



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
INSTITUTO DE CIENCIAS**



TESIS

**ESTUDIO DE LA ADMINISTRACIÓN LOCAL DE UN ANTIOXIDANTE EN UN MODELO DE
HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA: ANÁLISIS COMPARATIVO CON LA ADMINISTRACIÓN
LOCAL DE UN AGONISTA DEL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO 2**

TESIS O TESINA PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS
ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PRESENTA:

M.C. DULCE ELENA LETRAS LUNA

DIRECTOR DE TESIS

D.C. NORA HILDA ROSAS MURRIETA
INSTITUTO DE CIENCIAS
BUAP

ASESOR DE TESIS

D.C. JOSÉ LUIS MORÁN PERALES
INSTITUTO DE CIENCIAS
BUAP

Diciembre 2024

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a los miembros de mi comité revisor por su valioso tiempo y aportaciones, que enriquecieron este trabajo.

A mis tutores, la Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta y el Dr. José Luis Morán, por su guía, paciencia y compromiso durante este proceso.

A mi familia, por ser mi mayor fortaleza, y a mis amigos, por su apoyo incondicional en cada etapa de este camino. Su confianza y aliento han sido fundamentales para la culminación de este proyecto.

“El paso más importante que puede dar alguien. No es el primero, ¿verdad?

Es el próximo. Siempre el próximo paso”

Juramentada, Brandon Sanderson

ABREVIATURAS

4-HDA: 4-hidroxialquenas	ER α : Receptores de estrógeno alfa
4-HNE: Aldeídos como el 4-hidroxinonenal	ER β : Receptores de estrógeno beta
AC: Adenilato ciclasa	FAK: Quinasa de adhesión focal
Ad4BP: Proteína de unión a Ad4	FHC: Ferritina de cadena pesada
ADAMTS- 1: Proteasa metalopeptidasa con motivos trombospondina tipo 1	FIGLA: Factor de transcripción específico bHLH para la foliculogénesis
AF: Folículos antrales	FIV: Fertilización in vitro
AMPA: Ácido 3,5-hidroximetil-4-isoxazol-propiónico	FSH: Hormona folículo estimulante
bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos básico	FSHR: Receptor a FSH
bHLH : Hélice-bucle-hélice-básica	GABA A: Ácido γ -aminobutírico A
BMP: Proteínas morfogenéticas óseas	GDF-9: Factor de crecimiento diferencial 9
BMP-15: Proteína morfogénica ósea 15	GH: Hormona de crecimiento
cAMP: Adenosín monofosfato cíclico	GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas
CBM: Complejo Carma3/Bcl10/Malt1	GPCR: Receptores acoplados a proteínas G
Cdk5: Quinasa dependiente de ciclina 5	GPx: Glutación peroxidasa
CGP: Células germinales primordiales	GSK-3 β : Glucógeno sintasa quinasa-3 beta
CL: Cuerpos lúteos	GST-pi: Glutación S-transferasa pi
COMT: Catecol-O-metiltransferasa	HAT: Transferencia de átomos de hidrógeno
DARPP-32: Fosfoproteína regulada por cAMP y dopamina de 32 kDa	hCG: Gonadotropina coriónica humana
DAT: Transportador de dopamina	hCG: Hormona coriónica gonadotrópica humana
DDH1 o AKR1C1: Dihidrodiol deshidrogenasa	HIF-1 α : Factor inducible por hipoxia 1 alfa
E2: estradiol	HO-1: Oxigenasa-1 de hemo
EB: Azul de Evans	HO-2: Oxigenasa de hemo 2
EGF: Factor de crecimiento epidérmico	ICSI: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial	IGF-1: Factor de crecimiento similar a la insulina 1
ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares	IU: Inseminación intrauterina
ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares	IL-1: Interleucina-1

IL-1 β : Interleucina-1 beta

IL6: Interleucina-6

IL-8: Interleucina 8

JNK : Quinasa N-terminal c-Jun

LGCs: Células granulosa luteinizadas

LH: Hormona luteinizante

LHR: Receptor a LH

MAO-A: Monoaminoxidasas A

MAO-B: Monoaminoxidasas B

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

MAPK: Quinasa de proteína activada por mitógenos

MDA: Malondialdehído

MT3: Metalotioneína-3

NAC: N-acetilcisteína

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato de hidrógeno

NE: Norepinefrina

NF κ B: Factor de Necrosis Tumoral de Factor Nuclear Kappa B

NGF: Factor de crecimiento nervioso

NMDA: N-metil-D-aspartato

NPR-1: Receptor de neuropilina-1

NPR-2: Receptor de neuropilina-2

NQO1: NADPH quinona deshidrogenasa 1

P4: Progesterona

P450AROM: Enzima aromatasa P450

p70S6K: Quinasa de proteína S6 ribosomal

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PF: Folículos preantrales

PGE2: Prostaglandina E2

PGF2 α : Prostaglandina F2 α

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa

PIGF: Factor de crecimiento placentario

PIP3: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

PKA: Proteína Quinasa A

PKB: Quinasa de proteínas B

PKC- δ : Quinasa de proteína C delta

PLC γ : Fosfolipasa C γ

PLD: de fosfolipasa D

PMSG: Gonadotropina coriónica equina

pNrf2: Factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2 fosforilado

PO: Folículos preovulatorios

PON2: Paraoxonasa 2

PP1: Fosfatasa de proteínas 1

PPAR: Receptor activado por el proliferador de peroxisomas

proteínas G: Proteínas de unión a nucleótidos de guanosina

PTEN: Homólogo de tensina

RDA: Receptores de dopamina

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SAPK2: Proteína quinasa 2 activada por estrés

SCF: Factor de células madre

SERM: Moduladores selectivos del receptor de estrógeno

SET: Transferencia de electrones de un solo electrón

SHO: Síndrome de hiperestimulación ovárica

SHP-2: Proteína tirosina fosfatasa con dominios SH2

SOD: Superóxido dismutasa

Sohlh1 y Sohlh2: bHLH básico específico de espermatogénesis y oogénesis 1 y 2

SOP: Síndrome de ovario poliquístico

SSI: Solución salina isotónica

TGF: Factor de crecimiento transformante

TH: Tirosina hidroxilasa

TNF: Factor de necrosis tumoral

TRA: Técnicas de reproducción asistida

TrkA: Receptor de tirosina quinasa

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VEGFR-2: Receptor tipo 2 del VEGF

