



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA



Facultad de Ciencias Químicas  
Departamento de Farmacia

## Tesis profesional

Efecto de la (26*R*)-26-hidroxi-diosgenina sobre el desarrollo folicular, la ovulación, desarrollo del útero y la expresión del VEGF en las ratas Wistar

Que para obtener el título de

**Licenciado en Químico Farmacobiólogo**

Presenta

**Alejandro Campos Sandoval**

Directores

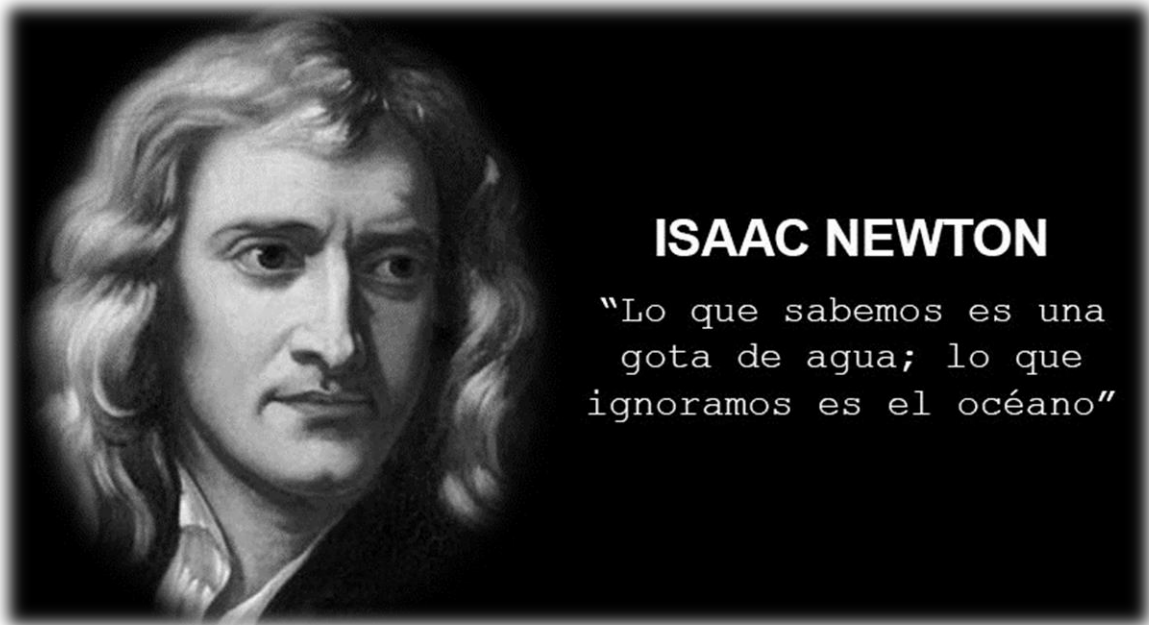
MC. Félix Luna Morales

Laboratorio de Neuroendocrinología FCQ-BUAP

Dra. María Isabel Martínez García

Laboratorio de Neuroquímica FCQ-BUAP

Puebla, Pue., 15 de febrero de 2018



## **ISAAC NEWTON**

"Lo que sabemos es una  
gota de agua; lo que  
ignoramos es el océano"

## AGRADECIMIENTOS



Esta tesis se realizó en el laboratorio de Neuroendocrinología de la FCQ-BUAP y fue apoyada por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado a través de los fondos del proyecto VIEP LUMF-NAT17-I.

Las fotografías del presente trabajo fueron capturadas en el laboratorio de Neurofarmacología FCQ-BUAP bajo la dirección del Dr. I. Daniel Limón Pérez de León y los animales de experimentación utilizados fueron facilitados por el Bioterio “Claude Bernard” de la BUAP, bajo la dirección del Dr. Carlos Escamilla Weinmann.

## ÍNDICE

	Pág.
<b>Introducción</b>	1
La DG inhibe la proliferación de las células tumorales de mamífero	2
La DG incrementa la proliferación de las células sanas de mamífero	8
Vías de señalización mediadas por los receptores a estrógeno	10
Participación del factor de crecimiento vascular endotelial en la angiogénesis	12
Una sapogenina esteroidal, la (26 <i>R</i> )-26-hidroxi Diosgenina	13
El ciclo estral de las ratas Wistar	14
<b>Justificación</b>	16
<b>Hipótesis</b>	17
<b>Objetivos</b>	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
<b>Materiales y métodos</b>	18
Diagrama de trabajo	18
Modelo biológico	18
Seguimiento del ciclo estral por citología vaginal	19
Administración de la (26 <i>R</i> )-26-hidroxi Diosgenina	19
Obtención de los úteros y ovarios	20
Inclusión en parafina de las muestras y cortes histológicos	20
Captura de imágenes, conteo de los folículos ováricos y medición del espesor de las capas de células del útero	20
Identificación de células VEGF-positivas por inmunohistoquímica	22
Análisis estadístico	22
<b>Resultados</b>	24
La 26OH-DG no modifica la duración del ciclo estral de las ratas	24
La 26OH-DG aumenta el desarrollo de los folículos ováricos	24
La 26OH-DG incrementa el número de cuerpos lúteos	26

La 26OH-DG disminuye el desarrollo del útero	27
La 26OH-DG disminuye el número de glándulas del endometrio	30
La 26OH-DG aumenta las células VEGF-positivas en el ovario	31
<b>Discusión</b>	32
<b>Conclusión</b>	34
<b>Referencias</b>	35
<b>Anexos</b>	40

## Abreviaturas

- 25D<sub>3</sub>-MARRS:** receptor MARRS
- 26OH-DG:** (26R)-26-hidroxidiosgenina
- ACC:** acetyl-CoA carboxilasa
- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- Akt:** (PKB) proteína quinasa B
- AP-1:** proteína activadora 1
- BAD:** proteína promotora de muerte asociada a Bcl-2
- Bax:** (Bcl-2) proteína pro-apoptótica
- Bcl-2:** proteína 2 anti-apoptótica de linfoma de células B
- CAT:** catalasa
- CL:** cuerpo lúteo
- COX-2:** ciclooxigenasa 2
- D:** Diestro
- DG:** diosgenina
- E:** estro
- E2:** 17 $\beta$ -estradiol
- ERE:** elementos de respuesta a estrógenos
- ERK:** (MAPK) proteína quinasa activada por mitógenos.
- FAS:** ácido graso sintasa
- FGF2:** factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2
- FITC:** Isotiocianato de fluoresceína
- FLIP:** proteína inhibidora de FLICE
- FSH:** hormona estimulante de los folículos
- GnRH:** hormona liberadora de las gonadotropinas
- GPx:** enzima glutatión peroxidasa
- GSH:** glutatión
- HE:** hematoxilina-Eosina
- HCT116:** Línea celular humana de carcinoma de colon
- HEL:** línea celular humana de eritroleucemia

**HepG2:** línea celular humana de carcinoma hepático

**HER2:** (neu) receptor para el factor de crecimiento epidérmico humano.

**HSP:** proteína de choque térmico

**IGF-1:** factor de crecimiento similar a la insulina

**IgG:** inmunoglobulina G

**IHC:** inmunohistoquímica

**ip:** intraperitoneal

**JNK:** quinasas c-Jun N-terminal

**LH:** hormona luteinizante

**M:** metaestro

**MEC:** matriz extracelular

**MEK:** proteína quinasa activada por mitógeno

**mTOR:** proteína diana de rapamicina en células de mamífero

**NFκB:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**P:** proestro

**p21 ras:** proteína de 21,000 dalton con afinidad a nucleótidos de guanina.

**p53:** proteína supresora de tumores

**PARP:** polimerasa poli ADP-ribosa

**PBS:** buffer de fosfatos salino

**PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PGE2:** prostaglandina E2

**PI3K:** fosfatidilinositol-3-quinasa

**PKA:** proteína quinasa A

**PKC:** proteína quinasa C

**PLA<sub>2</sub>:** fosfolipasa A<sub>2</sub>

**PMA:** forbol-12-miristato-13-acetato

**PPARc:** receptor gamma activador de peroxisomas

**Raf:** proteína serina-treonina quinasa

**RE:** receptor a estrógenos

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**SCD-1:** estearoil-CoA desaturasa 1

**SOD:** superóxido dismutasa

**SP-1:** proteína de especificidad 1

**SREBP1c:** proteína de unión a elementos reguladores de esteroles

**SSI:** solución salina isotónica

**STAT5A:** transductor de señales y activador transcripcional 5A

**TM4:** células de Sertoli de testículo de ratón BALB/c

**VEGF:** factor de crecimiento endotelial vascular

## Introducción

La planta *Dioscorea mexicana*, localmente conocida como *cabeza de negro*, ha sido fuente natural de la diosgenina (DG). En los últimos 80 años se ha demostrado que esta sapogenina esterooidal tiene actividad biológica en diversos tejidos (Figura 1 y 2). En la industria farmacéutica de diversos países del mundo, la DG se ha utilizado como precursora de progesterona, estradiol y cortisona, entre otros fármacos (Norton, 1998). Varios estudios han mostrado que la DG tiene efecto anticancerígeno dado que inhibe el crecimiento de las células e induce apoptosis en varias líneas celulares tumorales como HER2, HCT116, HEL y PC-3, entre otras (Chen et al., 2011; Chen et al., 2015). También se ha probado que tiene propiedades antioxidantes, en el hígado de las ratas con falla renal crónica, la DG reguló los niveles de lipoperoxidación causados por el radical hidroxilo y restauró la actividad de las enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) (Manivannan et al., 2013). Además, en modelos animales, la DG disminuyó la obesidad y contrarrestó el síndrome metabólico y la diabetes inducida experimentalmente (Roghani-Dehkordi et al., 2015).

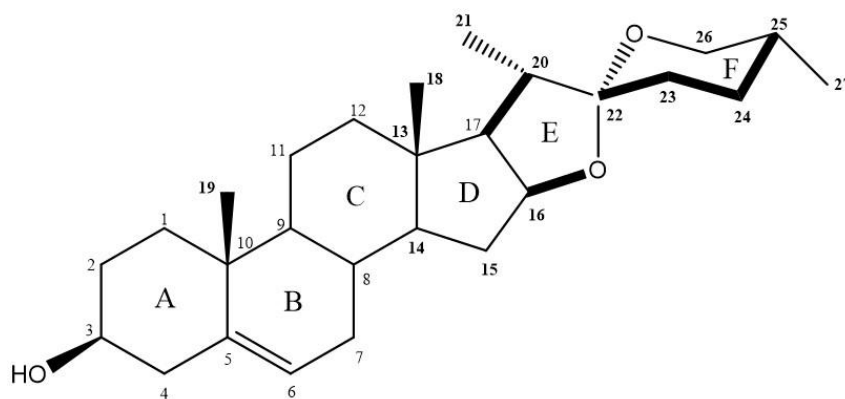


Figura 1. Estructura química de la diosgenina. El peso molecular es de 414.62 g/mol y su fórmula condensada es  $C_{27}H_{42}O_3$ . La molécula está formada por 27 átomos de carbono en 6 anillos (A, B, C, D, E y F), 4 metilaciones en las posiciones 10, 13, 20 y 25, y un grupo hidroxilo en la posición 3. En este último pueden unirse carbohidratos.

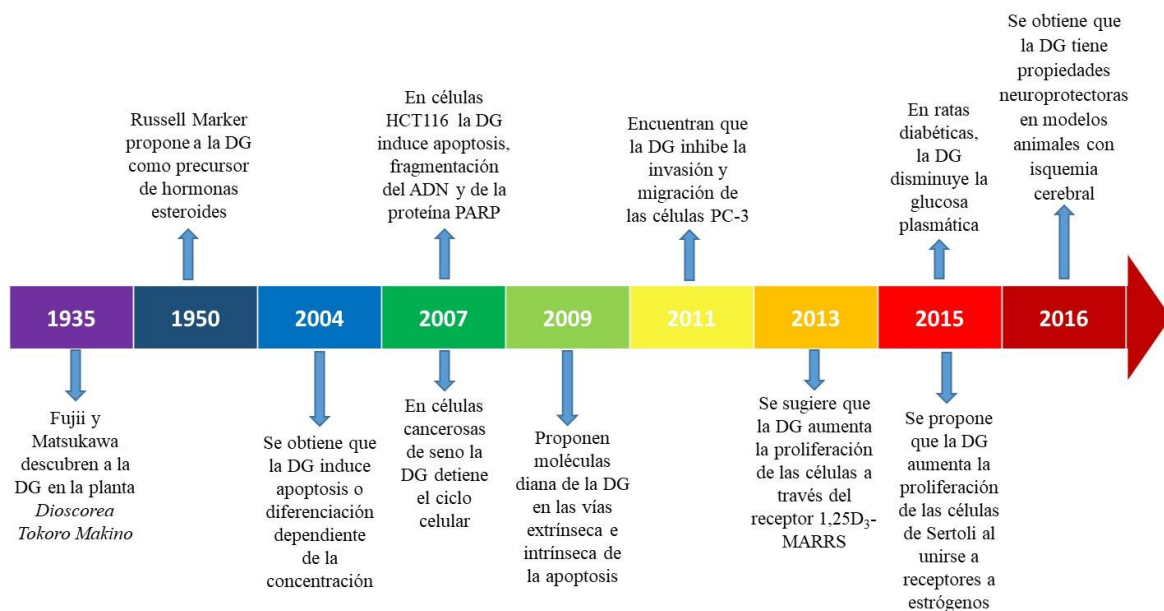


Figura 2. Línea del tiempo con los avances científicos obtenidos sobre la función biológica de la diosgenina. En la actualidad, los estudios con diosgenina en animales de experimentación, ha incrementado considerablemente.

### La DG inhibe la proliferación de las células tumorales de mamífero

El efecto antiproliferativo de la DG ha sido probado en experimentos *in vitro* usando diferentes líneas celulares humanas. En células HER2 de cáncer de seno, la DG inhibió su proliferación, modulando la vía intracelular Akt, mTOR y JNK, además reguló la expresión de la ácido graso sintasa, enzima que cataliza la biosíntesis de ácidos grasos a partir de acetil-CoA y malonil-CoA (Chiang et al., 2007). En otro estudio realizado con la misma línea celular, la DG inhibió las vías de señalización de crecimiento y supervivencia celular mediada por Raf/MEK y NFκB (Srinivasan et al., 2009). La proteína Akt inactiva a p53 y a factores proapoptóticos como BAD, además de activar a NFκB, factor de transcripción que incrementan la expresión de genes anti-apoptóticos. La inactivación de la proteína p53 se debe a que Akt se fosforila y activa a MDM2, una proteína que regula negativamente a la proteína p53. La proteína MDM2 se encuentra en el citoplasma, tiene dominios de señalización en el núcleo (NSL) y sitios de unión a p53. Cuando MDM2 es activada por Akt, pasa al núcleo, se une a p53 e impide la transcripción de genes proapoptóticos. Posteriormente, del núcleo pasa al citoplasma donde participa en la ubiquitinación y en la

degradación de p53. La activación de NFκB ocurre por su fosforilación y consecuente activación de la kinasa inhibidora de NFκB (IKKαβ) que fosforila a IκB (inhibidor de NFκB) para ser degradado por ubiquitinación en el proteosoma dejando libre a NFκB, esta reacción determina que pase al núcleo y active la transcripción de genes antiapoptóticos (Pinzón et al., 2009). Otra acción de la DG es detener el ciclo celular en la fase G1, lo que evita que las células pasen a la fase de síntesis y a la replicación del ADN, las células permanecen en la fase G0 de reposo del ciclo celular. Se ha reportado que la relación entre Bax/Bcl-2 aumenta y activa a la caspasa-3 induciendo apoptosis (Srinivasan et al., 2009).

