdicos. El corazón del animal fue exteriorizado con ayuda de un fórceps para separar las costillas. Se realizó una pequeña incisión en el ápice del ventrículo izquierdo y se colocó el catéter de la perfusión por el ventrículo, hasta la porción proximal de la aorta, y se fijó al cuerpo del animal. Se realizó una incisión en la aurícula derecha para dejar escapar el líquido de perfusión que circulaba por el animal. Cuando el catéter de la perfusión exsanguinizante estuvo asegurado en el corazón, se lavó por un minuto al animal para desangrarlo (usualmente de 250 a 500 mL de solución Hartmann) hasta observar que el líquido contenía poca sangre. Los ovarios obtenidos de los animales perfundidos fueron limpiados y se les retiro el exceso de tejido adiposo para posteriormente ser colocados en fijador de Carnoy durante 24 h y posteriormente se colocaron en soluciones de sacarosa al 10, 20 y 30% cada 24 h para su criopreservación.

6.3 Determinación de la Presencia de las Proteínas de β -tubulina, NeuN y Tirosina Hidroxilasa por Inmunofluorescencia

Los ovarios criopreservados fueron cortados en secciones de 10 μ m de grosor en el criostato (THERMO Shandon Cryotome E) a -25 °C. Se tomó un corte de cada cinco para colocarlos en las laminillas y así dividirlos en los diferentes grupos experimentales (NeuN/ β -tubulina; NeuN/TH; Control Negativo NeuN/ β -tubulina; Control Negativo NeuN/TH y laminilla de referencia con tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E) (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de las secciones de los ovarios para estudios histológicos e histoquímicos.

NeuN/ β -Tubulina		NeuN/TH		CONTROL NEGATIVO- NeuN/ β -Tubulina		CONTROL NEGATIVO- NeuN/TH		H&E	
1	31	2	32	3	33	4	34	5	35
6	36	7	37	8	38	9	39	10	40
11	41	12	42	13	43	14	44	15	45
16	46	17	47	18	48	19	49	20	50
21	51	22	52	23	53	24	54	25	55
26	56	27	57	28	58	29	59	30	60

Immunofluorescencia: las secciones se descongelaron a temperatura ambiente y se trataron por 90 min en suero fetal bovino, al 6% (Gibco, Thermo Scientific) y Tween 20 al 0.1% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario durante 72h a 4°C. Se utilizaron anticuerpos primarios policlonales anti-conejo β -Tubulina (1:500 Cell Signaling), anti-ratón NeuN (1:500 Merck Millipore) y anti-conejo TH (1:500 EMD Millipore Crop.). Después de la incubación del anticuerpo primario, los tejidos se lavaron en Buffer Tris-EDTA (Buffer TE) 0.5M durante 1 min, posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a rodamina (1:500 Jackson Immuno Research Laboratories Inc.) y anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a fluoresceína (1:500 Jackson Immuno Research Laboratories Inc.) durante 24 horas. Al finalizar la incubación de los anticuerpos secundarios, los tejidos se lavaron con Buffer TE por 1 min. A los tejidos se les agregó DAPI-Vecta-Shield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) para su observación al microscopio. Las observaciones y el análisis de la inmunorreactividad a los anticuerpos en

los folículos ováricos se realizaron con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX41), la toma de fotografías panorámicas se realizó con una cámara digital (Q-Imaging) acoplada a un microscopio confocal (Nikon ECLIPSE Ti). Las fotomicrografías fueron obtenidas en formato TIFF del software Image Pro-premier 9.2 (Media Cybernetics, Inc., Rockville, USA).

6.4 Análisis Estadístico

El conteo de las neuronas Inmunorreactivas, así como el área del soma se realizó mediante el software Image Pro-premier 9.2 (Media Cybernetics, Inc., Rockville, USA). Para obtener el número de neuronas por área se utilizó el método de estimación para poblaciones celulares de Block (Block, 1951) como factor de corrección (Tabla 2). Posteriormente se determinó si había diferencias significativas entre los grupos experimentales por medio de una ANDEVA seguida de una prueba de Tukey para datos no paramétricos (Graphpad Prism. 8.1).

Tabla 2. Anticuerpos utilizados y estructuras en las que se evaluaron cuantitativamente los marcadores moleculares.

	FOLÍCULOS	CUERPO LÚTEO	GLÁNDULA INTERSTICIAL
TH	12 cortes, alrededor de 90 folículos x rata	12 cortes 60CL x rata	12 cortes 12 mapeo de área total de la corteza x rata
B-TUBULINA	Co-localización	Co-localización	Co-localización
NeuN	Co-localización	Co-localización	Co-localización

7. Resultados

7.1 Análisis Morfológico

El análisis histológico de los ovarios en las diferentes edades muestra que el tamaño del ovario de la rata de tres meses es mayor respecto al ovario de la rata de 12 y 15 meses (3M= 14223.57 mm², 12M= 8915.413 mm² y 15M= 10270.32 mm² (Figura 6). Los cambios en la arquitectura ovárica en función de la edad nos permiten mostrar que en el grupo de animales adulto joven (Figura 6), las estructuras predominantes que ocupan el área de la corteza ovárica son los folículos en diferentes estadios de desarrollo y los cuerpos lúteos. La innervación intrínseca es notoria alrededor de las estructuras mencionadas.

A la edad en que normalmente la rata deja de ovular (12 meses), la proporción de tejido ovárico cambia, ya que se hace muy evidente la presencia de quistes ováricos y, en segundo término, se pueden apreciar aún folículos atrésicos y cuerpos lúteos en regresión; las neuronas en esta etapa se localizaron alrededor de las estructuras quísticas o foliculares, con tendencia a ubicarse en la región media del ovario (Figura 7).

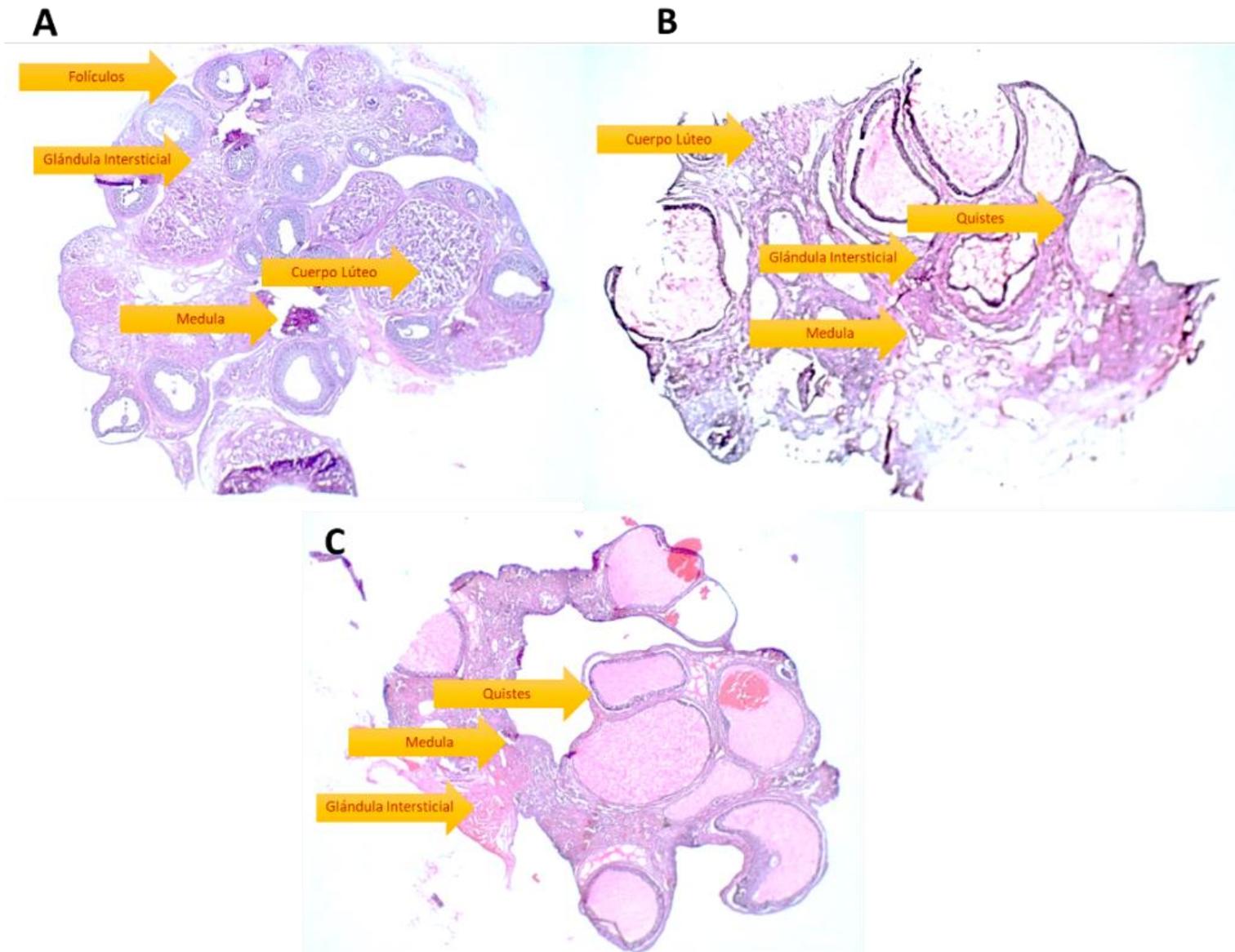


Figura 6. Cortes de ovarios teñidos con H&E, señalando sus diferentes estructuras. Note las diferencias de acuerdo con la edad de los animales: A) 3 meses; B) 12 meses; C) 15 meses en tinción.

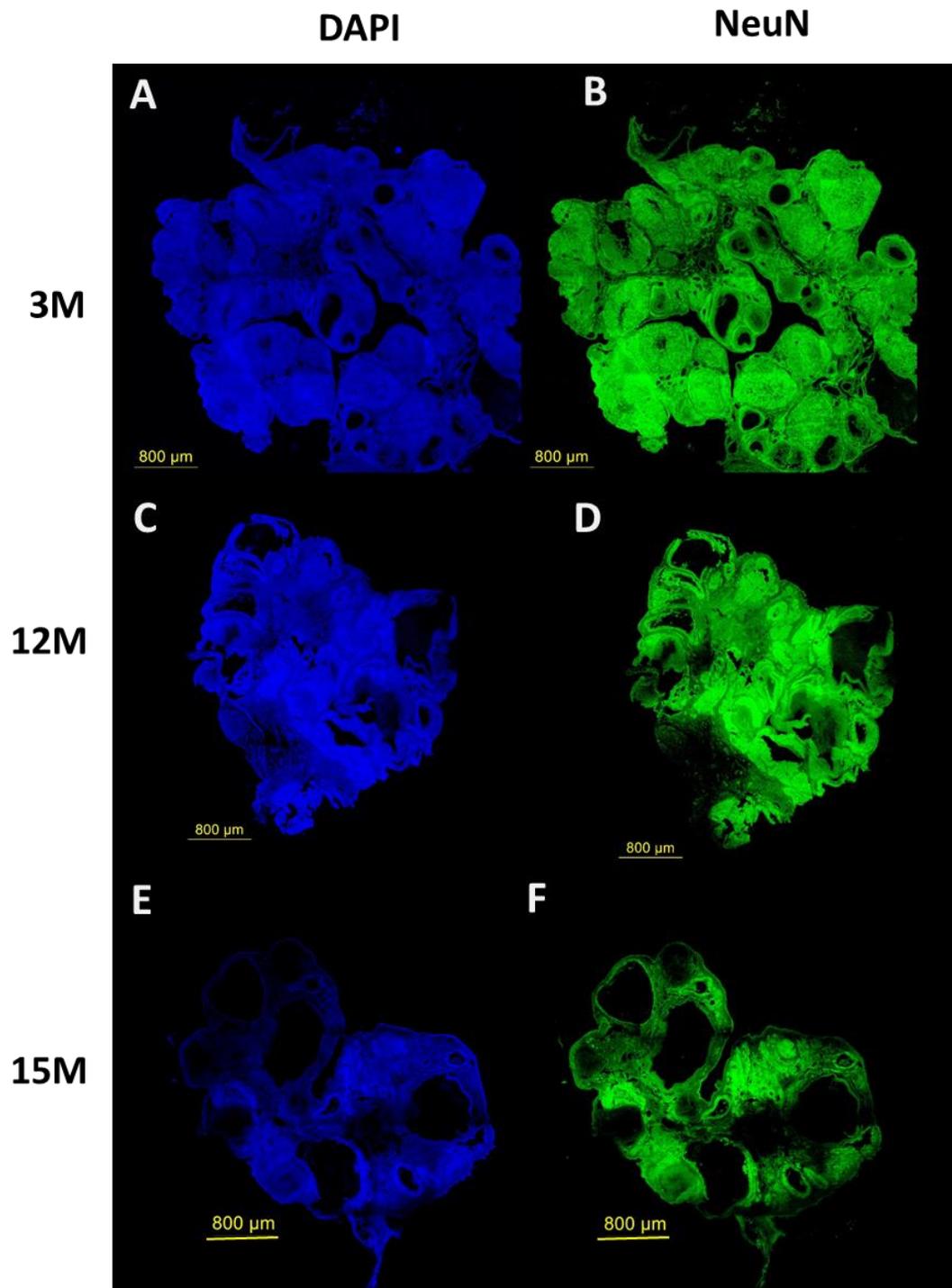


Figura 7. Microfotografías que muestran la reconstrucción de ovarios de ratas de la cepa CII ZV de 3, 12 y 15 meses de edad (3M, 12M y 15M). Se muestran en verde los cortes sobreexpuestos de los ovarios marcados con NeuN. Los núcleos están marcados con DAPI.

En el ovario de la rata senescente de 15 meses de edad prevalecen las estructuras quísticas y las neuronas se presentan alrededor de dichas estructuras, predominantemente en la glándula intersticial (Figura 8-10). Las neuronas intrínsecas del ovario fueron observadas en todas las edades estudiadas. En la corteza ovárica hay mayor concentración de neuronas en la glándula intersticial y alrededor de los folículos. A los 15 meses de edad, a pesar de que el área ocupada por el ovario está disminuida y hay menor número de estructuras funcionales (folículos, cuerpos lúteos, glándula intersticial y quistes), el conteo de neuronas se realizó en las que están localizadas alrededor de los quistes.

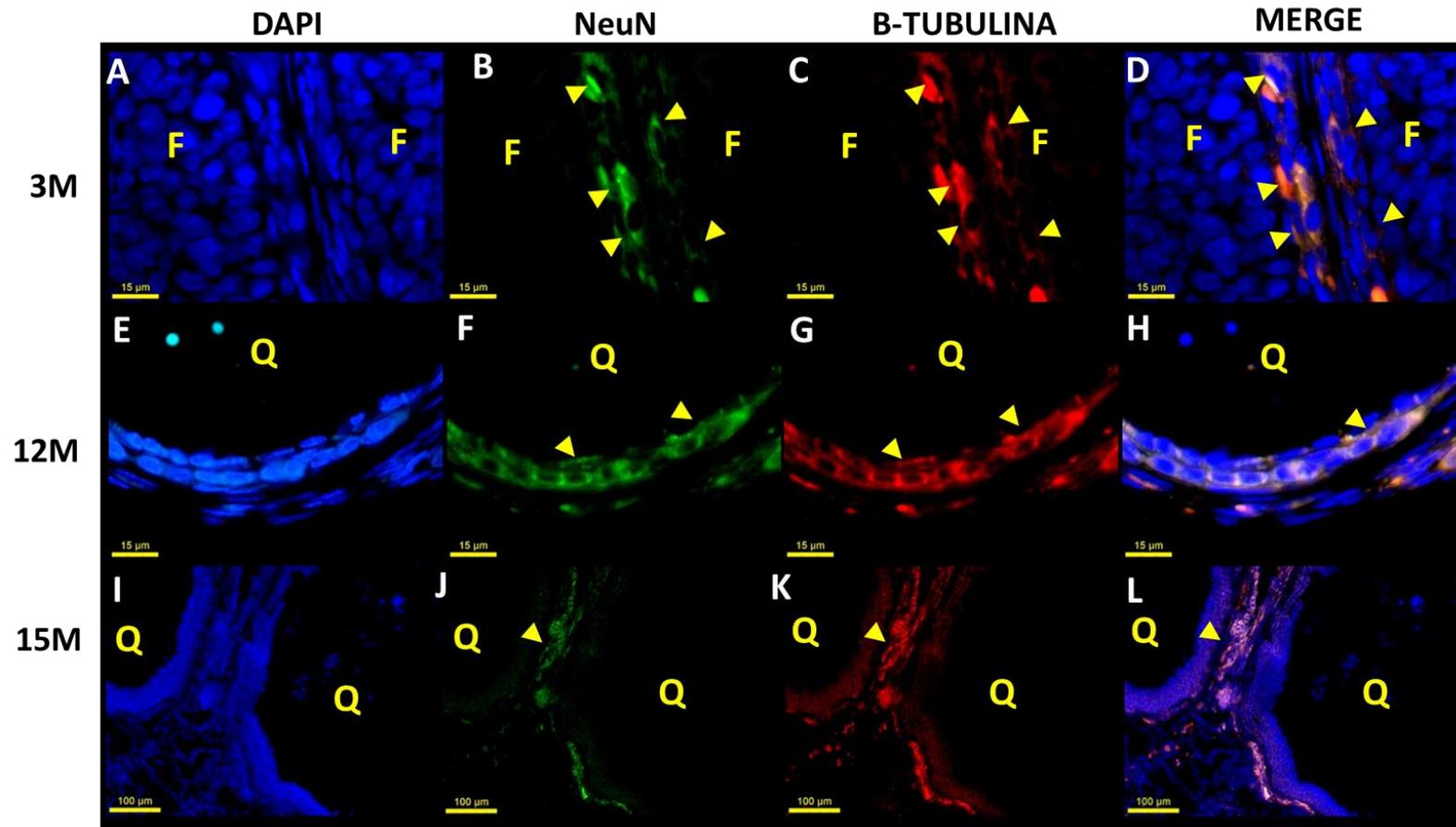


Figura 8. Inmunofluorescencia utilizada para localizar neuronas intrínsecas en el ovario (NeuN, verde y β -tubulina, rojo). Distribución de las neuronas intrínsecas alrededor de los folículos (F) de los ovarios en ratas de 3 meses (B y C), alrededor de un quiste (Q) de 12 meses (F y G, 60x) y alrededor de un quiste de ratas de 15 meses (J y K). Los núcleos están marcados con DAPI en A, E, I. La co-localización de NeuN y β -tubulina se muestra en las imágenes D, H y L. Las flechas amarillas muestran neuronas intrínsecas de los ovarios.

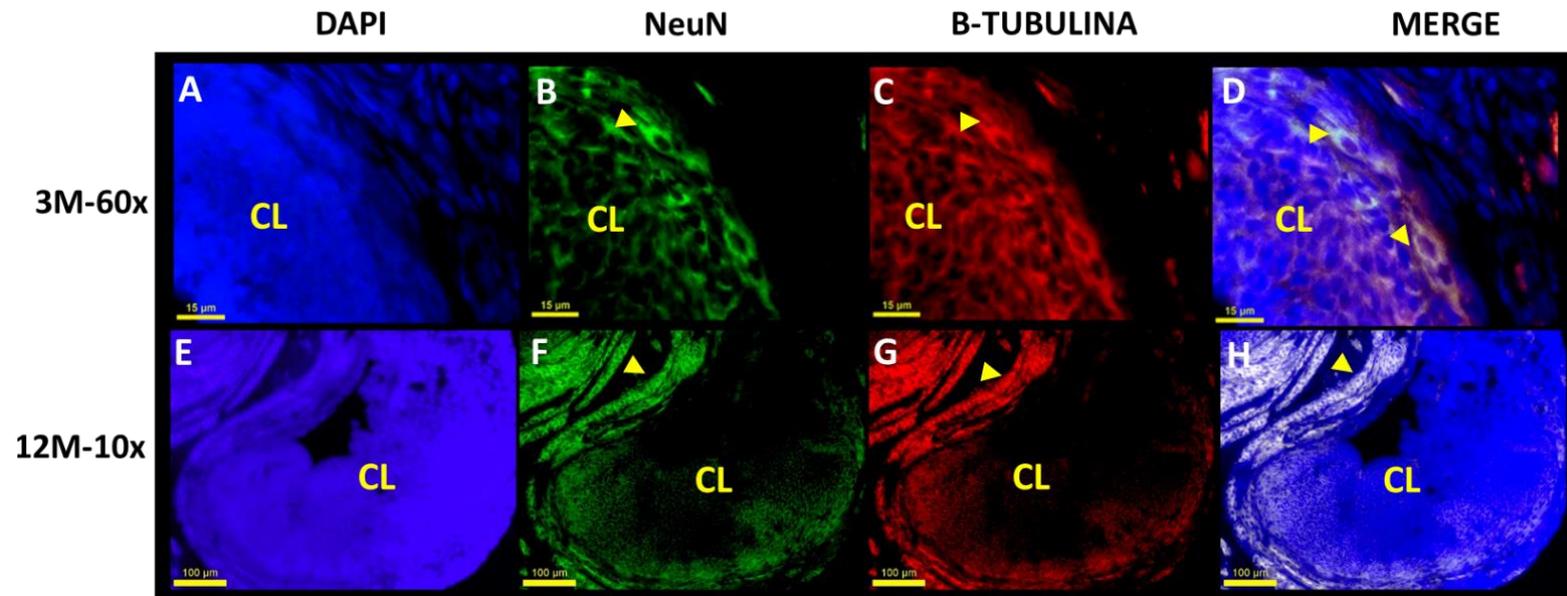


Figura 9. Microfotografías de los ovarios de ratas hembra de 3 y 12 meses. La inmunofluorescencia se realizó con anticuerpos anti-ratón NeuN (verde) y anti-conejo β -tubulina (rojo), se muestran neuronas intrínsecas de los ovarios alrededor de los cuerpos lúteos (CL). NeuN (B y F) y β -Tubulina (C y G). La co-localización de NeuN y β -tubulina se muestra en D y H. Los núcleos están marcados con DAPI en A y E. Las flechas amarillas muestran neuronas intrínsecas de los ovarios.

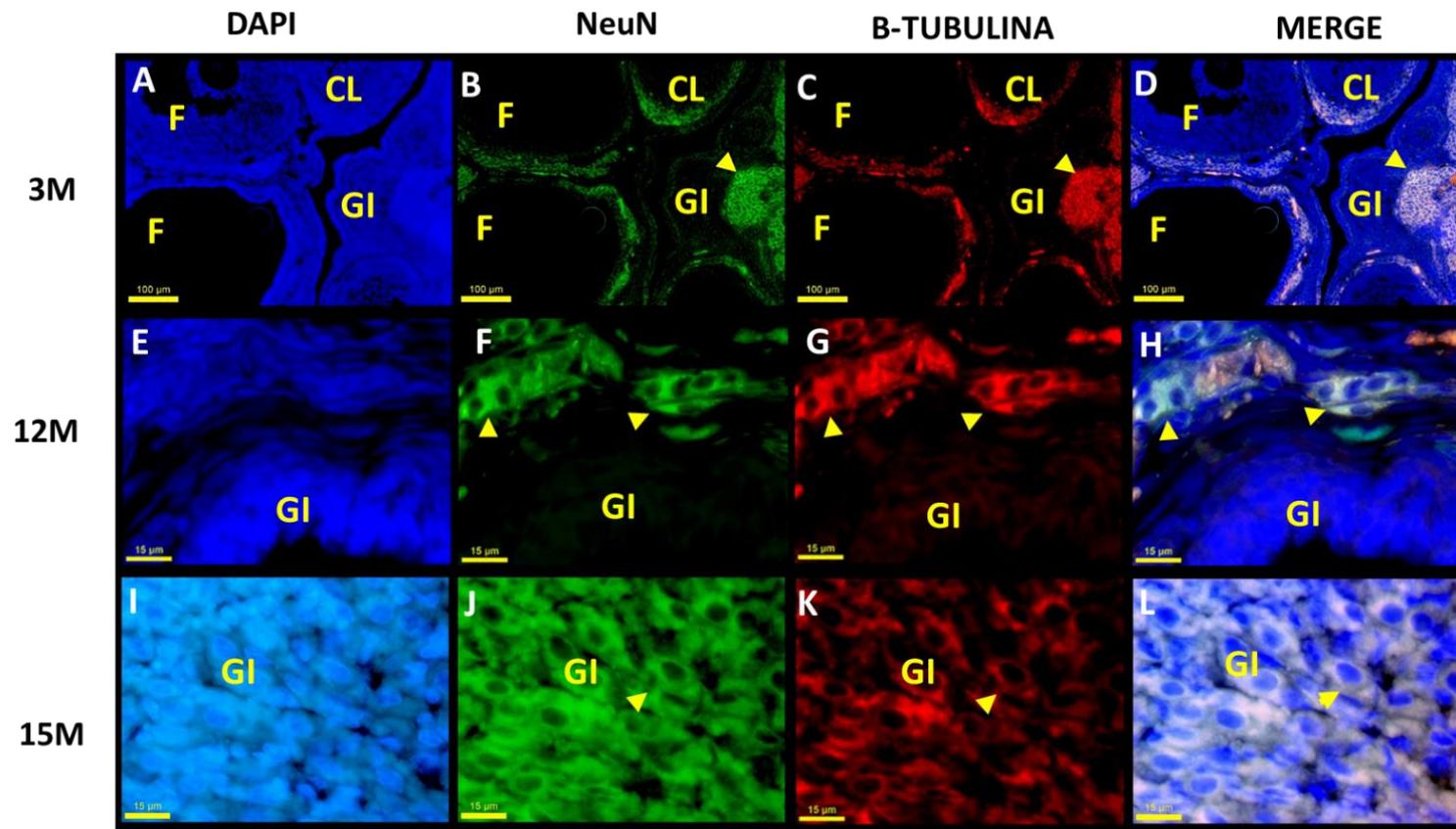


Figura 10. Mmicrofotografías de ratas hembra de 3, 12 y 15 meses de edad. La inmunofluorescencia se realizó con anticuerpos anti-NeuN (verde) y de anti- β -tubulina (rojo), que muestran neuronas intrínsecas en los cuerpos lúteos (CL), folículos (F) y la glándula intersticial (GI). NeuN-N (B, F y J) y β -Tubulina (C, G y K). La co-localización de NeuN y β -tubulina se muestra en D, H y L. Los núcleos están marcados con DAPI en A, E e I. Las flechas amarillas muestran neuronas intrínsecas de los ovarios.

El arreglo de las neuronas al interior de los ovarios, principalmente en la glándula intersticial, es en clústeres (Figura 11), incluso alrededor de los folículos no están aisladas, siempre se observan en grupos de al menos 3 neuronas. Las neuronas presentan características morfológicas muy diferentes a las células foliculares teniendo como principal diferencia un núcleo prominente y bien definido (promedio de $10.37\mu\text{m}$). Las neuronas ubicadas alrededor de los folículos también son alargadas, pero se distinguen de las células de la teca por su mayor tamaño.

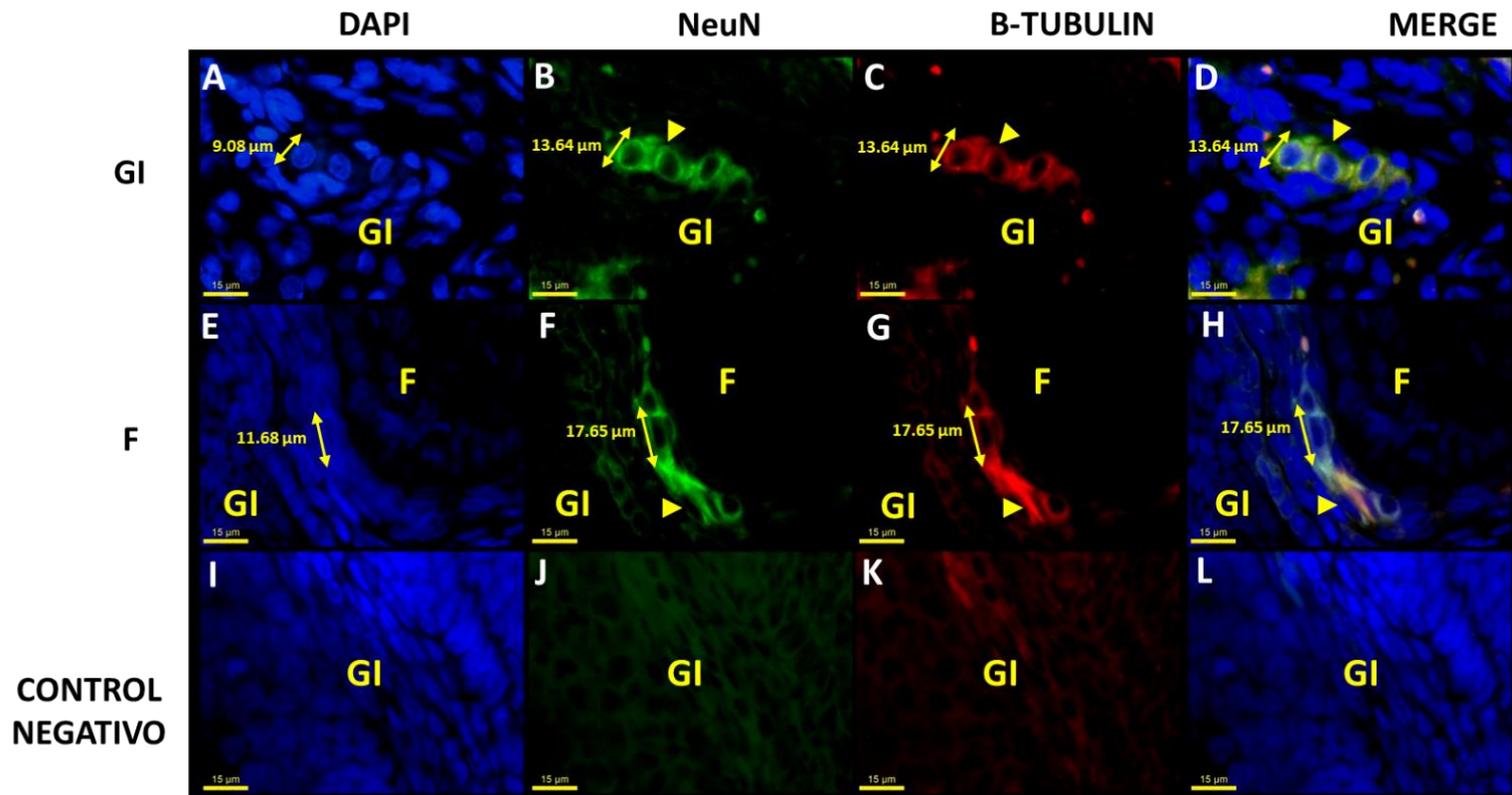


Figura 11. Microfotografías que muestran un grupo de neuronas en la glándula intersticial (GI) y los folículos (F) en ovarios de ratas hembra de 3 meses de edad. NeuN (B y F) y β -Tubulina (C y G). La co-localización de NeuN y β -tubulina se muestra en D y H. Los núcleos están marcados con DAPI en A y E. Las flechas amarillas muestran neuronas intrínsecas de los ovarios, en la capa de teca del folículo. El control negativo de la inmunofluorescencia se muestra en las microfotografías I, J y L.