VMAT2: Transportador vesicular de monoaminas 2

ÍNDICE	
ABREVIATURAS.....	3
RESUMEN	8
MARCO TEÓRICO.....	8
Morfología y función ovárica.....	8
Desarrollo folicular	11
Ovulación	14
Infertilidad y reproducción asistida	18
Síndrome de hiperestimulación ovárica	21
VEGF y vías de señalización	23
Receptores de dopamina y vías de señalización.....	27
Dopamina en el ovario	30
Sistema dopaminérgico en patologías ováricas.....	35
<i>Cáncer de ovario</i>	35
<i>Síndrome de ovario poliquístico</i>	37
Especies reactivas de oxígeno y balance óxido-reducción.....	38
Papel de las ROS en la función ovárica	40
Dopamina, VEGF y ROS	42
ANTECEDENTES	44
Estrés oxidativo en el SHO.....	46
Mecanismo de acción de la NAC	48
JUSTIFICACIÓN	49
HIPÓTESIS.....	50
OBJETIVO GENERAL.....	50
Objetivos particulares	50
METODOLOGÍA	50
Análisis <i>in silico</i>	50
<i>Acoplamiento proteína-proteína</i>	50
<i>Acoplamiento Molecular</i>	51
<i>Preparación de las proteínas</i>	51
<i>Preparación de los ligandos</i>	51
<i>Docking</i>	52
Análisis <i>in vivo</i>	52
<i>Modelo de SHO in vivo</i>	52
<i>Protocolos de tratamiento hormonal</i>	52
<i>Técnica de la microinyección</i>	53
<i>Procedimiento post-Tratamiento y autopsia de los animales</i>	53
<i>Evaluación del peso corporal, masa ovárica y masa uterina</i>	54
<i>Evaluación de la permeabilidad vascular</i>	54

<i>Procesamiento de homogeneizados de tejido ovárico</i>	55
<i>Cuantificación de lipoperoxidación: MDA y 4HDA</i>	55
<i>Cuantificación de nitritos</i>	55
<i>Histología ovárica y conteo de folículos</i>	56
<i>Medición de la concentración de VEGF-A en suero</i>	56
<i>Análisis estadístico</i>	57
RESULTADOS.....	57
<i>Interacción entre el RDA2 y el VEGFR-2</i>	57
<i>Acomplamiento molecular entre dos agonistas dopaminérgicos y dopamina con el RDA2</i>	58
Estudio <i>in vivo</i>	63
<i>Validación del modelo in vivo del SHO</i>	63
<i>Marcadores de estrés oxidativo incrementados asociados con el SHO</i>	64
<i>El SHO produce cambios en la distribución de la población folicular y de cuerpos lúteos</i>	65
<i>La cabergolina y la NAC reducen la permeabilidad vascular de manera dosis dependiente a través de la disminución de VEGF-A</i>	66
<i>La NAC atenúa las alteraciones inducidas por el SHO sobre los parámetros ováricos y uterinos en contrastante al agonista dopaminérgico</i>	68
<i>Altas dosis de NAC mitigan la lipoperoxidación y los niveles de NO, exhibiendo efectos contrastantes en comparación con la cabergolina</i>	70
DISCUSIÓN	72
Estudio <i>in silico</i>	72
Estudio <i>in vivo</i>	73
CONCLUSIONES	77
PERSPECTIVAS	78
ANEXOS	80
BIBLIOGRAFÍA.....	84

RESUMEN

En este estudio, se investigó el efecto terapéutico de la administración intrabursa-ovárica de dos agentes farmacológicos, cabergolina y N-acetilcisteína (NAC), sobre el síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) en ratas inmaduras. El SHO es una complicación grave asociada con técnicas de reproducción asistida. El objetivo de esta investigación fue comprender como un agonista de dopamina (cabergolina) y un antioxidante (N-acetilcisteína) pueden influir en la prevención o mitigación de la aparición y progresión del SHO. Para ello se realizaron medidas del peso corporal, ovárico y uterino, y se analizaron las concentraciones del factor de crecimiento endotelial vascular tipo A (VEGF-A), un indicador clave de la angiogénesis y la permeabilidad vascular. Se midieron los niveles ováricos de algunos metabolitos de estrés oxidativo, como MDA, 4-HDA y los nitritos. La evaluación de la permeabilidad vascular en la cavidad peritoneal y el análisis morfológico de los ovarios también se evaluaron. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de una vía o T de Student, según el caso, considerando un valor de $P < 0.05$ como significativo. Los resultados revelaron que el SHO induce un aumento significativo en la lipoperoxidación, los niveles de nitritos, las concentraciones de VEGF-A, la permeabilidad vascular y el peso de los tejidos uterinos y ováricos, lo que subraya la gravedad del síndrome y su impacto en la fisiología ovárica. La administración de cabergolina tuvo efectos notables en la reducción de la permeabilidad vascular y los niveles de VEGF-A, resaltando su potencial para mitigar algunos de los aspectos más perjudiciales del SHO, específicamente aquellos relacionados con la función ovárica. Por otro lado, la NAC demostró ser particularmente eficaz en diversas concentraciones. A dosis bajas, redujo significativamente los pesos ováricos y uterinos, así como los niveles de VEGF-A y la permeabilidad vascular, promoviendo un ambiente folicular más equilibrado y saludable. A dosis más altas, la NAC logró disminuir los niveles de nitritos y lipoperoxidación, indicando una reducción del estrés oxidativo, aunque sin influir de manera significativa en otros parámetros evaluados. Estos hallazgos sugieren que la NAC, ofrece una prometedora estrategia terapéutica para el manejo del SHO, al modificar parámetros cruciales asociados con el síndrome. La capacidad de esta sustancia para alterar de manera significativa indicadores clave de estrés oxidativo, inflamación y desequilibrio hormonal abre nuevas vías para la investigación sobre sus mecanismos de acción y su potencial como tratamiento. Los hallazgos reportados alientan una exploración más profunda y detallada de cómo la cabergolina y la NAC pueden ser integradas en estrategias terapéuticas más efectivas para el tratamiento del SHO, ya que pudieran mejorar la salud de pacientes sometidos a técnicas de reproducción asistida.