En células de cáncer de próstata humano PC-3, la DG redujo significativamente la viabilidad de las células (Figura 3) y disminuyó su capacidad de migración e invasión (Chen et al., 2011).

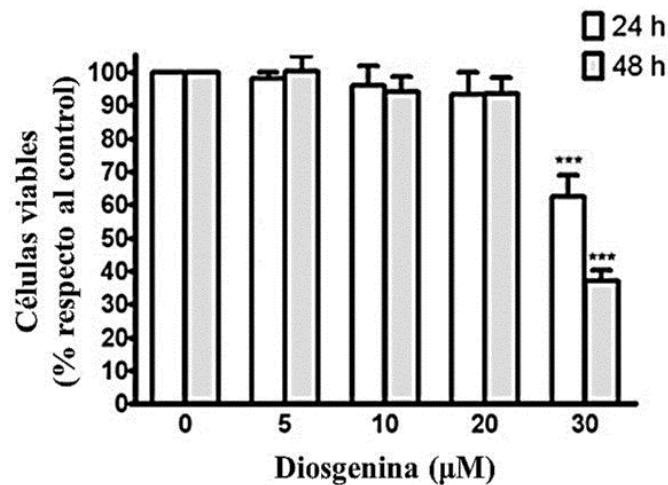


Figura 3. Efecto citotóxico de la DG en las células PC-3. Las células se trataron con varias concentraciones de DG durante 24 y 48 h. A concentración inferior a 20 µM no afectó significativamente la viabilidad de las células PC-3. A 30 µM, la viabilidad de las células disminuyó 40% a las 24 horas y 60% a las 48 horas de tratamiento (Tomado y modificado de Chen et al., 2011).

En otro experimento con las células HEL, la DG disminuyó su proliferación (Figura 4). El aumento de p21 indujo que las células permanecieran en la fase G2/M, sin la activación de p53. Además, el Ca<sup>2+</sup> intracelular aumentó y desregula el potencial de la membrana de las mitocondrias. El Ca<sup>2+</sup> activó a PLA<sub>2</sub>, a COX-2 y la sobreproducción de prostaglandinas (PGE2) (Leger et al., 2004b).

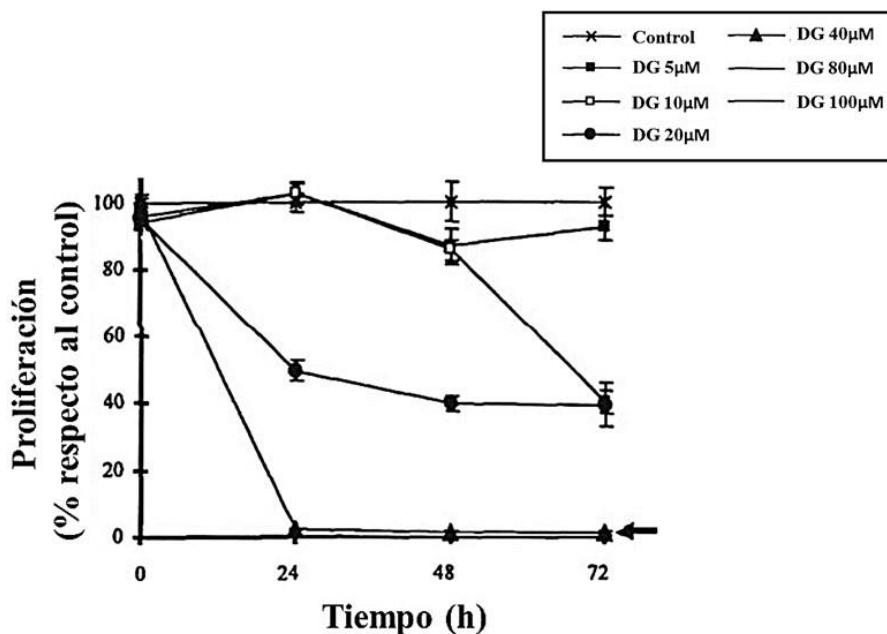


Figura 4. Efecto de la DG en la proliferación de las células HEL. Las células se trataron con concentraciones crecientes de DG durante 24, 48 y 72 horas. A concentración de 40 µM o mayor, la proliferación de las células disminuyó significativamente (Tomado y modificado de Leger et al., 2004b).

En sinoviocitos de pacientes con artritis reumatoide, la DG indujo apoptosis por medio de la expresión de COX-2, mayor producción de PGE2 y activación de caspasa-3 (Liagre et al., 2004, 2007). De manera contradictoria, en líneas celulares de varios tipos de cáncer se ha mostrado que COX-2 es esencial para inducir angiogénesis, por lo que su sobreexpresión favorece el desarrollo y la progresión del tumor (Prescott., 2000). En células HCT116 de carcinoma de colon humano, la DG (40µM) inhibió la proliferación e indujo apoptosis por la fragmentación del ADN y fragmentación de la proteína nuclear PARP implicada en la reparación del ADN (Figura 5 y 6). Además, disminuyó la expresión de la proteína p21 ras y de la proteína β-catenina (Raju y Bird, 2007).

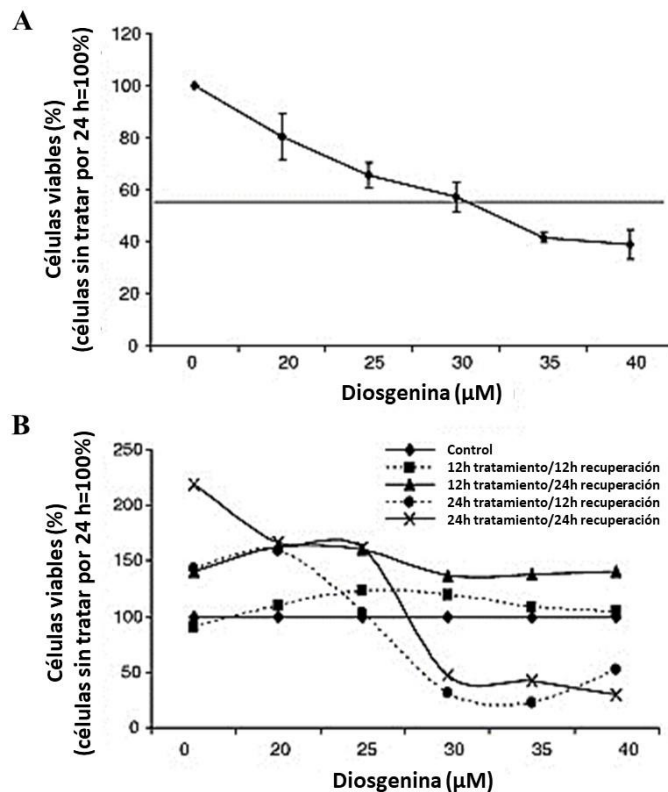


Figura 5. Viabilidad de las células HCT-116 y la recuperación posterior al tratamiento con DG. (A) Efecto inhibitor de la DG sobre el crecimiento de las células a concentraciones crecientes. (B) Recuperación a 12 y 24 horas de las células HCT-116 después del tratamiento por 12 y 24 horas con DG. La viabilidad de las células se evaluó con azul de tripán y los datos representan el % de células viables (Tomado y modificado de Raju y Bird, 2007).

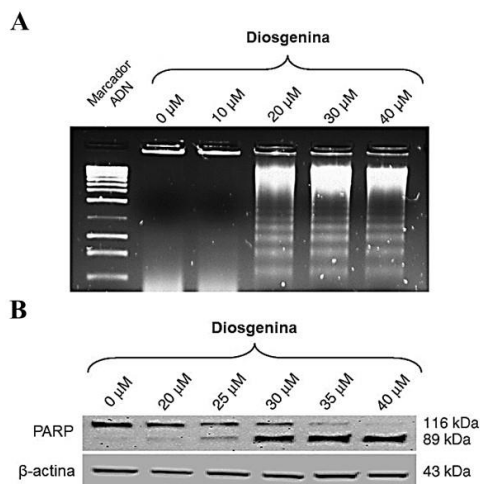


Figura 6. La DG induce apoptosis en las células HCT-116. (A) Fragmentación del ADN inducida por DG a 0, 10, 20, 30 y 40 $\mu\text{M}$ . (B) Fragmentación de PARP inducida por diferentes dosis de DG (Tomado y modificado de Raju y Bird, 2007).

La proteína p21 ras fosforila a Raf-1 y esta última activa a MEK1 y MEK2 que fosforilan residuos treonina y tirosina de las proteínas ERK1 y ERK2. Estas últimas pasan al núcleo, donde se fosforilan y activan al factor de transcripción Elk-1 que se une al factor SRF para activar a Fos que al unirse a Jun forman el complejo AP-1 para la transcripción de proteínas, la proliferación y la diferenciación de las células (Guirado, 2007).

Se ha demostrado que los efectos de la DG son dependientes de la concentración; a 40  $\mu\text{M}$  induce apoptosis en células HEL de eritroleucemia humana, mientras que a 10  $\mu\text{M}$  induce diferenciación de los megacariocitos (Figura 7) (Beneytout et al., 1995; Leger et al., 2004a; Cailleteau et al., 2009).

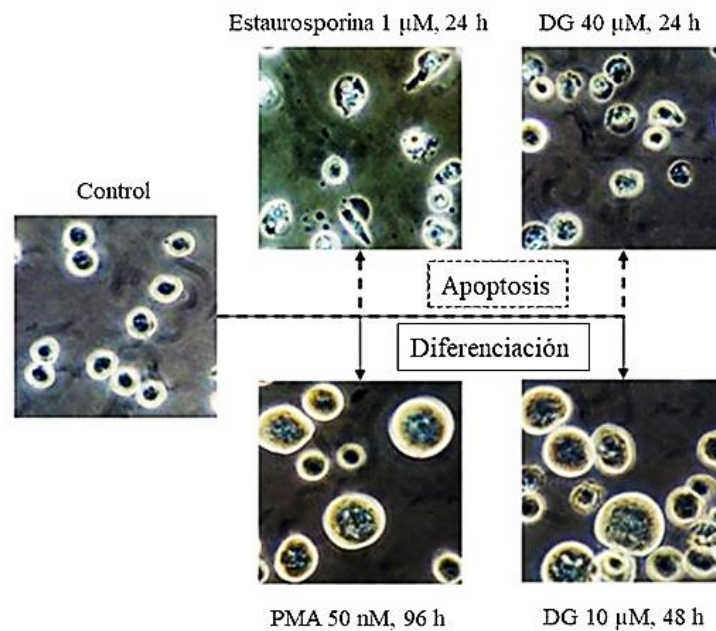


Figura 7. Células HEL control y tratadas con inductores de apoptosis o diferenciación. La estauosporina a 1 $\mu\text{M}$  y DG a 40 $\mu\text{M}$  causaron apoptosis. La PMA a 50nM y DG a 10 $\mu\text{M}$  indujeron diferenciación (Tomado y modificado de Leger et al., 2004a).

Por otro lado, en cultivos primarios de tirocitos humanos que previamente fueron estimulados con IGF-1, la DG activó la vía extrínseca de la apoptosis disminuyendo la expresión de FLIP y activando la caspasa-8. La vía apoptótica mitocondrial también fue activada a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la regulación de la relación Bcl-2/Bax y la activación de caspasa-9 (Figura 8) (Mu et al., 2012; Cailleteau et al., 2009).

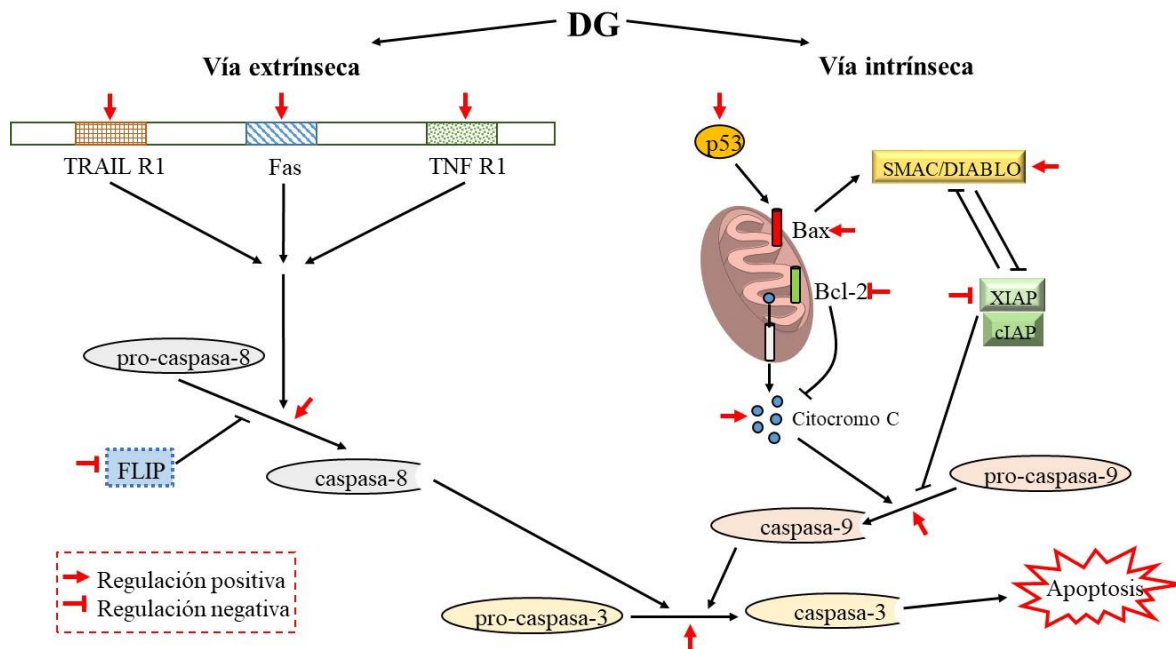


Figura 8. Vías de señalización de la DG para inducir apoptosis. Activación de la vía extrínseca mediada por los receptores de muerte TRAIL R1, Fas, TNF R1 y caspasa-8. Vía intrínseca mediada por p53, Bax, Bcl-2, SMAC/DIABLO, XIAP, IAP, citocromo C y caspasa-9 (Tomado y modificado de Cailleteau et al., 2009).

En modelos animales, la DG mejora la diabetes dependiente de insulina (Chen et al., 2015), también la obesidad, el síndrome metabólico y las dislipidemias (Uemura 2011; Chen et al., 2015). En células HepG2, la DG disminuyó el contenido de triglicéridos y los niveles de expresión de genes lipogénicos como FAS, SCD-1 Y ACC mediante la inhibición de la expresión de SREBP1c y la acumulación de lípidos. También se ha mostrado que, en las ratas diabéticas, la DG disminuyó la glucosa y los lípidos, además de los triglicéridos y el colesterol mediante la activación selectiva de PPARc. También presentó propiedades antioxidantes en el hígado y el corazón, reestableciendo los niveles de glutatión GSH y manteniendo la función de la superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, enzimas antioxidantes que disminuyen en los animales diabéticos (Uemura et al., 2011).