7.2 Determinación de la Presencia de Tirosina Hidroxilasa

La marca inmunorreactiva a NeuN/TH, se localizó en los ovarios de todas las edades. En los ovarios de las ratas de 3 meses las neuronas NeuN/TH se ubicaron principalmente alrededor de los folículos. En los animales de 12 y 15 meses de edad, la marca inmunorreactiva se expresó alrededor de los quistes ováricos y en la glándula intersticial (Figura 12).

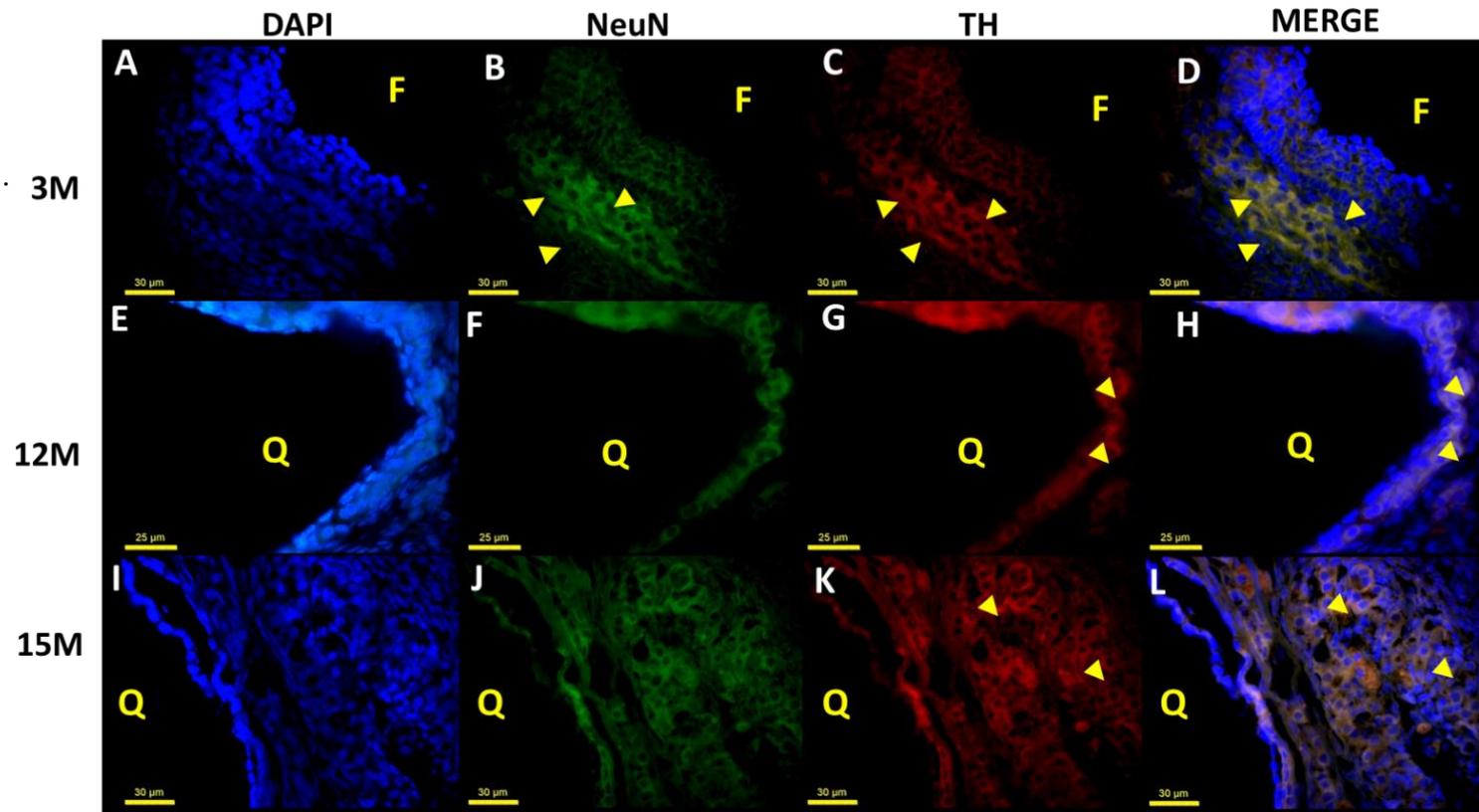


Figura 12. Se muestran grupos de neuronas NeuN/TH en folículos (F) y quistes ováricos (Q) en ovarios de ratas hembra de 3, 12 y 15 meses de edad. NeuN-N (B, F y J) y TH (C, G y K). La co-localización de NeuN y TH se muestra en D, H y L. Los núcleos están marcados con DAPI en A, E e I. Las flechas en amarillo muestran neuronas NeuN/TH al interior de los ovarios.

7.3 Evaluación Cuantitativa

Las neuronas localizadas alrededor de los folículos presentan variaciones a lo largo de la vida del animal. Como es de esperarse a los 15 meses ya no hay folículos, sin embargo, se realizó el conteo de neuronas alrededor de los quistes. A los 12 meses de edad se presentó un incremento significativo del número de neuronas asociadas a las estructuras foliculares. Por otra parte, también se midió el área de las células inmunorreactivas a NeuN y β -Tubulina, en las diferentes estructuras ováricas, ratificando lo descrito en los resultados previos que mostraban incremento en el tamaño de las neuronas conforme avanza la edad del animal. Estos datos son aplicables a las neuronas localizadas alrededor de los folículos y en la glándula intersticial, no así para las localizadas alrededor de los cuerpos lúteos.

Se realizó la cuantificación del número de neuronas por estructura en el ovario: alrededor de los folículos, alrededor del cuerpo lúteo y en la glándula intersticial. El número de neuronas localizadas alrededor de los folículos-quistes fue diferente entre las edades ($P < 0.05$; 3M=16.96 \pm 2.78 EEM; 12M=23.56 \pm 4.29 EEM, 15M=6.06 \pm 3.73EEM) (Figura 12A), con un pico a los 12 meses de edad. El número de neuronas alrededor del cuerpo lúteo no presentó variaciones entre las diferentes edades (3M=10.7 \pm 1.6 EEM; 12M=6.6 \pm .06 EEM), al igual que en la glándula intersticial (3M=69.8 \pm 14.8 EEM; 12M=68.2 \pm 19.3 EEM y 15M= 47.2 \pm 20.2 EEM) (Figura 13 B y C).

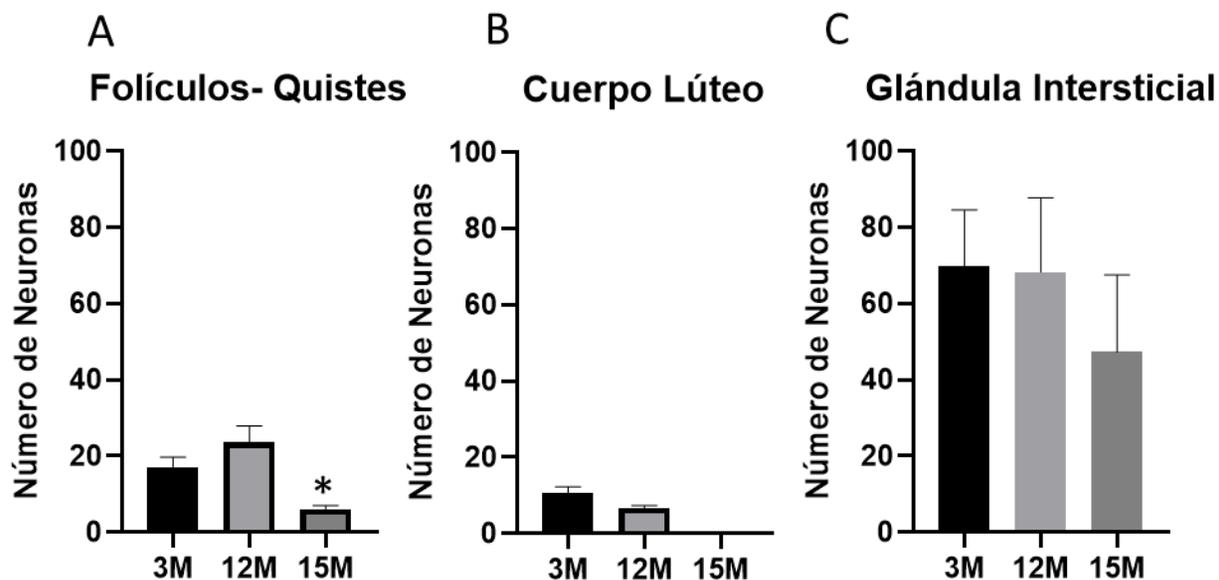


Figura 13. Media±EEM. del número de neuronas intrínsecas localizadas en las diferentes zonas del tejido ovárico en ratas hembra de 3,12 y 15 meses de edad, *P<0.05 vs. 3 y 12 meses (ANDEVA seguida de Tukey).

Por otra parte, el área de las células inmunorreactivas a NeuN y β -Tubulina, mostró un incremento conforme avanza la edad del animal. En los folículos de los ovarios de ratas se encontró diferencia significativa en el área de las neuronas de 15 meses de edad con respecto a los de 3 y 12 meses de edad ($P < 0.05$) (Figura 14A). Al analizar el área de las neuronas alrededor de los cuerpos lúteos no encontramos diferencias significativas $P > 0.05$ (3M=129.4±3.3 EEM, 12M=135.3±16.2 EEM) (Figura 14B). Podemos observar que la glándula intersticial presenta el número mayor de neuronas al interior del ovario y que es constante a lo largo de la etapa adulta del animal (Figura 14C).

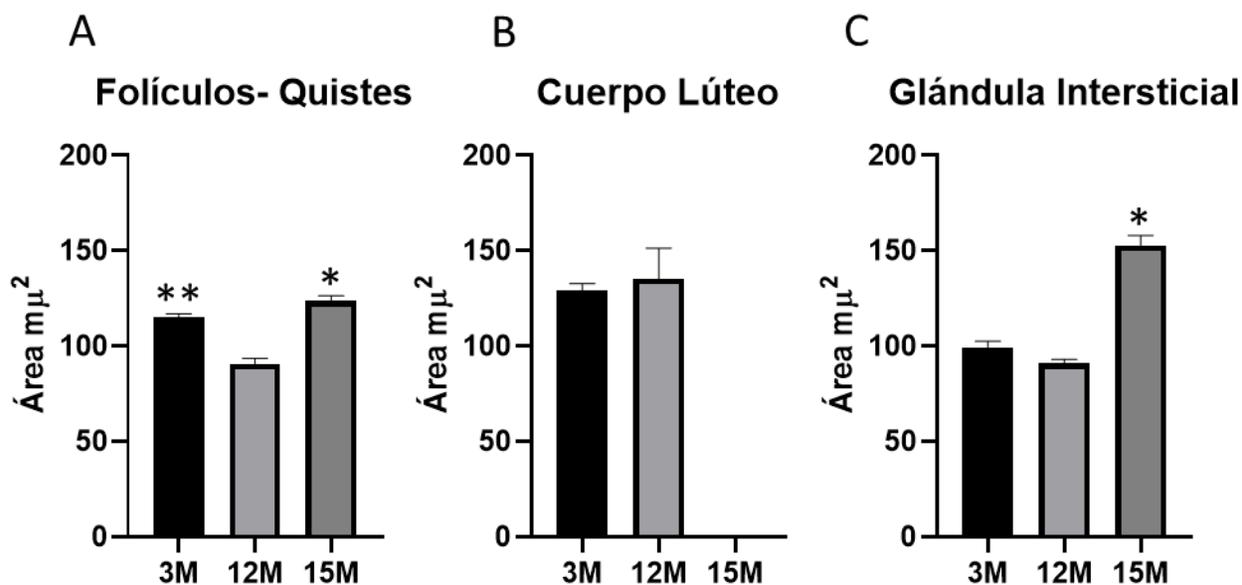


Figura 14. Media±EEM del área de las neuronas intrínsecas del ovario en ratas de la cepa CII-ZV de 3,12 y 15 meses de edad. *P<0.05 vs. 3 y 12 meses, **P<0.05 vs 12 meses (ANDEVA seguida de Tukey).

La marca inmunorreactiva a NeuN/TH se observó en los ovarios de las tres edades analizadas y las mismas estructuras del ovario descritas para la marca NeuN/ β -tubulina. Cabe resaltar que, en los ovarios de las ratas senescentes, el número de neuronas fue significativamente menor comparado con los animales de 3 y 12 meses de edad $P<0.05$ (3M=14.97±1.02 EEM; 12M=25.64±1.55 EEM y 15M=4.640±0.46 EEM) (Figura 15A). El área de las neuronas NeuN/TH fue diferente entre todos los grupos, donde a los 12 meses las neuronas presentaron menor tamaño ($P<0.05$; 3M=115.54±1.938 EEM; 12M=88.30±2.422 EEM y 15M=126.7±1.663 EEM) (Figura 15B).

El área de las neuronas localizadas alrededor del cuerpo lúteo no presentó diferencias significativas entre las edades; sin embargo, en la glándula intersticial podemos observar que existe una diferencia significativa en el área de las neuronas de los ovarios de los animales de 15 meses de edad con respecto a los de 3 y 12 meses de edad ($P<0.05$: 3M=102.9±1.15 EEM; 12M=95.8±1.79 EEM y 15M=164.2±3.22 EEM) (Figura 15C).

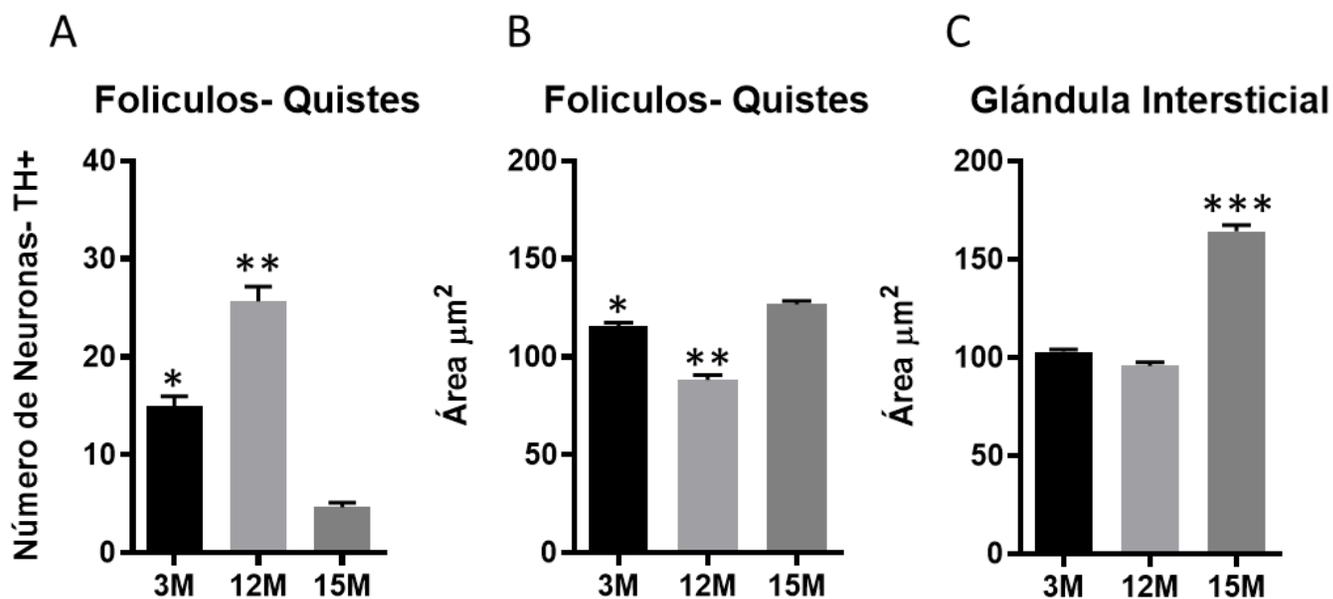


Figura 15. Se muestra: A) Media \pm EEM. del número de neuronas noradrenérgicas en folículos de ovarios de ratas de 3 meses de edad y de quistes ováricos de ratas de 12 y 15 meses de edad, B) Media \pm e.e.m. del área de neuronas noradrenérgicas en folículos de ovarios de ratas de 3 meses de edad y de quistes ováricos de ratas de 12 y 15 meses de edad, C) Media \pm EEM. del área del soma de las neuronas noradrenérgicas en la Glándula Intersticial de ratas de 3, 12 y 15 meses de edad, en todas se muestra diferencia significativa. *P<0.05 vs. 12 y 15 meses, **P<0.05 vs. 15 meses, ***P<0.05 vs 3 y 12 meses (ANDEVA seguida de Tukey).

8. Discusión

En el presente trabajo describimos la localización de neuronas intrínsecas en los ovarios de las ratas Long Evans (CII ZV), en la etapa adulta y en el periodo de senescencia reproductiva. Con estas evidencias proponemos una participación de estas neuronas en los procesos de formación-funcionamiento-muerte de las diversas estructuras funcionales del ovario en las que se encuentran localizadas: folículo, quiste, cuerpo lúteo y glándula intersticial. Los anticuerpos utilizados en el presente trabajo se eligieron por la especificidad y el uso que han tenido para reconocer cuerpos neuronales en sistema nervioso central y periférico. NeuN se expresa en el núcleo de las neuronas del sistema nervioso central, sin embargo, su marca inmunorreactiva se ha localizado en el citoplasma de neuronas periféricas del sistema entérico (Van Nassauw et al., 2005). La marca de NeuN en el citoplasma de neuronas puede deberse a la variante 48 kDa ya que es la que predomina en citoplasma (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015; Mullen et al.,

1992). Además, se ha encontrado que NeuN es un miembro de la familia de factores de Splicing de RbFox-1 y un epítipo de RbFox-3 el cual tiene varias versiones en sus extremos N-terminal siendo el Fox3v3 la que se encuentra en el citoplasma, estas proteínas están altamente conservadas en especies y son reconocidas por el anticuerpo a NeuN (Duan et al., 2016).

Por otro lado, se ha asociado la presencia de NeuN con la muerte neuronal, ya que en el animal senescente se ha encontrado menor marca respecto a animales jóvenes, por lo que en el presente hemos utilizado un segundo marcador para animales senescentes (Dredge & Jensen, 2011; Kim et al., 2009; Lind et al., 2005; Mariani et al., 2015; Portiansky et al., 2006; Weyer & Schilling, 2003). La β -tubulina tipo III se utilizó como segundo marcador neuronal confirmatorio para la identificación de neuronas intrínsecas del ovario, ya que el tipo III solo se evidencia en cuerpos neuronales (Almeida-Souza et al., 2011; Baas et al., 2016; Katsetos et al., 2003).

Con relación a la detección de β -tubulina en tejidos de animales senescentes, encontramos que conforme avanza la edad del animal desde la etapa adulta hasta la etapa senescente aumenta la síntesis de microtúbulos, encontrando mayor marca de β -tubulina en animales senescentes, esto lo hace un indicador esencial para las neuronas intrínsecas del ovario de la rata senescente. Además, mientras que NeuN estaría perdiendo inmunoreactividad, β -tubulina tendría mayor expresión en el animal senescente (Baas et al., 2016; Jiang & Oblinger, 1992; Korzhevskii et al., 2011). Los marcadores neuronales que utilizamos también se han ocupado para describir la inervación intrínseca de los ovarios de ratas neonatas, juveniles y adultas jóvenes, además de otras especies de mamíferos, incluyendo la mujer (Anesetti et al., 2001).

La inervación extrínseca de los ovarios se ha estudiado ampliamente por su función reguladora en el desarrollo folicular, esteroidogénesis y ovulación (Dogonay et al., 2010); misma que muestra modificaciones en la arquitectura ovárica a lo largo de la vida del animal (Acuna et al., 2009). Se ha propuesto que tanto la inervación extrínseca como la intrínseca llega hasta las células de la teca, sin atravesar la membrana basal de los folículos, cuerpo lúteo o quistes (Anesetti et al., 2001; D'Albora et al., 2002; D'Albora et al., 2000). Estos autores (D'Albora et al., 2000) mostraron neuronas intrínsecas en el ovario de la rata de la cepa Wistar

pero no en la Sprague-Dawley. Interesantemente, localizaron somas principalmente en la médula del ovario y algunos más aislados alrededor de los folículos ováricos.

Nuestros resultados corroboran algunos antecedentes dado que mostramos a las neuronas ubicadas estrechamente ligadas a las células de la teca interna y a la membrana basal. También aportamos evidencias de la presencia de somas en el interior de folículos atrésicos y en algunos cuerpos lúteos. Sin embargo, no replicamos la descripción de que hay una mayor cantidad de neuronas en la médula del ovario.

El análisis minucioso de los cortes nos ha dado la posibilidad de describir la regionalización de cúmulos de neuronas en forma de clústeres en la corteza ovárica, específicamente en la glándula intersticial, lo que pudiera estar asociado a la regulación de la esteroidogénesis. Esto abre la posibilidad de que las neuronas que existen alrededor de los cuerpos lúteos participen en su mantenimiento funcional, específicamente en la producción de progesterona, en principio, a través de los sistemas de neurotransmisión.

La abundante inervación que de manera particular tiene cada folículo desde etapas tempranas de su desarrollo hasta el proceso de su muerte celular, nos sugiere una regulación del desarrollo folicular y ovulación muy puntual y específica (Madedkurozwa, 2008). Los estudios de las terminaciones nerviosas extrínsecas del ovario han mostrado que liberan al interior del ovario diversos neurotransmisores, tales como NA, VIP, ACh, y neuropéptidos para ejercer efectos sobre el metabolismo de las estructuras funcionales del ovario (Dissen et al., 2002; Hsueh et al., 1984; Mayerhofer et al., 1997) (Figura 16).

Apoyamos la propuesta de que los folículos que comienzan a crecer en regiones ováricas más densamente inervadas, con lo cual pueden tener una ventaja selectiva sobre aquellos que no están expuestos a señales dependientes de AMPc activadas por neurotransmisores. Por lo tanto, están sometidos más rápidamente al control de las gonadotropinas (Mayerhofer et al., 1997), ya que la región donde más se ha observado inervación es en la corteza ovárica (D'Albora et al., 2000).

En diferentes modelos animales y en condiciones fisiológicas, ACh (Lakomy et al., 1982) así como NA (Masuda et al., 2001) y VIP (Bruno et al., 2011) regulan la esteroidogénesis ovárica dependiendo de la etapa del ciclo estral. Dado que se conoce el papel de la ACh en la proliferación celular (Gutkind et al., 1991) y en la morfogénesis (Lauder, 1993; Lauder &

Schambra, 1999) en diferentes tejidos, su presencia en los ovarios sugiere la participación de ACh al interior del ovario como un medio de control del desarrollo folicular en la función reproductiva de las hembras (Mayerhofer & Fritz, 2002). En otras especies como la cerda el óxido nítrico regula la esteroidogénesis y la contractilidad de las arterias ováricas, similarmente, la somatostatina está involucrada en el crecimiento y desarrollo folicular en ratas y ratones (Jana et al., 2018)

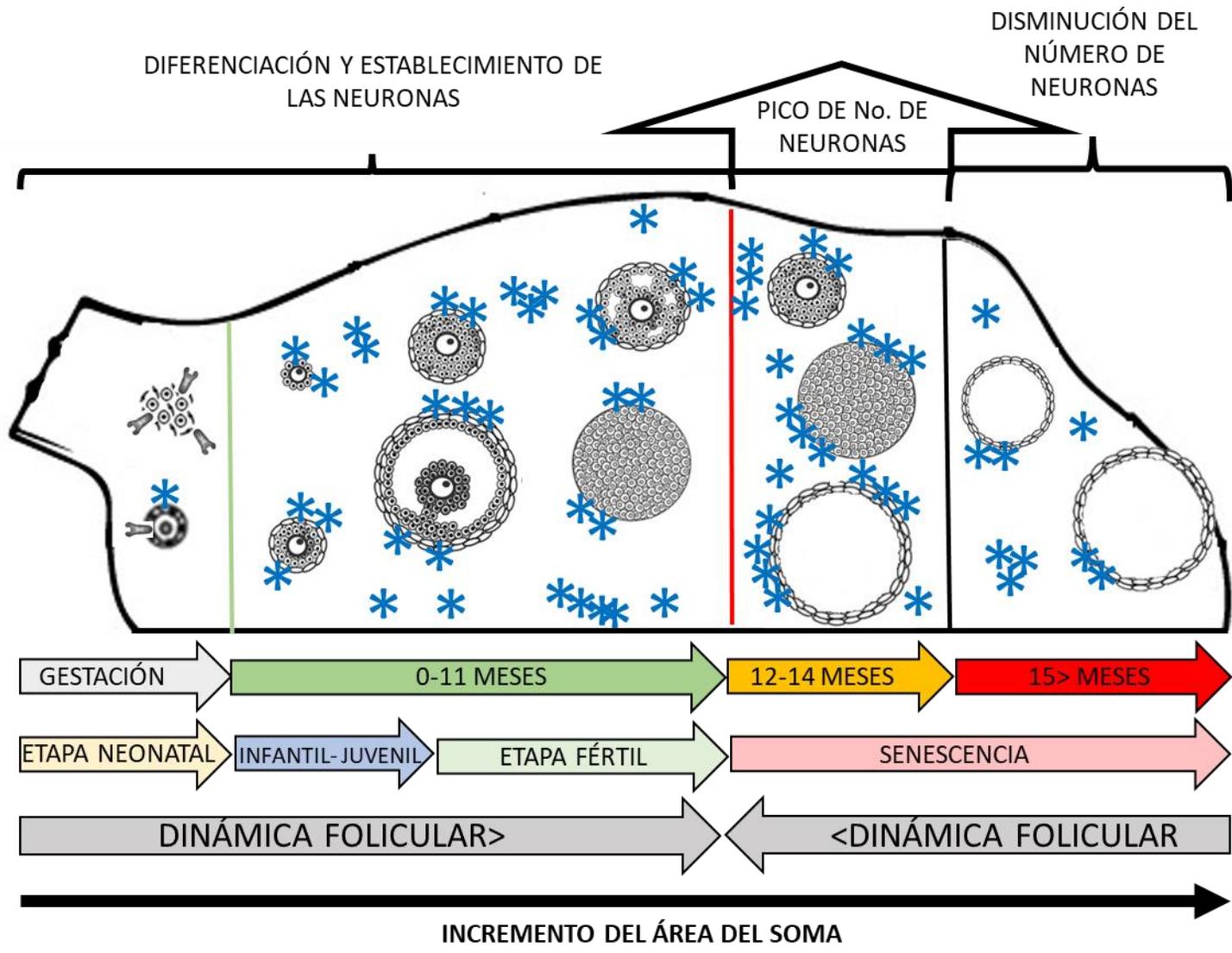


Figura 16. Representación de la dinámica folicular del ovario asociado a la inervación intrínseca del ovario durante la etapa reproductiva de la rata hembra y hacia la senescencia, se muestra el incremento del número de neuronas y el área del soma en el ovario desde la gestación hasta la etapa fértil.

Es conocido que los receptores a estrógenos se expresan en las neuronas simpáticas y parasimpáticas que inervan al ovario, así como en los ganglios sensoriales en modelos animales adulto; y que el tratamiento a largo plazo con 17β -estradiol, reduce la población de estas neuronas (Jana et al., 2012; Jana et al., 2013; M. Koszykowska et al., 2011). Por ello, sugerimos que la actividad de la inervación intrínseca de los ovarios no solo en edades infantiles y adultas, sino también en la etapa senescente podría ser regulada por esteroides ováricos, además de la inervación extrínseca; elementos que presentan variaciones diversas a lo largo de la vida del animal (Acuna et al., 2009).

La relación que guarda la presencia de las neuronas al interior del ovario en función de la edad, especialmente durante la pérdida de la función reproductiva, nos permite sugerir la edad de 12 meses como clave en la actividad ovárica, ya que es cuando el animal pierde la ciclicidad, comienza a decaer la función ovárica y aumenta la cantidad de NA al interior del ovario (Acuna et al., 2009; Chavez-Genaro et al., 2007; Cruz et al., 2017), misma que puede estar siendo producida por las neuronas al interior de los ovarios. Los resultados de este estudio muestran que hay una abundante inervación noradrenérgica alrededor de los folículos, así como en el cuerpo lúteo de los ovarios de las ratas de 3 y 12 meses de edad. En los animales de 15 meses de edad se observa alrededor de los quistes ováricos, lo que indicaría que el sistema nervioso simpático ejerce una influencia sobre la actividad del ovario a lo largo de la vida del animal, concordando con lo propuesto en trabajos donde se ha observado concentración elevada de noradrenalina en la gónada senescente (Aguado, 2002; Chavez-Genaro et al., 2007; Cruz et al., 2017).