MARCO TEÓRICO

Morfología y función ovárica

El ovario de los mamíferos es un órgano par ubicado en la cavidad peritoneal que se encuentra a cada lado del útero; está ligado por el *mesovarium* al ligamento superior ancho desde el útero hasta la pared de la cavidad pélvica (Gougeon, 1996). Constituye la unidad estructural y funcional del sistema reproductor femenino, cuyas funciones son reguladas por las gonadotropinas hipofisarias, hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), las cuales están coordinadas con las propias secreciones del ovario (Rimon-Dahari et al., 2016)

Al examinar el ovario maduro, mediante una sección media sagital, se distinguen dos regiones distintas: la corteza externa y la médula interna. La superficie del ovario está cubierta por una capa de células cúbicas conocida como epitelio germinal, la cual está rodeada por una capa de tejido conectivo colagenoso conocida como túnica albugínea (Espey & Richards, 2006). Los folículos en estado de reposo se localizan en la corteza ovárica, justo debajo de la túnica albugínea, en una zona

avascular. Los folículos en desarrollo ya sean sanos o en proceso de atresia, junto con los cuerpos lúteos, tanto recientes como envejecidos, se sitúan cerca de la médula cortical, una zona rica en vascularización. Los folículos se encuentran inmersos en un entorno dinámico y complejo compuesto por células estromales, vasos sanguíneos y ramificaciones del sistema nervioso autónomo. La médula ovárica alberga una densa red de tejido conectivo que rodea a las células estromales, así como a los vasos sanguíneos y linfáticos (Gougeon, 1996) (Fig. 1).

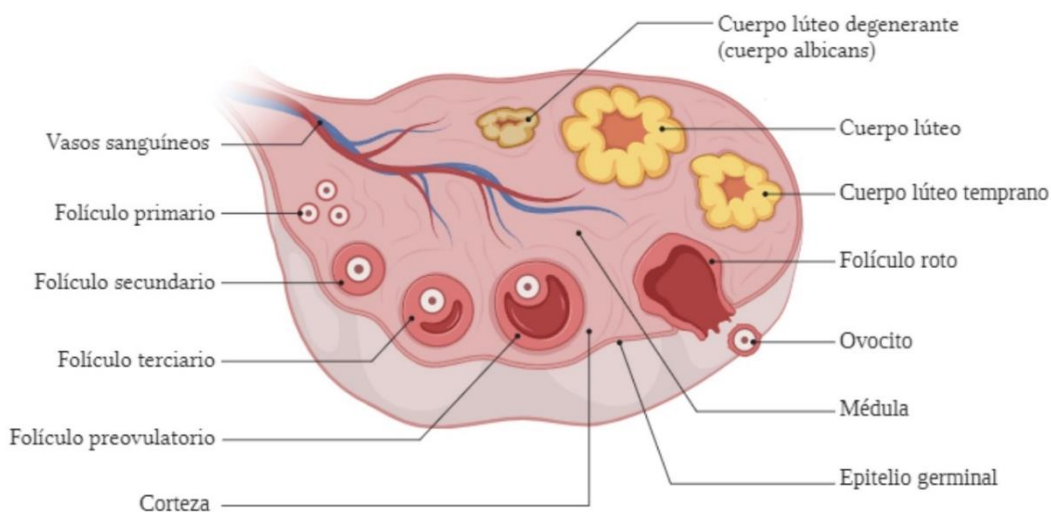


Figura 1. Representación de la estructura del ovario y sus principales componentes anatómico-funcionales. El ovario se diferencia en dos zonas: Médula y corteza. En la médula se observa la inervación y vascularización que recibe el ovario, mientras que en la corteza se encuentran folículos en diferentes estadios del desarrollo. A partir de un folículo primordial, el folículo pasa por diversas etapas de desarrollo antes de ser expulsado durante la ovulación: primario, secundario, antral y preovulatorio. Posterior a la ovulación, las células de la granulosa y teca interna restantes se convertirán en el cuerpo lúteo. Created with Biorender.

El estroma ovárico alberga cuatro tipos principales de células intersticiales, clasificadas según sus características y ubicación dentro del ovario como primarias, tecales, secundarias e hiliares. Las células intersticiales primarias emergen en el ovario durante el desarrollo fetal y desaparecen posteriormente. De especial importancia son las células intersticiales tecales, originadas en el estroma, que migran hacia la membrana basal del folículo. Allí, se organizan en capas para formar las tecas interna y externa tras su diferenciación y adquisición de receptores para LH (Williams & Erickson, 2000). Esta migración hacia la membrana basal ocurre cuando el ovocito madura y el folículo presenta dos o tres capas de células granulosas (Lunenfeld & Insler, 1993). En casos donde los folículos no ovulan y sufren atresia, las células tecales intersticiales se convierten en células intersticiales secundarias, agrupándose en formaciones glandulares dispersas a lo largo del estroma,

constituyendo lo que se conoce como glándula intersticial (Hsueh et al., 1994). Las células intersticiales hiliares, ubicadas en el hilio ovárico, presentan similitudes con las células de Leydig del testículo (Williams & Erickson, 2000).

El ovario y los testículos, junto con la glándula adrenal, son responsables de la producción y liberación de hormonas esteroides derivadas del colesterol, todo bajo la regulación del eje hipotálamo-adenohipófisis. Las funciones primordiales de las gónadas en los adultos abarcan la síntesis de hormonas esteroides y la producción de gametos, o células sexuales maduras. Las hormonas esteroides juegan un papel crucial en la diferenciación sexual, el desarrollo fetal, así como en el crecimiento y maduración sexual (Nussey & Whitehead, 2001) (Fig. 2).

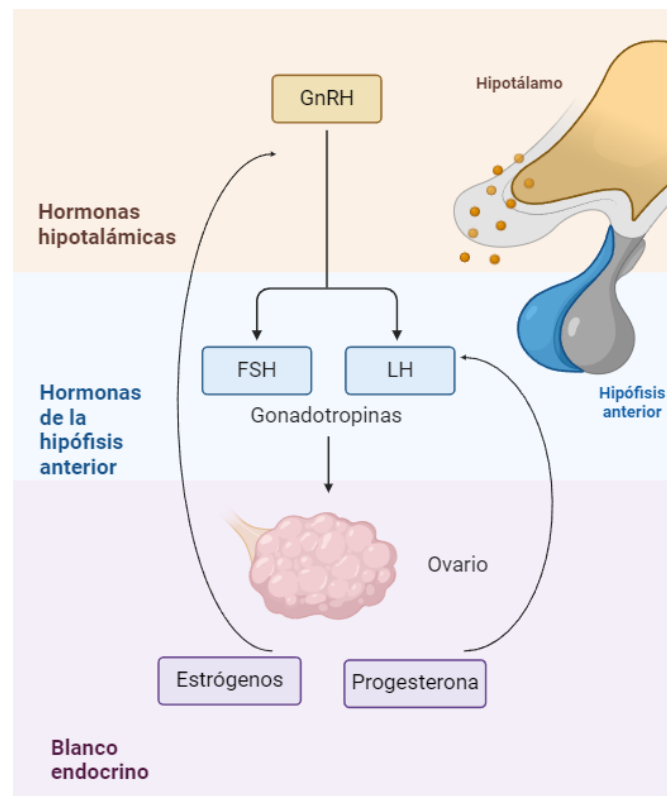


Figura 2. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario. De manera general, la GnRH viaja por el sistema porta hipotalámico hipofisiario hasta la adenohipófisis, en respuesta, se secreta FSH y LH, ambas hormonas llegan al ovario donde se unen a sus receptores en los tejidos funcionales de la gónada (Basado en Herbison, 2016) Created with Biorender.