### **La DG incrementa la proliferación de las células sanas de mamífero**

La DG aumentó la viabilidad y la proliferación de las células de Sertoli en cultivos de células TM4 y en cultivos primarios de células de testículo (Figura 9). Estos efectos fueron dependientes de la concentración (0.01-5.0 $\mu$ M) y del tiempo de administración (6-48h). Hubo aumento de la translocación de los receptores a estrógenos a la membrana celular, activación de las vías de señalización ERK/Akt, incremento de los reguladores positivos del ciclo celular como las ciclinas y cinasas y disminución de la expresión de proteínas proapoptóticas como Bax, AIF, caspasa-3 y caspasa-9 (Wu et al., 2015). Después de unirse al ligando, los receptores a estradiol inducen la fosforilación de las proteínas adaptadoras Src y SHC para formar el complejo SHC-GRB2-SOS. Este complejo activa a RAS, Raf, MAPKs y ERK. La quinasa ERK pasa al núcleo e induce la transcripción de genes que favorecen la proliferación de las células. Los receptores a estrógenos también activan la vía PI3K-AKT para realizar su función antiapoptótica (Simoncini et al., 2003). Por otro lado, en ratones sanos, la DG aumentó el crecimiento de los axones en las neuronas de la corteza prefrontal y mejoró la memoria en la prueba de reconocimiento de objetos. Se sugirió que estos eventos son mediados por la proteína 1,25D<sub>3</sub>-MARRS (Figura 10A) (Tohda et al., 2013), un receptor a esteroides de respuesta rápida y asociado a la membrana celular que activa cascadas de señalización intracelular mediada por PKC, PKA, ERK y PI3K (Figura 10B) (Tohda et al., 2012). En ratas y en un modelo de isquemia cerebral, la DG disminuyó la tasa de mortalidad de los animales, el número de células apoptóticas y el volumen de tejido cerebral infartado sugiriendo que la DG posee propiedades neuroprotectoras (Zhang et al., 2016).

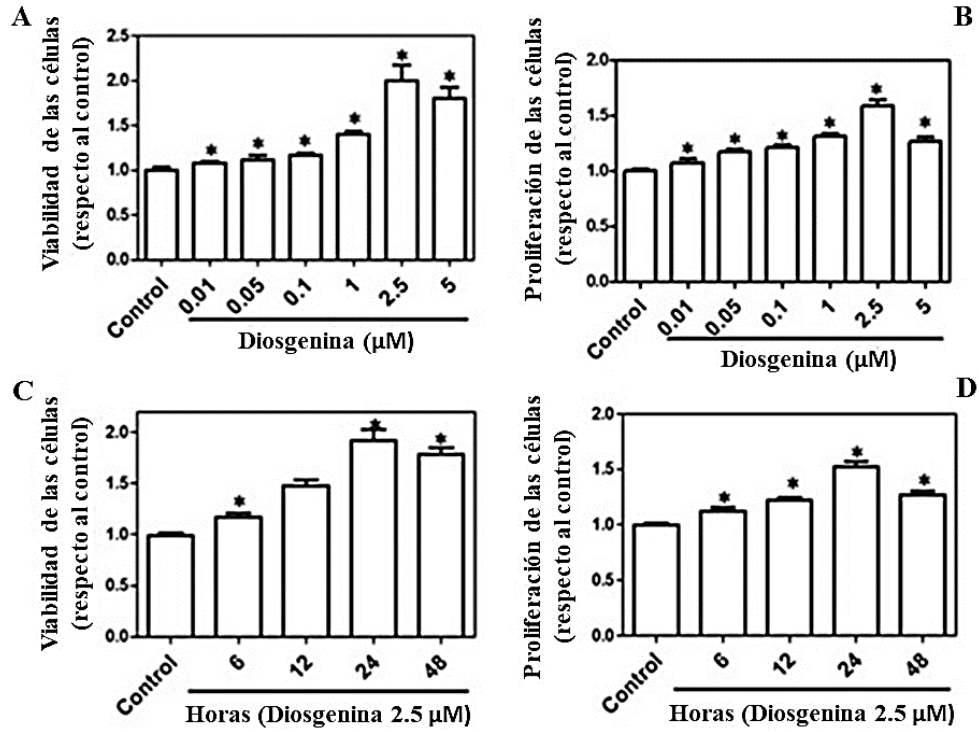


Figura 9. La DG aumentó la viabilidad y la proliferación de las células de Sertoli en cultivos primarios. Los efectos significativos se obtuvieron a las 24 horas con dosis de 2.5μM (Tomado y modificado de Wu et al., 2015).

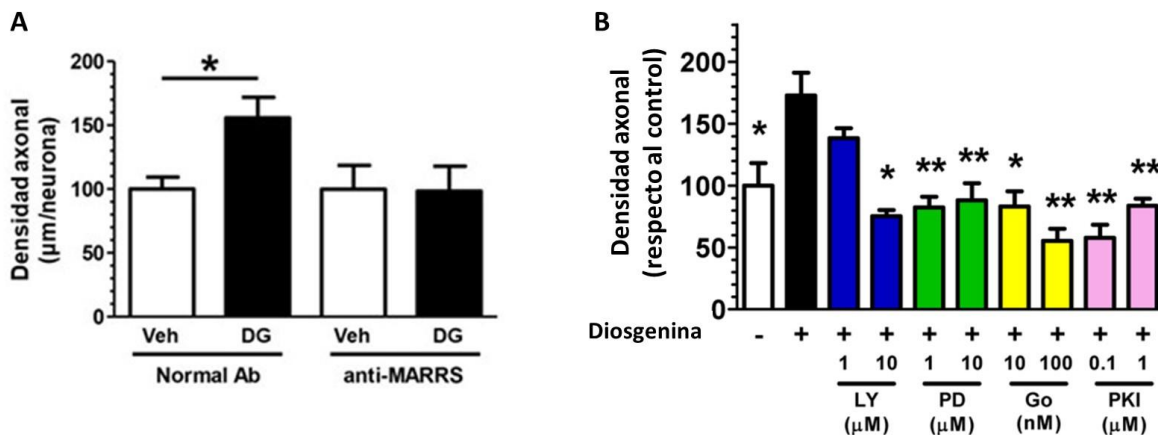


Figura 10. A. El anticuerpo anti-MARRS bloquea el aumento de la densidad de axones inducido por diosgenina. B. Proteínas quinasas implicadas en el crecimiento de los axones. El inhibidor PI3K LY294002 (1 y 10 μM), el inhibidor de MEK1 PD98059 (1 y 10 μM), el inhibidor de la proteína quinasa C Go6970 (10 y 100 nM) y el inhibidor de la proteína quinasa A PKI (0.1 y 1 μM) inhiben el crecimiento de los axones inducido por DG (Tomado y modificado de Tohda et al., 2013).

### **Vías de señalización mediadas por los receptores a estrógeno**

Los estrógenos estimulan el crecimiento, el desarrollo, la diferenciación y la homeostasis celular, así como de los tejidos que forman. Sus efectos están mediados por los receptores a estrógenos (RE) que activan varias vías de señalización para regular la transcripción de los genes diana (Moggs et al, 2001). El 17 $\beta$ -estradiol (E2), uno de los principales estrógenos, causa su efecto a través de su difusión por la membrana plasmática de las células diana y su unión a sus receptores intracelulares provocando un cambio conformacional que causa la disociación de los complejos de chaperonas. Los receptores forman dímeros que se translocan al núcleo para estimular la transcripción de genes blanco a partir de la interacción directa con los elementos de respuesta a estrógeno (ERE) (Figura 11). Los RE asociados a la membrana plasmática median la vía de señalización no genómica (Björnström y Sjöberg, 2005; Zhang et al, 2006) a través de las vías ERK/MAPK y PI3K/AKT. De esta manera el RE interactúa de manera indirecta con factores de transcripción como AP-1, NF- $\kappa$ B y SP-1, favoreciendo la diferenciación y proliferación de las células. También hay interacción del complejo ER $\alpha$ -E2 con el receptor de IGF-1 y activación de la vía de señalización MAPK (Kahlert et al, 2000).

Las rutas ERK/MAPK y PI3K/Akt activadas por el complejo ER $\alpha$ -E2 mejoran la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, reducen la activación de caspasa-3 y promueven la transición de la fase G1 a la fase S a través de la estimulación de la expresión de ciclina D1. (Marino et al, 2002; Acconcia et al, 2005). En las mamas, el E2 incrementa la proliferación de las células a través de la activación de la transcripción del gen ciclina D1 (Foster et al, 2001). El promotor de ciclina D1 posee sitios de unión para STAT5 y NF- $\kappa$ B, receptores para el RE a través de acciones genómicas y no genómicas (Björnström y Sjöberg, 2005). Además, el promotor del gen VEGF contiene una variante similar a ERE que se une al RE y al complejo RE-SP1 (O'Lone et al, 2004). Cuando el RE $\beta$  se co-expresa con el RE $\alpha$  disminuye la proliferación celular dependiente de la concentración inducida por RE $\alpha$ . En células MCF-7 que expresan solo RE $\alpha$ , el E2 aumenta la proliferación celular y favorece la formación de tumores (Matthews y Gustafsson, 2003). Sin embargo, en células MCF-7 transfectadas, el RE $\beta$  inhibe la proliferación inducida por E2 y también disminuye la formación de tumores en un modelo de injerto realizado en ratón que previamente fue estimulado con E2 (Paruthiyil et al, 2004).

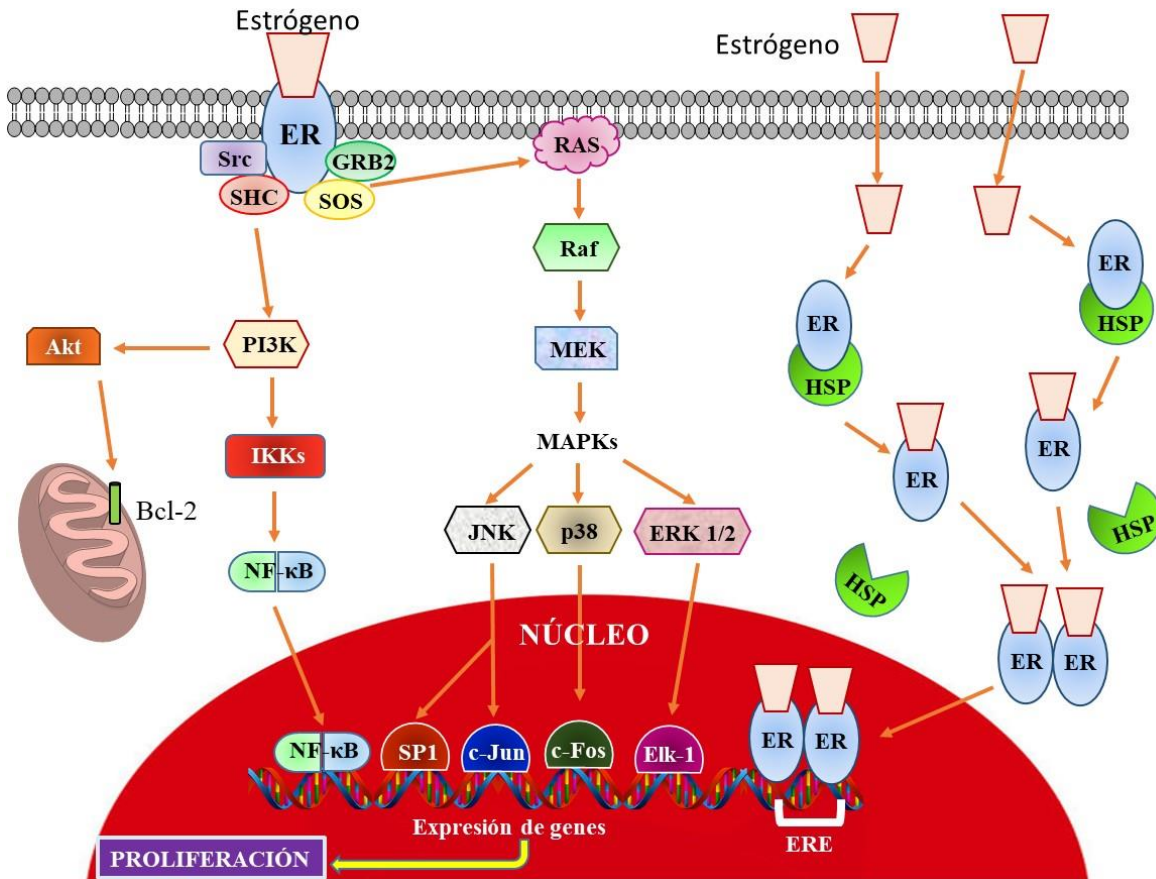


Figura 11. Vías de señalización estimuladas por estradiol. El mecanismo clásico de acción involucra la interacción nuclear directa de los receptores. La unión con la hormona libera al RE de un complejo inhibitorio con HSPs y provoca cambios conformacionales que le permiten unirse a ERE de los genes diana para estimular su transcripción. Los RE localizados en la membrana celular están involucrados con la vía de señalización no genómica de los estrógenos. Esta vía involucra segundos mensajeros como PI3K, Akt y MAPKs (Tomado y modificado de Moggs et al, 2001).

## **Participación del factor de crecimiento vascular endotelial en la angiogénesis**

En la angiogénesis ocurre la formación y el crecimiento de los vasos sanguíneos a partir de los ya existentes. En este proceso hay degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular, división y migración de células endoteliales y formación de tubos que darán origen nuevos vasos sanguíneos. Fisiológicamente, los capilares son necesarios para el intercambio de nutrientes y de metabolitos de acuerdo a la actividad metabólica de los tejidos, siendo clave para el desarrollo folicular, desarrollo de endometrio y desarrollo del embrión, por mencionar algunos (Adair y Montani, 2010). La angiogénesis aumenta por la acción de los factores proangiogénicos como el VEGF, FGF2, PDGF y la angiopoyetina (Galvão et al, 2013). El VEGF es uno de los factores proangiogénicos más importantes en los mamíferos, hay 5 miembros en la familia: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y el factor de crecimiento placentario (Shimizu, 2016). Cuando VEGF se une a su receptor tirosina cinasa en la membrana de células endoteliales, induce la dimerización y fosforilación de proteínas (Shibuya, 2011). VEGF induce la proliferación de células endoteliales mediante la activación de la vía PKC-Raf-MEK-ERK (Takahashi et al, 1999) y los efectos de sobrevivencia están mediados por la ruta PI3K-Akt (Figura 12) (Gerber et al, 2002). La angiogénesis es fundamental para el desarrollo folicular y para el establecimiento del CL después de la ovulación. La presencia de VEGF-A ha sido demostrada en células de la granulosa y de la teca de los folículos antrales, y en células esteroideogénicas de los CL de bovinos, monos y ratas (Woad y Robinson, 2016). En contraste, en folículos atresicos y en CL degenerados, la expresión de VEGF disminuye. In vitro, el tratamiento con VEGF reduce la apoptosis de las células de la granulosa disminuyendo la atresia de los folículos a través del bloqueo de Bax. Se ha reportado que la inyección in vivo de VEGF incrementa el número de folículos antrales en ovarios de ratona (Shimizu, 2016) y la administración de factores antiangiogénicos (VEGF-trap) en ratas, disminuyó el número de CL, la densidad de vasos sanguíneos y la producción de progesterona (Woad y Robinson, 2016).