Diversos autores han propuesto que la hiperactividad simpática puede contribuir al desarrollo y progresión del síndrome de ovario poliquístico (PCOS) (Morales-Ledesma et al., 2010). En el modelo animal con PCOS, inducido por la administración neonatal de valerato de estradiol, en el cual la concentración de NA en el ovario se encuentra aumentada, mientras que la concentración de estradiol está disminuida, lo que reduce el crecimiento folicular, produciendo falla ovárica, pérdida de la ciclicidad y reducción de la fertilidad (Lara et al., 2000; Lara, McDonald, Ahmed, et al., 1990; Lara, McDonald, & Ojeda, 1990).

El factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), que en sistema nervioso periférico promueven la neurogénesis y la plasticidad

neuronal tanto en animales en desarrollo como en adultos, también funcionan como reguladores del desarrollo folicular, ovulación y esteroidogénesis (Russo et al., 2012). En el animal con PCOS ambos factores están incrementados (Chang et al., 2019; Streiter et al., 2016). El ratón transgénico con sobreexpresión de NGF, presenta características metabólicas y reproductivas al PCOS de humano (Wilson et al., 2014). Sin embargo, en mujeres posmenopáusicas o con menor reserva folicular, los niveles de NGF y BDNF están disminuidos (Begliomini et al., 2007; Pluchino, Cubeddu, Begliomini, et al., 2009; Pluchino, Cubeddu, Giannini, et al., 2009), hechos que pudieran estar relacionados con un número disminuido de neuronas en la gónada de los animales de 15 meses de edad, ya que ambos factores de crecimiento pudieran tener un pico a los 12 meses, y de ahí disminuir gradualmente en función de la edad del animal. Otro aspecto que pudiera estar relacionado con el efecto de estos factores de crecimiento, es el tamaño más grande de los somas neuronales en los animales viejos.

9. Conclusiones

- En los ovarios de las ratas de la cepa CII-ZV las neuronas intrínsecas están localizadas en las tecas foliculares, alrededor de los cuerpos lúteos y en la glándula intersticial. Por ello, estarían relacionadas con las funciones de las estructuras ováricas de donde se encuentran ubicadas.
- El aumento en el número de las neuronas a la edad de 12 meses coincide con la edad en que el animal pierde la ciclicidad y deja de ovular. De este modo, la participación de la inervación en el ovario estaría involucrada en el control de la liberación de los folículos, así como en su desarrollo.
- El incremento en el tamaño de las neuronas noradrenérgicas relacionadas con los quistes ováricos en los animales de 15 meses de edad nos permite proponer una maquinaria celular exacerbada en el mantenimiento de los quistes ováricos, relacionados con diversas patologías y durante la senescencia reproductiva.

10. Perspectivas

El presente estudio nos permite evidenciar la presencia de neuronas al interior del ovario y su asociación la pérdida de la función reproductiva y el desarrollo de patologías como el SOP. De acuerdo con estudios recientes (Allen et al., 2018; Gysler & Drapkin, 2021; Reavis et al., 2020) se puede proponer la participación de la inervación en el desarrollo de otras patologías

como el cáncer de ovario. Se han observado neuronas al interior de otros órganos, como pulmón, páncreas, riñón, intestino grueso e intestino delgado, y su asociación con patologías en estos órganos. Por otra parte, para complementar este trabajo faltaría analizar la presencia de otros neurotransmisores como acetilcolina y la serotonina, así como analizar el comportamiento las neuronas intrínsecas a lo largo del ciclo estral. Por último, falta analizar si estas neuronas están influenciando directamente la producción de hormonas esteroides.

11. Referencias

Acuna, E., Fornes, R., Fernandois, D., Garrido, M. P., Greiner, M., Lara, H. E., & Paredes, A. H. (2009). Increases in norepinephrine release and ovarian cyst formation during ageing in the rat. *Reprod Biol Endocrinol*, 7, 64. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-64>

Aguado, L. I. (2002). Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microsc Res Tech*, 59(6), 462-473. <https://doi.org/10.1002/jemt.10232>

Aguado, L. I., & Ojeda, S. R. (1984). Prepubertal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. Role of noradrenergic innervation. *Endocrinology*, 114(5), 1845-1853. <https://doi.org/10.1210/endo-114-5-1845>

Aguado, L. I., Petrovic, S. L., & Ojeda, S. R. (1982). Ovarian β -Adrenergic Receptors during the Onset of Puberty: Characterization, Distribution, and Coupling to Steroidogenic Responses*. *Endocrinology*, 110(4), 1124-1132. <https://doi.org/10.1210/endo-110-4-1124>

Al-Zi'abi, M. O., Bowolaksono, A., & Okuda, K. (2009). Survival role of locally produced acetylcholine in the bovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, 80(4), 823-832. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.069203>

Allen, J. K., Armaiz-Pena, G. N., Nagaraja, A. S., Sadaoui, N. C., Ortiz, T., Dood, R., . . . Sood, A. K. (2018). Sustained Adrenergic Signaling Promotes Intratumoral Innervation through BDNF Induction. *Cancer Res*, 78(12), 3233-3242. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1701>

Almeida-Souza, L., Timmerman, V., & Janssens, S. (2011). Microtubule dynamics in the peripheral nervous system: A matter of balance. *Bioarchitecture*, 1(6), 267-270. <https://doi.org/10.4161/bioa.1.6.19198>

Anesetti, G., Lombide, P., D'Albora, H., & Ojeda, S. R. (2001). Intrinsic neurons in the human ovary. *Cell Tissue Res*, 306(2), 231-237. <https://doi.org/10.1007/s004410100451>

Anetsberger, D., Kurten, S., Jabari, S., & Brehmer, A. (2018). Morphological and Immunohistochemical Characterization of Human Intrinsic Gastric Neurons. *Cells Tissues Organs*, 206(4-5), 183-195. <https://doi.org/10.1159/000500566>

Baas, P. W., Rao, A. N., Matamoros, A. J., & Leo, L. (2016). Stability properties of neuronal microtubules. *Cytoskeleton* (Hoboken), 73(9), 442-460. <https://doi.org/10.1002/cm.21286>

Bakewell, S. (1995). The autonomic nervous system-Basic Anatomy and Physiology-Update in Anaesthesia 5(6) [online]. http://www.nda.ox.ac.uk/wfsa/html/u05/u05_010.htm

Baljet, B., & Drukker, J. (1979). The extrinsic innervation of the abdominal organs in the female rat. *Acta Anat* (Basel), 104(3), 243-267. <https://doi.org/10.1159/000145073>

Banerjee, S., Banerjee, S., Saraswat, G., Bandyopadhyay, S. A., & Kabir, S. N. (2014). Female reproductive aging is master-planned at the level of ovary. *PLoS One*, 9(5), e96210. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096210>

Beckmann, J., & Lips, K. S. (2014). The non-neuronal cholinergic system in health and disease. *Pharmacology*, 92(5-6), 286-302. <https://doi.org/10.1159/000355835>

Begliuomini, S., Casarosa, E., Pluchino, N., Lenzi, E., Centofanti, M., Freschi, L., . . . Genazzani, A. R. (2007). Influence of endogenous and exogenous sex hormones on plasma brain-derived neurotrophic factor. *Hum Reprod*, 22(4), 995-1002. <https://doi.org/10.1093/humrep/del479>

Block, E. (1951). Quantitative morphological investigations of the follicular system in women; methods of quantitative determinations. *Acta Anat* (Basel), 12(3), 267-285. <https://doi.org/10.1159/000140549>

Bruno, J. B., Matos, M. H. T., Chaves, R. N., & Figueiredo, J. R. d. (2011). Involvement of vasoactive intestinal peptide (VIP) on ovarian physiology.

Bulun, S. (2011). CHAPTER 17 - Physiology and Pathology of the Female Reproductive Axis. In (pp. 581-660). <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0324-5.00017-1>

Burden, H. W. (1985). The adrenergic innervation of mammalian ovaries. *Catecholamines as Hormone Regulators*, 261-278. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10024837071/en/>

Cabero, R. L., Cabrillo, R. E., & Obstetricia, S. S. E. d. G. y. (2013). Anatomía del aparato genital femenino. In *Tratado de Ginecología y Obstetricia* (2 ed., Vol. 2, pp. 169-177). Medica Panamericana.

Chang, H. M., Wu, H. C., Sun, Z. G., Lian, F., & Leung, P. C. K. (2019). Neurotrophins and glial cell line-derived neurotrophic factor in the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Hum Reprod Update*, 25(2), 224-242. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy047>

Chavez-Genaro, R., Lombide, P., Dominguez, R., Rosas, P., & Vazquez-Cuevas, F. (2007). Sympathetic pharmacological denervation in ageing rats: effects on ovulatory response and follicular population. *Reprod Fertil Dev*, 19(8), 954-960. <https://doi.org/10.1071/rd07075>

Cruz, G., Fernandois, D., & Paredes, A. H. (2017). Ovarian function and reproductive senescence in the rat: role of ovarian sympathetic innervation. *Reproduction*, 153(2), R59-R68. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0117>

Cruz, M. P. (2015). *Relacion Anatomica Entre los Ovarios y los Ganglios Autonomicos y Sensoriales durante el Ciclo Estral* [Tesis, Universidad Autonoma de Tlaxcala]. Tlaxcala Tlaxcala.

D'Albora, H., Anesetti, G., Lombide, P., Dees, W. L., & Ojeda, S. R. (2002). Intrinsic neurons in the mammalian ovary. *Microsc Res Tech*, 59(6), 484-489. <https://doi.org/10.1002/jemt.10231>

D'Albora, H., & Barcia, J. J. (1996). Intrinsic neuronal cell bodies in the rat ovary. *Neurosci Lett*, 205(1), 65-67. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12361-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12361-2)

D'Albora, H., Lombide, P., & Ojeda, S. R. (2000). Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study. *Cell Tissue Res*, 300(1), 47-56. <https://doi.org/10.1007/s004419900130>

De Bortoli, M. A., Garraza, M. H., & Aguado, L. I. (1998). Adrenergic intracerebroventricular stimulation affects progesterone concentration in the ovarian vein of the rat: participation of the superior ovarian nerve. *J Endocrinol*, 159(1), 61-68. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9795342>

Dissen, G., Paredes, A., Romero, C., Dees, W., & Ojeda, S. (2003). Neural and Neurotrophic Control of Ovarian Development. In (pp. 3-II). <https://doi.org/10.1016/B978-012444562-8/50002-1>

Dissen, G. A., Romero, C., Paredes, A., & Ojeda, S. R. (2002). Neurotrophic control of ovarian development. *Microsc Res Tech*, 59(6), 509-515. <https://doi.org/10.1002/jemt.10227>

Doganay, M., Simsek, A., Tapisiz, O. L., Mulazimoglu, B. S., Yumusak, N., & Gungor, T. (2010). Superior ovarian nerve (SON) transection leads to stunted follicular maturation: a histomorphologic and morphometric analysis in the rat model. *Fertil Steril*, 93(5), 1711-1714. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.09.026>

Dominguez, R., Cruz, M. E., & Chávez-Genaro, R. (1988). Differences in the Ovulatory Ability Between the Right and Left Ovary Are Related to Ovarian Innervation. *Growth Factors and the Ovary*, 39, 321-325. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5688-2_39

Dominguez, R., & Riboni, L. (1971). Failure of ovulation in autografted ovary of hemispayed rat. *Neuroendocrinology*, 7(3), 164-170. <https://doi.org/10.1159/000121964>

Dredge, B. K., & Jensen, K. B. (2011). NeuN/Rbfox3 nuclear and cytoplasmic isoforms differentially regulate alternative splicing and nonsense-mediated decay of Rbfox2. *PLoS One*, 6(6), e21585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021585>

Duan, W., Zhang, Y. P., Hou, Z., Huang, C., Zhu, H., Zhang, C. Q., & Yin, Q. (2016). Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator. *Mol Neurobiol*, 53(3), 1637-1647. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9122-5>

Dumesic, D. A., & Richards, J. S. (2013). Ontogeny of the ovary in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 100(1), 23-38. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.02.011>

Fernandois, D., Na, E., Cuevas, F., Cruz, G., Lara, H. E., & Paredes, A. H. (2016). Kisspeptin is involved in ovarian follicular development during aging in rats. *Journal of Endocrinology*, 228(3), 161-170. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0429>

Finch, C. E. (2014). The menopause and aging, a comparative perspective. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 142, 132-141. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.03.010>

Fritz, S., Föhr, K. J., Boddien, S., Berg, U., Brucker, C., & Mayerhofer, A. (1999). Functional and molecular characterization of a muscarinic receptor type and evidence for expression of choline-acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in human granulosa-luteal cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(5), 1744-1750. <https://doi.org/10.1210/jc.84.5.1744>

Fujii, T., Mashimo, M., Moriwaki, Y., Misawa, H., Ono, S., Horiguchi, K., & Kawashima, K. (2017). Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 134(1), 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2017.05.002>

Furness, J. B. (2015). Chapter 4 - Peripheral Autonomic Nervous System. In G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System (Fourth Edition)* (pp. 61-76). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374245-2.00004-8>

Gabella, G. (2004). CHAPTER 3 - Autonomic Nervous System. In G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System (Third Edition)* (pp. 77-109). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012547638-6/50004-3>

Gerendai, I., Csaba, Z., Vokó, Z., & Csernus, V. (1995). Involvement of a direct neural mechanism in the control of gonadal functions. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 53(1), 299-305. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0960-0760\(95\)00067-A](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0960-0760(95)00067-A)

Gerendai, I., & Halász, B. (1997). Neuroendocrine asymmetry. *Frontiers in neuroendocrinology*, 18(3), 354-381. <https://doi.org/10.1006/frne.1997.0154>

Gibbins, I. L., Jobling, P., Messenger, J. P., Teo, E. H., & Morris, J. L. (2000). Neuronal morphology and the synaptic organisation of sympathetic ganglia. *J Auton Nerv Syst*, 81(1-3), 104-109. [https://doi.org/10.1016/s0165-1838\(00\)00132-6](https://doi.org/10.1016/s0165-1838(00)00132-6)

Gibbins, I. L., & Morris, J. L. (2006). Structure of peripheral synapses: autonomic ganglia. *Cell Tissue Res*, 326(2), 205-220. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0233-1>

Gilbert, A. B. (1969). Innervation of the ovary of the domestic hen. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*, 54(4), 404-411. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1969.sp002039>

Gori, J., Castaño, R., & Lorusso, A. (2016). Anatomía del aparato genital femenino y la mama: Órganos Genitales. In *Ginecología de Gori* (3 ed., pp. 3-11). Editorial Medica Panamericana.

Gusel'nikova, V. V., & Korzhevskiy, D. E. (2015). NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*, 7(2), 42-47. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26085943>

Gutkind, J. S., Novotny, E. A., Brann, M. R., & Robbins, K. C. (1991). Muscarinic acetylcholine receptor subtypes as agonist-dependent oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(11), 4703-4707. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.4703>

Guyton, A. (2016). Los Sentidos Especiales. In J. Hall (Ed.), *Tratado de fisiología medica* (13a. ed., pp. 699-711). Elsevier.

Gysler, S. M., & Drapkin, R. (2021). Tumor innervation: peripheral nerves take control of the tumor microenvironment. *J Clin Invest*, 131(11). <https://doi.org/10.1172/JCI147276>

Hao, M. M., Fung, C., Boesmans, W., Lowette, K., Tack, J., & Vanden Berghe, P. (2020). Development of the intrinsic innervation of the small bowel mucosa and villi. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 318(1), G53-G65. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00264.2019>

Hsueh, A. J., Adashi, E. Y., Jones, P. B., & Welsh, T. H., Jr. (1984). Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev*, 5(1), 76-127. <https://doi.org/10.1210/edrv-5-1-76>

Jana, B., Calka, J., Rytel, L., & Czarzasta, J. (2015). Morphological and neurochemical characterization of the ovarian sympathetic chain ganglia perikarya in testosterone-treated sexually matured pigs. *Ann Anat*, 202, 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2015.07.003>

Jana, B., Lata, M., Bulc, M., & Calka, J. (2012). Long term estradiol-17beta administration changes population of the dorsal root ganglia neurons innervating the

ovary in the sexually mature gilts. *Neuropeptides*, 46(4), 157-165.
<https://doi.org/10.1016/j.npep.2012.05.001>

Jana, B., Meller, K. A., Czajkowska, M., & Calka, J. (2018). Long-term estradiol-17beta exposure decreases the cholinergic innervation pattern of the pig ovary. *Ann Anat*, 216, 135-141. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2017.11.010>

Jana, B., Rytel, L., Czarzasta, J., & Calka, J. (2013). Reduction of the number of neurones in the caudal mesenteric ganglion innervating the ovary in sexually mature gilts following testosterone administration. *J Neuroendocrinol*, 25(9), 826-838.
<https://doi.org/10.1111/jne.12057>

Jiang, Y. Q., & Oblinger, M. M. (1992). Differential regulation of beta III and other tubulin genes during peripheral and central neuron development. *J Cell Sci*, 103 (Pt 3), 643-651. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1478962>

Kandel, E. R. (2013). Principles of Neural Science. In J. H. Schwartz, T. M. Jessell, S. A. Siegelbaum, & A. J. Hudspeth (Eds.), *Principles of Neural Science* (Fifth Edition ed., pp. 961-964). McGraw-Hill Companies. (1976) (Reprinted from 2013)

Katsetos, C. D., Legido, A., Perentes, E., & Mork, S. J. (2003). Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *J Child Neurol*, 18(12), 851-866; discussion 867. <https://doi.org/10.1177/088307380301801205>

Kim, K. K., Adelstein, R. S., & Kawamoto, S. (2009). Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J Biol Chem*, 284(45), 31052-31061. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052969>

Klein, C. M., & Burden, H. W. (1988). Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neuroscience Letters*, 85(2), 217-222. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3374837>

Korzhevskii, D. E., Karpenko, M. N., & Kirik, O. V. (2011). [Microtubule-associated proteins as markers of nerve cell differentiation and functional status]. *Morfologija*, 139(1), 13-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21539080>

Koszykowska, M., Całka, J., Gáko, M., & Jana, B. (2011). Long-term estradiol-17β administration reduces population of neurons in the sympathetic chain ganglia

supplying the ovary in adult gilts. *Experimental and Molecular Pathology*, 91(1), 353-361. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2011.04.002>

Koszykowska, M., Calka, J., Sz wajca, P., & Jana, B. (2011). Long-term estradiol-17beta administration decreases the number of neurons in the caudal mesenteric ganglion innervating the ovary in sexually mature gilts. *J Reprod Dev*, 57(1), 62-71. <https://doi.org/10.1262/jrd.10-061s>

Lakomy, M., Doboszynska, T., & Szteyn, S. (1982). Cholinergic nerves in the ovary, the uterine tube and the uterus in pig. *Folia Morphol (Warsz)*, 41(2), 191-200. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6985134>

Lara, H. E., Dissen, G. A., Leyton, V., Paredes, A., Fuenzalida, H., Fiedler, J. L., & Ojeda, S. R. (2000). An Increased Intraovarian Synthesis of Nerve Growth Factor and Its Low Affinity Receptor Is a Principal Component of Steroid-Induced Polycystic Ovary in the Rat*. *Endocrinology*, 141(3), 1059-1072. <https://doi.org/10.1210/endo.141.3.7395>

Lara, H. E., McDonald, J. K., Ahmed, C. E., & Ojeda, S. R. (1990). Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. *Endocrinology*, 127(5), 2199-2209. <https://doi.org/10.1210/endo-127-5-2199>

Lara, H. E., McDonald, J. K., & Ojeda, S. R. (1990). Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology*, 126(1), 364-375. <https://doi.org/10.1210/endo-126-1-364>

Lauder, J. M. (1993). Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends in Neurosciences*, 16(6), 233-240. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-2236\(93\)90162-F](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-2236(93)90162-F)

Lauder, J. M., & Schambra, U. B. (1999). Morphogenetic roles of acetylcholine. *Environ Health Perspect*, 107 Suppl 1, 65-69. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107s165>

Lawrence, I. E., & Burden, H. W. (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The Anatomical record*, 196(1), 51-59. <https://doi.org/10.1002/ar.1091960106>

Lind, D., Franken, S., Kappler, J., Jankowski, J., & Schilling, K. (2005). Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J Neurosci Res*, 79(3), 295-302. <https://doi.org/10.1002/jnr.20354>

Madekurozwa, M. C. (2008). An immunohistochemical study of ovarian innervation in the emu (*Dromaius novaehollandiae*). *Onderstepoort J Vet Res*, 75(1), 59-65. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v75i1.89>

Mariani, M., Karki, R., Spennato, M., Pandya, D., He, S., Andreoli, M., . . . Ferlini, C. (2015). Class III beta-tubulin in normal and cancer tissues. *Gene*, 563(2), 109-114. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.03.061>

Masuda, M., Kubota, T., & Aso, T. (2001). Effects of nitric oxide on steroidogenesis in porcine granulosa cells during different stages of follicular development. *Eur J Endocrinol*, 144(3), 303-308. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1440303>

Mayerhofer, A., Dissen, G. A., Costa, M. E., & Ojeda, S. R. (1997). A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*, 138(8), 3320-3329. <https://doi.org/10.1210/endo.138.8.5335>

Mayerhofer, A., & Fritz, S. (2002). Ovarian acetylcholine and muscarinic receptors: hints of a novel intrinsic ovarian regulatory system. *Microsc Res Tech*, 59(6), 503-508. <https://doi.org/10.1002/jemt.10228>

Mayerhofer, A., & Kunz, L. (2005). A non-neuronal cholinergic system of the ovarian follicle. *Annals of Anatomy*, 187(5-6), 521-528. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2005.06.005>

Mayerhofer, A., Kunz, L., Krieger, A., Proskocil, B., Spindel, E., Amsterdam, A., . . . Wessler, I. (2006). FSH regulates acetylcholine production by ovarian granulosa cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4, 1-7. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-37>

Mayerhofer, A., Smith, G. D., Danilchik, M., Levine, J. E., Wolf, D. P., Dissen, G. A., & Ojeda, S. R. (1998). Oocytes are a source of catecholamines in the primate

ovary: evidence for a cell-cell regulatory loop. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(18), 10990-10995. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10990>

Morales-Ledesma, L., Linares, R., Rosas, G., Moran, C., Chavira, R., Cardenas, M., & Dominguez, R. (2010). Unilateral sectioning of the superior ovarian nerve of rats with polycystic ovarian syndrome restores ovulation in the innervated ovary. *Reprod Biol Endocrinol*, 8, 99. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-99>

Mullen, R. J., Buck, C. R., & Smith, A. M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116(1), 201-211. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1483388>

<http://dev.biologists.org/content/116/1/201.abstract>

Nichols, S. M., Bavister, B. D., Brenner, C. A., Didier, P. J., Harrison, R. M., & Kubisch, H. M. (2005). Ovarian senescence in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Hum Reprod*, 20(1), 79-83. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh576>

Ojeda, S. R., & Lara, H. E. (1989). Role of the Sympathetic Nervous System in the Regulation of Ovarian Function. In K. M. Pirke, W. Wuttke, & U. Schweiger, *The Menstrual Cycle and Its Disorders* Berlin, Heidelberg.

Peng, M. T., & Huang, H. H. (1972). Aging of hypothalamic-pituitary-ovarian function in the rat. *Fertil Steril*, 23(8), 535-542. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)39131-2](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)39131-2)

Pluchino, N., Cubeddu, A., Begliuomini, S., Merlini, S., Giannini, A., Bucci, F., . . . Genazzani, A. R. (2009). Daily variation of brain-derived neurotrophic factor and cortisol in women with normal menstrual cycles, undergoing oral contraception and in postmenopause. *Hum Reprod*, 24(9), 2303-2309. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep119>

Pluchino, N., Cubeddu, A., Giannini, A., Merlini, S., Cela, V., Angioni, S., & Genazzani, A. R. (2009). Progestogens and brain: an update. *Maturitas*, 62(4), 349-355. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2008.11.023>

Portiansky, E. L., Barbeito, C. G., Gimeno, E. J., Zuccolilli, G. O., & Goya, R. G. (2006). Loss of NeuN immunoreactivity in rat spinal cord neurons during aging. *Exp Neurol*, 202(2), 519-521. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.07.014>

Purves, D. (2016). Transmision sinaptica. In Neurociencia (5a ed., pp. 71-163). Medica Panamericana.

Reavis, H. D., Chen, H. I., & Drapkin, R. (2020). Tumor Innervation: Cancer Has Some Nerve. *Trends Cancer*, 6(12), 1059-1067. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.07.005>

Ropper, A. H., Samuels, M. A., Klein, J. P., & Prasad, S. (2019). Diseases of the Peripheral Nerves. In A. Moyer & K. J. Davis (Eds.), *Adams and Victor's Principles of Neurology* (11 ed.). McGraw-Hill Education. (1976)

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. *Gynecol Endocrinol*, 28(4), 241-244. <https://doi.org/10.3109/09513590.2011.613969>

Silverthorn, D. U. (2019). Capítulo 8 Propiedades de las neuronas y de las redes neuronales. In *Fisiología Humana* (8 ed., pp. 237-286). Medica Panamericana.

Smith, M. S., Freeman, M. E., & Neill, J. D. (1975). The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*, 96(1), 219-226. <https://doi.org/10.1210/endo-96-1-219>

Streiter, S., Fisch, B., Sabbah, B., Ao, A., & Abir, R. (2016). The importance of neuronal growth factors in the ovary. *Mol Hum Reprod*, 22(1), 3-17. <https://doi.org/10.1093/molehr/gav057>

te Velde, E. R., Dorland, M., & Broekmans, F. J. (1998). Age at menopause as a marker of reproductive ageing. *Maturitas*, 30(2), 119-125. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9871906>

Thompson, N., Mastitskaya, S., & Holder, D. (2019). Avoiding off-target effects in electrical stimulation of the cervical vagus nerve: Neuroanatomical tracing techniques to study fascicular anatomy of the vagus nerve. *J Neurosci Methods*, 325, 108325. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.108325>

Uchida, S., & Kagitani, F. (2015). Autonomic nervous regulation of ovarian function by noxious somatic afferent stimulation. 1-9. <https://doi.org/10.1007/s12576-014-0324-9>

Van Nassauw, L., Wu, M., De Jonge, F., Adriaensen, D., & Timmermans, J. P. (2005). Cytoplasmic, but not nuclear, expression of the neuronal nuclei (NeuN) antibody is an exclusive feature of Dogiel type II neurons in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Histochem Cell Biol*, 124(5), 369-377. <https://doi.org/10.1007/s00418-005-0019-7>

Venegas-Meneses, B., Padilla, J. F., Juarez, C. E., Moran, J. L., Moran, C., Rosas-Murrieta, N. H., . . . Dominguez, R. (2015). Effects of ovarian dopaminergic receptors on ovulation. *Endocrine*, 50(3), 783-796. <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0636-4>

Vok, Z. (1995). Involvement of a Direct Neural Mechanism in the Control of Gonadal Functions. 53(1), 299-305.

Wessler, I. K., & Kirkpatrick, C. J. (2017). Non-neuronal acetylcholine involved in reproduction in mammals and honeybees. *Journal of Neurochemistry*, 142, 144-150. <https://doi.org/10.1111/jnc.13953>

Weyer, A., & Schilling, K. (2003). Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J Neurosci Res*, 73(3), 400-409. <https://doi.org/10.1002/jnr.10655>

Williams, C. J., & Erickson, G. F. (2000). Morphology and Physiology of the Ovary. In K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J. M. Hershman, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, R. McLachlan, J. E. Morley, M. New, L. Perreault, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer, D. L. Trencze, A. Vinik, & D. P. Wilson (Eds.), *Endotext*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25905186>

Wilson, J. L., Chen, W., Dissen, G. A., Ojeda, S. R., Cowley, M. A., Garcia-Rudaz, C., & Enriori, P. J. (2014). Excess of nerve growth factor in the ovary causes a polycystic ovary-like syndrome in mice, which closely resembles both reproductive and metabolic aspects of the human syndrome. *Endocrinology*, 155(11), 4494-4506. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1368>

12. Publicaciones

El Cuerpo Lúteo, nuevos mecanismos de regulación y su asociación con la infertilidad

The Corpus Luteum, new regulation mechanisms and their association with Infertility

Bravo-Benítez Juan Manuel¹, Medel Rojas Alfonso², Mirto-Aguilar Nancy², Cruz Gómez Yolanda³, Morán Raya Carolina^{2*}

¹Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México. ²Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. ³Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México.

Recibido: 26 de julio de 2021

Aceptado: 17 de octubre de 2021

Puedes encontrar este artículo en: <http://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2021/30/Bravo-Benítez/HTML.html>

Resumen

El cuerpo lúteo es un tejido dinámico que se forma después de que el ovocito es liberado del folículo ovárico. Su principal función es la producción de progesterona para el establecimiento y mantenimiento de la preñez. En esta revisión se abordan temas relacionados con la formación, función y regresión del cuerpo lúteo. Se describen procesos fisiológicos tales como angiogénesis y el efecto de hormonas no esteroideas producidas por el cuerpo lúteo. También se incluye una sección sobre inervación intrínseca del ovario, incluyendo al cuerpo lúteo, un tema controvertido ya que se considera que esta estructura no recibe inervación. Los avances en la comprensión de la fisiología del cuerpo lúteo ayudarán a mejorar nuestro conocimiento sobre la fisiología de las gónadas, fundamentalmente para buscar nuevos tratamientos a problemas de fertilidad asociados a insuficiencia lútea, por lo que es altamente relevante tanto para la clínica humana como en la zootecnia.

Palabras clave: Inervación ovárica, ovulación, Función ovárica, Cuerpo Lúteo, Insuficiencia Lutea.

Abstract

The corpus luteum is a dynamic tissue that is generated after an oocyte is released by an ovarian follicle. Its main function is the production of progesterone for the establishment and maintenance of pregnancy. This review addresses issues related to the formation, function, and regression of the corpus luteum. Physiological processes such as angiogenesis and the effect of non-steroidal hormones produced by the corpus luteum are described. The intrinsic innervation of the ovaries, including the corpus luteum is also introduced, a controversial topic since this structure is considered as non-innervated. Advances in the understanding of the physiology of the corpus luteum will help to improve our knowledge about the physiology of the gonads, primarily focusing on new treatments for fertility disorders related to luteal insufficiency. This information is highly relevant for both human clinical and livestock farming areas.