La capacidad reproductiva de las hembras se caracteriza por su naturaleza cíclica, aspecto que influye directamente en el crecimiento y desarrollo de los folículos ováricos. En condiciones normales, los ovarios humanos generan un folículo dominante que culmina en una única ovulación

por ciclo menstrual. No obstante, en especies poliovulantes, se observa la presencia de múltiples folículos dominantes en cada ciclo. Estos folículos dominantes juegan un papel clave en la síntesis de estradiol (E2) durante la fase folicular del ciclo menstrual. Después de la ovulación, los folículos experimentan una degeneración y evolucionan hacia cuerpos lúteos, encargados de secretar altas concentraciones de progesterona (P4) a lo largo de la fase lútea del ciclo (Williams & Erickson, 2000). El folículo ovárico se compone de un ovocito central, el cual está circundado por células de la granulosa a lo largo de su desarrollo, incluidas las que forman la corona radiada y el *cumulus oophorus*, además de un antro folicular, células de la teca interna, tejido conectivo y células de la teca externa (Espey & Richards, 2006). Por otro lado, el cuerpo lúteo emerge como una glándula endocrina temporal, constituida por las células foliculares remanentes post-ovulación. Estas representan el culmen de transformaciones morfológicas y bioquímicas significativas en las células de la teca interna y en la capa granulosa del folículo preovulatorio, un proceso estrechamente vinculado al aumento de los niveles séricos de LH (Zhang et al., 2013).

Desarrollo folicular

La foliculogénesis inicia con el reclutamiento de folículos primordiales desde la reserva folicular, hacia el crecimiento y la ovulación o la atresia folicular. Este proceso se estructura en dos etapas distintas. La etapa preantral, también conocida como fase independiente de gonadotropinas, se distingue por el crecimiento y la diferenciación del ovocito. Por otro lado, la etapa antral, o fase dependiente de gonadotropinas, se caracteriza por un aumento significativo en el tamaño del folículo (Erickson & Shimasaki, 2001).

Los ovocitos se originan a partir de las células germinales primordiales que, durante las etapas tempranas del desarrollo gonadal, migran para transformarse en ovogonias. La foliculogénesis se inicia cuando las células pregranulosas son reclutadas alrededor del ovocito, formando así el folículo primordial dentro del ovario, ya sea en la etapa fetal o neonatal. Durante este proceso inicial, el desarrollo del ovocito se pausa en la Profase I de la meiosis (Picton et al., 1998).

Las proteínas producidas por el ovocito y las células de la granulosa desempeñan roles cruciales en la supervivencia y el reclutamiento de los folículos primordiales. Entre las proteínas específicas del ovocito se encuentran los factores de transcripción de hélice-bucle-hélice-básica (bHLH), que son cruciales tanto para la espermatogénesis como para la ovogénesis, bHLH básico específico de espermatogénesis y ovogénesis 1 y 2 (Sohlh1 y Sohlh2); y el factor de línea germinal, factor de transcripción específico bHLH para la foliculogénesis (FIGLA), que también posee un dominio de

hélice-bucle-hélice. Estos factores pueden fomentar la supervivencia y activación de los folículos primordiales a través de la regulación de la expresión de genes esenciales río abajo en la secuencia de DNA (Pangas & Rajkovic, 2006; Toyoda et al., 2009). Los factores de transcripción homeóticos LHX8 y NOBOX también juegan un papel importante en la regulación de la expresión de genes críticos para el desarrollo folicular, incluyendo el factor de crecimiento transformante (TGF), , miembro de la familia del factor I, el factor de crecimiento diferencial 9 (GDF-9) y la proteína morfogénica ósea 15 (BMP-15), miembros de la familia del factor de crecimiento (Rajkovic et al., 2004; Ren et al., 2015). Las proteínas GDF-9 y BMP-15, originadas en el ovocito, estimulan la proliferación de células de la granulosa durante la fase de folículo primario. Asimismo, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), secretados por los ovocitos, promueven la activación del folículo y elevan la expresión del factor de células madre (SCF) en las células de la granulosa. El SCF, procedente de las células granulosas, interactúa con el receptor de tirosina quinasa c-kit en el ovocito para favorecer su crecimiento y es esencial para la activación del folículo primordial. La activación de la señalización de SCF a través del receptor c-kit en los ovocitos conduce a la inactivación de FOXO3a durante la activación folicular (Parrott & Skinner, 1999; Yoshida et al., 1997) (Fig. 3).

El folículo primario se distingue por tener una o varias células granulosas de forma cuboidal, confinadas a una capa que envuelve al ovocito. Dentro de los hitos cruciales en el desarrollo de los folículos primarios se encuentran la expresión del receptor de FSH (FSHR), además del crecimiento y diferenciación del ovocito (Erickson & Shimasaki, 2001). La expresión de los FSHR por parte de las células de la granulosa se inicia en la fase de folículo primario. Los elementos que inducen la expresión del FSHR abarcan la propia FSH, la activina, el adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y el TGF (Findlay & Drummond, 1999). Conforme avanza la foliculogénesis preantral, la estructura folicular experimenta transformaciones significativas. Los cambios durante el desarrollo de un folículo primario a secundario incluyen el incremento en el número de células de la granulosa, las cuales forman capas múltiples alrededor del ovocito; y la formación de una capa de células de la teca. Este avance de un folículo primario a uno secundario completamente desarrollado se debe a un proceso regulatorio autocrino y paracrino activo, el cual es impulsado por factores de crecimiento emanados del ovocito mismo, tales como GDF-9 y BMP-15 (Erickson & Shimasaki, 2001) (Fig. 3).