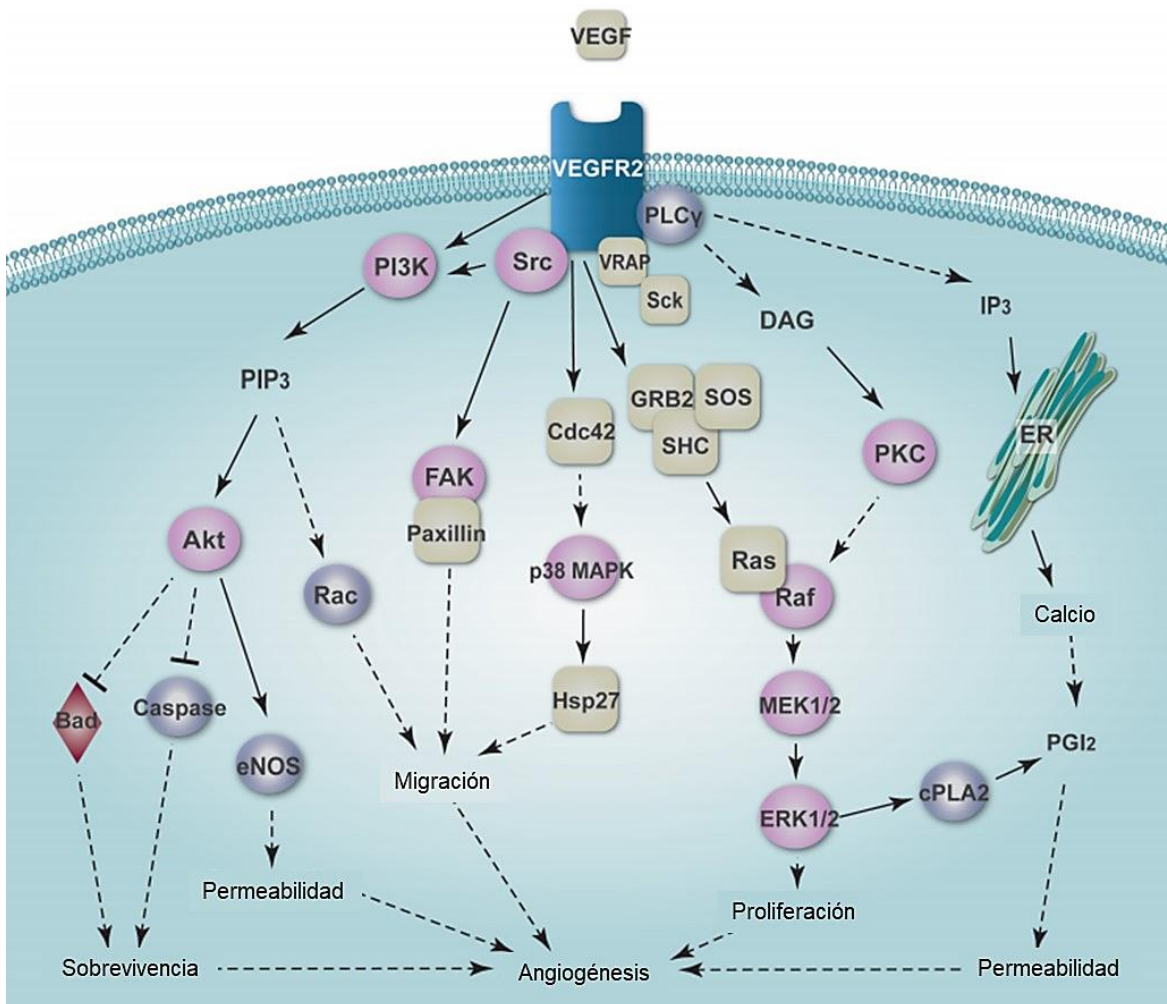


Figura 12. Vías de señalización estimuladas por VEGF. El complejo VEGF-VEGFR activa la vía PKC-Raf-MEK-ERK e induce proliferación celular. La ruta PI3K-Akt media la supervivencia de las células. Hay vasculogénesis y angiogénesis (Tomado y modificado de Takahashi et al, 1999; Gerber et al, 2002).

### Una sapogenina esterooidal, la (26R)-26-hidroxi-diosgenina

La (26R)-26-hidroxi-diosgenina (26OH-DG) es un derivado hidroxilado de la DG y tiene un grupo hidroxilo adicional en el carbono 26 (Figura 13). Esta molécula fue obtenida en el laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP que está bajo la dirección del Dr. Jesús Sandoval Ramírez. En comparación con la DG, la modificación molecular aumentó la hidrosolubilidad de la 26OH-DG. En estudios previos realizados en el laboratorio de Neuroendocrinología se obtuvo que la 26OH-DG a dosis de 4 mg/Kg inhibió el desarrollo de los folículos en los ovarios de ratas

Wistar, el desarrollo del útero y la ovulación (Amaro et al., 2014; Hilario-Martínez et al., 2015).

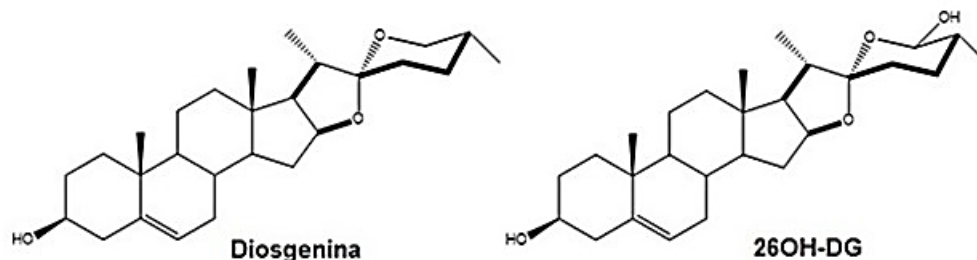


Figura 13. Comparación de las estructuras químicas de diosgenina y 26OH-DG. La diosgenina tiene un punto de fusión de 205-208°C y solubilidad en etanol y agua de 83 mg/ml y <1 mg/ml a 25°C respectivamente. La 26OH-DG, al poseer un grupo hidroxilo en el carbono 26, es más hidrosoluble.

### El ciclo estral de las ratas Wistar

El ciclo estral de las ratas Wistar tiene una duración de 4 días y consta de 4 fases: proestro, estro, metaestro y diestro (Cora et al., 2015). En el proestro, los folículos ováricos crecen rápidamente, en el útero hay distensión del lumen por edema y las células epiteliales se alargan formando un epitelio en forma de columna, mientras que en la vagina se forma el estrato granuloso. En el estro ocurre la ovulación, hay degeneración del epitelio de revestimiento del útero y en la vagina hay descamación de las células epiteliales cornificadas. En el metaestro se forman los cuerpos lúteos y en el útero continua la degeneración vacuolar, comienza el reemplazo de las células y en la región media de la vagina hay desprendimiento completo del epitelio cornificado. En el diestro los folículos ováricos son pequeños pero los cuerpos lúteos alcanzan su tamaño máximo, el lumen del útero es estrecho, en la luz de la vagina abundan los leucocitos y el espesor del epitelio vaginal es bajo (Westwood, 2008; Rodríguez y Pásaro, 1998). Estos cambios responden a patrones de la secreción de hormonas ováricas que son regulados por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Figura 14 y 15) (Messinis, 2006; Nelson, 2011).

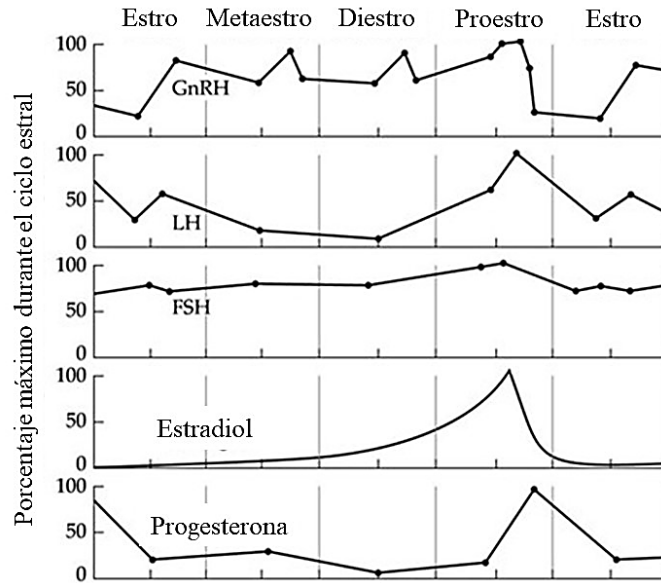


Figura 14. Variaciones en los niveles de GnRH, LH, FSH, el estradiol y la progesterona en el plasma de la rata a lo largo del ciclo estral (Tomado y modificado de Nelson, 2011; Rodríguez y Pásaro, 1998).

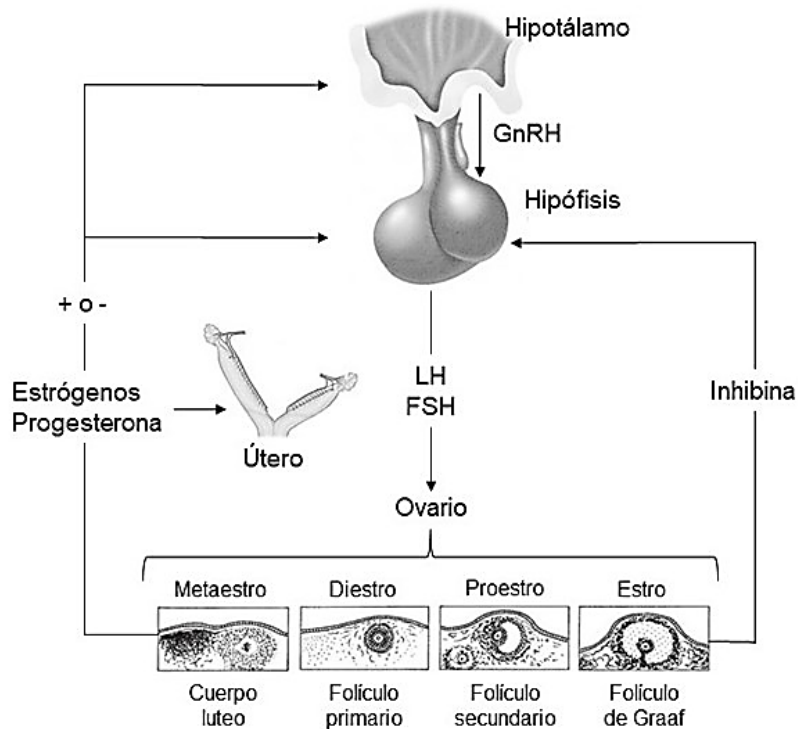


Figura 15. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario. La LH y la FSH se liberan como respuesta a la acción de la GnRH del hipotálamo (Tomado y modificado de Nelson, 2011).

## **Justificación**

La diferenciación, proliferación y apoptosis de las células en los tejidos son procesos altamente regulados a lo largo de la vida, la falla de los mecanismos que los regulan puede conducir a enfermedades como el cáncer o trastornos relacionados con la reproducción, por mencionar algunos. En relación a este último y en los humanos, la infertilidad es un problema que afecta al 15% de las parejas en edad reproductiva y un 40% de los casos se debe a disfunciones en el sistema reproductor femenino. Entre los más frecuentes está el síndrome de ovario poliquístico y la endometriosis siendo las principales causas de infertilidad. En la primera hay una acumulación de folículos inmaduros en los ovarios, dando lugar a quistes e impidiendo la ovulación. En la segunda, hay un crecimiento anormal del endometrio uterino, en estados avanzados invade otros órganos como los ovarios, el recto y la pelvis. Por esto, uno de los retos de la investigación científica es encontrar nuevas terapias que estimulen el desarrollo folicular y la ovulación y que además controlen la proliferación celular del útero.

Por otro lado, las plantas han sido fuente importante de moléculas con propiedades biológicas, una de ellas es la DG. En cultivos celulares de testículos de rata, la DG estimula la proliferación y diferenciación de las células de Sertoli e inhibe la apoptosis (Wu et al., 2015). Sin embargo, también se ha reportado que inhibe el crecimiento de células cancerosas de próstata humana (Chen et al., 2011) dando evidencia de que posee doble efecto farmacológico. Dado que favorece la proliferación y la diferenciación de las células, potencialmente podría utilizarse para estimular el desarrollo de los folículos ováricos y la ovulación. Además, modificaciones en la molécula de DG permitirían obtener mejores resultados que en el futuro podrían ofrecer nuevas alternativas terapéuticas dirigidas contra la infertilidad y el cáncer de ovarios y útero. Considerando estas ideas y los efectos producidos por la 26OH-DG a dosis alta (4 mg/Kg) sobre los ovarios y útero decidimos evaluar los efectos a dosis bajas (50 µg/Kg) sobre el desarrollo folicular, la ovulación y desarrollo del útero de las ratas Wistar. Este trabajo corresponde a la fase preclínica en la investigación y desarrollo de nuevos fármacos.

### **Hipótesis**

La (26R)-26-hidroxiandrostenediona (26OH-DG) a dosis baja (50 µg/Kg) aumenta el desarrollo del endometrio uterino, el desarrollo de los folículos ováricos, la expresión del VEGF en el ovario y la ovulación de las ratas Wistar.

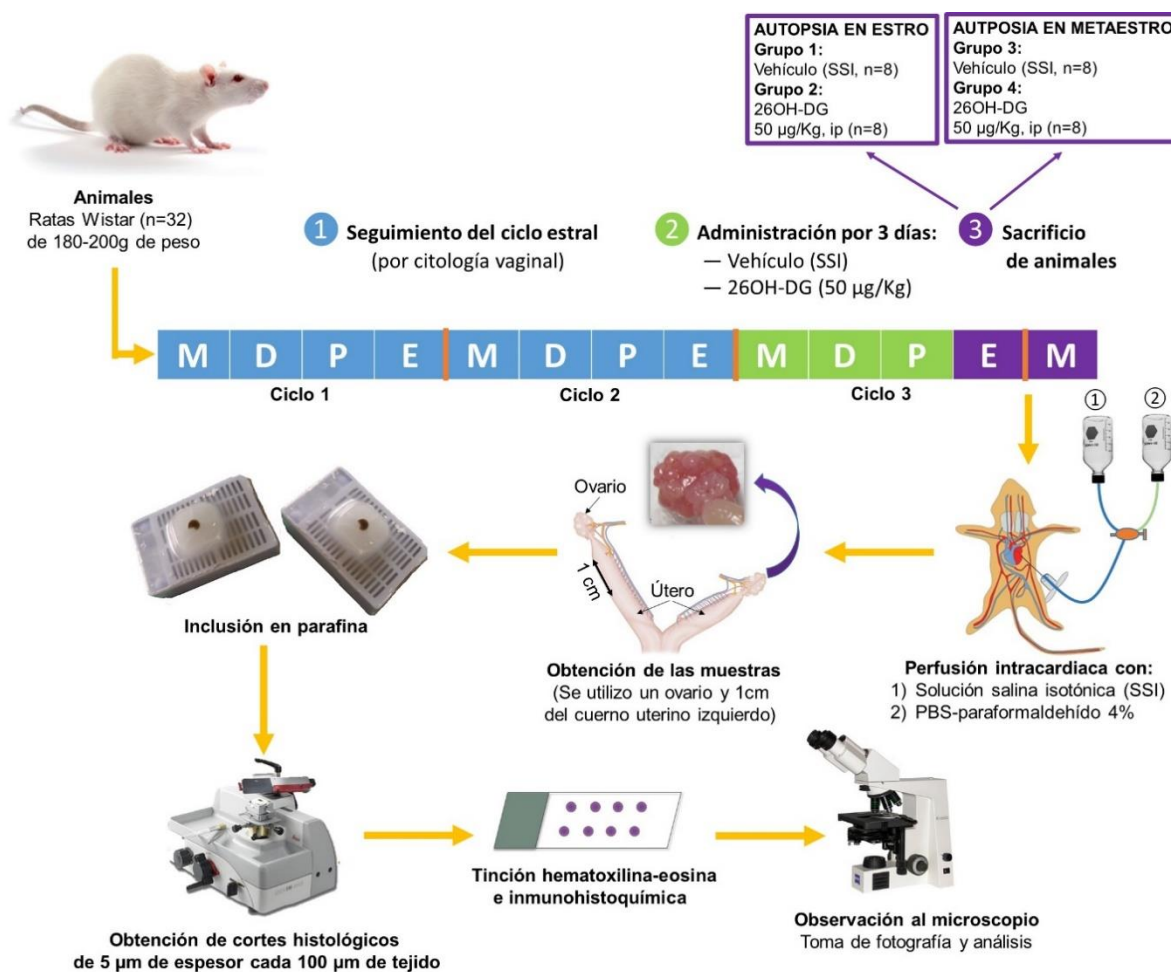
### **Objetivo general**

Evaluar *in vivo* el efecto farmacológico de la 26OH-DG sobre el desarrollo de los ovarios y el útero de ratas Wistar.