Keywords: Ovarian Innervation, Ovulation, Ovarian Function, Corpus Luteum, Luteal Insufficiency.

*Correspondencia: Morán Raya Carolina. Laboratorio de Aplicaciones Biomédicas, Centro de Investigación en Físicoquímica de Materiales, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. Dirección: 72570, Av. San Claudio 1814, Jardines de San Manuel, 72570 Puebla, Pue. Teléfono: 2223611400 Email: carolina.moran@correo.buap.mx

Este es un artículo de libre acceso distribuido bajo los términos de la licencia de Creative Commons, (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en algún medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.



1. Introducción

La supervivencia de las especies depende del proceso reproductivo, en el caso de los mamíferos el funcionamiento cíclico de los ovarios es indispensable, el cual de manera general consiste en una fase folicular y una fase lútea. El ovario es regulado por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas mediante sistemas de retroalimentación positiva y negativa. El Cuerpo Lúteo (CL) es un tejido dinámico que se forma del tejido remanente del folículo de Graaf, una vez que el ovocito ha sido liberado del folículo ovárico. Su función principal es la producción de progesterona para el establecimiento y mantenimiento de la preñez. En esta revisión se describe que el papel del CL no solamente es endócrino, más bien se muestra como una estructura compleja y dinámica que interacciona con otros sistemas. También se ponen en evidencia las áreas que deben estudiarse para conocer sobre sus funciones y posibles campos por abordar sobre problemas de índole clínico relacionados con la disfunción del CL.

2. Duración del Cuerpo Lúteo

De acuerdo a la vida media del CL posterior a la ovulación y donde no hubo fecundación, los mamíferos pueden ser divididos en tres categorías: (A) de CL de larga duración, (B) de CL de corta duración y (C) de CL de ultra-corta duración. A las especies que tienen CL de larga duración se les conoce como monoéstricas estacionales, porque tienen un ciclo estral anual. Incluye a carnívoros (gatos, perros, lobos, zorros, hurones y zorrillos) y otros animales como el ciervo, armadillo y marsupiales, cuya duración del CL varía entre dos semanas y seis meses.¹ En la hembra de *Canis Familiaris*, la duración de la fase lútea es de alrededor de 65 días se encuentre preñada o no preñada.

Los animales con CL de corta duración son individuos con varios ciclos estrales al año (especies poliéstricas), cuyo CL se desarrolla y funciona en un intervalo finito de tiempo durante el ciclo ovárico, sin embargo, la vida del CL incrementa marcadamente en la preñez. Las

especies de esta categoría incluyen a los primates (monos, grandes simios y humanos), en los que después de la ovulación se forma un CL que es funcional durante dos semanas para permitir el movimiento del embrión a través del cuello uterino y para preparar al útero para la implantación. Por último, los animales con CL de ultra-corta duración, son especies poliéstricas que no forman un CL funcional (roedores poliéstricos y algunos insectívoros), incluye también a los ovuladores reflejos, como la coneja, aquellos donde el apareamiento provoca la ovulación o pseudopreñez.²

3. Fenómenos de transición y luteinización

La regulación de la esteroidogénesis del CL puede desglosarse en tres acontecimientos importantes; luteinización (conversión de un folículo ovulatorio), regresión lútea y mantenimiento/rescate de la preñez. Los factores que controlan estos eventos y dictaminan su variabilidad en las diferentes especies de mamíferos dependen de la composición de las células lúteas grandes (LLC, por sus siglas en inglés) derivadas de las células de la granulosa del folículo, de las células lúteas pequeñas (SLC, por sus siglas en inglés) derivadas de las células foliculares de la teca y de las enzimas implicadas en la vía esteroidogénica, aunque estas últimas son relativamente similares entre las especies de mamíferos.³

La transición de un folículo preovulatorio a un CL es un proceso con mecanismos complejos similares a la cicatrización de heridas y formación de tumores, básicamente en la obtención de un suministro adecuado de nutrientes al acceder al sistema vascular del órgano.^{4,5} Antes de la ovulación, se presentan cambios estructurales en las células de la granulosa y de la teca. Por ejemplo, en el núcleo, la cromatina se dispersa y se forma el nucléolo, lo que va acompañado de un aumento en el número de polirribosomas en el citoplasma. Las uniones comunicantes entre las células de la granulosa y también entre las células de la teca desaparecen, presumiblemente como un preludio a la remodelación celular. A medida que las células

se redondean y sus crestas cambian de forma laminar a tubular, la cantidad de retículo endoplásmico liso de las células incrementa y se modifican las características estructurales mitocondriales.⁵ Aunado a la remodelación tisular se interrumpe la proliferación celular presentándose hipertrofia y diferenciación de células esteroideogénicas del folículo, lo que da lugar a las células lúteas del CL. Al mismo tiempo, en las capas celulares de la granulosa del folículo que previamente eran avasculares se presenta un proceso de formación acelerada de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis). En algunas especies también se forman nuevos vasos linfáticos (linfatogénesis). En el CL la angiogénesis permite la formación de una base microvascular extensa.⁶ Aunque se cree que la formación rápida del CL postovulación se debe principalmente a un proceso de hipertrofia (aumento en el tamaño del volumen de células) más que a un proceso de hiperplasia (aumento en el número de células), durante el desarrollo del CL de bovinos se ha observado proliferación de células SLC, lo que sugiere que el CL se forma por los dos procesos; hipertrofia e hiperplasia (Figura 1). La capacidad proliferativa de las SLCs disminuye conforme se pasa del estadio de crecimiento a la etapa de desarrollo y regresión del CL.⁷

4. Angiogénesis

La angiogénesis fisiológica en adultos es un evento raro, con pocas excepciones como la vasculogénesis necesaria para el crecimiento de tejido en la cicatrización o en los órganos reproductores femeninos, como el útero y el ovario. La angiogénesis en el CL tiene su origen en la vasculatura del folículo en desarrollo. Previa a la ovulación, la membrana basal del folículo impide la entrada de los vasos sanguíneos a la capa de células de la granulosa. Cuando el folículo colapsa, lo efectúa hacia adentro, y la capa de células de la teca junto con sus vasos sanguíneos se

sitúan dentro de los pliegues del compartimento granuloso. Con la pérdida de la integridad de la membrana basal se presentan extensas remodelaciones tisulares, dando comienzo a la invasión vascular en la región que contiene las células luteínicas y el subsecuente desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente. La sangre y el plasma se extravasan en la cavidad folicular donde forman un coágulo rico en fibrina, originando una serie de eventos subsecuentes que se asocian con un período de intensa angiogénesis donde la vasculatura formada se extiende a través del tejido.^{6,7}

Particularmente en el CL, la regulación del proceso angiogénico parece estar controlada por acciones resultantes del equilibrio entre factores pro- y antiangiogénicos.⁸ Aunque poco se conoce sobre los mecanismos celulares específicos involucrados, en general se plantea que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF- α) producido por las células lúteas tempranas, actúa de forma paracrina a través de receptores/correceptores de VEGF (por ejemplo, neuropilinas) en células endoteliales microvasculares para promover la angiogénesis. Además, los factores locales, como los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) -1 y -2, pueden generar sinergias con la hormona luteinizante (LH) para promover la producción de VEGF,⁹ en el CL de primates el VEGF actúa inicialmente como un factor angiogénico, pero posteriormente como un factor trófico (Figura 2).¹⁰⁻¹²

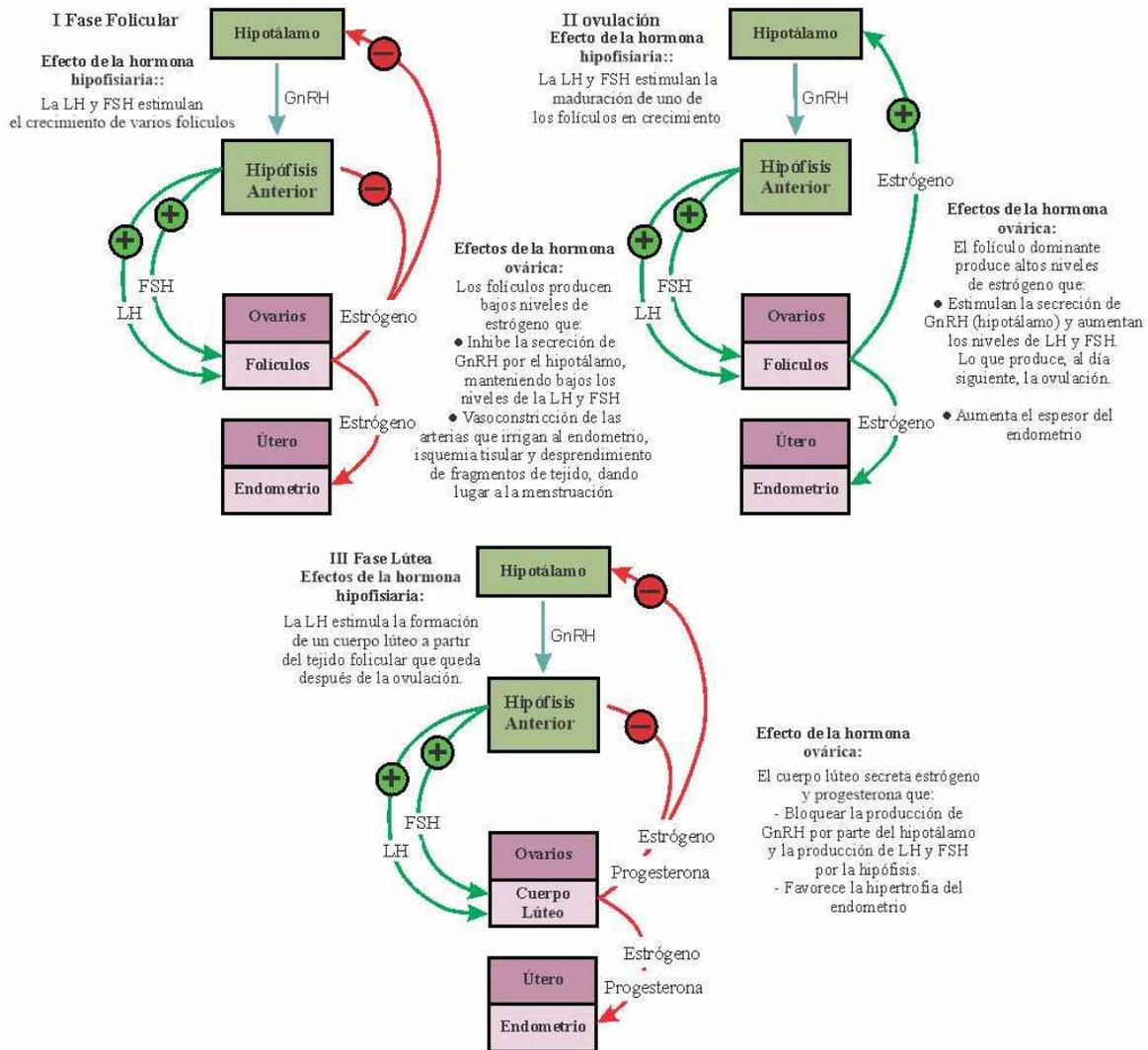


Figura 1.- Regulación hormonal de los ciclos ováricos y menstruales mediante sistemas de retroalimentación positiva y negativa en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas.⁸

Por otro lado, se ha observado que los esteroides ováricos influyen en el volumen de irrigación del tejido y la sensibilidad a los receptores β -adrenérgicos: el bloqueo de estos receptores provoca un aumento en el flujo sanguíneo ovárico, mientras que el bloqueo de los α -receptores causa el efecto opuesto. Es decir, que la noradrenalina (NA), a través de la unión con sus receptores (α o β -adrenérgicos), aumenta el flujo de sangre de los ovarios hasta en un 60%. El flujo de sangre ovárica en ovinos y bovinos es más alto

durante la fase lútea media y notablemente más bajo durante el estro. La presencia de un CL funcional parece estar asociada con una capacidad vasodilatadora local pronunciada, ya que aproximadamente el 90% del flujo de sangre a los ovarios es influenciada por el CL durante la fase lútea media. Además de esto, la progesterona reduce la tasa de degradación de NA al inhibir la actividad de la monoaminooxidasa (MAO) y la catecol-o-metiltransferasa (COMT), por lo tanto, al aumentar la vida media del neurotransmisor

puede suponerse que el ovario, por medio de sus propios esteroides, regula el flujo de sangre a través del tracto reproductivo.¹³

Teniendo en cuenta las etapas tempranas de la formación del CL y su importancia en la preñez temprana, este mecanismo protege y apoya la función normal del CL. Sin embargo, aún no están bien esclarecidos los mecanismos precisos mediante los cuales

aparece la neovascularización lútea, puede ser a través de la angiogénesis (expansión de los vasos sanguíneos existentes) o posiblemente mediante la vasculogénesis (por ejemplo, de las células progenitoras vasculares circulantes) que se forman la densa red capilar en el tejido lútea diferenciado.^{1,7,8}

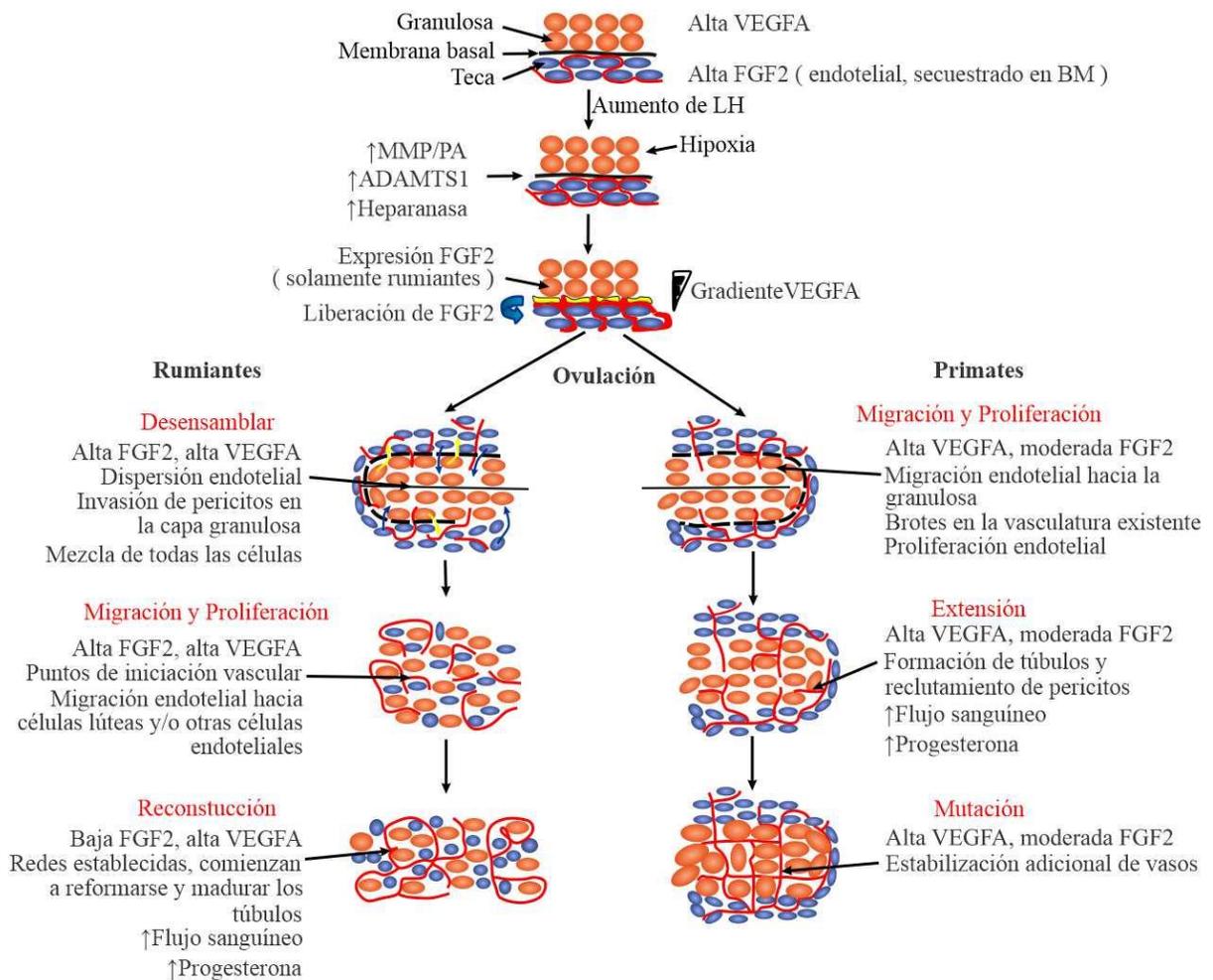


Figura 2.- Mecanismos de vascularización del CL en rumiantes y primates. Las células de la granulosa y la teca se muestran en naranja y azul respectivamente, la vasculatura en rojo (no se distinguen). En el folículo preovulatorio, la capa granulosa permanece avascular, mientras que la teca presenta una extensa vascularización.⁷

5. Mecanismos de regulación del Cuerpo Lúteo

La formación y duración limitada del CL son críticas para la fertilidad, ya que la progesterona es la hormona esteroide esencial requerida para la implantación del embrión y mantenimiento del embarazo intrauterino hasta que se desarrolla la placenta. La actividad lútea depende de la interacción de diversos factores de crecimiento, citocinas y hormonas, incluyendo las hormonas tiroideas.¹⁴ De los varios factores luteotróficos, tres hormonas juegan un papel principal que, dependiendo de la especie, actúa para funcionar individualmente o como parte de un complejo: LH, Prolactina (PRL) y Estradiol (E2).¹⁵ El aumento preovulatorio de las gonadotropinas (LH, Hormona Folículo Estimulante [FSH, por sus siglas en inglés]) y de PRL promueven la diferenciación morfológica de las células foliculares y está asociada con los cambios bioquímicos involucrados en la luteinización. En roedores, la PRL es luteotrófica durante el periodo de preñez, pero luteolítica durante los ciclos no fértiles. La PRL estimula la angiogénesis actuando directamente en las células endoteliales o indirectamente mediante la estimulación de factores proangiogénicos como el VEGF. Por otra parte, las propiedades antiangiogénicas de PRL se presentan después de una escisión proteolítica por vaso-inhibinas, una familia de fragmentos de PRL (incluida la PRL de 16 kDa) con potentes efectos antiangiogénicos, vasoconstrictores y en contra de la permeabilidad de los vasos.¹⁶

En la mujer, la LH y la hormona coriónica humana (hCG), son las hormonas luteotróficas vitales durante el ciclo menstrual y el embarazo temprano, respectivamente. En lo que se refiere a los mecanismos celulares y endocrinos que regulan el funcionamiento del CL en humanos y en otras especies de mamíferos, se tienen puntos en común y algunas diferencias importantes. Por ejemplo, los primates y bovinos tienen un contenido similar de células

LLC y SLC, y un gran número de células endoteliales capilares que forman la vasculatura, las cuales tienen un papel esencial en la función óptima del CL. Cabe destacar que las células lúteas en rumiantes crecen más que en los primates y adquieren una capacidad para producir progesterona que es independiente de la estimulación de LH. A diferencia del CL de los bovinos, las LLC de los primates siguen requiriendo la estimulación por LH y la hCG a lo largo de la fase lútea. Aunque los folículos preovulatorios de mujeres y vacas son de tamaño similar, así como la producción esteroideogénica (10 a 20 mg/h), el CL bovino produce aproximadamente diez veces más progesterona en comparación con el CL humano (17.4 mg/h frente a 1.4 mg/h), posiblemente debido al mayor desarrollo de las células lúteas bovinas que producen la hormona.¹⁷

En los primates y los rumiantes, el CL es en gran medida, dependiente de la LH que actúa a través del AMPc/proteína cinasa. En contraste, en roedores y conejos, la PRL y el E2 son críticos como factores de la luteólisis.³ En la mujer, el patrón de secreción de LH y la producción de progesterona tienen las siguientes características: (a) la frecuencia de liberación pulsátil de la LH disminuye progresivamente correlacionándose con la duración de la exposición a progesterona; (b) la amplitud de los pulsos de LH varía con la aparición de una mayor cantidad de pulsos más pequeños que se correlacionan bien con el nivel de progesterona; (c) en la fase lútea temprana, el patrón de secreción de progesterona es estable; (d) en el centro y fase lútea tardía, la secreción de progesterona es episódica, y se correlaciona con la liberación pulsátil de LH; y (e) la progesterona sola en la fase lútea media y tardía no refleja con exactitud la adecuación del CL.^{17,18}

La respuesta de los tejidos esteroideogénicos a las hormonas gonadotróficas está regulada en parte por los receptores en las células y tejidos gonadales. Como resultado de la unión de la hormona al receptor, la enzima adenilato ciclasa activa un aumento en los niveles intracelulares de

AMPC. La actividad incrementada de la proteína cinasa conduce a una mayor síntesis de hormonas esteroides ováricas a través de varios mecanismos, incluyendo la activación directa de componentes de la enzima mediante la fosforilación. En el CL son varios los factores que influyen en el número de receptores a LH, entre ellos la activación directa de los componentes del sistema enzimático esteroideogénico vía fosforilación. El complejo hormona-receptor se internaliza entonces por endocitosis y la hormona se degrada en lisosomas. Después de la internalización, el receptor es también degradado en lisosomas o reciclado a través del aparato de Golgi. Los receptores nuevos o reciclados para LH se incorporan en la membrana limitante con proteínas que contienen gránulos secretorios. Las acciones de la LH en la membrana plasmática de las células que contienen estos gránulos secretorios hacen que aumente la exocitosis e incorporan estos gránulos en la membrana (y los receptores a LH). Estos mecanismos propuestos explican el aumento del número de receptores a LH inmediatamente después de la estimulación de la célula lútea con dosis masivas de LH. También explican la "regulación a la baja" de los receptores de LH, 24 horas después de la administración de LH.¹⁹

El conocimiento sobre los eventos moleculares que conducen a la regresión funcional y estructural del CL es limitado debido a que existen diferencias entre los eventos luteolíticos de mamíferos primates y no primates. El CL de los primates tiene una vida media de 14 -16 días en los ciclos menstruales no fértiles, pero en los ciclos menstruales en los que se produce una implantación, la continuación de su capacidad funcional es indispensable para el mantenimiento satisfactorio del embarazo, hasta que la placenta se convierta en la fuente principal de progesterona. Para aportar conocimiento sobre el mecanismo fisiológico por el cual la hCG prolonga la vida funcional del CL de primates, en monos *Cynomolgus* se administró hCG o LH ya sea a una tasa constante o en una tasa que aumenta

exponencialmente durante la fase lútea media y tardía del ciclo menstrual. Los resultados indican que el CL experimenta una reducción sustancial en su capacidad de respuesta a la LH entre las fases lútea media y tardía del ciclo menstrual y que la capacidad de respuesta disminuida del CL en estas etapas solo puede superarse por las concentraciones elevadas de gonadotropinas logradas por la producción placentaria de la hCG.^{20,21}

6. Regresión Lútea

La regresión del CL está compuesta de dos eventos: la pérdida de su capacidad esteroideogénica (principalmente de progesterona), conocida como regresión funcional, seguida de una regresión estructural que involucra muerte celular por apoptosis y degeneración de la matriz extracelular por medio de luteólisis.²² La regresión del CL, tanto funcional como estructuralmente, es esencial para la ciclicidad normal. El CL debe retroceder funcionalmente para disminuir la secreción de progesterona y permitir otra oleada ovulatoria de LH y, por lo tanto, otro ciclo estral. También debe replegarse de manera estructural (destrucción y remoción de las células lúteas) para mantener el ovario en la proporción adecuada con respecto al resto del tracto reproductivo y habilitar los folículos preovulatorios para crecer y posteriormente ovular.²³ Por lo anterior, podemos decir que el CL es una glándula endocrina cuya vida útil está programada por limitantes hormonales.²⁴

La expresión del receptor CD95 (Apo-1) (Fas) y la apoptosis inducida por Fas son mecanismos atribuidos a la destrucción selectiva de células del CL durante la regresión lútea. En ciertos tipos de células epiteliales, la sensibilidad de estas se debe a la pérdida o escisión de los filamentos intermedios que contienen queratina. Específicamente la queratina 8/18 (K8/K18) de los filamentos influye en la muerte celular, en parte mediante la regulación de la expresión de Fas en la superficie celular.²⁵ Sin embargo, no se han estudiado completamente los sistemas de señalización que impulsan la

regresión del CL de los primates en los ciclos de no concepción.

Recientemente ha incrementado el interés por conocer el papel funcional de los metabolitos del estradiol (EM), principalmente en tejidos productores de estrógeno. El CL humano produce una serie amplia de EM, y se ha postulado que actúan a través de vías paracrinas y autocrinas que afectan la angiogénesis o los eventos mediados por LH.^{6,7}

Por otra parte, se ha observado que el sistema inmune participa en la autofagocitosis de células lúteas en humanos. Los macrófagos parecen jugar un papel indispensable en funciones ováricas, puesto que estos invaden al CL. La acumulación de células inmunes se asocia con la necrosis que se presenta durante la regresión del CL, como se ha observado en ovarios de vacas y humanos.²⁶ Se sugiere que en el CL existe un proceso de necrosis ya que se producen grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS); además, los altos niveles de cortisol causan estrés oxidativo en las células de la granulosa causando su muerte, lo que afecta directamente a los ovocitos ya que las células de la granulosa dejan de proveer a los folículos de nutrientes, factores de crecimiento y factores de supervivencia, lo que conlleva a la disminución en la producción de E2. Algunos estudios sugieren que el E2 participa como antioxidante en la supervivencia de los ovocitos de cerdo.^{27,28} La dependencia continua del CL de los primates sobre LH/ hCG /AMPc también parece estar detrás de la luteólisis, ya que parece requerir un mayor soporte luteotrópico.²⁹

En contraste, la regresión del CL de los rumiantes es iniciada por prostaglandinas F- α (PGF) a partir de la señal del útero que no presenta implantación. En consecuencia, la fase lútea corta en rumiantes se debe principalmente a la secreción prematura de PGF por el útero no preñado, mientras que la insuficiencia del CL en primates está relacionada con un inadecuado soporte luteotrópico y a la regresión prematura del CL. Así, el CL tiene dos vías que dependen de la preñez: funcionar como el principal soporte de progesterona o la regresión del CL en la

ausencia de la preñez, estos procesos son producidos por vías celulares y enzimáticas comunes, reguladas por procesos luteotrópicos y luteolíticos.^{30,31} Estos procesos incluyen factores paracrinicos o autocrinos asociados con la angiogénesis, que median las acciones de LH/hCG (por ejemplo, progesterona), o contrarrestar efectos luteotrópicos (es decir, luteólisis local; por ejemplo, PGF α).³¹

7. Inervación y Cuerpo Lúteo

La inervación del ovario incluye componentes somáticos y autonómicos que llegan a los ovarios por medio del nervio ovárico superior y el nervio del plexo ovárico (NPO).^{32,33} Recientemente nuestro grupo de trabajo hizo una descripción detallada de la inervación extrínseca que llega a los ovarios a través del NPO, mostrando su diversidad en cuanto a los ganglios prevertebrales donde se localizan las neuronas posganglionares.³⁴ Las terminales nerviosas localizadas en los ovarios liberan neurotransmisores y neuropéptidos que influyen en la actividad de los tejidos ováricos cuyo papel sería de tipo regulador en la esteroidogénesis y el desarrollo folicular.³⁵⁻³⁹ Así mismo se ha mostrado que en las membranas de las células foliculares existen receptores adrenérgicos y que, el empleo de fármacos agonistas o antagonistas modifica la liberación de los esteroides ováricos.^{40,41}

La denervación del ovario disminuye la actividad esteroidogénica del CL, aumenta los receptores en las células lúteas, retrasa el desarrollo folicular e interrumpe la ciclicidad ovárica.^{37,39} Así mismo, la secreción de progesterona y de andrógenos se modifica cuando el ganglio celíaco es estimulado con agonistas noradrenérgicos como propanolol o fentolamina, o cuando se estimulan los receptores adrenérgicos en los ovarios.⁴² Incluso, se ha descrito que el efecto de la estimulación vía nerviosa supera al efecto producido por LH en la liberación de progesterona.⁴³

Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que los receptores β -adrenérgicos modulan la liberación de hormonas esteroideas.⁴⁴ En

bovinos, el bloqueo de los β -receptores ováricos con propanolol disminuye las concentraciones de progesterona periférica entre el 20% al 30% a los 11 días de ser inyectado. Estos datos sugieren que la secreción basal de progesterona puede depender de la estimulación adrenérgica directa y constante en el CL.⁴⁵

El sistema noradrenérgico puede participar en la función secretora del CL en varios niveles reguladores como pueden ser: (a) afectar el funcionamiento del CL a través de vías en el sistema nervioso central, que involucran áreas extrahipofisarias, amigdalas e hipotálamo posterior; (b) controlar la contractilidad de la vasculatura periférica y ovárica, influyendo en el flujo sanguíneo de CL; y (c) aumentar la actividad de enzimas específicas que participan en la síntesis de oxitocina ovárica postraduccional y la esteroidogénesis del CL.¹³ En rumiantes, el funcionamiento del CL temprano es independiente de la LH, mientras que el CL en la fase lútea media requiere de LH como soporte luteotrófico, estos datos apuntan a la importancia de la estimulación β -adrenérgica en la regulación funcional del CL recién formado. Lo que supone que esto es especialmente importante en las primeras etapas de la preñez. Sin embargo, en novillas la infusión de un bloqueador β -adrenérgico a mitad del ciclo reduce la secreción de progesterona en un 20-30%. Por lo tanto, se ha sugerido que la estimulación β -adrenérgica es igualmente crucial para la función del CL durante toda la fase lútea como para todo el ciclo en general.^{13,45,46}

8. Inervación intrínseca del ovario

La inervación intrínseca del ovario es provista por neuronas con soma multipolar alojadas principalmente en la médula ovárica; mientras que las localizadas en la corteza están inmersas en la capa de células de la teca, pero no atraviesan la membrana basal y por lo tanto, no ingresan al interior del folículo ni del CL.⁴⁷