La aparición del antro marca las etapas culminantes de la foliculogénesis, señalando el cambio desde una regulación dominada por factores intraováricos hacia una influencia extraovárica. El eje

hipotálamo-hipófisis-gónada de la mujer juega un papel esencial en la maduración folicular, el comportamiento sexual y la preparación del cuerpo para el embarazo. Antes de que este eje alcance su plena madurez, los folículos son reclutados para evolucionar desde la fase primordial; sin embargo, la formación de folículos antrales depende directamente del estímulo gonadotrópico (Espey & Richards, 2006). Las células de la granulosa como el ovocito se organizan en una estructura celular precisa del folículo antral, lo que resulta en la diferenciación de varios subtipos de células de la granulosa: membrana, periantral y *cumulus oophorus*. Durante el desarrollo antral, todas las células de la granulosa expresan FSHR, aunque la ubicación específica de cada grupo celular determina su respuesta diferenciada a la FSH. Por ejemplo, las células de la membrana granulosa expresan tanto la enzima aromatasa P450 (P450AROM) como el receptor para LH (LHR), a diferencia de las células periantrales y del *cumulus* (Erickson & Shimasaki, 2001).

En mujeres con ciclos menstruales normales, la selección del folículo dominante ocurre al final de la fase lútea (Gougeon, 1996). Se observa que la tasa de mitosis en las células de la granulosa aumenta significativamente, aproximadamente al doble, tras la mitad de la fase lútea, lo que indica que la luteólisis juega un papel en el incremento de la actividad mitótica de las células de la granulosa dentro del grupo de pequeños folículos antrales. La señal inicial para la selección del folículo dominante se da cuando las células de la granulosa mantienen una división a un ritmo acelerado, en contraste con la desaceleración de la proliferación en los demás folículos. La tasa mitótica en las células de la granulosa y de la teca permanece elevada durante el desarrollo subsiguiente del folículo antral (Williams & Erickson, 2000). El proceso de selección folicular está íntimamente ligado al incremento de la FSH en el plasma durante el ciclo menstrual. Este aumento de FSH inicia unos días antes de que los niveles de P4 en plasma desciendan a valores basales al término de la fase lútea. Los niveles de FSH se mantienen altos a lo largo de la primera semana de la fase folicular para que se produzca la selección del folículo dominante y se garantice la fertilidad femenina, es esencial la presencia de niveles elevados y constantes de FSH circulante. La reducción en la síntesis de E2 e inhibina A por parte del cuerpo lúteo constituye las razones principales detrás del incremento secundario de FSH, lo cual facilita la selección del folículo dominante (Williams & Erickson, 2000).

El 99.9% de los folículos ováricos en mamíferos se pierden a través de la atresia, proceso en el cual juega un papel crucial la activación de la apoptosis tanto en las células del ovocito como en las de la granulosa. La apoptosis, un mecanismo complejo de muerte celular programada, se rige por vías de señalización específicas (Danial & Korsmeyer, 2004). Este fenómeno puede ser desencadenado por

señales extrínsecas, como la interacción de ligandos con receptores específicos de la superficie celular (receptores de muerte), ejemplificado por la acción del factor de necrosis tumoral α (TGF α) o el ligando FasL. Por otro lado, las vías intrínsecas, o intracelulares, implican cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa que resultan en la liberación de factores proapoptóticos al citoplasma, siendo reguladas principalmente por las proteínas de la familia Bcl-2. En ambos casos, el proceso culmina con la activación de las caspasas, que son proteasas específicas responsables de ejecutar la apoptosis (Hsueh et al., 1994).

Ovulación

La ovulación representa un proceso dinámico marcado por transformaciones en la integridad de la superficie folicular, desencadenado por un aumento en los niveles de LH que activa múltiples vías de señalización e involucra la interacción entre diversos tipos de células y compartimentos celulares (Brännström et al., 2010). Este evento crítico en la reproducción femenina depende de la acción conjunta del sistema endocrino, las señales del sistema inmune y los factores paracrinos propios del ovario. Aunque los distintos compartimentos celulares del folículo preovulatorio (el ovocito, las células de la granulosa y las células de la teca) responden de manera única, sus actividades están sincronizadas en respuesta a las señales hormonales y a otros estímulos reguladores de la ovulación (Richards & Ascoli, 2018).

Durante el desarrollo del folículo antral, la reducción en la expresión del LHR en las células granulosas del *cumulus* provoca un aumento en la expresión de estos receptores en las células murales granulosas. Esto sugiere que dichas células constituyen el principal compartimento folicular encargado de la transducción de la señal ovulatoria de la LH. La LH desencadena la vía de señalización Gs/AMPC/Proteína quinasa A (PKA), lo que lleva a respuestas transcripcionales y la activación de otras rutas de señalización, incluyendo la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Su et al., 2006). Frente a la oleada de LH, estas vías promueven rápidos cambios en el perfil de expresión génica de las células murales granulosas, destacándose la inducción de factores de transcripción como CREB, Sp1, Sp3, y la transcripción de reguladores transcripcionales claves, incluyendo el receptor de P4, EGR-1 y C/EBP (Russell et al., 2003). Además, el receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ (PPAR γ), que forma parte de la superfamilia de receptores nucleares y es regulado por el receptor de P4, se transcribe activamente en estas células tras el pico de LH (Kim et al., 2008).