### **Objetivos específicos**

1. Evaluar el desarrollo del endometrio, el desarrollo de los folículos ováricos y la ovulación en ratas tratadas con 26OH-DG a dosis baja (50 µg/Kg).
2. Evaluar por inmunohistoquímica la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en ovarios de ratas tratadas con 26OH-DG a dosis baja (50 µg/Kg).

## Diagrama de trabajo



## Materiales y métodos

### Modelo biológico

Usamos ratas hembras de la cepa Wistar (180-200 g) que fueron mantenidas con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, temperatura de  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , humedad del 50% y alimento y agua a libre acceso. Los procedimientos experimentales se realizaron siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) que establece las especificaciones técnicas sobre la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Además, Alejandro Campos Sandoval, quien realizó los experimentos fue capacitado y certificado en el “Manejo y vías de administración en ratas de laboratorio” por profesionales del bioterio “Claude Bernard” de la BUAP.

### Seguimiento del ciclo estral por citología vaginal

El seguimiento del ciclo estral de las ratas se realizó por citología vaginal. Los frotos se tomaron a las 8:00-9:00 am, mismos que se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina. Posteriormente se observaron en un microscopio óptico de campo claro acoplado a una cámara fotográfica y a una PC. Se tomaron fotografías con las que determinamos las fases del ciclo estral de las ratas. Para la evaluación citológica se identificaron células características de cada fase del ciclo estral. El proestro por la presencia de células epiteliales nucleadas, pequeñas y redondas. En el estro por la abundancia de las células epiteliales queratinizadas sin núcleo, procedentes de la descamación del epitelio superficial de la vagina. El metaestro por la presencia de leucocitos y pocas células epiteliales queratinizadas y el diestro por la predominancia de leucocitos, en ocasiones pueden encontrarse células epiteliales nucleadas que anuncian el proestro siguiente de las ratas (Figura 16) (Cora et al., 2015; Byers et al., 2012; Rodríguez y Pásaro, 1998).

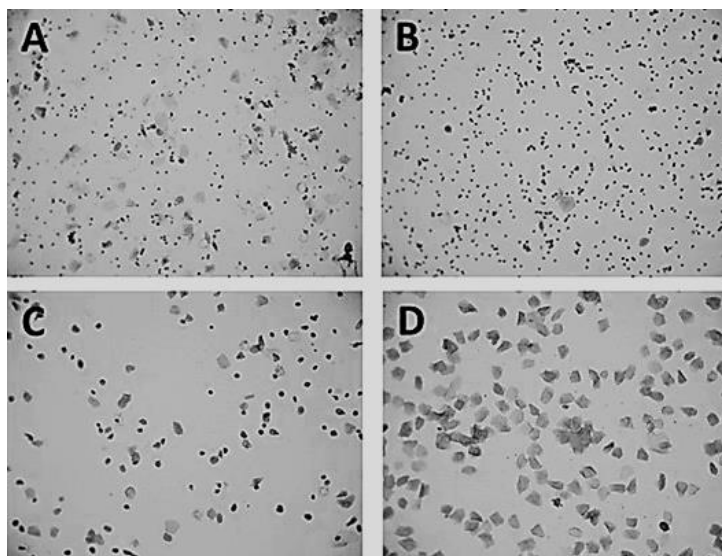


Figura 16. Imágenes de la citología vaginal de las ratas Wistar en las diferentes fases del ciclo estral reproductivo. A. Metaestro, B. Diestro, C. Proestro y D. Estro.

### Administración de la (26R)-26-hidroxdiosgenina

Usamos suspensiones de 26OH-DG a concentración de 1.0 mg/ml. Inicialmente, la 26OH-DG fue disuelta en 10µl de alcohol etílico absoluto, posteriormente en SSI, la concentración

de alcohol étílico final fue del 1%, misma que fue mantenida a 4 grados Celsius y en oscuridad. Antes de la administración, la suspensión de 26OH-DG original se diluyó a hasta obtener 100 µg/ml de las cuales administramos 50µg/Kg. Las ratas fueron administradas en el día del metaestro, diestro y proestro por vía intraperitoneal entre las 9:00-10:00 horas y se sacrificaron en el estro y metaestro siguientes al tratamiento.

### **Obtención de los úteros y ovarios**

Las ratas se colocaron en una cámara con CO<sub>2</sub>, una vez inconscientes se perfundieron por vía intracardiaca en dos etapas; primero con SSI por 30 minutos y después PBS-paraformaldehído al 4% por 20 minutos. Inmediatamente después disecamos y obtuvimos el útero y los ovarios y obtuvimos el peso húmedo de ellos. Los órganos se post-fijaron en PBS-paraformaldehído a temperatura ambiente por 24 horas y después en alcohol al 70% hasta ser incluidos en parafina.

### **Inclusión en parafina de las muestras y cortes histológicos**

Los ovarios fueron deshidratados en alcohol a concentraciones crecientes (70, 80, 96 y 100%) seguido de xileno e infiltrado con parafina líquida a 52°C. Para la inclusión de los úteros, usamos un centímetro del extremo del cuerno uterino y se siguió el mismo procedimiento utilizado para los ovarios. Finalmente, los órganos fueron colocados dentro de bloques de parafina. Con un micrótopo Leica SM2010R y en sección transversal, se hicieron cortes histológicos de 5µm de espesor cada 100µm de tejido que se tiñeron con hematoxilina-eosina. También se obtuvieron cortes de 5µm de espesor entre cada 100 µm de tejido para identificar células positivas al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por medio de inmunohistoquímica. Los cortes teñidos con HE se observaron en un microscopio óptico acoplado a una cámara fotográfica y a una PC. Se tomaron fotografías que se almacenaron para su posterior análisis.

### **Captura de imágenes, conteo de folículos ováricos y medición del espesor de las capas de células del útero**

Las fotografías se tomaron con el objetivo de 10X. Para contar los folículos ováricos, como criterio de inclusión, solo contamos los folículos que tenían ovocito. Los folículos fueron

clasificados en base a las características morfológicas de las células de la granulosa y células de la teca como: folículos preantrales sanos (FPS), folículos preantrales atresicos (FPA), folículos antrales sanos (FAS) y folículos antrales atresicos (FAA) (Figura 17). Para el útero, de cada corte histológico tomamos fotografías de la sección transversal y con el programa Motic plus 2.0 para PC realizaron 3 mediciones de cada una de las capas del útero que fueron perpendiculares a la superficie del perimetrio (Figura 18).

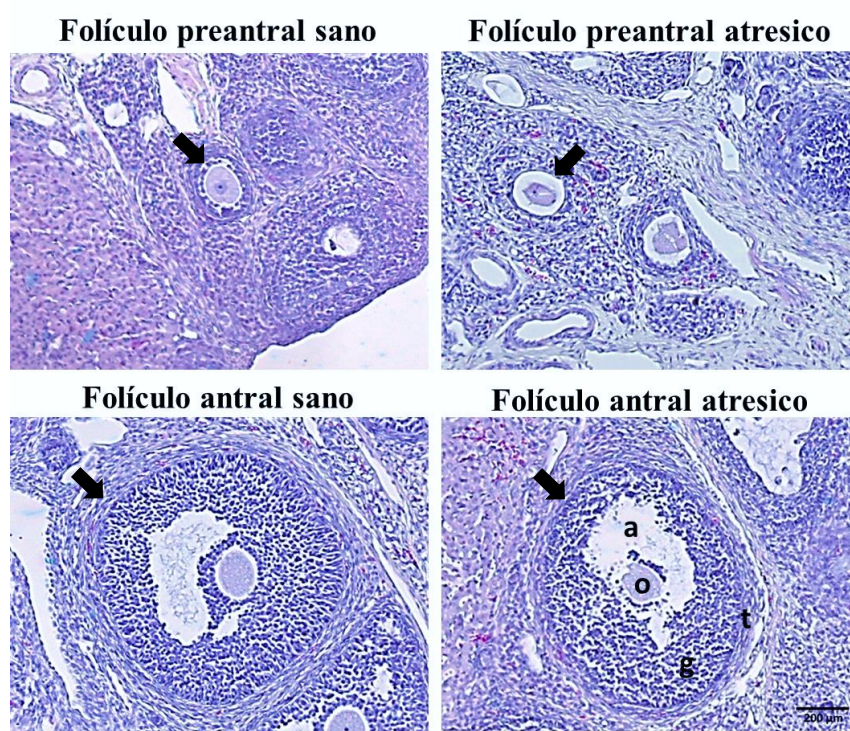


Figura 17. Micrografías representativas de los folículos ováricos de la rata Wistar teñidos con HE y señalados con flecha. Las células de la teca se indican con la letra (t), las células de la granulosa con la letra (g), el antro está señalado con la letra (a) y el ovocito con la letra (o).

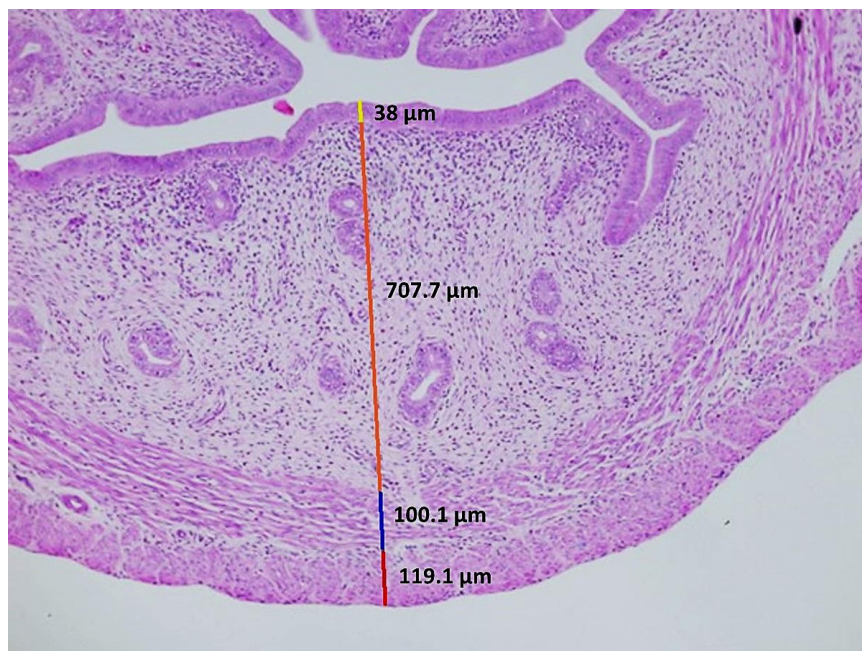


Figura 18. Micrografía de corte histológico de útero de rata Wistar teñido con la técnica de hematoxilina-eosina. El espesor de la mucosa se representa con la línea de color amarillo, el endometrio con color naranja, el miometrio con azul y el perimetrio con la línea color rojo.

### **Identificación de células VEGF-positivas por inmunohistoquímica**

Usamos cortes histológicos de 5µm de espesor mismos que fueron desparafinados, hidratados y lavados en buffer de fosfato y finalmente expuestos a tritón al 2% (PBS-T). La recuperación de los antígenos se realizó con buffer de citratos a un pH=6 y 55 grados Celsius, los epítopes fueron bloqueados con albumina bovina libre de IgG. Después, los cortes histológicos fueron incubados con el anticuerpo primario en una cámara húmeda por 20 horas a 4 grados Celsius; se utilizó el anticuerpo contra VEGF a dilución 1:100 para detectar células positivas. Como anticuerpos secundarios usamos anti-IgG de ratón acoplado a FITC a dilución de 1:100. Los núcleos se marcaron con yoduro de propidio. Las laminillas fueron selladas con Vectashield y se observaron usando un microscopio Leica-DM100, se tomaron fotografías y se almacenaron en la PC. Por último y con el programa IM50 se contabilizaron las células VEGF-positivas.

### **Análisis estadístico**

Para el útero, graficamos el promedio de las medidas del espesor de la mucosa, endometrio, miometrio y perimetrio, así como el número de glándulas endometriales. El número de folículos contabilizados en cada uno de los ovarios también fue promediado y se graficó de

acuerdo a las siguientes categorías: folículo preantral sano (FPS), folículo preantral atrésico (FPA), folículo antral sano (FAS) y folículo antral atrésico (FAA). El número de cuerpos lúteos y de células VEGF-positivas también fue promediado y graficado. La comparación estadística de los datos se realizó con la prueba t de Student y ANOVA.

## Resultados

### La 26OH-DG no modifica la duración del ciclo estral de las ratas

Considerando que la luz y la temperatura son dos de los principales sincronizadores del ciclo reproductivo de las ratas, en los experimentos de esta tesis, los animales fueron expuestos a ciclos de luz-oscuridad de 12-12 horas y temperatura de  $20\pm 2$  grados Celsius. Obtuvimos que en las ratas que fueron administradas con 26OH-DG ( $50\mu\text{g}/\text{kg}$ , ip) y en las ratas administradas con el vehículo (SSI), la duración del ciclo estral fue de 4 días (Tabla 1), prueba de t de Student.

Tabla 1. Duración del ciclo estral de las ratas administradas con el vehículo o con 26OH-DG en el día de metaestro, diestro y proestro.

Grupos	Administración	Sacrificio	Ciclo estral
Vehículo (SSI)	M-D-P	Estro (24 h)	4 días
26OH-DG ( $50\mu\text{g}/\text{kg}$ )	M-D-P	Estro (24 h)	4 días
Vehículo (SSI)	M-D-P	Metaestro (48 h)	4 días
26OH-DG ( $50\mu\text{g}/\text{kg}$ )	M-D-P	Metaestro (48 h)	4 días

M, metaestro, D, diestro y P, proestro. Prueba de t de Student.

### La 26OH-DG aumenta el desarrollo de los folículos ováricos

En las ratas analizadas en estro, 24 horas después de finalizar el tratamiento, no hubo diferencia significativa en el número de folículos preantrales y antrales entre el grupo de animales tratados con la 26OH-DG en comparación con el grupo de animales administrados con el vehículo (Figura 19). Sin embargo, en las ratas analizadas en el metaestro, 48 horas después del tratamiento aumento el número de folículos preantrales y antrales sanos en las ratas administradas con 26OH-DG en relación a las ratas administradas con el vehículo (Figura 19). El número de folículos atresicos fue similar en el estro y metaestro, 24 y 48 horas después del tratamiento en las ratas tratadas con 26OH-DG y en las ratas que recibieron el vehículo.