Respecto a la naturaleza bioquímica de las neuronas intrínsecas del ovario, se mostró

que producen neuropéptido Y (NPY), aunque no se determinó si también producen otros péptidos.⁴⁷ Resultados de nuestro laboratorio muestran que en los ovarios de la rata hembra adulta de la cepa Long Evans, existe una inervación intrínseca abundante y, específicamente en la corteza del ovario, cada folículo está asociado a un grupo de neuronas que pudiera influir en su desarrollo. También hemos encontrado que al interior del CL existen células que muestran inmunorreactividad a enzimas involucradas en la síntesis de catecolaminas (TH), que seguramente tienen la capacidad de influenciar la regulación y síntesis de progesterona en el CL.⁴⁸

9. Catecolaminas y CL

En el CL de mamíferos se ha sugerido que la dopamina (DA) puede tener influencia directamente a través de sus receptores específicos, indirectamente a través de los adrenoreceptores por medio de una reacción cruzada o mediante su conversión a NA en el proceso catalizada por la dopamina- β -hidroxilasa. La DA está presente en el CL de los bovinos, donde estimula la secreción de oxitocina en el CL de novillas.⁴⁶ La DA estimula la liberación de oxitocina en la hipófisis de ratas lactantes, con una potencia comparable a la de la NA. De igual manera, se ha observado que la NA influye en la secreción concomitante de progesterona y oxitocina en el ovario durante todas las etapas del ciclo estral en bovinos actuando a través de los adrenoreceptores. De este modo suponemos que la DA afecta la función ovárica después de su conversión en NA.^{46,49}

También se ha observado que la NA afecta la secreción de progesterona y su síntesis por mediante un aumento de la actividad del citocromo P450_{sc} y de la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Este efecto está mediado a través de los receptores celulares β_1 y β_2 de las células lúteas, la cantidad total de estos receptores se correlaciona con las concentraciones de progesterona periférica durante la fase lútea y

esto refleja la capacidad del ovario para reaccionar a la estimulación.^{33,37,41,44}

En otros estudios se ha observado que la denervación ovárica causa una disminución de la actividad esteroidogénica en el CL, un aumento de los receptores en las células lúteas, un retraso en el desarrollo folicular y la interrupción de la ciclicidad.^{37,39} El aumento de la actividad noradrenérgica durante situaciones estresantes podría afectar la función del CL y, por el contrario, el aumento duradero en las concentraciones de catecolaminas en sangre disminuye notablemente el número de receptores de catecolaminas en el CL, posiblemente por su autorregulación. Incluso se observó que las concentraciones de DA dentro del CL están altamente correlacionadas con los de NA durante el ciclo estral, y son más altas en el CL recién formado que en el CL desarrollado, el CL regresivo o el CL de mujeres embarazadas. El CL de bovinos puede sintetizar NA a partir de DA como precursor, también se ha observado que la respuesta del CL al tratamiento con NA se reduce en el envejecimiento, en comparación con las vacas cíclicas.⁴⁵

La progesterona reduce la actividad de la MAO, la principal enzima responsable de la degradación intracelular de las catecolaminas.⁴⁶ La MAO se encuentra alrededor de los vasos sanguíneos ováricos, en la glándula intersticial y en el CL en envejecimiento, pero no en los folículos o en el CL recién formado en ratas. La actividad de la MAO ovárica varía durante el ciclo estral en ratas,³³ por lo que se supone que también puede afectar indirectamente la función ovárica.⁵⁰ Lo que indica que la estimulación catecolaminérgica puede ser una parte importante en el mecanismo de secreción del CL.^{46,51}

10. La insuficiencia de la Fase Lútea

La insuficiencia de la fase lútea debido a problemas hormonales lleva al fracaso de la implantación y ha sido responsable de abortos espontáneos y fracasos en reproducción

asistida. Esta deficiencia se observa en mujeres con ovarios poliquísticos, trastornos de la tiroides y alteraciones en la producción de prolactina, lo cual genera un bajo ambiente hormonal de progesterona, provocando iatrogenia debido entre otros, a malas intervenciones en reproducción asistida. El uso de análogos de la hormona liberadora de gonadotropina para prevenir la oleada de LH y la aspiración de las células de la granulosa durante la recuperación del ovocito (en procedimientos de fertilización in vitro), puede perjudicar la capacidad del CL para producir progesterona. El uso de agentes progestacionales como progesterona/hCG han demostrado ser eficaces en mujeres con antecedentes de aborto recurrente. Sin embargo, no se ha demostrado un efecto beneficioso de agentes de uso generalizado para establecer un tratamiento óptimo, como ácido ascórbico, estrógeno o prednisolona junto con progesterona.^{14,21,52-54}

Por otra parte, la obesidad y la malnutrición se han relacionado con una disminución de la fecundidad en las mujeres.⁵⁵ La deficiencia de la capacidad reproductiva de mujeres obesas se atribuye a la anovulación. Sin embargo, en mujeres obesas con ciclos ovulatorios regulares se observa fertilidad reducida.^{56,57} Por lo cual, se sugiere que la obesidad afecta directamente la calidad de los ovocitos y embriones,⁵⁸ así como la receptividad endometrial.⁵⁹ También se ha visto que la excreción urinaria de metabolitos de progesterona disminuye, debido a la supresión en la secreción de gonadotropinas en mujeres obesas,⁶⁰ por lo que se ha llegado a pensar que la obesidad afecta la función del CL. Además, se ha mostrado que la secreción de progesterona está asociada con la regulación negativa de las vías esteroidogénicas del CL, por lo que una variación de peso contribuye a la disfunción del CL.⁵⁵ Este nuevo panorama nos ha ayudado a comprender mejor las consecuencias y factores asociados en la disfunción reproductiva relacionada con el peso, lo que podría ayudar a reforzar los tratamientos para mejorar la capacidad reproductiva de las mujeres con obesidad.^{53,54}

11. Conclusiones

En los últimos años se han realizado avances significativos sobre el estudio de la inervación y su influencia en diferentes órganos, incluyendo al ovario y sus estructuras, tales como el CL. La formación y duración del CL son críticas para la reproducción en mamíferos, ya que la progesterona lútea es esencial para la implantación del embrión y el mantenimiento de la preñez, hasta que se desarrolla la placenta. La disfunción de esta glándula dinámica puede generar problemas de salud tales como abortos por insuficiencia lútea, quistes ováricos e infertilidad.

Actualmente se han realizado avances significativos en el conocimiento de los mecanismos fisiológicos que regulan la función ovárica, sin embargo, se requieren más estudios que nos permitan conocer la neurobiología del CL, en especial para esclarecer las vías de señalización que subyacen para determinar la funcionalidad del CL en el ciclo ovárico. El conocimiento de la fisiopatología del CL requiere de estudios integrativos con enfoques metodológicos novedosos, *in vivo* e *in vitro*, que nos permitan conocer más de la insuficiencia lútea, los mecanismos celulares y endocrinos en el ovario que están siendo afectados por el estrés y que a su vez provocan patologías que antes tenían una menor prevalencia entre las mujeres en edad reproductiva. Resultados recientes y trabajos futuros pueden ser importantes no sólo para tratamiento de los trastornos ováricos en mujeres, sino que también para el diseño de nuevos anticonceptivos e incluso usarse para la recuperación de la fauna silvestre, especialmente en la reproducción de las especies en peligro de extinción. En la presente revisión se hizo énfasis en los mecanismos de regulación del CL y cómo participan en el control de las funciones ováricas como el ciclo ovárico y su influencia en posibles patologías asociadas al CL, dándonos una visión más amplia de lo que aún falta por estudiar para entender de los mecanismos de regulación del ovario.

12. Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

13. Agradecimientos

Agradecemos al “Programa Nacional de Becas de Doctorado, CONACYT” por el apoyo para la realización de este trabajo CONACYT FC2016-01-231 y VIEP-3180. El autor Juan Manuel Bravo-Benítez fue apoyado con el programa de becas de doctorado de CONACYT-JMBB772933/624536.

14. Referencias

1. Stouffer, R. L.; Bishop, C. V.; Bogan, R. L.; Xu, F.; Hennebold, J. D., Endocrine and local control of the primate corpus luteum. *Reprod Biol* 2013, 13 (4), 259-71.
2. Williams, C. J.; Erickson, G. F., Morphology and Physiology of the Ovary. In *Endotext*, Feingold, K. R.; Anawalt, B.; Boyce, A.; Chrousos, G.; Dungan, K.; Grossman, A.; Hershman, J. M.; Kaltsas, G.; Koch, C.; Kopp, P.; Korbonits, M.; McLachlan, R.; Morley, J. E.; New, M.; Perreault, L.; Purnell, J.; Rebar, R.; Singer, F.; Trencce, D. L.; Vinik, A.; Wilson, D. P., Eds. South Dartmouth (MA), 2000.
3. Christenson, L. K.; Devoto, L., Cholesterol transport and steroidogenesis by the corpus luteum. *Reprod Biol Endocrinol* 2003, 1, 90.
4. Schams, D.; Berisha, B., Regulation of corpus luteum function in cattle--an overview. *Reprod Domest Anim* 2004, 39 (4), 241-51.
5. Bergers, G.; Benjamin, L. E., Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003, 3 (6), 401-10.

6. Reynolds, L. P.; Grazul-Bilska, A. T.; Redmer, D. A., Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine* 2000, 12 (1), 1-9.
7. Robinson, R. S.; Woad, K. J.; Hammond, A. J.; Laird, M.; Hunter, M. G.; Mann, G. E., Angiogenesis and vascular function in the ovary. *Reproduction* 2009, 138 (6), 869-81.
8. Galvao, A. M.; Ferreira-Dias, G.; Skarzynski, D. J., Cytokines and angiogenesis in the corpus luteum. *Mediators Inflamm* 2013, 2013, 420186.
9. Singhal, S. S.; Singhal, J.; Yadav, S.; Dwivedi, S.; Boor, P. J.; Awasthi, Y. C.; Awasthi, S., Regression of lung and colon cancer xenografts by depleting or inhibiting RLIP76 (Ral-binding protein 1). *Cancer Res* 2007, 67 (9), 4382-9.
10. Awasthi, S.; Singhal, S. S.; Yadav, S.; Singhal, J.; Drake, K.; Nadkar, A.; Zajac, E.; Wickramarachchi, D.; Rowe, N.; Yacoub, A.; Boor, P.; Dwivedi, S.; Dent, P.; Jarman, W. E.; John, B.; Awasthi, Y. C., RLIP76 is a major determinant of radiation sensitivity. *Cancer Res* 2005, 65 (14), 6022-8.
11. Awasthi, S.; Singhal, S. S.; Singhal, J.; Yang, Y.; Zimniak, P.; Awasthi, Y. C., Role of RLIP76 in lung cancer doxorubicin resistance: III. Anti-RLIP76 antibodies trigger apoptosis in lung cancer cells and synergistically increase doxorubicin cytotoxicity. *Int J Oncol* 2003, 22 (4), 721-32.
12. Billhaq, D. H.; Lee, S., A potential function of RLIP76 in the ovarian corpus luteum. *J Ovarian Res* 2019, 12 (1), 34.
13. Kotwica, J.; Skarzynski, D.; Jaroszewski, J., Involvement of beta-adrenoceptors in the regulation of luteal function in cattle. *Br Vet J* 1991, 147 (3), 189-96.
14. Silva, J. F.; Ocarino, N. M.; Serakides, R., Luteal activity of pregnant rats with hypo- and hyperthyroidism. *J Ovarian Res* 2014, 7, 75.
15. Niswender, G. D.; Juengel, J. L.; Silva, P. J.; Rollyson, M. K.; McIntush, E. W., Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 2000, 80 (1), 1-29.
16. Clapp, C.; Thebault, S.; Macotela, Y.; Moreno-Carranza, B.; Triebel, J.; Martinez de la Escalera, G., Regulation of blood vessels by prolactin and vasoinhibins. *Adv Exp Med Biol* 2015, 846, 83-95.
17. Filicori, M.; Butler, J. P.; Crowley, W. F., Jr., Neuroendocrine regulation of the corpus luteum in the human. Evidence for pulsatile progesterone secretion. *J Clin Invest* 1984, 73 (6), 1638-47.
18. Yang, Y. L.; Ren, L. R.; Sun, L. F.; Huang, C.; Xiao, T. X.; Wang, B. B.; Chen, J.; Zabel, B. A.; Ren, P.; Zhang, J. V., The role of GPR1 signaling in mice corpus luteum. *J Endocrinol* 2016, 230 (1), 55-65.
19. Niswender, G. D., Response of the corpus luteum to luteinizing hormone. *Environ Health Perspect* 1981, 38, 47-50.
20. Zeleznik, A. J., In vivo responses of the primate corpus luteum to luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, 95 (18), 11002-7.
21. Zeleznik, A. J., In vivo responses of the primate corpus luteum to luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95 (18), 11002-7.
22. Quirk, S. M.; Cowan, R. G.; Harman, R. M., Role of the cell cycle in regression of the corpus luteum. *Reproduction* 2013, 145 (2), 161-75.

23. Juengel, J. L.; Garverick, H. A.; Johnson, A. L.; Youngquist, R. S.; Smith, M. F., Apoptosis during luteal regression in cattle. *Endocrinology* 1993, 132 (1), 249-54.
24. Telleria, C. M., Can luteal regression be reversed? *Reprod Biol Endocrinol* 2006, 4, 53.
25. Duncan, A.; Forcina, J.; Birt, A.; Townson, D., Estrous cycle-dependent changes of Fas expression in the bovine corpus luteum: influence of keratin 8/18 intermediate filaments and cytokines. *Reprod Biol Endocrinol* 2012, 10, 90.
26. Bagnjuk, K.; Mayerhofer, A., Human Luteinized Granulosa Cells-A Cellular Model for the Human Corpus Luteum. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019, 10, 452.
27. Grootjans, S.; Vanden Berghe, T.; Vandenabeele, P., Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview. *Cell Death Differ* 2017, 24 (7), 1184-1195.
28. Chaudhary, G. R.; Yadav, P. K.; Yadav, A. K.; Tiwari, M.; Gupta, A.; Sharma, A.; Pandey, A. N.; Pandey, A. K.; Chaube, S. K., Necroptosis in stressed ovary. *J Biomed Sci* 2019, 26 (1), 11.
29. Nichols, S. M.; Bavister, B. D.; Brenner, C. A.; Didier, P. J.; Harrison, R. M.; Kubisch, H. M., Ovarian senescence in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Hum Reprod* 2005, 20 (1), 79-83.
30. Wiltbank, M. C.; Salih, S. M.; Atli, M. O.; Luo, W.; Bormann, C. L.; Ottobre, J. S.; Vezina, C. M.; Mehta, V.; Diaz, F. J.; Tsai, S. J.; Sartori, R., Comparison of endocrine and cellular mechanisms regulating the corpus luteum of primates and ruminants. *Anim Reprod* 2012, 9 (3), 242-259.
31. Sansing, L. H.; Harris, T. H.; Kasner, S. E.; Hunter, C. A.; Kariko, K., Neutrophil depletion diminishes monocyte infiltration and improves functional outcome after experimental intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl* 2011, 111, 173-8.
32. Baljet, B.; Drukker, J., The extrinsic innervation of the abdominal organs in the female rat. *Acta Anat (Basel)* 1979, 104 (3), 243-67.
33. Aguado, L. I., Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microsc Res Tech* 2002, 59 (6), 462-73.
34. Pastelin, C. F.; Rosas, N. H.; Morales-Ledesma, L.; Linares, R.; Dominguez, R.; Moran, C., Anatomical organization and neural pathways of the ovarian plexus nerve in rats. *J Ovarian Res* 2017, 10 (1), 18.
35. Dissen, G. A.; Romero, C.; Paredes, A.; Ojeda, S. R., Neurotrophic control of ovarian development. *Microsc Res Tech* 2002, 59 (6), 509-15.
36. Hsueh, A. J.; Adashi, E. Y.; Jones, P. B.; Welsh, T. H., Jr., Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev* 1984, 5 (1), 76-127.
37. Mayerhofer, A.; Dissen, G. A.; Costa, M. E.; Ojeda, S. R., A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 1997, 138 (8), 3320-9.
38. Dominguez, R.; Cruz, M. E.; Chávez-Genaro, R., Differences in the Ovulatory Ability Between the Right and Left Ovary Are Related to Ovarian Innervation. *Growth Factors and the Ovary* 1988, 39, 321-325.
39. Dominguez, R.; Riboni, L., Failure of ovulation in autografted ovary of hemispayed rat. *Neuroendocrinology* 1971, 7 (3), 164-70.

40. Gerendai, I.; Csaba, Z.; Vokó, Z.; Csernus, V., Involvement of a direct neural mechanism in the control of gonadal functions. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1995, 53 (1), 299-305.
41. Ojeda, S. R.; Lara, H. E. In *Role of the Sympathetic Nervous System in the Regulation of Ovarian Function*, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1989; pp 26-32.
42. Casais, M.; Sosa, Z. Y.; Rastrilla, A. M.; Aguado, L. I., Coeliac ganglion adrenergic activity modifies ovarian progesterone during pregnancy: its inter-relationship with LH. *J Endocrinol* 2001, 170 (3), 575-84.
43. De Bortoli, M. A.; Garraza, M. H.; Aguado, L. I., Adrenergic intracerebroventricular stimulation affects progesterone concentration in the ovarian vein of the rat: participation of the superior ovarian nerve. *J Endocrinol* 1998, 159 (1), 61-8.
44. Aguado, L. I.; Petrovic, S. L.; Ojeda, S. R., Ovarian β -Adrenergic Receptors during the Onset of Puberty: Characterization, Distribution, and Coupling to Steroidogenic Responses*. *Endocrinology* 1982, 110 (4), 1124-1132.
45. Kotwica, J.; Bogacki, M.; Rekawiecki, R., Neural regulation of the bovine corpus luteum. *Domest Anim Endocrinol* 2002, 23 (1-2), 299-308.
46. Kotwica, J.; Skarzynski, D.; Bogacki, M.; Miszkiel, G., Influence of dopamine as noradrenaline precursor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro. *Br J Pharmacol* 1996, 118 (7), 1669-74.
47. D'Albora, H.; Anesetti, G.; Lombide, P.; Dees, W. L.; Ojeda, S. R., Intrinsic neurons in the mammalian ovary. *Microsc Res Tech* 2002, 59 (6), 484-9.
48. Nayak, D.; Roth, T. L.; McGavern, D. B., Microglia development and function. *Annu Rev Immunol* 2014, 32, 367-402.
49. Tripathy, S.; Asaithambi, K.; Jayaram, P.; Medhamurthy, R., Analysis of 17 β -estradiol (E2) role in the regulation of corpus luteum function in pregnant rats: Involvement of IGFBP5 in the E2-mediated actions. *Reprod Biol Endocrinol* 2016, 14, 19.
50. Yoshimoto, Y.; Sakumoto, T.; Arai, R.; Miyake, A.; Kimura, H.; Aono, T.; Tanizawa, O.; Maeda, T., Monoamine oxidase in rat ovary during the estrous cycle. A histochemical study by a new coupled peroxidatic oxidation method. *Endocrinology* 1986, 119 (4), 1800-4.
51. Dumesic, D. A.; Richards, J. S., Ontogeny of the ovary in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2013, 100 (1), 23-38.
52. Ojeda, S. R.; Lara, H. E. In *Role of the Sympathetic Nervous System in the Regulation of Ovarian Function, The Menstrual Cycle and Its Disorders*, Berlin, Heidelberg, 1989//; Pirke, K. M.; Wuttke, W.; Schweiger, U., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1989; pp 26-32.
53. Lustig, R. H.; Bradlow, H. L.; Fishman, J. In *Estrogen Metabolism in Disorders of Nutrition and Dietary Composition, The Menstrual Cycle and Its Disorders*, Berlin, Heidelberg, 1989//; Pirke, K. M.; Wuttke, W.; Schweiger, U., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1989; pp 119-132.
54. Shah, D.; Nagarajan, N., Luteal insufficiency in first trimester. *Indian J Endocrinol Metab* 2013, 17 (1), 44-9.
55. Kuokkanen, S.; Polotsky, A. J.; Chosich, J.; Bradford, A. P.; Jasinska, A.; Phang, T.; Santoro, N.; Appt, S. E., Corpus luteum as a novel target of weight changes that contribute to impaired female

- reproductive physiology and function. *Syst Biol Reprod Med* 2016, 62 (4), 227-42.
56. Polotsky, A. J.; Hailpern, S. M.; Skurnick, J. H.; Lo, J. C.; Sternfeld, B.; Santoro, N., Association of adolescent obesity and lifetime nulliparity--the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). *Fertil Steril* 2010, 93 (6), 2004-11.
57. Bolumar, F.; Olsen, J.; Rebagliato, M.; Saez-Lloret, I.; Bisanti, L., Body mass index and delayed conception: a European Multicenter Study on Infertility and Subfecundity. *Am J Epidemiol* 2000, 151 (11), 1072-9.
58. Bellver, J.; Pellicer, A.; Garcia-Velasco, J. A.; Ballesteros, A.; Remohi, J.; Meseguer, M., Obesity reduces uterine receptivity: clinical experience from 9,587 first cycles of ovum donation with normal weight donors. *Fertil Steril* 2013, 100 (4), 1050-8.
59. Bellver, J.; Martinez-Conejero, J. A.; Labarta, E.; Alama, P.; Melo, M. A.; Remohi, J.; Pellicer, A.; Horcajadas, J. A., Endometrial gene expression in the window of implantation is altered in obese women especially in association with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2011, 95 (7), 2335-41, 2341 e1-8.
60. Santoro, N.; Lasley, B.; McConnell, D.; Allsworth, J.; Crawford, S.; Gold, E. B.; Finkelstein, J. S.; Greendale, G. A.; Kelsey, J.; Korenman, S.; Luborsky, J. L.; Matthews, K.; Midgley, R.; Powell, L.; Sabatine, J.; Schocken, M.; Sowers, M. F.; Weiss, G., Body size and ethnicity are associated with menstrual cycle alterations in women in the early menopausal transition: The Study of Women's Health across the Nation (SWAN) Daily Hormone Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89 (6), 2622-31.

Journal of Molecular Histology

Intrinsic innervation of the ovary and its variations in the rat senescence process.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	HIJO-D-21-00338R1	
Full Title:	Intrinsic innervation of the ovary and its variations in the rat senescence process.	
Article Type:	Original Paper	
Keywords:	Ovarian Innervation, Senescent Rat, Intrinsic Neurons, Ovarian Function	
Corresponding Author:	Moran Carolina, Ph. D. Benemerita Universidad Autonoma de Puebla Instituto de Ciencias MEXICO	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Benemerita Universidad Autonoma de Puebla Instituto de Ciencias	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Juan Manuel Bravo-Benitez, M. S.	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Juan Manuel Bravo-Benitez, M. S.	
	Cruz Yolanda	
	Lucio Rosa Angélica	
	Venegas Berenice, Ph. D.	
	Diaz Alfonso	
	Morales-Ledesma Leticia	
	Domínguez Roberto	
	Moran Carolina, Ph. D.	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	CONACYT (FC2016-01-231)	M.S. Juan Manuel Bravo-Benitez
	CONACYT (JMBB772933/624536.)	M.S. Juan Manuel Bravo-Benitez
	VIEP (3180/2019)	Ph. D. Moran Carolina
Abstract:	<p>Ovarian functions decrease with perimenopause. The ovary has extrinsic innervation, but the neural influence on ovarian functions and dysfunction is not well-studied. The present study aimed to biochemically and morphometrically characterize the intrinsic neurons in ovaries from young adult, middle-aged, and senescent Long Evans CII-ZV rats (3, 12, and 15 months old, respectively). Ovaries were extracted from four rats of each age group (n=12 total), cryopreserved, and processed for immunofluorescence studies with the primary NeuN/β-tubulin and NeuN/tyrosine hydroxylase (TH) antibodies. The soma area and number of intrinsic neurons in the ovarian stroma, surrounding follicles, corpus luteum, or cyst were evaluated. The intrinsic neurons were grouped in cluster-like shapes in ovarian structures. In senescent rats, the intrinsic neurons were mainly localized in the ovarian stroma and around the cysts. The number of neurons was lower in senescent rats than in young adult rats ($p < 0.05$), but the soma size was larger than in young adult rats. Immunoreactivity to TH indicated the presence of noradrenergic neurons in the ovary with the same characteristics as NeuN/β-tubulin, which indicates that they are part of the same neuronal group. Taken together, the findings indicate that the intrinsic neurons may be related to the loss of ovarian functions associated with aging.</p>	

Ivelisse Sánchez Díaz

Editor-in-Chief

Journal of Molecular Histology

Dear Ivelisse,

We appreciate both the attentions taken on our manuscript and the suggestions to help improving its quality. In turn, we thank the reviewers for taking the time and care regarding the process.

Most of the manuscript has been modified according to the reviewers recommendations, which helped us correct the presented writing and syntax errors as to conform to the standards of the Journal of Molecular Histology. Below we list the suggested changes that contributed to the improvement of the manuscript as well as the specific actions/modifications taken to approach the suggestion.

Reviewer 1	
Suggestions:	Modification in the document:
The article is well written, however there are numerous grammatical errors. it is recommended that the authors get in touch with someone proficient in English Language to correctly read and edit the manuscript	An exhaustive review of the document was carried out to correct typographical and grammatical errors. The latter were corrected by an expert on the subject.
The grouping of rats is unclear. the authors indicated three groups but on line 123, used the word OR between the second group (12 months) and the third group (15 months). It is suggested that the authors find a name for the groups e.g., Groups A, B and C or I, II and III and stick to this format.	Redefinition of group name on page 5, lines 148-150. The females were assigned to the following groups: young adult rats aged 3-5 months (3M, n=4), middle-aged rats aged 12 months (12M, n=4), and senescent rats aged 15 months (15M, n=4).
In the methodology, there was no indication for the procedure employed in measurement of neuron area as mentioned in the results as well as discussion.	A description of the procedure employed in measurement of neuron area was made, Page 7-8, 182-188. Immunoreactive neurons to primary antibodies were counted and the area of the soma determined using Image Pro-premier 9.2 software (Media Cybernetics, Inc., Rockville, USA). To obtain the soma area of the intrinsic neurons, the immunoreactive cells, including well-

	defined nuclei, were selected and delineated manually in microphotographs and the area of the intrinsic neurons measured by the software. To define the number of neurons around each follicle or cyst, the Block method for estimation of cell populations (Block, 1951, 1952) was used as a correction factor.
How many rats were ultimately used per group to obtain the results in this study? the authors reported that 8 ovaries were harvested per group however, they also stated that only rats that were in oestrous, continued estrus and continued anestrus stages were used respectively for rats in the first, second and third groups? authors should please clarify.	We changed the text on page 5, lines 150-155. Currently it states: Both ovaries from each animal were analyzed (i.e., eight ovaries per group).
In line 173, the authors reported that TH immunoglobulin reactivity was outstanding. the statement is ambiguous and authors should clarify. clarification is also required for how TH neurons are "poor" in line 174.	We clear this point, on Page 7 line 207-211, by changing "poor" for "lower".
The paragraph in the discussion in lines 226 - 240 should be moved to introduction because they justify the selection of antibodies for the study.	We moved the paragraph to the introduction, page 4, 122-135 pages
The discussion is deficit as it relates to the title of the paper. the results should be better correlated to the senescent rats in the second and third groups and how the number and area of neurons in the ovary affects the normal physiology of senescent rats.	The discussion was modified as to enrich the present work.

Reviewer 2	
Suggestions:	Modification in the document:
Although the manuscript language is simple and clear there are a few grammatic mistakes and typos which needs proof-reading.	An exhaustive review of the document was carried out to correct typographical and grammatical errors. The latter were corrected by an expert on the subject.

<p>Intrinsic innervation in ovaries has been reported previously in different species but not in the Long Evans CII-ZV strain. The authors need to indicate why is it important to study ovarian innervation in the Long Evans CII-ZV strain? Is it for comparing the Long Evans CII-ZV strain with other species and how innervation in the ovaries can develop/evolve differently in different species? Or because the Long Evans CII-ZV strain make a good model to study ovarian innervation?</p>	<p>The clarification suggested by the reviewer was made in the introduction section on page 8, line 239-244.</p>
<p>In the abstract the authors stated “characterize (biochemistry and morphometrically) the intrinsic neurons”. Using Biochemistry is not accurate here as this gives the reader the impression that they will look at protein-protein interaction or protein biochemistry.</p>	<p>The clarification was made in the document by changing the term "biochemistry" for “biochemically”.</p>
<p>The results section was rather descriptive. The authors need to state what the results are telling not just describing what they found.</p>	<p>A more complete writing of the results was made as suggested by the reviewer.</p>
<p>In abbreviations: there was same abbreviation for different terms. Probably the same but named differently? NGF: Nerve growth factor and NGF: neuronal growing factor.</p>	<p>The error in the abbreviations was corrected by removing one of the terms, since it was the same.</p>
<p>On page 4 line 81, it is not clear what is VIP?</p>	<p>The abbreviation was clarified in the section abreviations.</p>
<p>In Figure 1: It is preferable if the authors can indicate the fold change increase of the nucleus of neurons in comparison to the ovarian cells?</p>	<p>We decided to make the clarification directly in the results.</p>
<p>On page 10, line 238 in the discussion section the authors mentioned that NeuN + ve neurons decrease with aging and on the other hand β-III tubulin + ve neurons increase, however, they have not clarified what this can tell the reader? Or what is the interpretation/conclusion of that?</p>	<p>This paragraph was moved to the introduction as indicated by the reviewer 1.</p>
<p>Other Changes</p>	

Style and wording changes were made throughout the document to improve understanding of ideas. Typographical errors were also corrected.