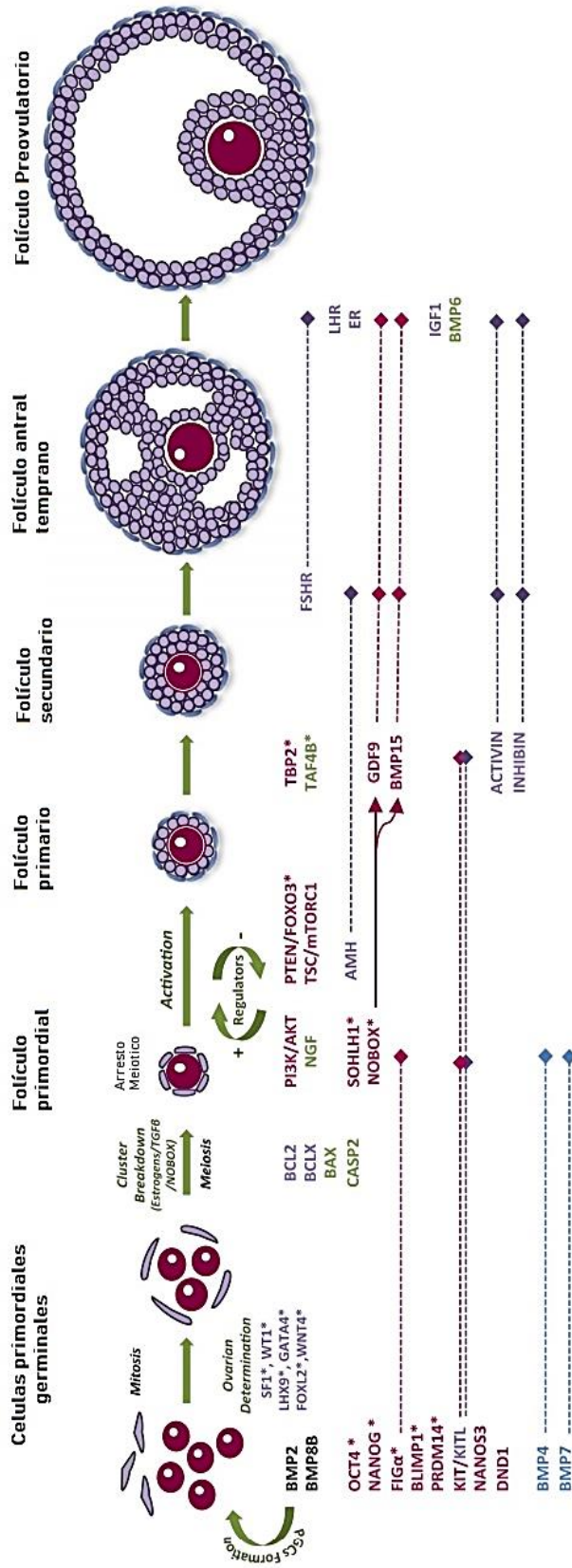


Figura 3. Figura representativa de los factores implicados en la formación de células germinales primordiales (PGC) y el desarrollo folicular. Los factores ováricos producidos por las células de la teca / células estromales (en azul), células somáticas / granulosa / granulosa (en morado), células germinales (en rojo) y granulosa (verde) participan y regulan el desarrollo de ovocitos y folículos en cada una de las etapas definidas a lo largo del desarrollo folicular. Los factores de transcripción involucrados se indican con una estrella (*). Las proteínas del ectodermo embrionario adicional que participan en la formación de PGC están indicadas en negro (Tomado y modificado Sánchez y Smitz, 2012)

Las células del *cumulus* reciben la señal ovulatoria de la LH de manera indirecta, a través de factores difusibles como los ligandos tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) que provienen de las células murales granulosas. La FSH interactúa con sus receptores en las células del *cumulus*, activando las vías de señalización AMPc/PKA y fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), lo cual apoya la expresión de genes asociados con la ovulación (Baumgarten et al., 2014). En el proceso de ovulación, las prostaglandinas desempeñan un rol activo como mediadores; por ejemplo, la prostaglandina E2 (PGE2) se produce rápidamente en las células del *cumulus* a través de la inducción de la expresión del gen COX-2. La PGE2 actúa de forma autocrina, estimulando su receptor, lo que a su vez activa la vía Gs/adenilato ciclasa (AC)/AMPc, contribuyendo así al proceso ovulatorio (Ben-Ami et al., 2006).

La interleucina-1 (IL-1), probablemente secretada por leucocitos situados en el compartimento de la teca, actúa de manera paracrina para inducir a las células del *cumulus* a producir componentes de su matriz extracelular. El ovocito juega un papel clave al secretar factores de crecimiento de la familia TGF, tales como GDF-9 y BMP-15, que son fundamentales para la diferenciación de las células del *cumulus* en su fenotipo específico (Eppig et al., 2002). Además, la interacción entre el sistema endocrino y los distintos compartimentos foliculares culmina en la formación de una matriz extracelular única en las células del *cumulus*, a través de un proceso denominado "mucificación" o "expansión del *cumulus*". Este proceso es esencial para la ocurrencia de la ovulación (Williams & Erickson, 2000).

Tras un período prolongado de inactividad, el ovocito dentro del folículo preovulatorio reactiva la meiosis durante la secuencia ovulatoria. El núcleo del ovocito, denominado "vesícula germinal", experimenta transformaciones que conducen a la expulsión del primer cuerpo polar y al avance de la meiosis hasta la segunda metafase. La meiosis se pausa en este punto, sin avanzar más, a menos que ocurra la fecundación (Williams & Erickson, 2000).

El cambio más notable durante la ovulación es la creación de un orificio en la superficie del ovario, conocido como mácula pelúcida o estigma, que permite la salida del óvulo y las células del *cumulus* del folículo. La formación del estigma resulta de un proceso que incluye apoptosis celular, migración celular y degradación proteolítica de las capas de la matriz extracelular. La LH juega un papel crucial en este proceso. Ante el incremento de LH, el folículo preovulatorio incrementa la producción de P4 y prostaglandinas, PGE2 y PGF2 α (Russell & Robker, 2007). Además, la remodelación de las células de la teca está influenciada por señales adicionales como la derivada de la interacción entre el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el receptor de tropomiosina quinasa tipo A (TrkA), cuya

expresión se activa en las células de la teca en respuesta al pico de LH. La interacción NGF-TrkA provoca una disminución de la comunicación intercelular al modificar las uniones gap entre las células de la teca, lo que resulta en un incremento de la actividad migratoria de estas células (Dissen et al., 1996).

La ovulación desencadena la producción de la proteasa metalopeptidasa con motivos trombospondina tipo 1 (ADAMTS-1) en las células murales de la granulosa, la cual es secretada hacia el complejo de células del *cumulus*, actuando allí para descomponer las proteínas de la matriz extracelular (Russell & Robker, 2007). En paralelo, la capa de la teca experimenta cambios rápidos en su vascularización en respuesta a la LH ovulatoria. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus vías de señalización intracelular son fundamentales para la angiogénesis folicular a lo largo del crecimiento del folículo antral. En primates, la remodelación vascular mediada por VEGF juega un papel vital en la ruptura folicular. El VEGF facilita la permeabilidad vascular, mejorando la entrega de factores sanguíneos como la LH y la FSH, así como de células inmunitarias hacia el folículo. Los niveles elevados de VEGF y el incremento resultante en la permeabilidad vascular están asociados con el síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) iatrogénica (Rizk et al., 1997). Las células inmunitarias, incluidos macrófagos y leucocitos, acceden a la capa de la teca a través de la vasculatura y secretan citoquinas, proteasas y radicales libres, contribuyendo a la remodelación adicional de la pared folicular. Estas vías de señalización convergen para desencadenar una cascada de eventos proteolíticos y de remodelación que facilitan la degradación controlada de la matriz estromal ovárica que rodea al folículo, culminando en la formación del estigma y la liberación del complejo ovocito-*cumulus* maduro (Williams & Erickson, 2000).