Específicamente, en los ovarios de las ratas tratadas con la 26OH-DG y analizadas en el estro, el número de folículos FPS, FPA, FAS y FAA fue de  $6.9 \pm 1.1$ ,  $5.4 \pm 1.1$ ,  $18.4 \pm 4.1$  y  $29.3 \pm 3.9$  respectivamente, comparados con  $7.6 \pm 1.8$ ,  $3.6 \pm 1.9$ ,  $19.8 \pm 3.1$  y  $29.4 \pm 1.9$  folículos en los ovarios de las ratas administradas con el vehículo. No hubo diferencia significativa entre el grupo de animales tratados con la 26OH-DG en comparación con las ratas administradas con el vehículo (Figura 20A). Sin embargo, en los ovarios de las ratas tratadas con 26OH-DG y analizadas en el metaestro, el número de folículos ováricos FPS, FPA, FAS y FAA fue de  $13.1 \pm 1.5$ ,  $8 \pm 1.2$ ,  $30.3 \pm 3$  y  $23.9 \pm 4.5$  respectivamente, comparados con  $3.9 \pm 1$ ,  $5.7 \pm 0.7$ ,  $7.7 \pm 1.2$  y  $26.4 \pm 3.8$  folículos en los ovarios de las ratas administradas con el vehículo. La 26OH-DG, aumento 2.4 y 2.9 veces el número de folículos sanos (FPS y FAS) respectivamente, mientras que el número de folículos atresicos (FPA y FAA) fue similar a los obtenidos en las ratas control (Figura 20B).

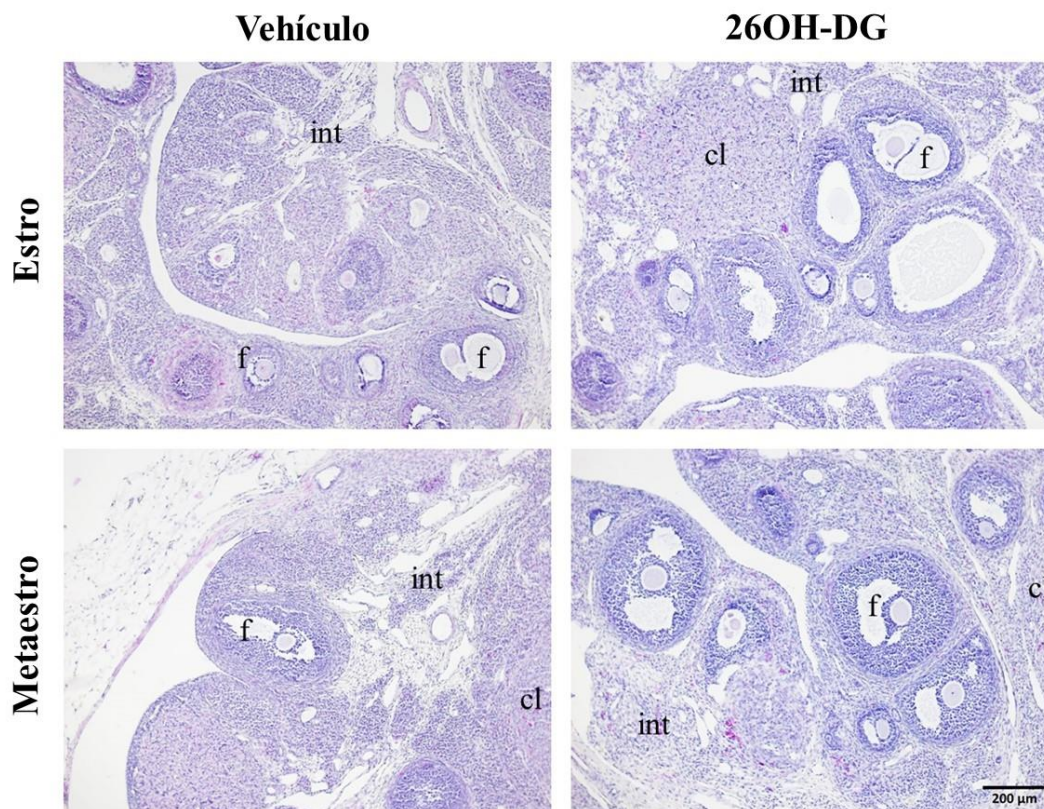


Figura 19. Cortes histológicos representativos de los folículos ováricos teñido con hematoxilina-eosina. En las ratas analizadas en el metaestro, aumentó el número de folículos preantrales y antrales sanos en las ratas administradas con 26OH-DG en relación a los animales administrados con el vehículo.

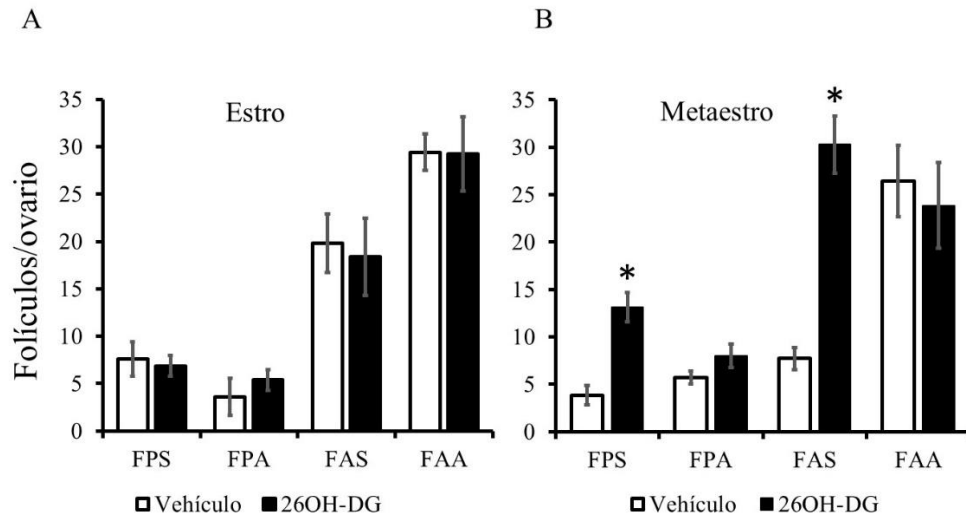


Figura 20. Gráfica de los folículos ováricos de las ratas control o administradas con 26OH-DG. A. ratas analizadas en el estro. B. ratas analizadas en el metaestro. Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM, \* $p \leq 0.05$ , prueba t-Student y ANOVA. FPS, folículos preantrales sanos; FPA, folículos preantrales atrésicos; FAS, folículos antrales sanos; FAA, folículos antrales atrésicos.

### La 26OH-DG incrementa el número de cuerpos lúteos

Contamos los cuerpos lúteos como indicador de ovulación. En las ratas administradas con la 26OH-DG y analizadas en el estro, el número de cuerpos lúteos fue en promedio de  $8.8 \pm 0.8$  comparados con  $7.3 \pm 0.7$  de las ratas administradas con el vehículo. 24 horas después del tratamiento, la 26OH-DG no modificó el número de cuerpos lúteos en los ovarios en relación con las ratas control. En cambio, en los animales analizados en el metaestro, el número de cuerpos lúteos de las ratas administradas con el vehículo o administradas con 26OH-DG fue de  $5.8 \pm 0.5$  y  $9.6 \pm 0.6$  respectivamente, incrementaron 0.65 veces en los ovarios de las ratas tratadas con 26OH-DG. Las imágenes de los cuerpos lúteos representativos y las gráficas se muestran en la (Figura 21).

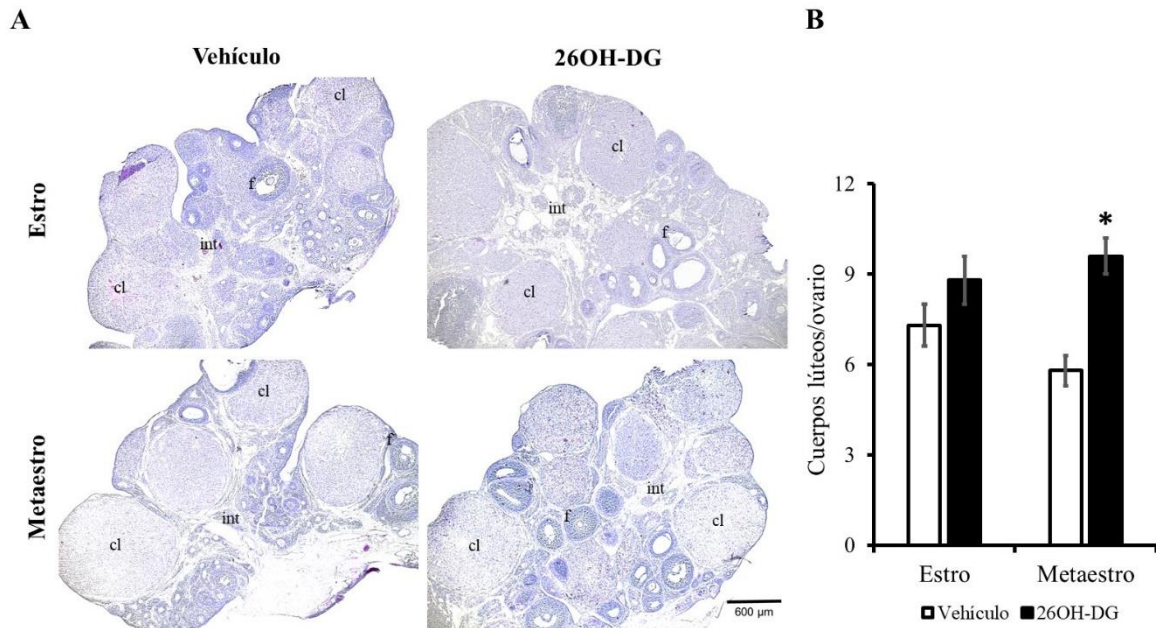


Figura 21. A. Cuerpos lúteos representativos de los ovarios de ratas control o administradas con 26OH-DG teñidos con hematoxilina-eosina. En las ratas analizadas en el metaestro, el número de cuerpos lúteos incremento con la 26OH-DG. f, folículo; cl, cuerpo lúteo; int, intersticio. B. Gráfica de los cuerpos lúteos. Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM, \* $p \leq 0.05$ , prueba t-Student y ANOVA.

### La 26OH-DG disminuye el desarrollo del útero

En las ratas analizadas en el estro, el espesor de la mucosa, endometrio y perimetrio, no se modificó con la administración de la 26OH-DG en comparación con las ratas que fueron administradas con el vehículo (Figura 22). En cambio, en las ratas analizadas en el metaestro, el espesor del miometrio y perimetrio disminuyo en las ratas administradas con 26OH-DG en comparación con las ratas control (Figura 23).

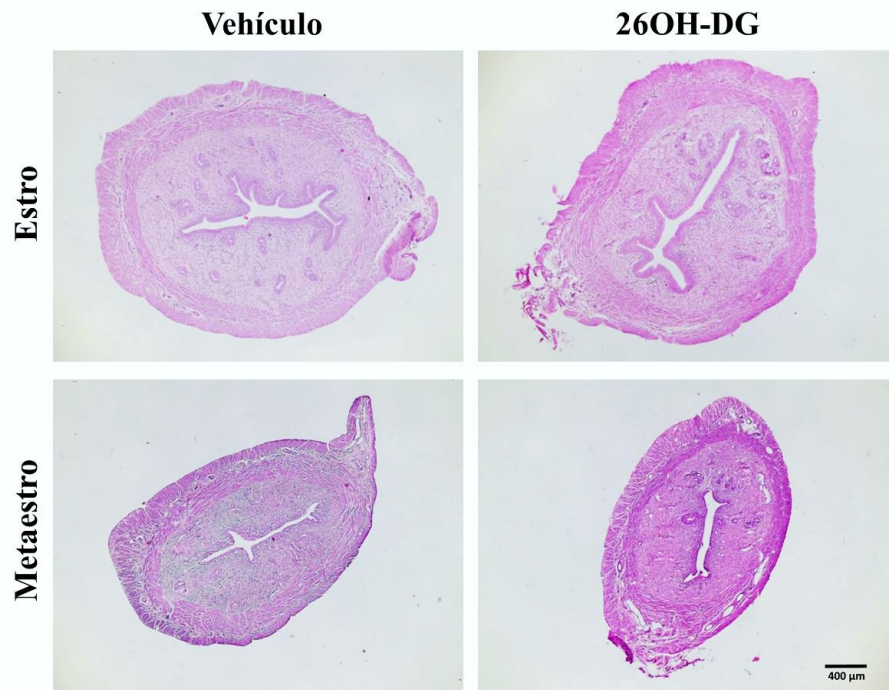


Figura 22. Úteros de rata control o administrada con 26OH-DG y teñidos con hematoxilina-eosina. En las ratas analizadas en el estro, el espesor de las capas del útero no se modificó con la administración de la 26OH-DG.

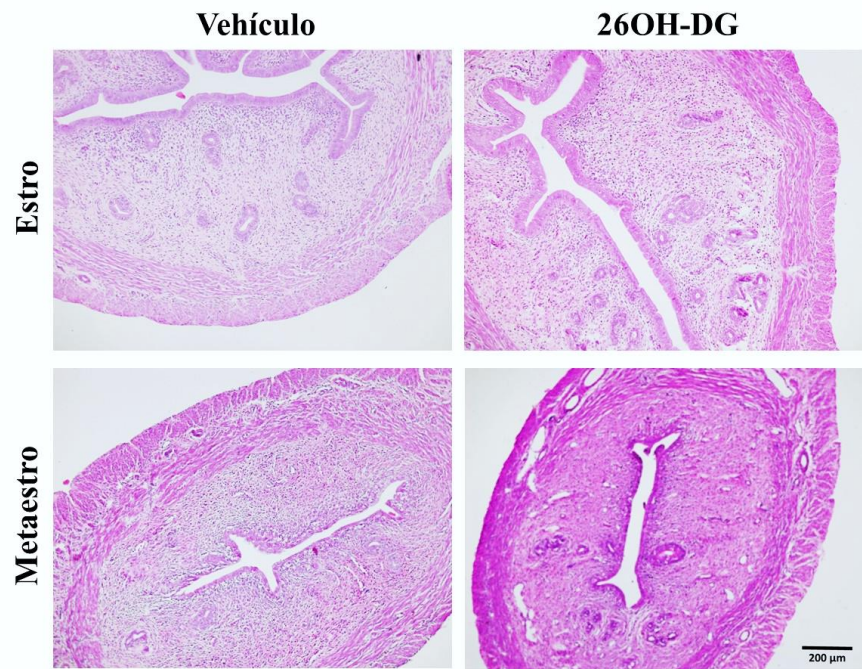


Figura 23. Úteros de rata administrada con 26OH-DG y teñido con hematoxilina-eosina. En los animales analizados en el metaestro, la 26OH-DG disminuyó el espesor del miometrio y perimetrio.