Dra. Carolina Morán Raya
Instituto de Ciencias
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
carolina.moran@correo.buap.mx

[Click here to view linked References](#)

1
2
3
4 **1 Intrinsic innervation of the ovary and its variations in the rat senescence process.**

5
6 2 Bravo-Benítez Juan Manuel¹, Cruz Yolanda², Lucio Rosa Angélica², Venegas Berenice³,
7 3 Diaz Alfonso⁴, Morales-Ledesma Leticia⁵, Domínguez Roberto⁵ and Moran Carolina^{6*}

8 4 ¹Doctorado en ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México.

9 5 ²Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala,

10 6 México. ³Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla,

11 7 Puebla, México. ⁴Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita

12 8 Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. ⁵Biology of Reproduction Research Unit,

13 9 Physiology of Reproduction Laboratory, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM,

14 10 DF, México. ⁶Centro de Investigación en Fisicoquímica de Materiales, Instituto de Ciencias,

15 11 Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

16 12 *Corresponding author: Carolina Moran

17 13 ORCID ID 0000-0002-2023-2242

18 14 Email: carolina.moran@correo.buap.mx

19 15

20 16 **Abstract**

21 17 Ovarian functions decrease with perimenopause. The ovary has extrinsic innervation, but the

22 18 neural influence on ovarian functions and dysfunction is not well-studied. The present study

23 19 aimed to biochemically and morphometrically characterize the intrinsic neurons in ovaries

24 20 from young adult, middle-aged, and senescent Long Evans CII-ZV rats (3, 12, and 15 months

25 21 old, respectively). Ovaries were extracted from four rats of each age group (n=12 total),

26 22 cryopreserved, and processed for immunofluorescence studies with the primary NeuN/ β -

27 23 tubulin and NeuN/tyrosine hydroxylase (TH) antibodies. The soma area and number of

28 24 intrinsic neurons in the ovarian stroma, surrounding follicles, corpus luteum, or cyst were

29 25 evaluated. The intrinsic neurons were grouped in cluster-like shapes in ovarian structures. In

30 26 senescent rats, the intrinsic neurons were mainly localized in the ovarian stroma and around

31 27 the cysts. The number of neurons was lower in senescent rats than in young adult rats

32 28 ($p < 0.05$), but the soma size was larger than in young adult rats. Immunoreactivity to TH

33 29 indicated the presence of noradrenergic neurons in the ovary with the same characteristics as

34 30 NeuN/ β -tubulin, which indicates that they are part of the same neuronal group. Taken

1
2
3
4 31 together, the findings indicate that the intrinsic neurons may be related to the loss of ovarian
5
6 32 functions associated with aging.

7
8 33 **Keywords:** Ovarian Innervation, Senescent Rat, Intrinsic Neurons, Ovarian Function

9
10 34 **Abbreviations**

11 35 CL: Corpus luteum; NE: Norepinephrine; NGF: Nerve growth factor; OS: Ovarian stroma;
12
13 36 Ach: Acetylcholinesterase; PCOS: Polycystic ovarian syndrome; BDNF: Brain-derived
14
15 37 neurotrophic factor; NeuN: Neuron-specific nuclear protein, TH: Tyrosine hydroxylase, VIP:
16
17 38 Vasoactive intestinal peptide

18
19 39 **Authors' contributions**

20 40 B-BJM and MC planned and designed the experiments. B-BJM, CY, VB, DA, and MC
21
22 41 performed experiments. B-BJM, CY, LAR, VV, DA, M-LL, DR, and MC devised the study,
23
24 42 analyzed the data, and wrote the manuscript. All authors read and approved the final
25
26 43 manuscript.

27
28 44 **Funding**

29
30 45 This study was supported by CONACYT FC2016-01-231 and VIEP-3180. Juan Manuel
31
32 46 Bravo-Benitez was supported by the doctoral fellowship program CONACYT-
33
34 47 JMBB772933/624536.

35
36 48 **Acknowledgements**

37 49 We want to thank the “Programa Nacional de Becas de Doctorado, CONACYT” for their
38
39 50 support in the realization of this study. We also thank the Biologist Saul Gaona for consulting
40
41 51 and performing the immunofluorescence, and Biologist José Luis Córdova for consulting and
42
43 52 performing the confocal microscopy.

44
45 53 **Availability of data and materials**

46 54 The data sets generated and/or analyzed during the current study are available from the
47
48 55 corresponding author upon reasonable request.

49
50 56 **Declarations**

51
52 57 **Ethics approval**

53 58 The animals used in this study were treated according to the Mexican Law of Animal
54
55 59 Treatment and Protection Guidelines (NOM-062-ZOO-1999). The institutional committee of
56
57 60 the Instituto de Ciencias of Universidad Autónoma de Puebla, BUAP, approved the
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 61 experimental protocols. Every effort was made to minimize the number of animals in each
5
6 62 experimental group and ensure minimal discomfort and pain.

7
8 63 **Consent for publication**

9
10 64 Not applicable.

11
12 65 **Competing interests**

13
14 66 The authors declare that they have no competing interests.

15
16 67 **Introduction**

17 68 In mammals in the mid-life stage, an exponential decrease in the number of ovarian follicles
18
19 69 correlates with the beginning of female subfertility, a process known as reproductive
20
21 70 senescence. Once this event occurs, there is a decrease in viable oocytes. In general, when
22
23 71 the pool of follicles in a woman's ovaries is <1000, the hormonal feedback with the
24
25 72 hypothalamus cannot be sustained, which leads to menopause (Cruz et al., 2017; te Velde et
26
27 73 al., 1998). In Sprague Dawley and Wistar rats, a decrease in the number of follicles and
28
29 74 modification of the estrous cycle has been observed at 10 months of age (Acuna et al., 2009;
30
31 75 Peng & Huang, 1972). The decrease in follicles continues until 12 months old (middle-aged),
32
33 76 then the rats experience subfertile and infertile periods as they grow older (senescent) (Acuna
34
35 77 et al., 2009; Chavez-Genaro et al., 2007).

36 78 The configuration of the ovarian tissue undergoes structural and functional change depending
37
38 79 on the age of the animal. Changes include proliferation, differentiation, and cellular death,
39
40 80 (e.g., follicle growth, ovulation, forming of the corpus luteum [CL], cysts, and ovarian stroma
41
42 81 [OS]). As the animal ages, there are modifications in the ovarian configuration; mainly, cysts
43
44 82 begin to appear when rats are 6 months old and, by the age of 14 months (senescent rat), large
45
46 83 cysts increase in number and occupy most of the ovarian cortex (Acuna et al., 2009).

47 84 The ovarian extrinsic innervation involves autonomic and sensorial components that reach
48
49 85 the ovaries through the superior ovarian nerve and ovarian plexus nerve (Aguado, 2002;
50
51 86 Baljet & Drukker, 1979; Doganay et al., 2010; Pastelin et al., 2017). In some species, the
52
53 87 nerve fibers reach the primordial and in-development follicles but do not penetrate the basal
54
55 88 lamina to the granulosa cells or CL (D'Albora & Barcia, 1996; D'Albora et al., 2000). For
56
57 89 example, in the female pig, the parasympathetic intraovarian nerve fibers surround the
58
59 90 preantral and antral follicles, the CL, blood vessels, and OS. Such fibers release acetylcholine
60
61 91 (Ach) and co-transmitters, including nitric oxide, vasoactive intestinal polypeptide (VIP),

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

92 somatostatin (SOM), substance P, and galanin (Jana et al., 2018). In pathological conditions
93 (hyperestrogenism), the quantity of parasympathetic nerve fibers in the adult pig ovary
94 decreases in the inner part of the ovary, altering the cholinergic innervation pattern, neuronal
95 isoform of nitric oxide synthase (nNOS), and VIP, which in turn modifies its functions (Jana
96 et al., 2018).

97 Other studies have described an association between a loss in the number of fertile follicles
98 and an increasing concentration of norepinephrine (NE) in the rat ovary (Chavez-Genaro et
99 al., 2007). Thus, an experimental increase in the ovarian sympathetic tone of 10-month-old
100 animals increases catecholamine levels, which correlates with cyst formation, along with
101 follicular degeneration. In the ovaries of 14-month-old animals, the number of cysts was
102 significantly high (Acuna et al., 2009). However, in the celiac ganglia (main neuronal relay
103 between the central nervous system and ovaries), the levels of NE do not increase during the
104 senescent period, but decrease with age. Therefore, the increase in NE may occur via intrinsic
105 innervation, which has not been studied in senescent stages (Acuna et al., 2009; Banerjee et
106 al., 2014; Chavez-Genaro et al., 2007; Dumesic & Richards, 2013; Mayerhofer et al., 1998;
107 Venegas-Meneses et al., 2015).

108 Intrinsic innervation and its participation in functioning has been demonstrated in diverse
109 organs (Anetsberger et al., 2018; Hao et al., 2020). The intrinsic innervation of the ovary has
110 been described in several species (Gilbert, 1969; Madekurozwa, 2008). In pigs, nerve
111 structures, such as neuronal cells and nerve fibers, have been identified inside the ovary (Jana
112 et al., 2015). In humans, neuronal intraovarian cells have also been described using anti-
113 human p75-NGFR, with reports of neural cells with a prominent nucleus around the follicles,
114 CL, medulla, and ovarian cortex (Anesetti et al., 2001), but without penetrating them. In
115 rodents, neurons in the ovaries of Wistar rats have been identified using morphogenic
116 markers (NeuN), as well as nerve growth factor (NGF) and tyrosine hydroxylase (TH) for
117 differentiated neurons. These neurons have a multipolar soma and are localized in the ovarian
118 medulla during neonatal and young adult stages. However, these neurons have not been found
119 in Sprague-Dawley rats (D'Albora & Barcia, 1996; D'Albora et al., 2000).

120 The aim of the present study was to locate and biochemically/morphometrically characterize
121 the intrinsic neurons in the ovaries of young adult, middle-aged, and senescent Long Evans
122 CII-ZV rats. The antibodies used in this study were chosen due to their specificity and ability

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

123 to recognize neuronal bodies in the central or peripheral nervous systems. NeuN has been
124 found in the nuclei of neurons of the central nervous system and in the cytoplasm of
125 peripheral neurons in the enteric system (Dredge & Jensen, 2011; Duan et al., 2016;
126 Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015; Kim et al., 2009; Lind et al., 2005; Mullen et al., 1992;
127 Van Nassauw et al., 2005; Weyer & Schilling, 2003). Considering that a reduction in NeuN
128 has been observed in the spinal cord of senescent rats compared to young rats (Portiansky et
129 al., 2006), we decided to use a second neuronal marker to identify intrinsic neurons in the
130 ovary, type-III β -tubulin (Almeida-Souza et al., 2011; Baas et al., 2016; Dredge & Jensen,
131 2011; Katsetos et al., 2003; Kim et al., 2009; Lind et al., 2005; Mariani et al., 2015;
132 Portiansky et al., 2006; Weyer & Schilling, 2003). The synthesis of this marker increases
133 with age; NeuN loses immunoreactivity, whereas the expression of β -tubulin increases
134 (Almeida-Souza et al., 2011; Baas et al., 2016; Jiang & Oblinger, 1992; Korzhevskii et al.,
135 2011).

136 **Materials and Methods**

137 **Animals**

138 The animals were provided by Bioterio Claude Bernard, BUAP. The protocol was approved
139 by the Committee to Use and Care for the Laboratory Animals of Benemérita Universidad
140 Autónoma de Puebla (Of. VIEP 1040/2019). All procedures described in this work were
141 carried out in accordance with the guidelines for the use and care of laboratory animals by
142 the Mexican Committee for Animal Care (NOM-062-ZO-1999). Every effort was made to
143 minimize the number of animals in each experimental group and to ensure minimal
144 discomfort and pain. Twelve adult female CII-ZV rats were used. They were kept in
145 controlled conditions (14 h light/10 h dark, lights on from 05:00 to 19:00 h) with free access
146 to water and food.

147 **Experimental design**

148 The females were assigned to the following groups: young adult rats aged 3-5 months (3M,
149 n=4), middle-aged rats aged 12 months (12M, n=4), and senescent rats aged 15 months (15M,
150 n=4). Both ovaries from each animal were analyzed (i.e., eight ovaries per group). In the 3M
151 group, only those in estrous were used (rats with three consecutive 4-day estrous cycles, daily
152 vaginal smears were taken between 09:00 and 10:00 h). In the 12M group, rats were used
153 only if vaginal cytology showed continuous estrous (regular estrus cycle and ovulation

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

154 ceased, vaginal cytology indicated desquamation cells in vagina). In the 15M group, rats
155 were used only if vaginal smears indicated continuous anestrus (persistent leukocytes).

156 **Ovary dissection**

157 Animals from each group were deeply anesthetized with pentobarbital between 09:00 and
158 11:00 h (80 mg/kg weight, i.p.). The animals were then perfused with 200 mL of Hartmann
159 solution and the ovaries dissected during the necropsy. The ovaries were placed in fixative
160 (Carnoy) for 24 h, rinsed with Hartmann solution, and kept in solution with 30% sucrose until
161 immunofluorescence processing.

162 **Immunofluorescence**

163 The preserved ovaries were cut into 10- μ m sections using a cryostat (THERMO Shandon
164 cryotome E) at -25°C. The sections were defrosted at room temperature and treated for 90
165 minutes in 6% fetal bovine serum (FBS; Cat. 26140079, Gibco Thermo Scientific) and 0.1%
166 Tween 20 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA). Next, they were incubated with the
167 primary antibody for 72 h at 4°C. Polyclonal antibody anti-rabbit β -tubulin (1:500, Cat. 2128
168 Cell Signaling) or anti-rabbit tyrosine hydroxylase (1:500, Cat. AB 152 Merck Millipore)
169 and anti-mouse NeuN (1:500, Cat. MAB 377 Merck Millipore) antibodies were used. After
170 incubation with the primary antibody, the tissues were washed with 0.5 M Tris-EDTA buffer
171 (BTE) for 1 min. They were incubated with the secondary antibodies, anti-rabbit coupled
172 with rhodamine (1:500, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) and anti-mouse
173 coupled with fluorescein (1:500, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.), for 24 h. At
174 the end of this incubation, the tissues were washed with BTE for 1 min. DAPI-Vecta-Shield
175 was added to the tissues (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for observation under
176 the microscope.

177 For negative controls, the primary antibody was substituted with 6% FBS and BTE.
178 Observations and analyses of the immunoreactivity of the antibodies in the ovarian follicles
179 were performed using a fluorescence microscope (Olympus BX41) equipped with an
180 Evolution VF Digital Camera (Media Cybernetics, Inc., USA).

181 **Statistical analysis**

182 Immunoreactive neurons to primary antibodies were counted and the area of the soma
183 determined using Image Pro-premier 9.2 software (Media Cybernetics, Inc., Rockville,
184 USA). To obtain the soma area of the intrinsic neurons, the immunoreactive cells, including

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

185 well-defined nuclei, were selected and delineated manually in microphotographs and the area
186 of the intrinsic neurons measured by the software. To define the number of neurons around
187 each follicle or cyst, the Block method for estimation of cell populations (Block, 1951, 1952)
188 was used as a correction factor. From the total number of slides, 1 in 5 was recovered and
189 selected for the following groups: NeuN/ β -tubulin; NeuN/TH; negative control for NeuN/ β -
190 tubulin; negative control for NeuN/TH; and H&E. Significant differences among
191 experimental groups were determined by ANOVA followed by a Tukey test for
192 nonparametric data (Graphpad Prism 8.1).

193 **Results**

194 Intrinsic neurons were observed in the ovaries of all rats (Figures 1-3). These neurons showed
195 different morphological characteristics from other ovarian cells, particularly a prominent,
196 well-defined nucleus (average nucleus diameter of all ages 10.37 μ m; Fig. 1), twice the size
197 of other ovarian cells.

198 In the 3M group, the neurons were localized around the follicles of different development
199 stages, the CL, cysts, and the OS. All neurons were observed to be in a cluster-like shape
200 (Fig. 1) similar to small nerve ganglia. Fig. 2a-d shows two contiguous follicles with parallel
201 theca, the latter containing neurons. The ovaries from the 12M group had atretic follicles and
202 CL in regression, as well as ovarian cysts. The neurons in this stage were localized around
203 the follicular cyst (Fig. 2), with a tendency to concentrate in the middle region of the ovary.
204 Follicles in different developmental stages and CL occupy the ovarian cortex area in young
205 animals, with intrinsic neurons around them (Fig. 3a-d). In the ovaries of the 15M group, the
206 neurons were observed in the OS and surrounding cystic structures (Fig. 3i-l).

207 In the 3M group, the immunoreactive neurons to NeuN/TH localized around the follicles, as
208 described for NeuN/ β -tubulin positive neurons (Fig. 4a-d). TH immunoreactivity around the
209 cyst was more abundant in the 12M group (Fig. 4e-h, arrowhead) than in senescent animals
210 (Fig. 4i-l, arrowhead). In the senescent rats, the TH-positive neurons (arrow) around the
211 ovarian cysts were lower in contrast to the neurons in the OS (arrows).

212 The total number of intrinsic neurons localized in the ovaries, around the follicles and cysts,
213 varied throughout the life of the animals (Fig. 5a). In the senescent group, there were no more
214 follicles or CL; however, there were neurons around the cysts. Regarding the number of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

215 neurons around the CL, there was no significant difference between the 3M and 12M groups
216 (10.7 ± 1.6 vs. 6.6 ± 0.06 , respectively).

217 In the OS, there were diverse and abundant intrinsic neurons, with no differences between
218 age groups. However, comparing the number of neurons around follicles (3M or 12M) or
219 cysts (15M) between the groups showed that senescent rats had fewer neurons than middle-
220 aged rats (Fig. 5a). Nevertheless, the area of the neurons was larger in the senescent rats than
221 in the other groups (Fig. 5c, $p < 0.05$). The number of NE-neurons was different in the groups,
222 with a peak in the middle-aged rats (Fig. 5b). The area of the NE-neurons surrounding the
223 follicles and ovarian cysts was also different between the groups, as it increased
224 proportionally with age. An age-dependent increase in the noradrenergic neuron area was
225 also found in the ovarian stroma (Fig. 5d).

226 **Discussion**

227 In this study using Long Evans CII-ZV rats, ovarian intrinsic innervation was associated with
228 all functional structures of the ovary, suggesting active participation of these neurons in
229 processes, such as development and loss of function. The neural influence on ovarian
230 functions and dysfunction has been poorly studied. The extrinsic innervation of the ovaries
231 regulates follicular development, steroidogenesis, and ovulation (Doganay et al., 2010), and
232 the nerve fibers reach the theca cells without crossing the basal membrane of the follicles,
233 CL, or cysts (Anesetti et al., 2001; D'Albora et al., 2002; D'Albora et al., 2000). However,
234 little is known about the intrinsic innervation of the mammalian ovary, especially in
235 senescent animals.

236 Previous studies (Anesetti et al., 2001; D'Albora et al., 2002; D'Albora & Barcia, 1996;
237 D'Albora et al., 2000; McKey et al., 2019) have shown intrinsic neurons in the mammalian
238 ovary, including the human ovary. In Wistar rats, neuronal somas have been identified,
239 mainly in the ovarian medulla and some isolated neurons around the ovarian follicles. Long
240 Evans CII-ZV rats are a good model for reproductive studies because the 4-day estrous cycle
241 is very regular and senescent process well described. Our results confirm the first
242 assumptions and showed that the neurons are associated with the inner theca cells and basal
243 lamina. The present study contributes that, in both young adult and senescent ovaries, most
244 neurons are associated in clusters in all structures of the ovarian cortex (OS and around
245 follicles, CL, and cysts).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

246 The abundant innervation that each follicle has from early development until cell death
247 suggests involvement in the regulation of the development of follicles and ovulation
248 (Madekurozwa, 2008). Significant levels of NE have been observed inside the ovaries of
249 senescent rats, but the concentration of NE in the extrinsic innervation (such as the celiac
250 ganglion) decreases with age (Chavez-Genaro et al., 2007; Cruz et al., 2017). This
251 neurotransmitter could be synthesized by other sources, such as the intrinsic innervation. We
252 demonstrated subpopulations of TH-positive neurons (limiting enzyme to synthesize NE)
253 that co-express NeuN and found an increased neuron size related to increasing age, but this
254 was associated with high production of NE in the senescent ovary.

255 The increased size of the somas of intrinsic neurons (NeuN-positive and TH-positive) related
256 to ovarian cysts and OS in senescent animals, coupled with a significant decrease in the
257 number of these neurons, allows us to propose an exacerbated cell machine in the
258 maintenance of ovarian cysts and high concentration of NE related to reproductive
259 senescence and various pathologies (Chavez-Genaro et al., 2007; Cruz et al., 2017).

260 Studies of extrinsic innervation in the ovary have shown that they release neurotransmitters
261 into the ovary; NE, VIP, and Ach, among others, may be responsible for some metabolic
262 activity of the functional structures of the ovary (Dissen et al., 2002; Hsueh et al., 1984;
263 Mayerhofer et al., 1997). For example, follicles growing in highly innervated ovarian regions
264 may have a selective advantage over others that are not exposed to neurotransmitter signals
265 (Mayerhofer et al., 1997). In addition, Ach (Lakomy et al., 1982; Mayerhofer et al., 1997),
266 NE (Masuda et al., 2001), and VIP (Bruno et al., 2011) regulate ovarian steroidogenesis
267 depending on the stage of the estrous cycle.

268 In the rat, the relationship between intrinsic neurons in the ovary and age, especially during
269 the loss of reproductive function, allows us to suggest that 12 months of age is key to the
270 start of decaying ovarian function in rats. At this point, there is an increase in NE inside the
271 ovary (Acuna et al., 2009; Chavez-Genaro et al., 2007; Cruz et al., 2017), which may be
272 produced by large intrinsic neurons. Several authors have proposed that sympathetic
273 hyperactivity may contribute to the development and progression of polycystic ovarian
274 syndrome (PCOS) (Morales-Ledesma et al., 2010). In young adult animals with PCOS
275 induced by neonatal estradiol valerate administration, there is a high concentration of NE in
276 the ovary, whereas the estradiol level is low. This causes a reduction in follicular growth,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

277 which in turn causes ovarian failure, loss of cyclicity, and reduced fertility (Lara et al., 2000;
278 Lara, McDonald, Ahmed, et al., 1990; Lara, McDonald, & Ojeda, 1990). The senescent rats
279 have several characteristics similar to PCOS in young adult rats, including follicular cysts
280 occupying the major ovarian cortex area, anovulation, high production of androgen, low
281 estradiol levels, and persistent vaginal cornification (Linares et al., 2019). These effects are
282 also similar to those observed in women with PCOS.

283 NGF and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which promote neurogenesis and
284 neuronal plasticity in the peripheral nervous system of both developing and adult animals,
285 also function as regulators of follicular development, ovulation, and steroidogenesis (Russo
286 et al., 2012). In animals with PCOS, both factors are increased (Chang et al., 2019; Streiter
287 et al., 2016). However, in postmenopausal women or those with a lower follicular reserve,
288 the levels of NGF and BDNF are decreased (Begliuomini et al., 2007; Pluchino, Cubeddu,
289 Begliuomini, et al., 2009; Pluchino, Cubeddu, Giannini, et al., 2009). This could be related
290 to a decreased number of neurons in the gonads of senescent animals, as BDNF significantly
291 decreases after the animal stops cycling (approximately 12 months).

292 Estrogen receptors are present in the sympathetic, parasympathetic, and sensorial neurons
293 that innervate the ovaries of adult animals. Long-term treatment with 17 β -estradiol reduces
294 the populations of these neurons (Jana et al., 2012; Jana et al., 2013; Koszykowska et al.,
295 2011). It is possible that, in rats, the intrinsic innervation activity in early and adult stages
296 may be regulated by ovarian steroids in addition to the extrinsic innervation (Acuna et al.,
297 2009).

298 **Conclusions**

299 In the ovaries of CII-ZV rats, the intrinsic neurons are in the follicular theca, around the CL,
300 in the OS, and around cysts. These results suggest active participation of these neurons in
301 processes of development and remodeling of ovarian structures. As the morphology and
302 number of these neurons vary with age, especially in senescent rats, we suggest that the
303 intrinsic neurons are a part of the age-related loss of ovarian functions.

304 **References**

305 Acuna, E., Fornes, R., Fernandois, D., Garrido, M. P., Greiner, M., Lara, H. E., & Paredes,
306 A. H. (2009). Increases in norepinephrine release and ovarian cyst formation during ageing
307 in the rat. *Reprod Biol Endocrinol*, 7, 64. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-64>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

308 Aguado, L. I. (2002). Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian
309 function. *Microsc Res Tech*, 59(6), 462-473. <https://doi.org/10.1002/jemt.10232>

310 Almeida-Souza, L., Timmerman, V., & Janssens, S. (2011). Microtubule dynamics in the
311 peripheral nervous system: A matter of balance. *Bioarchitecture*, 1(6), 267-270.
312 <https://doi.org/10.4161/bioa.1.6.19198>

313 Anesetti, G., Lombide, P., D'Albora, H., & Ojeda, S. R. (2001). Intrinsic neurons in the
314 human ovary. *Cell Tissue Res*, 306(2), 231-237. <https://doi.org/10.1007/s004410100451>

315 Anetsberger, D., Kurten, S., Jabari, S., & Brehmer, A. (2018). Morphological and
316 Immunohistochemical Characterization of Human Intrinsic Gastric Neurons. *Cells Tissues*
317 *Organs*, 206(4-5), 183-195. <https://doi.org/10.1159/000500566>

318 Baas, P. W., Rao, A. N., Matamoros, A. J., & Leo, L. (2016). Stability properties of neuronal
319 microtubules. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 73(9), 442-460. <https://doi.org/10.1002/cm.21286>

320 Baljet, B., & Drukker, J. (1979). The extrinsic innervation of the abdominal organs in the
321 female rat. *Acta Anat (Basel)*, 104(3), 243-267. <https://doi.org/10.1159/000145073>

322 Banerjee, S., Banerjee, S., Saraswat, G., Bandyopadhyay, S. A., & Kabir, S. N. (2014).
323 Female reproductive aging is master-planned at the level of ovary. *PLoS One*, 9(5), e96210.
324 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096210>

325 Begliuomini, S., Casarosa, E., Pluchino, N., Lenzi, E., Centofanti, M., Freschi, L., . . .
326 Genazzani, A. R. (2007). Influence of endogenous and exogenous sex hormones on plasma
327 brain-derived neurotrophic factor. *Hum Reprod*, 22(4), 995-1002.
328 <https://doi.org/10.1093/humrep/del479>

329 Block, E. (1951). Quantitative morphological investigations of the follicular system in
330 women; methods of quantitative determinations. *Acta Anat (Basel)*, 12(3), 267-285.
331 <https://doi.org/10.1159/000140549>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

332 Block, E. (1952). Quantitative morphological investigations of the follicular system in
333 women; variations at different ages. *Acta Anat (Basel)*, 14(1-2), 108-123.
334 <https://doi.org/10.1159/000140595>

335 Bruno, J. B., Matos, M. H. T., Chaves, R. N., & Figueiredo, J. R. d. (2011). Involvement of
336 vasoactive intestinal peptide (VIP) on ovarian physiology.