El cuerpo lúteo se origina a partir de las células de la pared del folículo ovulatorio. Su formación comienza antes de la ovulación, pero se hace evidente después de la ruptura folicular, desarrollándose plenamente a lo largo de un periodo específico para cada especie (Espey & Richards, 2006). La luteinización abarca la proliferación, diferenciación celular y remodelación del tejido, e involucra principalmente la hipertrofia y transformación de las células esteroideogénicas foliculares en células luteales, además de la angiogénesis, o desarrollo rápido de vasos sanguíneos (Rizk et al., 1997). Este proceso se inicia con cambios bioquímicos y morfológicos en las células de la teca interna y en las células de la granulosa del folículo preovulatorio, siendo estimulado por el aumento de los niveles de LH sérica.

Las células constituyentes del cuerpo lúteo provienen de dos tipos de células secretoras de esteroides del folículo ovulatorio: las células de la granulosa y las células de la teca, resultando en la formación de dos tipos de células luteales: las células granulosa-luteínicas y las células teca-luteínicas (Espey & Richards, 2006; X. Zhang et al., 2013).

Si no ocurre la implantación, el cuerpo lúteo se somete a un proceso de degeneración conocido como luteólisis. La desintegración del cuerpo lúteo humano se hace evidente 8 días después de la ovulación, comenzando con la contracción de las células granulosa-luteínicas. En contraste, las células teca-luteínicas muestran una hiperestimulación selectiva durante las etapas iniciales de la luteólisis. Con el tiempo, la luteólisis culmina en la destrucción completa de las células del cuerpo lúteo. Desde el punto de vista histológico, el remanente final es un nódulo de tejido conectivo denso conocido como *corpus albicans* (Williams & Erickson, 2000).

Infertilidad y reproducción asistida

La infertilidad es una condición que afecta aproximadamente a una de cada seis parejas, originada por una diversidad de causas tanto en hombres como en mujeres. Entre los factores de riesgo se encuentran la edad avanzada, el consumo de tabaco, una dieta alta en grasas saturadas, obesidad, ciertos medicamentos e infecciones. Se estima que un 40% de los casos se deben a causas masculinas, otro 40% a femeninas y el 20% restante a razones aún por determinar (Calvo et al., 2020). A su vez, condiciones particulares como la endometriosis y la falla ovárica prematura afectan la fertilidad femenina, mientras que anomalías genéticas y algunas deficiencias pueden provocar infertilidad en hombres. Además, el estrés oxidativo y los radicales libres desempeñan un rol crucial en la patogénesis de la infertilidad en ambos géneros (Agarwal & Allamaneni, 2004).

La infertilidad femenina es un problema de salud complejo caracterizado por la incapacidad de establecer un embarazo clínico después de 12 meses de relaciones sexuales regulares y sin protección. Afecta aproximadamente al 8-12% de las parejas en edad reproductiva en todo el mundo (Vander Borcht & Wyns, 2018). Sin embargo, en algunas regiones del mundo, las tasas de infertilidad son mucho más altas, alcanzando el 30% en algunas poblaciones (Ombelet, 2009), particularmente en poblaciones de Asia del Sur, África subsahariana, Medio Oriente, norte de África, Europa Central y del Este, y Asia Central (Borumandnia et al., 2022; Mascarenhas et al., 2012). Un análisis de la carga de la infertilidad en China y en el mundo desde 1990 hasta 2019 mostró que el número de casos de infertilidad femenina aumentó en 7.06 millones en China y en 56.71 millones a nivel mundial (Yu et

al., 2023). La prevalencia de la infertilidad femenina sigue aumentando a nivel global, con variaciones significativas según la región y los factores socioeconómicos.

Entre las principales causas de la infertilidad femenina se encuentran trastornos de la ovulación, anomalías uterinas, obstrucciones tubáricas, así como factores peritoneales y cervicales. Condiciones específicas como la insuficiencia ovárica prematura, síndrome de ovario poliquístico (SOP), endometriosis, fibromas uterinos y pólipos endometriales son factores significativos en la contribución a la infertilidad femenina (Vander Borgh & Wyns, 2018). El estrés oxidativo, resultado de un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad antioxidante para contrarrestarlas, incide en la fertilidad, tanto natural como asistida. La detección de la fuente de producción excesiva de ROS, el tratamiento de la causa subyacente y la suplementación con antioxidantes, tanto *in vitro* como *in vivo*, pueden ofrecer beneficios a mujeres infértiles afectadas por este desequilibrio (Agarwal & Allamaneni, 2004).

La evaluación y el tratamiento de la infertilidad femenina pueden incluir pruebas diagnósticas iniciales como la medición del nivel de P4 en la fase lútea media para confirmar la ovulación, y pruebas para evaluar la permeabilidad tubárica y la morfología uterina. Los tratamientos pueden variar desde la inducción de la ovulación para mujeres con anovulación, hasta técnicas de reproducción asistida como la inseminación intrauterina (IIU) o la fertilización *in vitro* (FIV) para obstrucciones tubáricas o factores inexplicables (Huang & Rosenwaks, 2014). La FIV ha experimentado un rápido desarrollo desde su aparición. Aunque la tecnología de FIV se utilizó originalmente para mujeres con infertilidad por factor tubárico, ha sido considerada como el tratamiento de último recurso para todas las parejas infértiles cuando la terapia convencional falla (Zhou et al., 2021). La selección del tratamiento dependerá de la causa específica de la infertilidad, la edad de la mujer, la duración de la infertilidad y las preferencias personales de la pareja.

La FIV es el método más empleado dentro de las tecnologías de reproducción asistida. Este proceso implica recolectar óvulos directamente del ovario, fertilizarlos *in vitro* en un laboratorio y luego transferir el embrión resultante al útero. Este procedimiento incluye varias etapas claves: estimulación ovárica controlada, extracción de óvulos, fertilización, cultivo de embriones y transferencia de estos (Fig 4). Adicionalmente, puede incorporar pruebas genéticas previas a la implantación y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). La crio-preservación mediante vitrificación se utiliza para congelar los embriones sobrantes o para preservar la fertilidad de óvulos o embriones (Jain & Singh, 2024).

La FIV ha evolucionado desde sus inicios, donde se aprovechaba un ciclo menstrual natural para extraer un único óvulo, hacia prácticas más avanzadas que estimulan los ovarios de manera controlada para obtener múltiples óvulos por ciclo, esta evolución ha aumentado significativamente las probabilidades de éxito en la concepción (Jain & Singh, 2024). En la estimulación ovárica controlada, se utilizan tratamientos y medicamentos variados, entre los cuales los moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM), como el citrato de clomifeno y el tamoxifeno, destacan por su efectividad. A pesar de que los protocolos de estimulación mínima, o mini-FIV, que emplean SERMs han demostrado reducir los riesgos asociados como el SHO y los embarazos múltiples, la tasa de nacimientos vivos puede ser ligeramente inferior en comparación con la FIV convencional (Zhang et al., 2016).