Al medir el espesor de cada una de las capas del útero, encontramos que en las ratas tratadas con la 26OH-DG, el espesor de la mucosa y del endometrio no se modificó, en relación a las ratas administradas con el vehículo (Figura 24A y 24B). Sin embargo, el espesor del miometrio de las ratas analizadas en el estro y administradas con el vehículo o con la 26OH-DG fue de  $195.7 \pm 13.1$  y  $170.9 \pm 7.8$  micras respectivamente, su espesor disminuyó 13%. Una respuesta similar ocurrió en los animales analizados 48 horas después de finalizado el tratamiento (metaestro) donde el espesor del miometrio disminuyó 15% en las ratas tratadas con 26OH-DG,  $147.3 \pm 11.4$  vs  $174 \pm 7.9$  micras obtenido en las ratas control (Figura 24C). El espesor del perimétrio fue de  $164.2 \pm 11$  y  $130.9 \pm 13.6$  micras en las ratas tratadas con 26OH-DG y analizadas en el metaestro, su valor disminuyó 21%. Este efecto no se observó en los animales que fueron analizados en el estro, 24 horas después de finalizar el tratamiento, donde el espesor del perimétrio de las ratas tratadas con 26OH-DG fue similar al obtenido con las ratas control (Figura 24D).

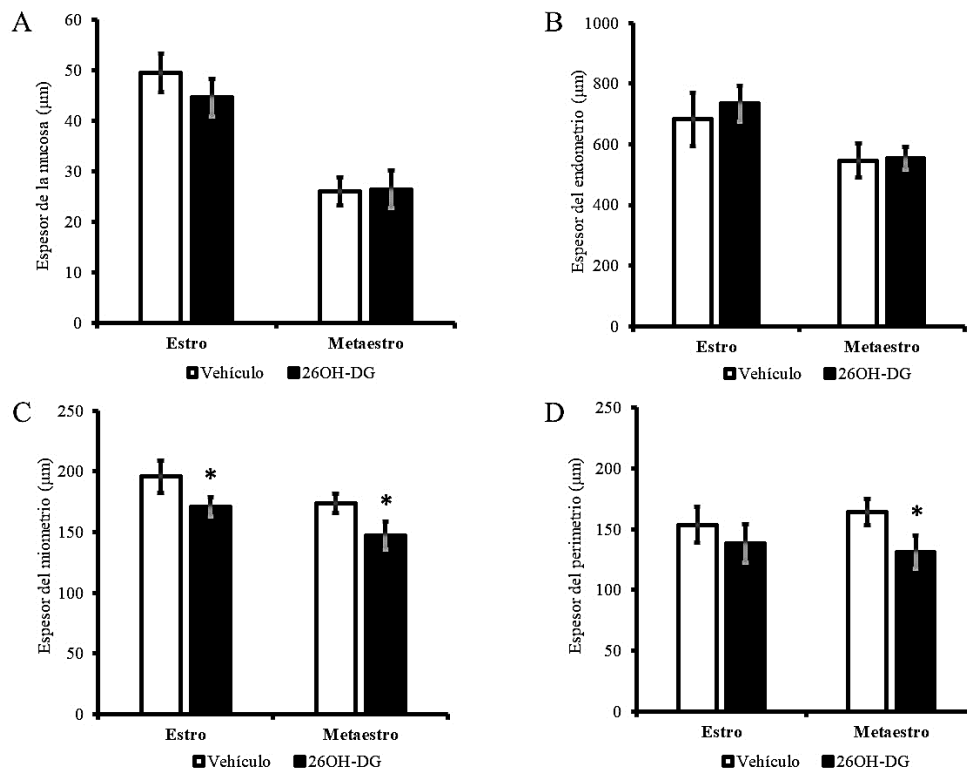


Figura 24. Morfometría de las capas de células del útero; espesor de la mucosa, endometrio, miometrio y perimetrio ( $\mu\text{m}$ ) del útero de las ratas administradas con el vehículo o administradas con 26OH-DG. Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM,  $*p \leq 0.05$ , prueba t-Student y ANOVA.

### La 26OH-DG disminuye el número de glándulas del endometrio

Considerando que las glándulas endometriales están directamente relacionadas con la secreción de glicodelina y con la implantación del blastocisto contamos las glándulas del endometrio. Obtuvimos que, en las ratas analizadas en el estro, la 26OH-DG no modificó el número de glándulas en relación a las ratas control. Sin embargo, cuando las ratas fueron analizadas en el metaestro, el número de glándulas endometriales de las ratas administradas con el vehículo o con la 26OH-DG fue de  $18.1 \pm 1.6$  y  $13.3 \pm 1.7$ , respectivamente. El número de glándulas disminuyó 26.5% en relación a los animales del grupo que fue administrado con el vehículo (Figura 25).

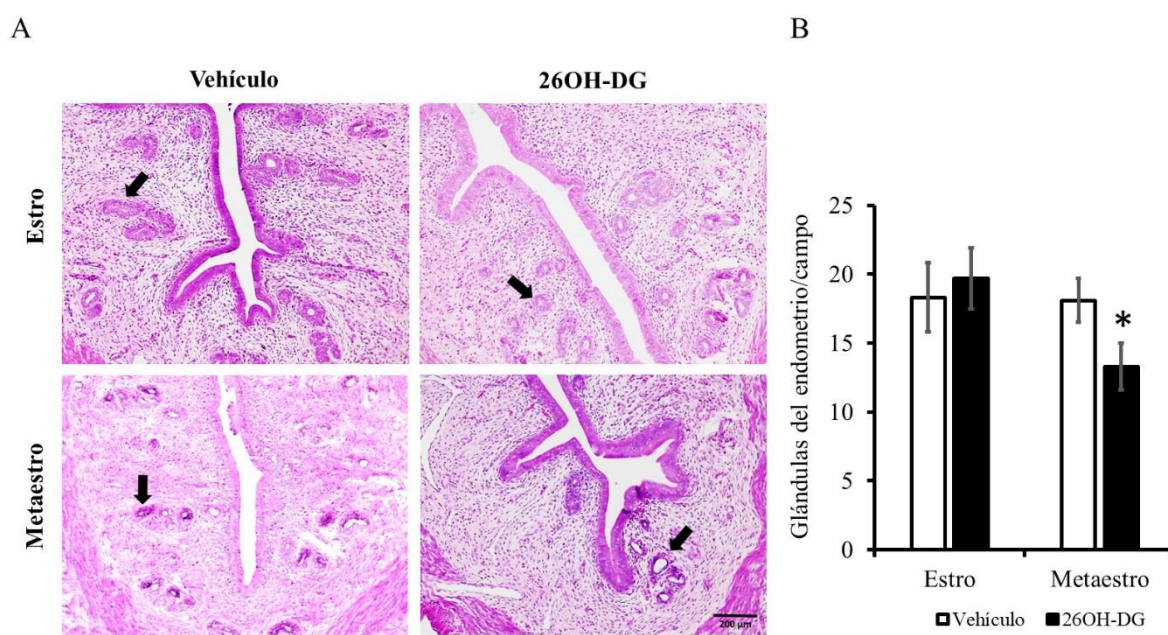


Figura 25. A. Micrografías de las glándulas del endometrio señaladas con flecha. En los animales analizados en el metaestro, la 26OH-DG disminuyó el número de glándulas del endometrio. B. Gráfica de las glándulas. Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM, \* $p \leq 0.05$ , prueba t-Student y ANOVA.

## La 26OH-DG aumenta las células VEGF-positivas en el ovario

Dado que el VEGF es esencial para la formación de vasos sanguíneos necesarios para el intercambio de nutrientes y el desarrollo de las células, contamos las células VEGF-positivas en el intersticio del ovario. Observamos que, en las ratas analizadas en el estro, la 26OH-DG no modificó el número de células intersticiales VEGF-positivas comparado con las ratas control. Sin embargo, cuando las ratas fueron analizadas en el metaestro, el número de células intersticiales VEGF-positivas en los ovarios de las ratas administradas con el vehículo o con la 26OH-DG fue de  $88 \pm 33$  y  $126 \pm 53$  respectivamente. El número de células VEGF-positivo aumento 43.2% en relación a los animales del grupo control (Figura 26).

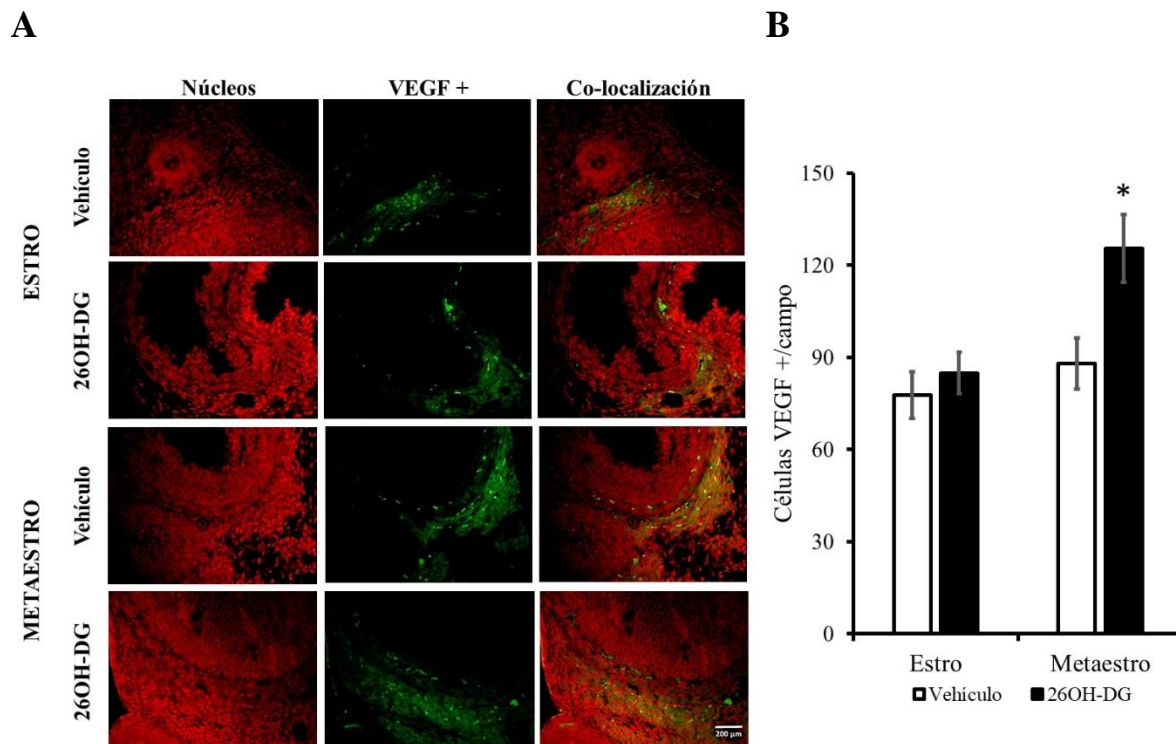


Figura 26. A. Células intersticiales VEGF-positivas en ovario de ratas analizadas en el estro y metaestro. En rojo están los núcleos de las células marcados con yoduro de propidio y en verde las células VEGF-positivas marcadas con FITC. B. Gráfica de las células VEGF-positivas. Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM,  $*p \leq 0.05$ , prueba t-Student y ANOVA.

## Discusión

En esta tesis estudiamos los efectos farmacológicos de la 26OH-DG a dosis baja (50 µg/Kg) sobre el desarrollo folicular, la ovulación y el desarrollo del útero de las ratas Wistar. Cabe recordar que realizamos una dosis de carga y dos dosis de sostén en el metaestro, diestro y proestro, respectivamente. La eutanasia de las ratas fue en el día del estro y metaestro del ciclo estral siguiente a la administración del fármaco.

La duración del ciclo estral de las ratas no se modificó sugiriendo que la 26OH-DG no interviene en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, sistema principal de regulación funcional del ciclo estral de las ratas. Este resultado es importante si consideramos que uno de los efectos secundarios de algunos fármacos como los antidepresivos es la alteración del ciclo estral (Silva et al., 2016) o con el uso de antagonistas al receptor de progesterona en donde afecta la secreción de las gonadotropinas y al ciclo estral (Kubota et al., 2016). Por otro lado, el aumento en el número de folículos preantrales y folículos antrales sanos en el metaestro y no en el estro, es indicativo de que la 26OH-DG estimuló la proliferación de las células de la granulosa y de la teca de los folículos dependiendo de la concentración de las hormonas. En el estro hay baja concentración de estradiol y baja concentración de progesterona, mientras que en el metaestro se mantiene baja la concentración de estradiol pero aumenta la concentración de progesterona (Nelson, 2011; Rodríguez y Pásaro, 1998). Este incremento en el número de folículos ocurrió a las 48 horas después del tratamiento, y no a las 24 horas, indicando que el efecto farmacológico de la 26OH-DG sobre los ovarios también es dependiente del tiempo. Este resultado es similar al reportado con DG que aumentó la viabilidad y la proliferación de las células de Sertoli en cultivos primarios de células testiculares del ratón. Además, el incremento en la proliferación de las células testiculares fue dependiente del tiempo, alcanzando el efecto máximo a las 24 horas con dosis de 2.5 µM (Wu et al., 2015). Cabe precisar que, la DG y la 26OH-DG son químicamente similares, sin embargo, la 26OH-DG es más hidrosoluble que la DG, lo cual modifica sus propiedades farmacocinéticas y de biodisponibilidad. Esto explicaría porque obtuvimos incremento de los folículos preantrales y antrales sanos a las 48 horas y no a las 24 horas después del tratamiento. Otra explicación sobre el mayor número de folículos ováricos es considerando lo que ocurre en las células de Sertoli donde han reportado que la DG estimula la diferenciación y la proliferación de las células al aumentar la translocación

de los receptores a estrógenos a la membrana celular y activando la vía de señalización ERK/Akt. Un efecto similar podría ser activado por la 26OH-DG sobre las células de la granulosa y sobre las células de la teca de los folículos ováricos. Otros factores que podrían estar interviniendo en esta vía de señalización es a través del factor nuclear NFκB y los reguladores positivos del ciclo celular como las ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas, inferencias que debemos probar experimentalmente.

Por otro lado, la 26OH-DG estimuló la ovulación de las ratas. Este efecto farmacológico también fue dependiente del tiempo; 24 horas después del tratamiento el número de cuerpos lúteos no se modificó en relación al control, sin embargo, a las 48 horas después del tratamiento el número de cuerpos lúteos aumentó. Durante la ovulación, los ovarios experimentan cambios estructurales que incluyen la remodelación de la matriz extracelular para facilitar la ruptura de la pared de los folículos preovulatorios, lo que favorece la liberación del ovocito y después la transformación del folículo postovulatorio en cuerpo lúteo. Los cambios en la matriz extracelular del folículo periovulatorio se producen a través de la acción de las metaloproteinasas de la matriz, una familia de enzimas capaces de romper los componentes de la matriz extracelular como el colágeno, la laminina y la fibronectina (Rosewell et al., 2011). El efecto estimulante de la 26OH-DG sobre la ovulación es posible si consideramos que su análogo, la DG, al unirse al receptor 1,25D<sub>3</sub>-MARRS activa la proteólisis en los folículos, rompe la pared de ellos y estimula la ovulación. Específicamente, las metaloproteinasas MMP2/9 tienen relación con el receptor 1,25D<sub>3</sub>-MARRS que actúa como una oxidasa, reductasa, isomerasa y chaperona en el plegamiento de proteínas recién sintetizadas. Si la acción de MMP2/9 se inhibe, aumentan los receptores 1,25D<sub>3</sub>-MARRS en la membrana de las células foliculares. Cabe señalar que los receptores 1,25D<sub>3</sub>-MARRS también tienen afinidad por el 17β-estradiol (Rosewell et al., 2011).