337 Chang, H. M., Wu, H. C., Sun, Z. G., Lian, F., & Leung, P. C. K. (2019). Neurotrophins and
338 glial cell line-derived neurotrophic factor in the ovary: physiological and pathophysiological
339 implications. *Hum Reprod Update*, 25(2), 224-242. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy047>

340 Chavez-Genaro, R., Lombide, P., Dominguez, R., Rosas, P., & Vazquez-Cuevas, F. (2007).
341 Sympathetic pharmacological denervation in ageing rats: effects on ovulatory response and
342 follicular population. *Reprod Fertil Dev*, 19(8), 954-960. <https://doi.org/10.1071/rd07075>

343 Cruz, G., Fernandois, D., & Paredes, A. H. (2017). Ovarian function and reproductive
344 senescence in the rat: role of ovarian sympathetic innervation. *Reproduction*, 153(2), R59-
345 R68. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0117>

346 D'Albora, H., Anesetti, G., Lombide, P., Dees, W. L., & Ojeda, S. R. (2002). Intrinsic neurons
347 in the mammalian ovary. *Microsc Res Tech*, 59(6), 484-489.
348 <https://doi.org/10.1002/jemt.10231>

349 D'Albora, H., & Barcia, J. J. (1996). Intrinsic neuronal cell bodies in the rat ovary. *Neurosci*
350 *Lett*, 205(1), 65-67. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12361-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12361-2)

351 D'Albora, H., Lombide, P., & Ojeda, S. R. (2000). Intrinsic neurons in the rat ovary: an
352 immunohistochemical study. *Cell Tissue Res*, 300(1), 47-56.
353 <https://doi.org/10.1007/s004419900130>

354 Dissen, G. A., Romero, C., Paredes, A., & Ojeda, S. R. (2002). Neurotrophic control of
355 ovarian development. *Microsc Res Tech*, 59(6), 509-515. <https://doi.org/10.1002/jemt.10227>

356 Doganay, M., Simsek, A., Tapisiz, O. L., Mulazimoglu, B. S., Yumusak, N., & Gungor, T.
357 (2010). Superior ovarian nerve (SON) transection leads to stunted follicular maturation: a

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

358 histomorphologic and morphometric analysis in the rat model. *Fertil Steril*, 93(5), 1711-
359 1714. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.09.026>

360 Dredge, B. K., & Jensen, K. B. (2011). NeuN/Rbfox3 nuclear and cytoplasmic isoforms
361 differentially regulate alternative splicing and nonsense-mediated decay of Rbfox2. *PLoS*
362 *One*, 6(6), e21585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021585>

363 Duan, W., Zhang, Y. P., Hou, Z., Huang, C., Zhu, H., Zhang, C. Q., & Yin, Q. (2016). Novel
364 Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator. *Mol Neurobiol*, 53(3),
365 1637-1647. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9122-5>

366 Dumesic, D. A., & Richards, J. S. (2013). Ontogeny of the ovary in polycystic ovary
367 syndrome. *Fertil Steril*, 100(1), 23-38. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.02.011>

368 Gilbert, A. B. (1969). Innervation of the ovary of the domestic hen. *Q J Exp Physiol Cogn*
369 *Med Sci*, 54(4), 404-411. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1969.sp002039>

370 Gusel'nikova, V. V., & Korzhevskiy, D. E. (2015). NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen
371 and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*, 7(2), 42-47.
372 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26085943>

373 Hao, M. M., Fung, C., Boesmans, W., Lowette, K., Tack, J., & Vanden Berghe, P. (2020).
374 Development of the intrinsic innervation of the small bowel mucosa and villi. *Am J Physiol*
375 *Gastrointest Liver Physiol*, 318(1), G53-G65. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00264.2019>

376 Hsueh, A. J., Adashi, E. Y., Jones, P. B., & Welsh, T. H., Jr. (1984). Hormonal regulation of
377 the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev*, 5(1), 76-127.
378 <https://doi.org/10.1210/edrv-5-1-76>

379 Jana, B., Calka, J., Rytel, L., & Czarzasta, J. (2015). Morphological and neurochemical
380 characterization of the ovarian sympathetic chain ganglia perikarya in testosterone-treated
381 sexually matured pigs. *Ann Anat*, 202, 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2015.07.003>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

382 Jana, B., Lata, M., Bulc, M., & Calka, J. (2012). Long term estradiol-17beta administration
383 changes population of the dorsal root ganglia neurons innervating the ovary in the sexually
384 mature gilts. *Neuropeptides*, 46(4), 157-165. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2012.05.001>

385 Jana, B., Meller, K. A., Czajkowska, M., & Calka, J. (2018). Long-term estradiol-17beta
386 exposure decreases the cholinergic innervation pattern of the pig ovary. *Ann Anat*, 216, 135-
387 141. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2017.11.010>

388 Jana, B., Rytel, L., Czarzasta, J., & Calka, J. (2013). Reduction of the number of neurones in
389 the caudal mesenteric ganglion innervating the ovary in sexually mature gilts following
390 testosterone administration. *J Neuroendocrinol*, 25(9), 826-838.
391 <https://doi.org/10.1111/jne.12057>

392 Jiang, Y. Q., & Oblinger, M. M. (1992). Differential regulation of beta III and other tubulin
393 genes during peripheral and central neuron development. *J Cell Sci*, 103 (Pt 3), 643-651.
394 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1478962>

395 Katsetos, C. D., Legido, A., Perentes, E., & Mork, S. J. (2003). Class III beta-tubulin isotype:
396 a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor
397 neuropathology. *J Child Neurol*, 18(12), 851-866; discussion 867.
398 <https://doi.org/10.1177/088307380301801205>

399 Kim, K. K., Adelstein, R. S., & Kawamoto, S. (2009). Identification of neuronal nuclei
400 (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J Biol Chem*,
401 284(45), 31052-31061. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052969>

402 Korzhevskii, D. E., Karpenko, M. N., & Kirik, O. V. (2011). [Microtubule-associated
403 proteins as markers of nerve cell differentiation and functional status]. *Morfologiya*, 139(1),
404 13-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21539080>

405 Koszykowska, M., Calka, J., Szwajca, P., & Jana, B. (2011). Long-term estradiol-17beta
406 administration decreases the number of neurons in the caudal mesenteric ganglion
407 innervating the ovary in sexually mature gilts. *J Reprod Dev*, 57(1), 62-71.
408 <https://doi.org/10.1262/jrd.10-061s>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

409 Lakomy, M., Doboszynska, T., & Szteyn, S. (1982). Cholinergic nerves in the ovary, the
410 uterine tube and the uterus in pig. *Folia Morphol (Warsz)*, *41*(2), 191-200.
411 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6985134>

412 Lara, H. E., Dissen, G. A., Leyton, V., Paredes, A., Fuenzalida, H., Fiedler, J. L., & Ojeda,
413 S. R. (2000). An Increased Intraovarian Synthesis of Nerve Growth Factor and Its Low
414 Affinity Receptor Is a Principal Component of Steroid-Induced Polycystic Ovary in the Rat*.
415 *Endocrinology*, *141*(3), 1059-1072. <https://doi.org/10.1210/endo.141.3.7395>

416 Lara, H. E., McDonald, J. K., Ahmed, C. E., & Ojeda, S. R. (1990). Guanethidine-mediated
417 destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats.
418 *Endocrinology*, *127*(5), 2199-2209. <https://doi.org/10.1210/endo-127-5-2199>

419 Lara, H. E., McDonald, J. K., & Ojeda, S. R. (1990). Involvement of nerve growth factor in
420 female sexual development. *Endocrinology*, *126*(1), 364-375. [https://doi.org/10.1210/endo-](https://doi.org/10.1210/endo-126-1-364)
421 [126-1-364](https://doi.org/10.1210/endo-126-1-364)

422 Linares, R., Rosas, G., Vieyra, E., Ramirez, D. A., Velazquez, D. R., Espinoza, J. A., . . .
423 Morales-Ledesma, L. (2019). In Adult Rats With Polycystic Ovarian Syndrome, Unilateral
424 or Bilateral Vagotomy Modifies the Noradrenergic Concentration in the Ovaries and the
425 Celiac Superior Mesenteric Ganglia in Different Ways. *Front Physiol*, *10*, 1309.
426 <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01309>

427 Lind, D., Franken, S., Kappler, J., Jankowski, J., & Schilling, K. (2005). Characterization of
428 the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular
429 localization. *J Neurosci Res*, *79*(3), 295-302. <https://doi.org/10.1002/jnr.20354>

430 Madekurozwa, M. C. (2008). An immunohistochemical study of ovarian innervation in the
431 emu (*Dromaius novaehollandiae*). *Onderstepoort J Vet Res*, *75*(1), 59-65.
432 <https://doi.org/10.4102/ojvr.v75i1.89>

433 Mariani, M., Karki, R., Spennato, M., Pandya, D., He, S., Andreoli, M., . . . Ferlini, C. (2015).
434 Class III beta-tubulin in normal and cancer tissues. *Gene*, *563*(2), 109-114.
435 <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.03.061>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

436 Masuda, M., Kubota, T., & Aso, T. (2001). Effects of nitric oxide on steroidogenesis in
437 porcine granulosa cells during different stages of follicular development. *Eur J Endocrinol*,
438 *144*(3), 303-308. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1440303>

439 Mayerhofer, A., Dissen, G. A., Costa, M. E., & Ojeda, S. R. (1997). A role for
440 neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating
441 hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*, *138*(8), 3320-
442 3329. <https://doi.org/10.1210/endo.138.8.5335>

443 Mayerhofer, A., Smith, G. D., Danilchik, M., Levine, J. E., Wolf, D. P., Dissen, G. A., &
444 Ojeda, S. R. (1998). Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary: evidence
445 for a cell-cell regulatory loop. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(18), 10990-10995.
446 <https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10990>

447 McKey, J., Bunce, C., Batchvarov, I. S., Ornitz, D. M., & Capel, B. (2019). Neural crest-
448 derived neurons invade the ovary but not the testis during mouse gonad development. *Proc*
449 *Natl Acad Sci U S A*, *116*(12), 5570-5575. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814930116>

450 Morales-Ledesma, L., Linares, R., Rosas, G., Moran, C., Chavira, R., Cardenas, M., &
451 Dominguez, R. (2010). Unilateral sectioning of the superior ovarian nerve of rats with
452 polycystic ovarian syndrome restores ovulation in the innervated ovary. *Reprod Biol*
453 *Endocrinol*, *8*, 99. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-99>

454 Mullen, R. J., Buck, C. R., & Smith, A. M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein
455 in vertebrates. *Development*, *116*(1), 201-211.
456 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1483388>
457 <http://dev.biologists.org/content/116/1/201.abstract>

458 Pastelin, C. F., Rosas, N. H., Morales-Ledesma, L., Linares, R., Dominguez, R., & Moran,
459 C. (2017). Anatomical organization and neural pathways of the ovarian plexus nerve in rats.
460 *J Ovarian Res*, *10*(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s13048-017-0311-x>

461 Peng, M. T., & Huang, H. H. (1972). Aging of hypothalamic-pituitary-ovarian function in
462 the rat. *Fertil Steril*, *23*(8), 535-542. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)39131-2](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)39131-2)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

463 Pluchino, N., Cubeddu, A., Begliuomini, S., Merlini, S., Giannini, A., Bucci, F., . . .
464 Genazzani, A. R. (2009). Daily variation of brain-derived neurotrophic factor and cortisol in
465 women with normal menstrual cycles, undergoing oral contraception and in postmenopause.
466 *Hum Reprod*, 24(9), 2303-2309. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep119>

467 Pluchino, N., Cubeddu, A., Giannini, A., Merlini, S., Cela, V., Angioni, S., & Genazzani, A.
468 R. (2009). Progestogens and brain: an update. *Maturitas*, 62(4), 349-355.
469 <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2008.11.023>

470 Portiansky, E. L., Barbeito, C. G., Gimeno, E. J., Zuccolilli, G. O., & Goya, R. G. (2006).
471 Loss of NeuN immunoreactivity in rat spinal cord neurons during aging. *Exp Neurol*, 202(2),
472 519-521. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.07.014>

473 Russo, N., Russo, M., Daino, D., Bucci, F., Pluchino, N., Casarosa, E., . . . Genazzani, A. R.
474 (2012). Polycystic ovary syndrome: brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plasma and
475 follicular fluid levels. *Gynecol Endocrinol*, 28(4), 241-244.
476 <https://doi.org/10.3109/09513590.2011.613969>

477 Streiter, S., Fisch, B., Sabbah, B., Ao, A., & Abir, R. (2016). The importance of neuronal
478 growth factors in the ovary. *Mol Hum Reprod*, 22(1), 3-17.
479 <https://doi.org/10.1093/molehr/gav057>

480 te Velde, E. R., Dorland, M., & Broekmans, F. J. (1998). Age at menopause as a marker of
481 reproductive ageing. *Maturitas*, 30(2), 119-125.
482 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9871906>

483 Van Nassauw, L., Wu, M., De Jonge, F., Adriaensen, D., & Timmermans, J. P. (2005).
484 Cytoplasmic, but not nuclear, expression of the neuronal nuclei (NeuN) antibody is an
485 exclusive feature of Dogiel type II neurons in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Histochem*
486 *Cell Biol*, 124(5), 369-377. <https://doi.org/10.1007/s00418-005-0019-7>

487 Venegas-Meneses, B., Padilla, J. F., Juarez, C. E., Moran, J. L., Moran, C., Rosas-Murrieta,
488 N. H., . . . Dominguez, R. (2015). Effects of ovarian dopaminergic receptors on ovulation.
489 *Endocrine*, 50(3), 783-796. <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0636-4>

1
2
3
4 490 Weyer, A., & Schilling, K. (2003). Developmental and cell type-specific expression of the
5
6 491 neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J Neurosci Res*, 73(3), 400-409.
7
8 492 <https://doi.org/10.1002/jnr.10655>
9

10 493 **Figure Legends**

11 494 **Fig. 1** Microphotographs show a cluster of neurons in the ovarian stroma (OS) and follicles
12 495 (F) of young adult (3M) female rats. a,e: The nuclei are labeled with DAPI. b,f: NeuN. c,g:
13 496 β -Tubulin. d,h: Co-localization of NeuN and β -tubulin. The yellow head arrows show
14 497 intrinsic neurons of the ovaries, in the theca layer of the follicle. i,j,l: Negative control

15 498 **Fig. 2** Immunofluorescent staining was used to localize intrinsic neurons in the ovary using
16 499 NeuN (green) and β -tubulin (red). a,e,i: Nuclei were labeled with DAPI. b,c: Distribution of
17 500 the intrinsic neurons around the follicles (F) of the ovaries in a young adult rat (3M). f,g:
18 501 Around a cyst (C) of the middle-aged rat (12M) (60x). j,k: Around a cyst in a senescent rat
19 502 (15M). d,h,l: Co-localization of NeuN and β -tubulin. The yellow head arrows show intrinsic
20 503 neurons of the ovaries

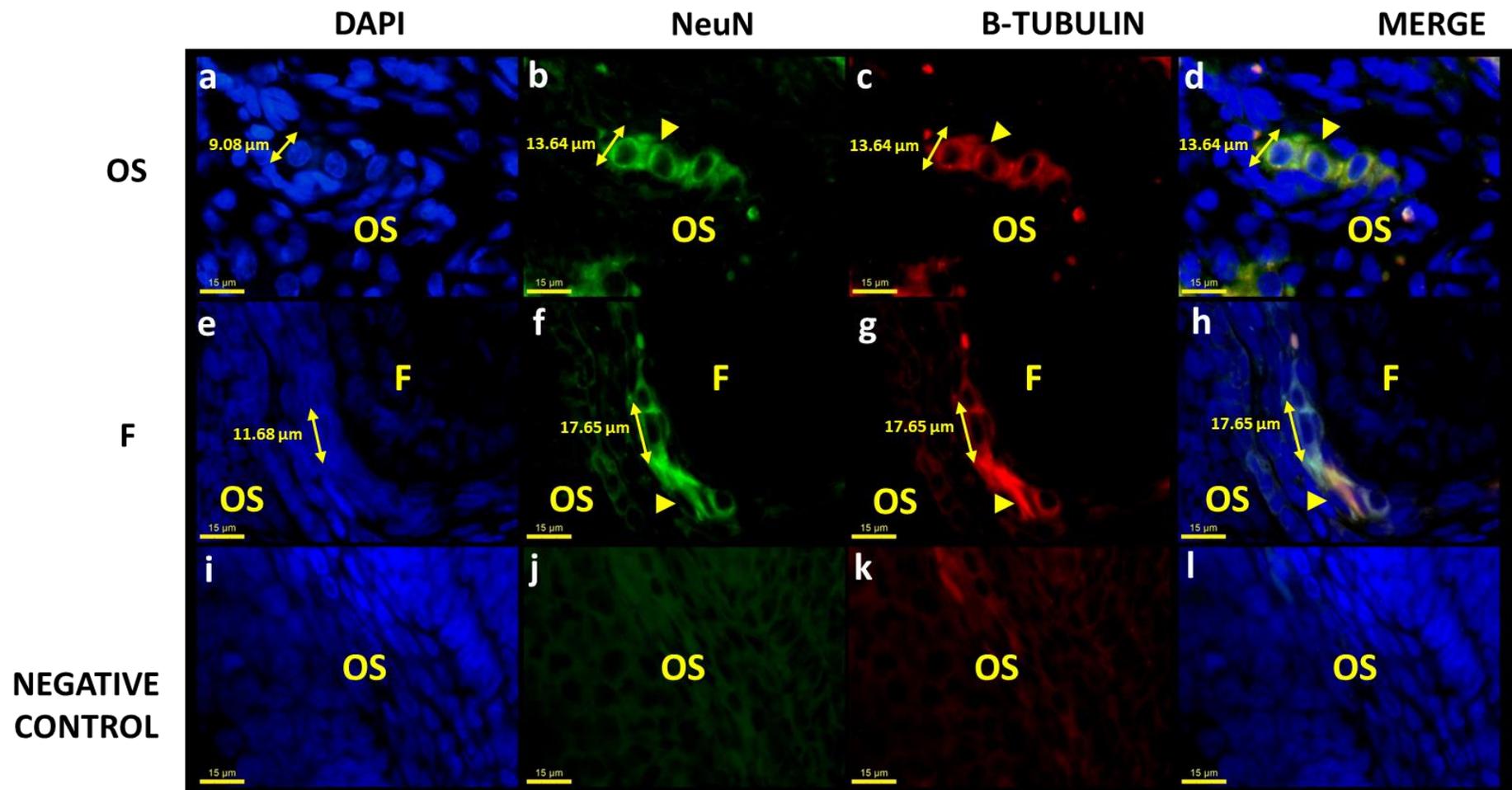
21 504 **Fig. 3** The top microphotographs are of ovaries from young adult rat (3M), middle-aged rat
22 505 (12M), and senescent rat (15M). Immunofluorescent staining was performed with mouse
23 506 anti-NeuN (green) and rabbit anti- β -tubulin (red) antibodies, showing intrinsic neurons in the
24 507 ovarian stroma (OS), corpus luteum (CL), and follicles (F). a,e,i: Nuclei were labeled with
25 508 DAPI. b,f,j: Neu-N. c,g,k: β -Tubulin. d,h,l: Co-localization of NeuN and β -tubulin. The
26 509 yellow arrows show intrinsic neurons of the ovaries

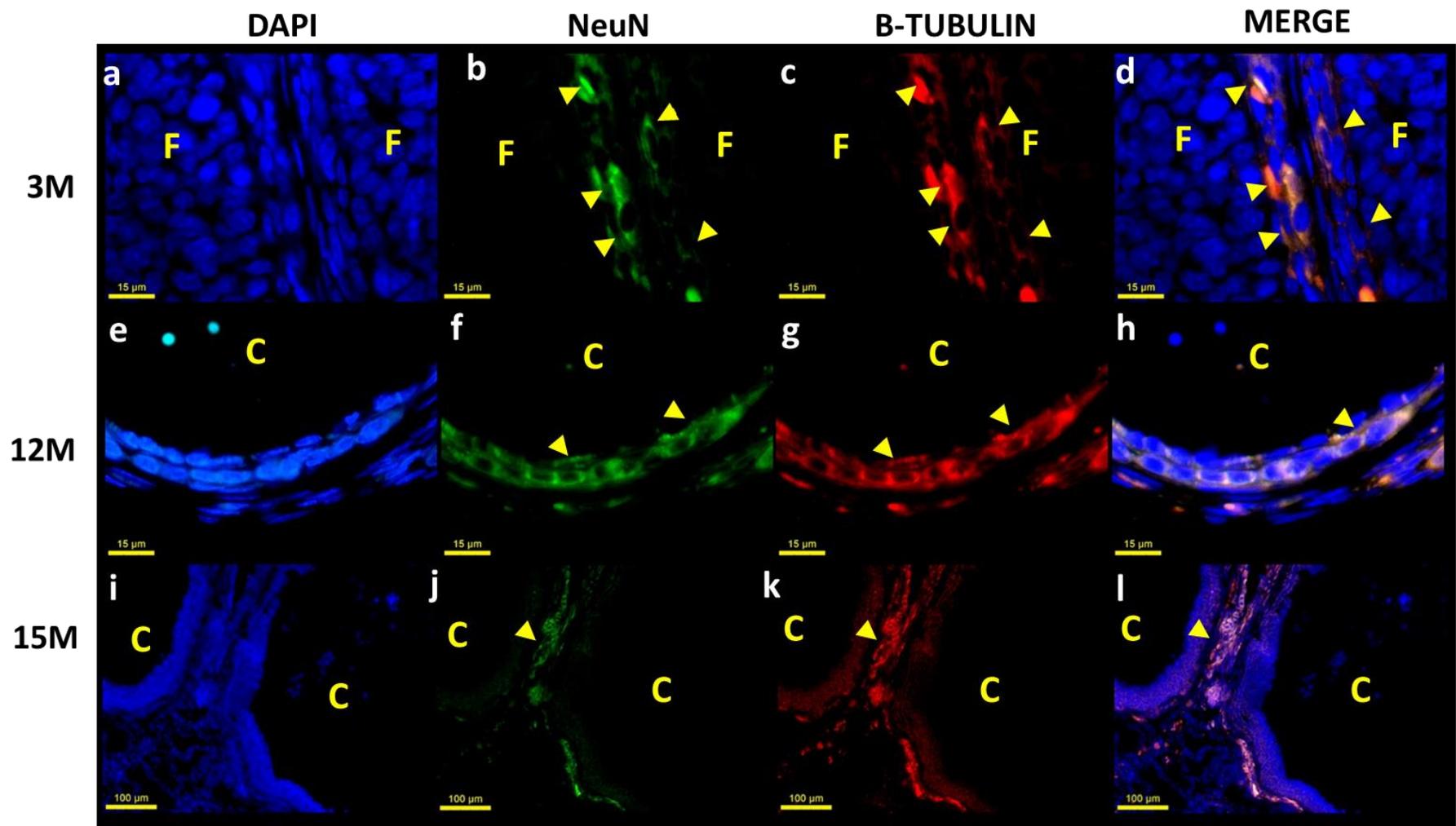
27 510 **Fig. 4** The top microphotographs are of ovaries from young adult rat (3M), middle-aged rat
28 511 (12M), senescent rat (15M). Immunofluorescent staining was performed with mouse anti-
29 512 NeuN (green) and rabbit anti-TH (red) antibodies. b,c,d: show noradrenergic neurons in the
30 513 theca layer of follicle. f,g,h: show noradrenergic neurons around the cyst (C). j,k,l: show
31 514 noradrenergic neurons in ovarian stroma (OS) and around the cyst. The yellow head arrows
32 515 show noradrenergic neurons around the follicle or cyst, and the yellow arrows show
33 516 noradrenergic neurons on the ovarian stroma in the Senescent rat.

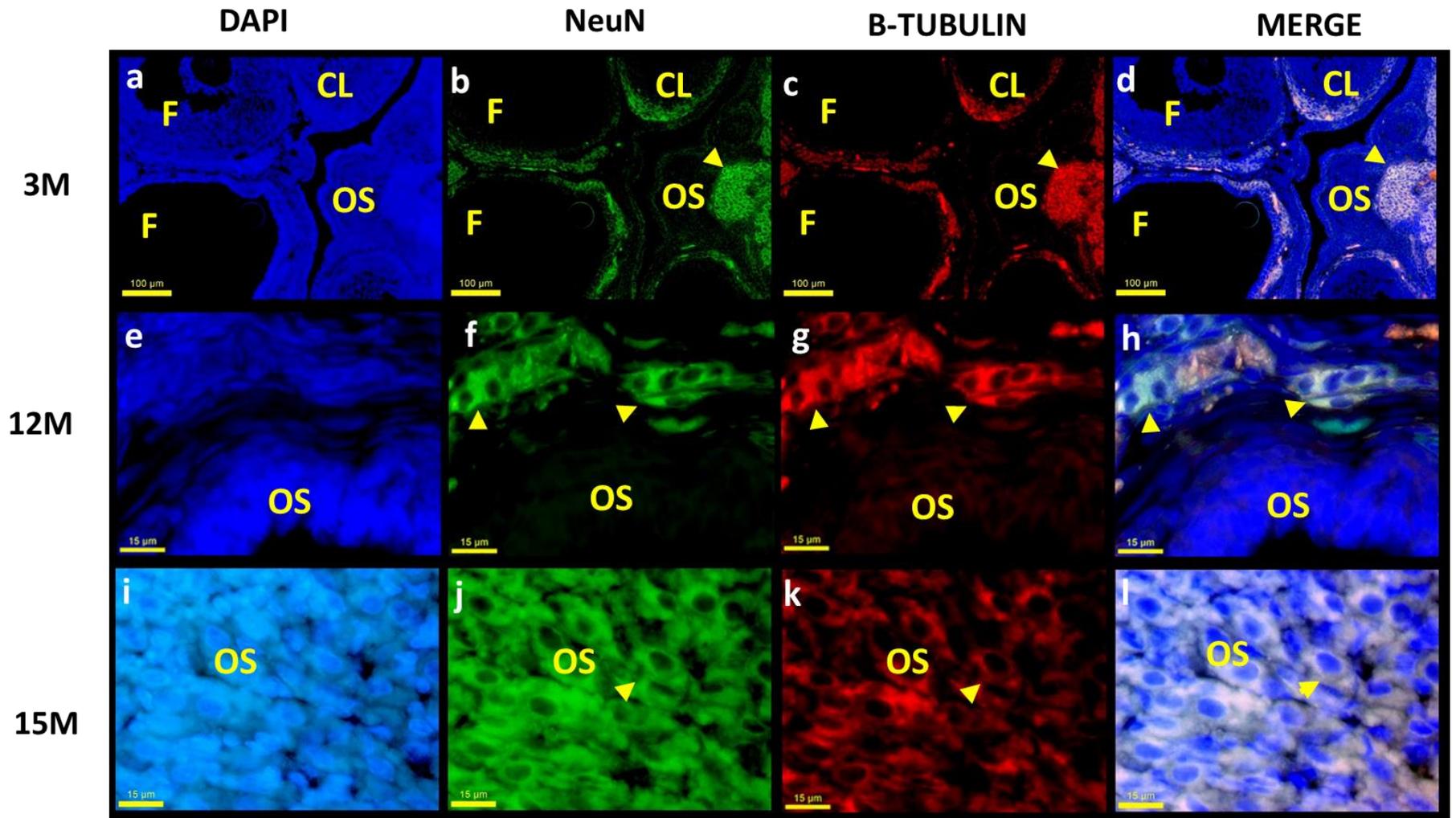
34 517 **Fig. 5** a: Median number of intrinsic neurons (NeuN/ β -tubulin) in ovaries from young adult
35 518 rat (3M), middle-aged rat (12M), and senescent (15M) CII-ZV rats. b: Median number of
36 519 intrinsic neurons (NeuN/TH) in ovaries c: Median area of the intrinsic neurons (NeuN/ β -
37 520 tubulin) from ovarian follicles and cysts. d: Median area of the intrinsic neurons (NeuN/ β -
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

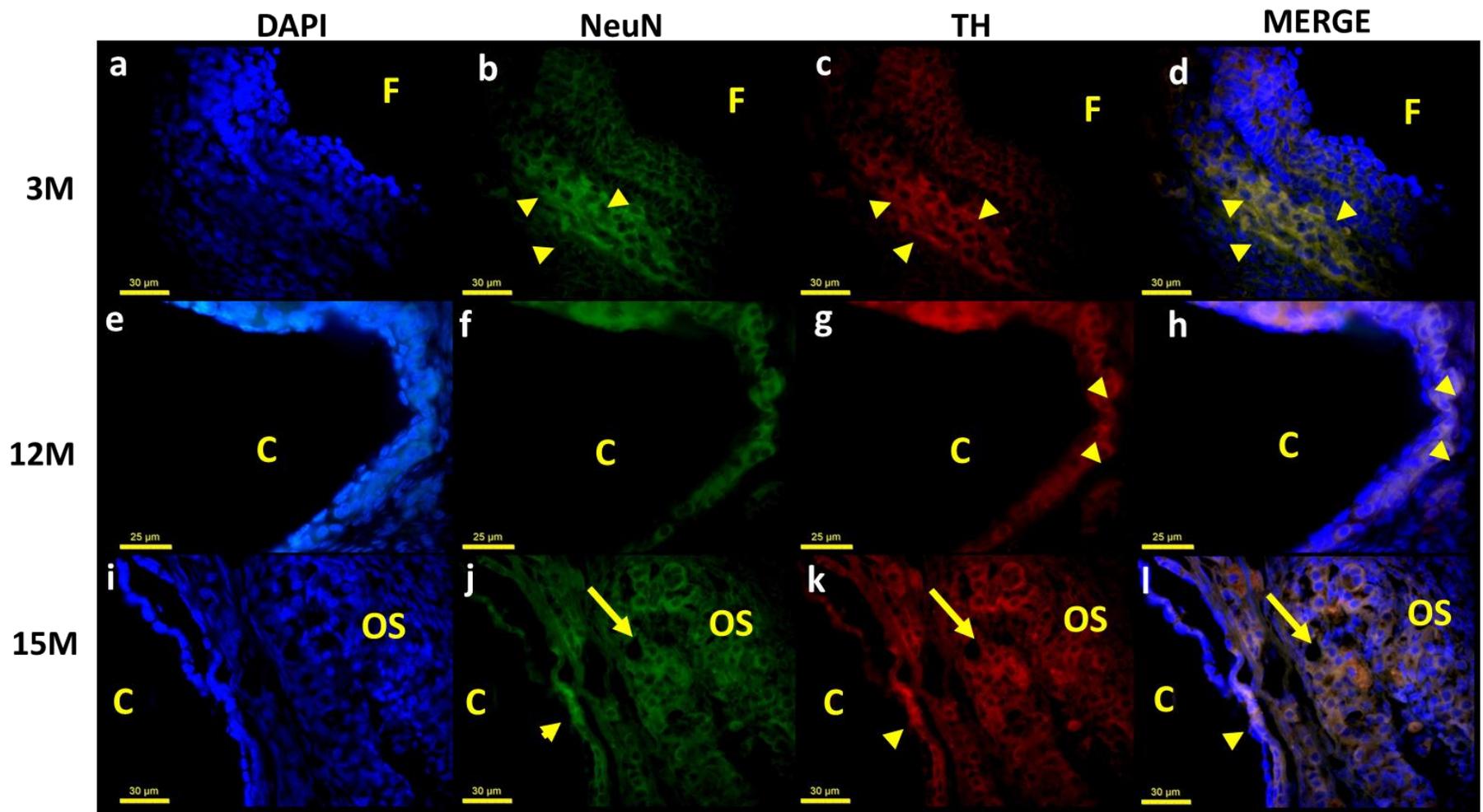
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

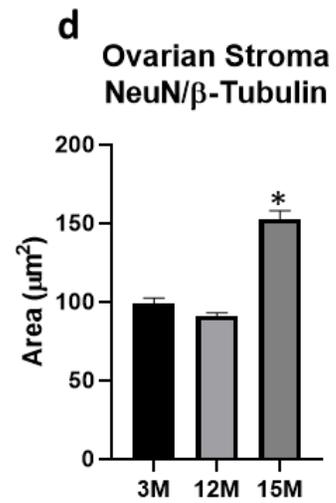
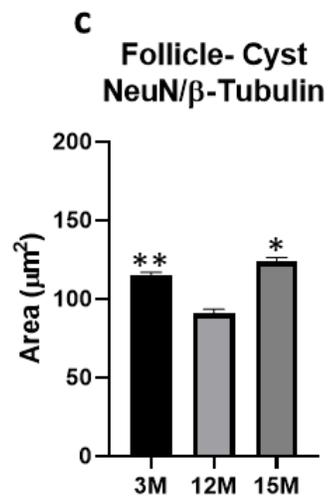
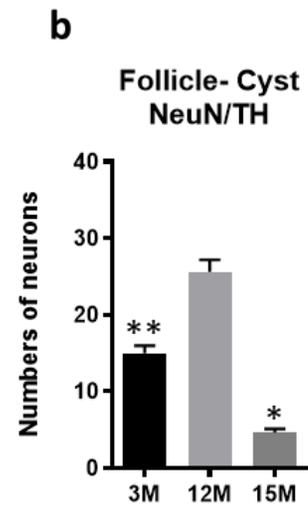
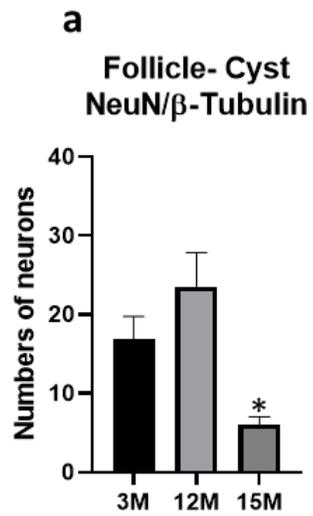
521 tubulin) from ovaries in the ovarian stroma. *P<0.05 vs. 3M and 12M, **P<0.05 vs 12M and
522 15M; ANOVA followed by Tukey. Error bars indicate SEM.











Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

Solicitud de Patente de Invención o de Registro de Modelo de Utilidad
o de Registro de Diseño Industrial

Homoclave del formato:	
IMPI-00-009	
Fecha de publicación del formato en el DOF:	
24	/ 05 / 2018

Folio y Fecha de Recepción	
INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL Dirección Divisinal de Patentes OFICINA REGIONAL CENTRO	
Solicitud Expediente:	MX/a/2019/005431
Fecha:	9/MAY/2019 Hora: 09:10:34
Folio:	MX/E/2019/029412 812641
 <small>MX/E/2019/029412</small>	

Datos generales de la solicitud	
Marcar con una X sólo una opción:	
<input checked="" type="radio"/>	Solicitud de Patente de Invención
<input type="radio"/>	Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad
<input type="radio"/>	Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique:
<input type="radio"/>	Modelo Industrial
<input type="radio"/>	Dibujo Industrial

Datos generales del o de los solicitante(s)

Personas físicas	
CURP (opcional):	
Nombre(s):	
Primer apellido:	
Segundo apellido:	
Nacionalidad:	
Teléfono (lada, número, extensión):	
Correo electrónico (opcional):	
<input type="radio"/> Continúa en anexo.	

Personas morales	
RFC (opcional): UAP370423PPP3	
Denominación o razón social:	
BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA	
Nacionalidad: MEXICANA	
Teléfono (lada, número, extensión):	
01 222 2295500 EXT. 3058	
Correo electrónico (opcional):	
<input type="radio"/> Continúa en anexo.	

Domicilio del o de los solicitante(s)	
Código postal: 72000	
Calle: 4 SUR	
<small>(Ejemplo: Avenida Insurgentes Sur, Boulevard Avila Camacho, Colón, Correo, etc.)</small>	
Número exterior: 104	Número interior:
Colonia: CENTRO	
<small>(Ejemplo: Anillo del Ajusco, Barrio de San Mateo, Fraccionamiento, Sector, etc.)</small>	
Municipio o demarcación territorial: PUEBLA	Localidad: PUEBLA
Entidad Federativa: PUEBLA	Entre calles (opcional):
País: MÉXICO	Calle posterior (opcional):

Datos generales del o de los inventor(es) o diseñador(es)	
CURP (opcional):	
Nombre(s): Alfonso	
Primer apellido: Medel	
Segundo apellido: Rojas	
Nacionalidad: Mexicana	
Teléfono (lada, número, extensión):	
01 222 2295500	
Correo electrónico (opcional): alfonso.medel@gmail.com	
<input checked="" type="radio"/> Continúa en anexo	

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

Domicilio del o de los inventor(es) o diseñador(es)

Código postal: 72570	
Calle: Instituto de Ciencias, Ciudad universitaria <small>(Por ejemplo: Avenida Insurgentes Sur, Boulevard Ávila Camacho, Calzada, Corredor, etc.)</small>	
Número exterior: s/n	Número interior:
Colonia: San Manuel <small>(Por ejemplo: Ampliación Juárez, Residencial Hidalgo, Fraccionamiento, Sección, etc.)</small>	
Municipio o demarcación territorial: Puebla	Localidad: Puebla
Entidad Federativa: Puebla	Entre calles (opcional):
País: México	Calle posterior (opcional):

Datos generales del o de los apoderado(s)

CURP (opcional):	Registro General de Poderes (opcional): DDAJ-26065
Nombre(s): Rosa Isela	RFC (opcional):
Primer apellido: Ávalos	Teléfono (lada, número, extensión): 012222295500 ext.3058
Segundo apellido: Méndez	Correo electrónico (opcional): juridicobuap@hotmail.com

Continúa en anexo

Domicilio para oír y recibir notificaciones

Código postal: 72000	
Calle: 4 sur <small>(Por ejemplo: Avenida Insurgentes Sur, Boulevard Ávila Camacho, Calzada, Corredor, etc.)</small>	
Número exterior: 104	Número interior:
Colonia: Centro <small>(Por ejemplo: Ampliación Juárez, Residencial Hidalgo, Fraccionamiento, Sección, etc.)</small>	
Municipio o demarcación territorial: Puebla	Localidad: Puebla
Entidad Federativa: Puebla	Entre calles (opcional):
País: México	Calle posterior (opcional):

Datos generales de los autorizados para oír y recibir notificaciones

Nombre(s): Jair Eric	Primer apellido: Vázquez	Segundo apellido: Torres	CURP (opcional):
-----------------------------	---------------------------------	---------------------------------	------------------

Continúa en anexo

Datos de la solicitud

Denominación o título de la invención, modelo de utilidad o diseño industrial: CAMA QUIRÚRGICA CON REGULACIÓN TERMICA PARA ANIMALES DE LABORATORIO
Fecha de divulgación previa (DD / MM / AAAA): / /

Divisional de la solicitud

No. Expediente en trámite:	Figura jurídica:
Fecha de presentación (DD / MM / AAAA): / /	

PCT

No. de solicitud internacional:
Fecha de presentación internacional (DD / MM / AAAA): / /

Prioridad o prioridades reclamada(s)

País (oficina) de origen:	Fecha de presentación (DD/MM/AAA): / /	Número de serie:
---------------------------	--	------------------

Continúa en anexo

Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.

Mtra. Rosa Isela Ayálos Méndez

Nombre y firma del solicitante o su apoderado.

Documentos anexos (uso interno)

- Comprobante de pago. Original.
- Documento que acredita la personalidad del mandatario, en su caso. Original o copia certificada.
- Constancia de inscripción en el Registro General de Poderes del IMPI, en su caso. Copia.
- Documento donde se acredita el carácter del causahabiente o de cesión de derechos. Original o copia certificada.
- Documentito (s) comprobatorio (s) de divulgación previa, en su caso. Original o copia certificada.
- Documento (s) de prioridad (es), en su caso. Copia certificada.
- Escrito solicitando el descuento del 50%, cuando corresponda. Original.
- Traducción de los documentos presentados en idioma distinto al español, en su caso. Original.
- Legalización o apostilla de los documentos anexos provenientes del extranjero, en su caso. Original.
- Descripción y reivindicación (es). Dos ejemplares.
- Resumen de la descripción de la invención. Dos ejemplares.
- Dibujo (s), en su caso. Dos ejemplares.
- Constancia de depósito de material biológico. Original o copia certificada.
- Hoja adicional complementaria "Datos generales del o de los solicitantes" / "Datos generales del o de los inventores o diseñadores", en su caso.
- Hoja adicional complementaria "Datos generales del o de los apoderados" / "Autorizados para oír y recibir notificaciones", en su caso. Original.
- Hoja adicional complementaria al punto "Divisional de la solicitud", en su caso. Original.
- Hoja adicional complementaria al punto "Prioridad o prioridades reclamadas", en su caso. Original.

Número total de hojas recibidas _____

Términos y condiciones

Información sobre el tratamiento de datos personales.

Los datos personales que proporcione al presentar la solicitud y con motivo del trámite de la misma, son recabados por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) a través de la Dirección Divisiva de Patentes (DDP) con la finalidad de dar trámite a la solicitud; determinar el cumplimiento de los requisitos exigidos por la normatividad nacional e internacional aplicable; contactar al solicitante, su representante y autorizados en relación al trámite; notificar actos y resoluciones que así lo requieran, y en su caso, publicar la solicitud y el Título respectivo, en términos de la Ley de la Propiedad Industrial (LPI) y demás disposiciones aplicables, para facilitar información al público y el ejercicio de derechos. La DDP no realiza tratamiento de datos que requieran la autorización expresa, de tener lugar el mismo, se recabará consentimiento expreso, que podrá ser revocado mediante solicitud ante la Unidad de Transparencia. El aviso de privacidad integral puede ser consultado en <http://www.gob.mx/impi> o en las Instalaciones del IMPI. (Fecha de actualización: 10/05/2018).

Los interesados podrán ejercer sus derechos de acceso y corrección ante la Dirección Divisiva de Patentes, con domicilio en Arenal #550, Pueblo Santa María Tepepan, Xochimilco, C.P. 16020, Ciudad de México; Teléfono: (01) (55) 53-34-07-00 en la Ciudad de México y Área Metropolitana, del interior de la República sin costo para el usuario 01-800-570-59-90, extensiones 10098, 10030 y 10026. Correo electrónico: dp@impi.gob.mx

Presentación y notificaciones.

El horario para la recepción de documentos, atención al público y consulta de expedientes en las distintas oficinas del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, durante los días que éste considere como hábiles, será de las 8-45 a las 16:00 horas.

La solicitud y sus anexos deben presentarse en la Coordinación Departamental de Recepción y Control de Documentos de la Dirección Divisiva de Patentes de este Instituto, con domicilio en Arenal #550, Planta Baja, Pueblo Santa María Tepepan, Xochimilco, C.P. 16020, Ciudad de México. También puede ser presentada en la ventanilla de sus Oficinas Regionales, así como en las Delegaciones y/o Representaciones Comerciales de la Secretaría de Economía.

También podrá remitir la solicitud mediante correo certificado con acuse de recibo; servicios de mensajería, paquetería u otros equivalentes o bien, a través del Buzón en Línea, en los términos previstos en el artículo 5o. BIS del Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial y el Título Cuarto del Acuerdo que establece las reglas para la presentación de solicitudes ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

Las resoluciones, requerimientos y demás actos del Instituto se notificarán a los solicitantes por correo certificado con acuse de recibo al domicilio que hubiesen señalado al efecto.

Información del trámite.

Trámite al que corresponde la forma: Solicitud de patente nacional, Solicitud de registro de modelo de utilidad nacional y, Solicitud de registro de diseño industrial.

Número de Registro Federal de Trámites y Servicios: IMPI-03-001 (A o B), IMPI-03-002 (A o B), IMPI-03-003 (A o B).

Fecha de autorización de la forma por parte de la Dirección General Adjunta de Propiedad Industrial del IMPI: 11-V-2018.

Fecha de autorización de la forma por parte de la Comisión Federal de Mejora Regulatoria: 17-V-2018.

Fundamento jurídico-administrativo.

Ley de la Propiedad Industrial. Artículos 38-47, 50, 52, 53, 54 y 55-61.

Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial. Artículos 5-7, 16, 17, 24-39, 43, 45 y 46.

Acuerdo que establece las reglas para la presentación de solicitudes ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Artículos 3-10, 12 TER-35 y Anexo Único.

Acuerdo por el que se da a conocer la tarifa por los servicios que presta el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Artículos 1a-1c bis, 9a-9c bis, 9f-9f bis y 26.

Acuerdo por el que se da a conocer la lista de Instituciones reconocidas por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial para el depósito de material biológico.

Acuerdo por el que se establecen los plazos de respuesta a diversos trámites ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Artículos 1 y 3: 6.

Acuerdo por el que se da a conocer el horario de atención al público en el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Artículo 1.

Tiempo de respuesta.

El plazo máximo de primer respuesta es de 3 meses. No aplica la positiva ni la negativa ficta.

Quejas y denuncias.

Órgano interno de Control en el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

56-24-04-12 o 13 (Directo).

56-24-04-00 (Computador), extensiones 11231 y 11237. Correo electrónico: quejas@impi.gob.mx

Sistema de Atención Telefónica a la Ciudadanía-SACTEL. En la Ciudad de México y área metropolitana: 2000 7000.

Interior de la República lada sin costo: 01-800-FUNCIÓN (326-2466). Desde Estados Unidos y Canadá: 1-800-475-73-93.

Contacto:

Arenal # 550, Pueblo Santa María Tepepan, Xochimilco, C.P. 16020, Ciudad de México.

Teléfono: (01) (55) 53-34-07-00 en la Ciudad de México y área metropolitana, del interior de la República sin

costo para el usuario 01-800-570-59-90, extensiones 10098, 10030 y 10026.

Correo electrónico: dp@impi.gob.mx

Instrucciones de llenado

Esta forma oficial es de distribución gratuita; se autoriza su libre reproducción, siempre que se ajusten al formato oficial y a sus características de impresión.

La solicitud debe llenarse en idioma español, por cualquier medio legible, manteniendo el mismo medio de llenado de inicio a fin, sin tachaduras ni enmendaduras.

La solicitud debe ser presentada por duplicado, impresa a doble cara (anverso y reverso) en una hoja de papel blanco, tamaño oficio, conforme al número de páginas que la integran y firmada autógrafamente en ambos ejemplares.

Folio y fecha de recepción. Para uso exclusivo del IMPI.

Datos generales de la solicitud. En el formato de solicitud señale en el círculo correspondiente el tipo de solicitud que desea presentar: solicitud de Patente de Invención, de Registro de Modelo de Utilidad o de Registro de Diseño Industrial; en este último caso, además deberá señalar si se trata de un Modelo Industrial o un Dibujo Industrial.

Datos generales del o de los solicitante(s). Anote en el recuadro correspondiente los datos completos de la(s) persona(s) física(s) o moral(es) que será(n) solicitante de la Patente de Invención, Registro de Modelo de Utilidad o Registro de Diseño Industrial.

En el campo CURP (Clave Única de Registro de Población), puede requisitarla únicamente si se trata de una persona física nacional.

En caso de que los solicitantes sean 2 o más personas físicas o morales; marque el recuadro Continúa en anexo y requisiite la Hoja adicional complementaria "Datos generales del o de los solicitantes" / "Datos generales del o de los inventor(es) o diseñador(es)", tantas veces sea necesario.

En el rubro Personas morales, el RFC (Registro Federal de Contribuyentes) puede requisitarlo únicamente si se trata de una persona moral nacional.

Domicilio del solicitante. Anote en el recuadro correspondiente los datos completos del domicilio del solicitante. El campo Entre calles es opcional.

Datos generales del o de los inventor(es) o diseñador(es). Anote en el recuadro correspondiente los datos completos del o los inventor(es) o diseñador(es) (estos siempre deberán ser personas físicas).

En caso de que los inventores o diseñadores sean 2 o más personas físicas, marque el recuadro Continúa en anexo y requisiite la Hoja adicional complementaria "Datos generales del o de los solicitantes" / "Datos generales del o de los inventor(es) o diseñador(es)", tantas veces sea necesario. Tratándose de solicitudes de Registro de Diseño Industrial se deberá hacer referencia a diseñadores.

Domicilio del o de los inventor(es) o diseñador(es). Anote en el recuadro correspondiente los datos completos del domicilio del o de los inventor(es) o diseñador(es). El campo Entre calles es opcional.

Datos del o de los apoderado(s) o autorizados para oír y recibir notificaciones. Anote en el recuadro correspondiente los datos completos del o de los apoderado(s).

En caso de que los apoderados sean 2 o más personas físicas, marque el recuadro Continúa en anexo y requisiite la Hoja adicional complementaria "Datos generales del o de los apoderados" / "Autorizados para oír y recibir notificaciones", tantas veces sea necesario.

Domicilio para oír y recibir notificaciones. Recuerde que conforme al Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial, este domicilio debe ubicarse dentro del territorio nacional. Anote en el recuadro correspondiente los datos completos del domicilio para oír y recibir notificaciones, conforme a las instrucciones para el domicilio contenidas en esta forma.

Datos de la solicitud; Proporcione la información necesaria.

Denominación o título de la invención, Modelo de Utilidad o Diseño Industrial. La denominación o título debe ser connotativa de la invención o diseño.

Fecha de divulgación previa. Si la invención fue divulgada dentro de los doce meses previos a la fecha de presentación de la solicitud, indique la fecha de divulgación y anexe la información comprobatoria que marca el Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial.

Divisional de la solicitud. En una solicitud que sea divisional de una solicitud previamente presentada, deberá proporcionar el número de expediente, la figura jurídica y la fecha de presentación de dicha solicitud. En caso de que la solicitud divisional sean 2 o más deberá señalar los datos del punto "Divisional de la solicitud" en escrito libre anexo.

Prioridad reclamada. El derecho de reclamar la prioridad solo tiene lugar si la presente solicitud ha sido previamente presentada en algún país miembro del Convenio de París para la Protección de la Propiedad Industrial, en su caso, deberá proporcionar los siguientes datos:

- País donde se presentó por primera vez la solicitud, fecha y número asignado a la solicitud en dicho país. En caso de que se reclamen 2 o más prioridades, deberá señalar los datos del punto "Prioridad o Prioridades reclamada(s)" en escrito libre anexo.

Nombre y Firma del solicitante o su mandatario. Anote el nombre completo de la persona que firma la solicitud, en caso de que se trate de una persona moral, indique el nombre de la persona física que está actuando en su representación y firme la solicitud. Si el poder debe ejercerse de forma conjunta por varios mandatarios, indique los nombres de todos ellos e incluya su firma.

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

Hoja adicional complementaria "Datos generales del o de los solicitantes" /
 "Datos generales del o de los inventores o diseñadores"
 (Use esta hoja en caso de que la solicitud sea presentada por dos o más personas físicas o morales)

Datos generales del solicitante o inventor o diseñador

Datos generales del solicitante

Datos generales del inventor o diseñador

Personas físicas
CURP (opcional):
Nombre(s): Carolina
Primer apellido: Morán
Segundo apellido: Raya
Nacionalidad: mexicana
Teléfono (lada, número, extensión): 01 222 2295500
Correo electrónico (opcional): carolina.moran@correo.buap.mx

Personas morales
RFC (opcional):
Denominación o razón social:
Nacionalidad:
Teléfono (lada, número, extensión):
Correo electrónico (opcional):

Domicilio del solicitante o inventor o diseñador

Código postal: 72570	
Calle: Instituto de Ciencias, Ciudad universitaria <small>(Por ejemplo: Avenida Insurgentes Sur, Bulevar de Aduana, Calle de la Universidad, etc.)</small>	
Número exterior: s/n	Número interior:
Colonia: San Manuel <small>(Por ejemplo: Ampliación Jardines Residencial, Jardín Fraccionamiento, Sector, etc.)</small>	
Municipio o demarcación territorial: Puebla	Localidad: Puebla
Entidad Federativa: Puebla	Entre calles (opcional):
País: México	Calle posterior (opcional):

Datos generales del solicitante o inventor o diseñador

Datos generales del solicitante

Datos generales del inventor o diseñador

Personas físicas
CURP (opcional):
Nombre(s): Plácido
Primer apellido: Zaca
Segundo apellido: Morán
Nacionalidad: mexicana
Teléfono (lada, número, extensión): 01 222 2295500
Correo electrónico (opcional): placido.zaca@correo.buap.mx

Personas morales
RFC (opcional):
Denominación o razón social:
Nacionalidad:
Teléfono (lada, número, extensión):
Correo electrónico (opcional):

Domicilio del solicitante o inventor o diseñador

Código postal: 72570	
Calle: Instituto de Ciencias, Ciudad universitaria <small>(Por ejemplo: Avenida Insurgentes Sur, Bulevar de Aduana, Calle de la Universidad, etc.)</small>	
Número exterior: s/n	Número interior:
Colonia: San Manuel <small>(Por ejemplo: Ampliación Jardines Residencial, Jardín Fraccionamiento, Sector, etc.)</small>	
Municipio o demarcación territorial: Puebla	Localidad: Puebla
Entidad Federativa: Puebla	Entre calles (opcional):
País: México	Calle posterior (opcional):

Instrucciones de llenado

Esta forma oficial es de distribución gratuita, se autoriza su libre reproducción, siempre que se ajusten al formato oficial y a sus características de impresión.

La información debe llenarse en idioma español, por cualquier medio legible manteniendo el mismo medio de llenado de inicio a fin, sin tachaduras ni enmendaduras.

La hoja adicional complementaria debe ser presentada por duplicado, impresa a doble cara (anverso y reverso) en una hoja de papel blanco, tamaño oficio.

Datos generales del solicitante o inventor o diseñador: En la hoja adicional señale en el círculo correspondiente el tipo de datos generales que desea presentar: datos generales del solicitante o datos generales del inventor o diseñador.

Datos generales del solicitante. Anote en el recuadro correspondiente los datos completos de la persona física o moral que será solicitante de la Patente de invención, Registro de Modelo de Utilidad o Registro de Diseño Industrial.

En el campo CURP (Clave Única de Registro de Población), puede requisitarla únicamente si se trata de una persona física nacional.

En el rubro Persona morales, el RFC (Registro Federal de Contribuyentes) puede requisitarse únicamente si se trata de una persona moral nacional.

Domicilio del solicitante. Anote en el recuadro correspondiente los datos completos del domicilio del solicitante. El campo **Entre calles** es opcional.

Datos generales del inventor o diseñador. Anote en el recuadro correspondiente los datos completos del inventor o diseñador (este siempre deberá ser persona física).

Domicilio del inventor o diseñador. Anote en el recuadro correspondiente los datos completos del domicilio del inventor o diseñador. El campo **Entre calles** es opcional.

Podrá requisitar la hoja adicional complementaria tantas veces sea necesaria.

Hoja adicional complementaria "Datos generales del o de los solicitantes" /
 "Datos generales del o de los inventores o diseñadores"
 (Use esta hoja en caso de que la solicitud sea presentada por dos o más personas físicas o morales)

Datos generales del solicitante o inventor o diseñador

Datos generales del solicitante

Datos generales del inventor o diseñador

Personas físicas
CURP (opcional):
Nombre(s): Juan Manuel
Primer apellido: Bravo
Segundo apellido: Benítez
Nacionalidad: Mexicana
Teléfono (lada, número, extensión): 01 222 2295500
Correo electrónico (opcional): jmbb1985@gmail.com

Personas morales
RFC (opcional):
Denominación o razón social:
Nacionalidad:
Teléfono (lada, número, extensión):
Correo electrónico (opcional):

Domicilio del solicitante o inventor o diseñador

Código postal: 72570	
Calle: Instituto de Ciencias, Ciudad Universitaria <small>(Por ejemplo: Avenida Insurgentes Sur, Boulevard Avila Camacho, Calzada Correo, etc.)</small>	
Número exterior: s/n	Número interior:
Colonia: San Manuel <small>(Por ejemplo: Arboledas Juárez, Residencial Hidalgo, Tránsito y Avenida, etc.)</small>	
Municipio o demarcación territorial: Puebla	Localidad: Puebla
Entidad Federativa: Puebla	Entre calles (opcional):
País: México	Calle posterior (opcional):

Datos generales del solicitante o inventor o diseñador

Datos generales del solicitante

Datos generales del inventor o diseñador

Personas físicas
CURP (opcional):
Nombre(s):
Primer apellido:
Segundo apellido:
Nacionalidad:
Teléfono (lada, número, extensión):
Correo electrónico (opcional):

Personas morales
RFC (opcional):
Denominación o razón social:
Nacionalidad:
Teléfono (lada, número, extensión):
Correo electrónico (opcional):

Domicilio del solicitante o inventor o diseñador

Código postal:	
Calle:	
<small>(Por ejemplo: Avenida Insurgentes Sur, Boulevard Avila Camacho, Calzada Correo, etc.)</small>	
Número exterior:	Número interior:
Colonia:	
<small>(Por ejemplo: Arboledas Juárez, Residencial Hidalgo, Tránsito y Avenida, etc.)</small>	
Municipio o demarcación territorial:	Localidad:
Entidad Federativa:	Entre calles (opcional):
País:	Calle posterior (opcional):

Instrucciones de llenado

Esta forma oficial es de distribución gratuita, se autoriza su libre reproducción, siempre que se ajusten al formato oficial y a sus características de impresión.

La información debe llenarse en idioma español, por cualquier medio legible manteniendo el mismo medio de llenado de inicio a fin, sin tachaduras ni enmendaduras.

La hoja adicional complementaria debe ser presentada por duplicado, impresa a doble cara (anverso y reverso) en una hoja de papel blanco, tamaño oficio.

Datos generales del solicitante o inventor o diseñador: En la hoja adicional señale en el círculo correspondiente el tipo de datos generales que desea presentar: datos generales del solicitante o datos generales del inventor o diseñador.

Datos generales del solicitante. Anote en el recuadro correspondiente los datos completos de la persona física o moral que será solicitante de la Patente de invención, Registro de Modelo de Utilidad o Registro de Diseño Industrial.

En el campo **CURP** (Clave Única de Registro de Población), puede requisitarlo únicamente si se trata de una persona física nacional.

En el rubro **Persona morales**, el **RFC** (Registro Federal de Contribuyentes) puede requisitarlo únicamente si se trata de una persona moral nacional.

Domicilio del solicitante. Anote en el recuadro correspondiente los datos completos del domicilio del solicitante. El campo **Entre calles** es opcional.

Datos generales del inventor o diseñador. Anote en el recuadro correspondiente los datos completos del inventor o diseñador (este siempre deberá ser persona física).

Domicilio del inventor o diseñador. Anote en el recuadro correspondiente los datos completos del domicilio del inventor o diseñador. El campo **Entre calles** es opcional.

Podrá requisitar la hoja adicional complementaria tantas veces sea necesaria.

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

**Hoja adicional complementaria "Datos generales del o de los apoderados" /
"Autorizados para oír y recibir notificaciones"
Únicamente para trámites ante la Dirección Divisonal de Patentes
(Use esta hoja para adicionar apoderados y / o autorizados para oír y recibir notificaciones)**

Datos generales del apoderado o autorizado para oír y recibir notificaciones	
Marcar con una X sólo una opción Datos generales del apoderado <input type="checkbox"/> Datos generales del autorizado para oír y recibir notificaciones <input checked="" type="checkbox"/>	
CURP (opcional):	Registro General de Poderes (opcional):
Nombre(s): Gabriela	RFC (opcional):
Primer apellido: Sánchez	Teléfono (lada, número, extensión): 01 222 2295500 Ext. 2237
Segundo apellido: Esgua	Correo electrónico (opcional):

Datos generales del apoderado o autorizado para oír y recibir notificaciones	
Marcar con una X sólo una opción Datos generales del apoderado <input type="checkbox"/> Datos generales del autorizado para oír y recibir notificaciones <input type="checkbox"/>	
CURP (opcional):	Registro General de Poderes (opcional):
Nombre(s):	RFC (opcional):
Primer apellido:	Teléfono (lada, número, extensión):
Segundo apellido:	Correo electrónico (opcional):

Datos generales del apoderado o autorizado para oír y recibir notificaciones	
Marcar con una X sólo una opción Datos generales del apoderado <input type="checkbox"/> Datos generales del autorizado para oír y recibir notificaciones <input type="checkbox"/>	
CURP (opcional):	Registro General de Poderes (opcional):
Nombre(s):	RFC (opcional):
Primer apellido:	Teléfono (lada, número, extensión):
Segundo apellido:	Correo electrónico (opcional):

Datos generales del apoderado o autorizado para oír y recibir notificaciones	
Marcar con una X sólo una opción Datos generales del apoderado <input type="checkbox"/> Datos generales del autorizado para oír y recibir notificaciones <input type="checkbox"/>	
CURP (opcional):	Registro General de Poderes (opcional):
Nombre(s):	RFC (opcional):
Primer apellido:	Teléfono (lada, número, extensión):
Segundo apellido:	Correo electrónico (opcional):

Datos generales del apoderado o autorizado para oír y recibir notificaciones	
Marcar con una X sólo una opción Datos generales del apoderado <input type="checkbox"/> Datos generales del autorizado para oír y recibir notificaciones <input type="checkbox"/>	
CURP (opcional):	Registro General de Poderes (opcional):
Nombre(s):	RFC (opcional):
Primer apellido:	Teléfono (lada, número, extensión):
Segundo apellido:	Correo electrónico (opcional):

Datos generales del apoderado o autorizado para oír y recibir notificaciones	
Marcar con una X sólo una opción Datos generales del apoderado <input type="checkbox"/> Datos generales del autorizado para oír y recibir notificaciones <input type="checkbox"/>	
CURP (opcional):	Registro General de Poderes (opcional):
Nombre(s):	RFC (opcional):
Primer apellido:	Teléfono (lada, número, extensión):
Segundo apellido:	Correo electrónico (opcional):

Instrucciones de llenado

Esta forma oficial es de distribución gratuita; se autoriza su libre reproducción, siempre que se ajusten al formato oficial y a sus características de impresión.

La información debe llenarse en idioma español, por cualquier medio legible manteniendo el mismo medio de llenado de inicio a fin, sin tachaduras ni enmendaduras.

La hoja adicional complementaria debe ser presentada por duplicado, impresa a doble cara (anverso y reverso) en una hoja de papel blanco, tamaño oficio.

Datos generales del apoderado o autorizado para oír notificaciones. En la hoja adicional señale en el círculo correspondiente el tipo de datos generales que desea presentar: datos generales del apoderado o autorizado para oír notificaciones.

Datos generales del apoderado. Si anotó en el círculo correspondiente "Datos generales del apoderado", deberá requisitar todos los datos generales de dicha persona a excepción de lo opcionales.

Datos generales del autorizado para oír notificaciones. Si anotó en el círculo correspondiente "Datos generales del autorizado para oír notificaciones", deberá requisitar los datos de Nombre(s), Primer apellido, Segundo apellido y CURP (opcional).

En el campo CURP (Clave Única de Registro de Población), puede requisitarla únicamente si se trata de una persona física nacional.

En el rubro **RFC** (Registro Federal de Contribuyentes) puede requisitarlo únicamente si se trata de una persona física nacional. Este campo es opcional.

Podrá requisitar la hoja adicional complementaria tantas veces sea necesaria.