En los ovarios de las ratas también aumento el número de células intersticiales VEGF-positivas a las 48 horas de tratamiento y no a las 24 horas. Este efecto es viable si consideramos que a las 48 horas después del tratamiento, el número de folículos preantrales y antrales sanos se incrementó, aumentando los requerimientos metabólicos del ovario. El incremento de células intersticiales VEGF-positivas promueve la formación y el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, garantizando el aporte de oxígeno y nutrientes necesarios para la supervivencia y el desarrollo de las células foliculares.

Sobre el útero, a las 24 horas después del tratamiento no modificó el espesor de ninguna de las capas celulares que lo conforman, sin embargo, a las 48 horas disminuyó el espesor del miometrio y del perimetrio y disminuyó el número de glándulas del endometrio. Estos hallazgos sugieren que la 26OH-DG disminuye la proliferación de las células del útero, también indica que la 26OH-DG tiene efectos opuestos; en ovario favoreció el desarrollo folicular y la ovulación, y en el útero disminuyó del miometrio, perimetrio y el número de glándulas endometriales. Este efecto dual es posible dado que su análogo, la DG tiene propiedades antiproliferativas (Srinivasan et al., 2009) o proliferativas (Wu et al., 2015; Zhang et al., 2016) dependiendo de la condición hormonal, propuesta que debemos estudiarse con mayor precisión.

### **Conclusión**

La 26OH-DG a dosis de 50 µg/kg aumenta el desarrollo folicular y la ovulación en las ratas Wistar analizadas en el metaestro posterior al tratamiento. También incrementa el número de células intersticiales VEGF-positivas en el ovario. En contraste, en el útero disminuye el espesor del miometrio y perimetrio y el número de glándulas del endometrio. En las ratas analizadas en el estro siguiente al tratamiento, la 26OH-DG no causa modificaciones en comparación con las ratas administradas con el vehículo. El efecto farmacológico de la 26OH-DG es dependiente del tiempo y de la concentración de las hormonas ováricas.

## Referencias

Acconcia F, Totta P, Ogawa S, Cardillo I, Inoue S, Leone S, Trentalance A, Muramatsu M, Marino M. 2005. Survival versus apoptotic 17 $\beta$ -estradiol effect: role of ER $\alpha$  and ER $\beta$  activated non-genomic signalling. *Journal of Cellular Physiology*, 203(1):193–201.

Adair TH, Montani JP. 2010. *Angiogenesis*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences. Chapter 1.

Amaro J, Martínez MI, Fernández-Herrera MA, Sandoval Ramírez J, Luna F. 2014. Efecto de la (26R)-26-hidroxidiosgenina sobre el sistema reproductor de las ratas Wistar. *LVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas*, Oaxaca, Oaxaca, México. L53.

Beneytout JL, Nappez C, Leboutet MJ, Malinvaud G. 1995. A plant steroid, diosgenin, a new megakaryocytic differentiation inducer of HEL cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 207(1):398-404.

Björnström L, Sjöberg M. 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular Endocrinology*, 19(4):833-842.

Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA. 2012. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS ONE* 7(4): e35538.

Cailleteau C, Liagre B, Beneytout JL. 2009. A proteomic approach to the identification of molecular targets in subsequent apoptosis of HEL cells after diosgenin-induced megakaryocytic differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 107(4):785-796.

Chen PS, Shih YW, Huang HC, Cheng HW. 2011. Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits migration and invasion of human prostate cancer PC-3 cells by reducing matrix metalloproteinases expression. *PLoS ONE* 6(5): e20164.

Chen Y, Tang YM, Yu SL, Han YW, Kou JP, Liu BL, Yu BY. 2015. Advances in the pharmacological activities and mechanisms of diosgenin. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13(8):0578-0587.

Chiang CT, Way TD, Tsai SJ, Lin JK. 2007. Diosgenin, a naturally occurring steroid, suppresses fatty acid synthase expression in HER2-overexpressing breast cancer cells through modulating Akt, mTOR and JNK phosphorylation. *FEBS Letters* 581(30): 5735-5742.

Cora MC, Kooistra L, Travlos G. 2015. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicologic Pathology*, 43(6): 776-793.

Foster JS, Henley DC, Ahamed S. 2001. Estrogens and cell-cycle regulation in breast cancer. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 12(7):320–327.

Galvão AM, Ferreira-Dias G, Skarzynski DJ. 2013. Cytokines and angiogenesis in the corpus luteum. *Mediators of Inflammation*, 2013: 420186.

Gerber HP, Malik AK, Solar GP, Sherman D, Liang XH, Meng G, Hong K, Marsters JC, Ferrara N. 2002. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature*, 417(6892):954-958.

Guirado Blanco Otmara. 2007. Expresión de las proteínas p21 Ras y cáncer. *Medicentro*, 11(1).

Hilario-Martínez C, Sandoval-Ramírez J, Luna F, Fernández-Herrera MA, Amaro J, Martínez I. Biological effects of diosgenin and 26-hydroxydiosgenin in the rat reproductive system. EFMC-YMCS. 2<sup>nd</sup> EFMC Young Medical Chemist Symposium. Antwerp, Belgium-September 17, 2015. 047.

Kahlert S, Nuedling S, van Eickels M, Vetter H, Meyer R, Grohe C. 2000. Estrogen receptor  $\alpha$  rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (24):18447–18453.

Kubota K, Cui W, Dhakal P, Wolfe MW, Rumi MA, Vivian JL, Roby KF, Soares MJ. 2016. Rethinking progesterone regulation of female reproductive cyclicity. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(15):4212-4217.

Leger DY, Liagre B, Cardot PJ, Beneytout JL, Battu S. 2004a. Diosgenin dose-dependent apoptosis and differentiation induction in human erythroleukemia cell line and sedimentation field-flow fractionation monitoring. *Analytical Biochemistry*, 335(2):267-278.

Leger DY, Liagre B, Corbière C, Cook-Moreau J, Beneytout JL. 2004b. Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in HEL cells with increase in intracellular calcium level, activation of cPLA2 and COX-2 overexpression. *International Journal of Oncology*, 25(3):555-562.

Liagre B, Leger DY, Vergne-Salle P, Beneytout JL. 2007. MAP kinase subtypes and Akt regulate diosgenin-induced apoptosis of rheumatoid synovial cells in association with COX-2 expression and prostanoid production. *International Journal of Molecular Medicine*, 19(1):113-122.

Liagre B, Vergne-Salle P, Corbiere C, Charissoux LJ, Beneytout JL. 2004. Diosgenin, a plant steroid, induces apoptosis in human rheumatoid arthritis synoviocytes with cyclooxygenase-2 overexpression. *Arthritis Research & Therapy*, 6(4): R373-R383.

Manivannan J, Arunagiri P, Sivasubramanian J, Balamurugan E. 2013. Diosgenin prevents hepatic oxidative stress, lipid peroxidation and molecular alterations in chronic renal failure rats. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 3(3): 289-293.

- Marino M, Acconcia F, Bresciani F, Weisz A, Trentalance A. 2002. Distinct nongenomic signal transduction pathways controlled by 17 $\beta$ -estradiol regulate DNA synthesis and cyclin D1 gene transcription in HepG2 cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(10):3720–3729.
- Matthews J, Gustafsson JA. 2003. Estrogen signalling: A subtle balance between ER $\alpha$  and ER $\beta$ . *Molecular Interventions*, 3(5):281–292.
- Messinis IE. 2006. Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications. *Human Reproduction Update*, 12(5): 557-571.
- Moggs JG, Orphanides G. 2001. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO Reports*, 2(9):775-81.
- Mu S, Tian X, Ruan Y, Liu Y, Bian D, Ma C, Yu C, Feng M, Wang F, Gao L, Zhao JJ. 2012. Diosgenin induces apoptosis in IGF-1-stimulated human thyrocytes through two caspase-dependent pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 418(2): 347-352.
- Nelson RJ. 2011. *An introduction to behavioral endocrinology*. 4<sup>th</sup> ed. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. pp 275-319.
- Norton AS. 1998. Corticosteroids, strophanthus, and dioscorea. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 38(2): 256-259.
- O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U. 2004. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Molecular Endocrinology*, 18(8):1859–1875.
- Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL, Leitman DC. 2004. Estrogen receptor  $\beta$  inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Research*, 64(1):423–428.
- Prescott SM. 2000. Is cyclooxygenase-2 the alpha and the omega in cancer? *The Journal of Clinical Investigation*, 105(11): 1511-1513.
- Pinzón CE, MD, Serrano ML, PhD, Sanabria MC, MSc3. 2009. Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos. *Revista de Ciencias de la Salud*, 7(2): 47-66.
- Raju J, Bird PR. 2007. Diosgenin, a naturally occurring furostanol saponin suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase expression and induces apoptosis in HCT-116 human colon carcinoma cells. *Cancer Letters*, 255:194-204.
- Rodríguez RM, Pásaro M-R. 1998. Control endocrino del ciclo reproductor de la rata: una experiencia docente utilizando un método de caracterización citológico. *Revista de Enseñanza Universitaria*, pp 545-554.

Roghani-Dehkordi F, Roghani M, Baluchnejadmojarad T. 2015. Diosgenin mitigates streptozotocin diabetes-induced vascular dysfunction of the rat aorta: the involved mechanisms. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 66(6): 584-592.

Rosewell K, Linah Al-Alem, Feixue Li, Brian Kelty, Thomas E. Curry, Jr. 2011. Identification of Hepsin and Protein Disulfide Isomerase A3 as Targets of Gelatinolytic Action in Rat Ovarian Granulosa Cells During the Periovulatory Period, 85(4): 858–866.

Shibuya M. 2011. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer*, 2(12):1097-1105.

Shimizu T. 2016. Molecular and cellular mechanisms for the regulation of ovarian follicular function in cows. *Journal of Reproduction and Development*, 62(4):323-329.

Silva AF, Sousa DS, Medeiros AM, Macêdo PT, Leão AH, Ribeiro AM, Izídio GS, Silva RH. 2016. Sex and estrous cycle influence diazepam effects on anxiety and memory: Possible role of progesterone. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 70:68-76

Simoncini T, Rabkin E, Liao JK. 2003. Molecular basis of cell membrane estrogen receptor interaction with phosphatidylinositol 3-kinase in endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 23(2):198-203.

Srinivasan S, Koduru S, Kumar R, Venguswamy G, Kyprianou N, Damodaran C. 2009. Diosgenin targets Akt-mediated prosurvival signaling in human breast cancer cells. *International Journal of Cancer*, 125(4): 961-967.

Takahashi T, Ueno H, Shibuya M. 1999. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene*, 18(13):2221-2230.

Tohda C, Lee YA, Goto Y, Nemere I. 2013. Diosgenin-induced cognitive enhancement in normal mice is mediated by 1,25D<sub>3</sub>-MARRS. *Scientific Reports*, 3:3395.

Tohda C, Urano T, Umezaki M, Nemere I, Kuboyama T. 2012. Diosgenin is an exogenous activator of 1,25D<sub>3</sub>-MARRS/Pdia3/ERp57 and improves Alzheimer's disease pathologies in 5XFAD mice. *Scientific Reports*, 2: 535.

Uemura T, Goto T, Kang MS, Mizoguchi N, Hirai S, Lee JY, Nakano Y, Shono J, Hoshino S, Taketani K, Tsuge N, Narukami T, Makishima M, Takahashi N, Kawada T. 2011. Diosgenin, the main aglycon of fenugreek, inhibits LXR $\alpha$  activity in HepG2 cells and decreases plasma and hepatic triglycerides in obese diabetic Mice1–3. *The Journal of Nutrition*, 141(1): 17-23.

Westwood FR. 2008. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicologic Pathology*, 36(3): 375-384.

Woad KJ, Robinson RS. 2016. Luteal angiogenesis and its control. *Theriogenology*, 86(1):221-228.

Wu L, Dong H, Zhao J, Wang Y, Yang Q, Jia C, Ma J. 2015. Diosgenin stimulates rat TM4 cell proliferation through activating plasma membrane translocation and transcriptional activity of estrogen receptors. *Biology of Reproduction*, 92(1):1-10.

Zhang D, Trudeau VL. 2006. Integration of membrane and nuclear estrogen receptor signaling. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 144(3): 306–315.

Zhang X, Xue X, Zhao J, Qian C, Guo Z, Ito Y, Sun W. 2016. Diosgenin attenuates the brain injury induced by transient focal cerebral ischemia-reperfusion in rats. *Steroids*, 113: 103-112.



### **La (26R)-26-hidroxidiosgenina aumenta el desarrollo folicular y la ovulación en las ratas**

**Campos Sandoval Alejandro**<sup>1</sup> (estudiante de licenciatura), García Castañeda Javier<sup>1</sup>, Alatríste Victorino<sup>1</sup>, Martínez María Isabel<sup>1</sup>, Sandoval-Ramírez Jesús<sup>2</sup> y Luna Félix<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacia, FCQ-BUAP, Puebla CP 72570, México

<sup>2</sup>Lab. de Síntesis y Modificación de Productos Naturales, FCQ-BUAP, Puebla CP 72570, México.

La (26R)-26-hidroxidiosgenina (26OH-DG) es un derivado sintético de la diosgenina (DG), ésta última abundante en los tubérculos de la planta *Dioscorea mexicana* y usada en la industria farmacéutica como precursor de fármacos anticancerígenos y osteogénicos. Previamente reportamos que la 26OH-DG (50mg/kg, i.p.) induce atresia folicular ovárica en las ratas. Aquí, nuestro objetivo fue evaluar los efectos de 26OH-DG a dosis baja sobre el ciclo estral (CE), el desarrollo folicular y la ovulación. Empleamos 32 ratas Wistar adultas, divididas en 4 grupos (n=8). Dos grupos de ratas a las que les administramos 26OH-DG (50µg/Kg, i.p.) en la mañana (8:00-10:00 horas) del día del metaestro, diestro y proestro. Las ratas control fueron administradas con el vehículo (solución salina isotónica [SSI], i.p.). En el estro o el metaestro siguiente, las ratas se anestesiaron con CO<sub>2</sub> y después se realizó la perfusión de SSI y paraformaldehído salino PBS (PF-PBS) por vía intracardiaca. Los ovarios fueron post-fijados en PF-PBS e incluidos en parafina. Posteriormente, se realizaron cortes histológicos seriados (5µm) que fueron teñidos con H&E. Los folículos ováricos y los cuerpos lúteos (CL) fueron contados con ayuda de un microscopio óptico acoplado a una cámara y PC. Con 50µg/kg de 26OH-DG no se modificó la duración del CE, pero aumentó significativamente el número de folículos secundarios y terciarios sanos y el número de CL. Concluimos que, la 26OH-DG administrada a dosis bajas y repetidas estimula el desarrollo folicular y la ovulación. Inferimos que es una molécula potencialmente útil como agente para la terapia de reemplazo hormonal.



SOCIEDAD MEXICANA DE  
CIENCIAS FISIOLÓGICAS, A.C.

Otorga la presente

## CONSTANCIA

a:

**Alejandro Campos Sandoval**

Quien asistió y presentó el trabajo

La (26R)-26-hidroxidiosgenina aumenta el desarrollo folicular y la ovulación en las ratas

Por:

**Campos Sandoval Alejandro (estudiante de licenciatura), García Castañeda Javier,  
Alatrste Victorino, Martínez María Isabel, Sandoval-Ramírez Jesús, Luna Félix**

En la modalidad de presentación cartel durante el  
LX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas  
del 13 al 17 de agosto en la ciudad de Monterrey, Nuevo León

Atentamente  
Por el Comité Organizador

**Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza**

**Dr. Jesús Hernández Falcón**

**Dr. Benjamín Florán Garduño**

**Dr. Rodolfo Delgado Lezama**