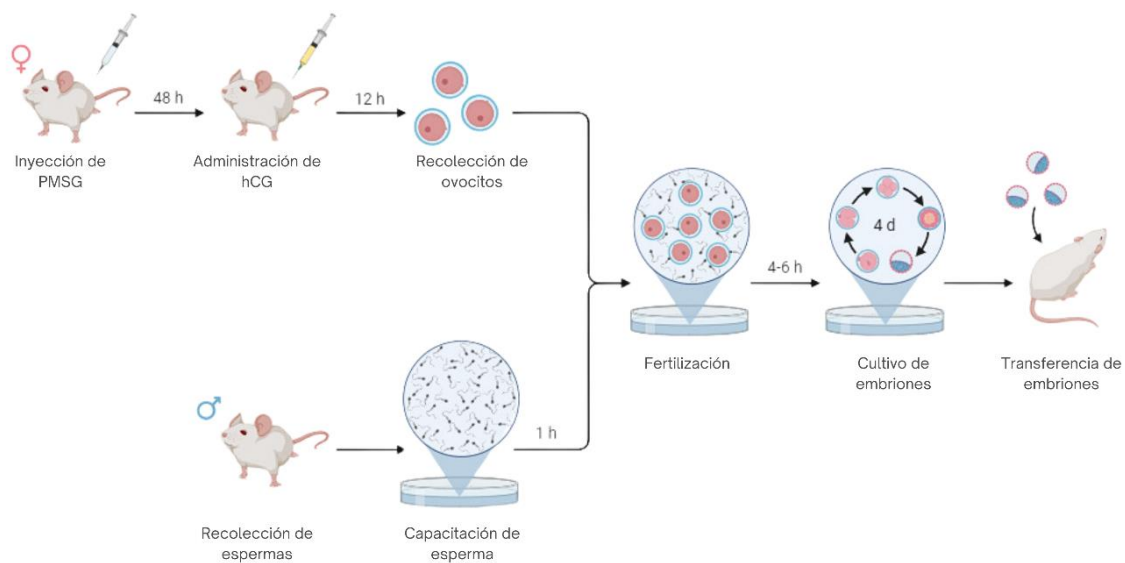


Figura 4. Procedimiento de fecundación in vitro (FIV) en ratones. Inicia con la administración de la hormona PMSG para promover el desarrollo de folículos, seguido por una inyección de hCG 48 horas más tarde para inducir la ovulación. A las 12 horas se recolectan los ovocitos, mientras que en paralelo se extrae y capacita espermias del macho. Los ovocitos y el espermias se unen para la fertilización, y luego los embriones resultantes se cultivan durante un periodo de 4 a 6 horas. El último paso muestra la transferencia de estos embriones al útero materno, completando así el ciclo de FIV. Created with BioRender.com

Para fomentar una estimulación ovárica que maximice el desarrollo folicular en un solo ciclo, la inyección de gonadotropinas exógenas, específicamente la FSH y la LH, se ha vuelto una práctica común. Este enfoque se apoya en medicamentos que previenen el pico prematuro de LH, empleando tanto agonistas como antagonistas de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), dependiendo del protocolo específico. La selección del protocolo suele basarse en una evaluación inicial que

incluye ultrasonidos y análisis hormonales, y a menudo sigue a un tratamiento previo con anticonceptivos orales (Jain & Singh, 2024).

La monitorización del desarrollo folicular se realiza mediante ultrasonido transvaginal y análisis de sangre para evaluar la respuesta ovárica, específicamente los niveles de E2. La maduración final de los folículos se induce artificialmente cuando estos alcanzan un tamaño óptimo, utilizando para ello gonadotropina coriónica humana (hCG) o un agonista de GnRH, preparando así el escenario para una extracción de óvulos efectiva y aumentando las posibilidades de éxito de la FIV (Huang & Rosenwaks, 2014).

Según el Centro para el Control de Enfermedades de los Estados Unidos de América, para el año 2017, el 1.9% de los infantes nacidos en Estados Unidos fueron concebidos mediante técnicas de reproducción asistida (TRA). Durante ese mismo año, se llevaron a cabo aproximadamente 200,000 ciclos de TRA que incluyeron la transferencia de embriones, resultando en 78,052 nacimientos vivos. Con el incremento en el acceso a estos tratamientos, las tasas de retraso en la maternidad y la expansión de la cobertura de seguro para las TRA, es previsible que estos números continúen en aumento (Sunderam, 2020).

Síndrome de hiperestimulación ovárica

El SHO representa una complicación iatrogénica poco común, aunque grave, que puede manifestarse durante la fase lútea o en las etapas iniciales del embarazo, particularmente asociada con la TRA. La incidencia de SHO severo es baja, oscilando entre el 0.5% y el 5% y la de SHO moderado se ha informado que varía entre el 3% y el 7%. A pesar de su relativa rareza, su importancia radica en el hecho de ser una complicación derivada de un procedimiento no esencial, que puede conllevar a una morbilidad significativa e incluso, en casos extremos, a resultados fatales (Delvigne, 2003). Por lo tanto, la identificación temprana de pacientes con alto riesgo y la implementación de estrategias preventivas efectivas son esenciales para mitigar el riesgo de desarrollo del SHO.

En el ámbito de la TRA, el uso de la hCG se ha generalizado como un sustituto para la LH de mitad de ciclo. Gracias a su composición bioquímica y a una dinámica biológica similar a la de la LH, la hCG se une y activa el LHR/hCGR, garantizando una óptima exposición del folículo a la actividad de la LH (Castillo et al., 2020). Sin embargo, el uso de hCG también se relaciona con un incremento en la secreción del VEGF, un aumento en la expresión del receptor tipo 2 del VEGF (VEGFR-2) y el

incremento de la permeabilidad vascular. Estos efectos están vinculados con el desarrollo del SHO (Gomez et al., 2006) (Fig. 5).

El SHO se clasifica en tres categorías y seis grados, lo cual ofrece un marco crucial para entender tanto su severidad como sus manifestaciones clínicas. Esta clasificación distingue entre las formas leve, moderada y severa del SHO, cada una definida por criterios clínicos y diagnósticos específicos (Golan & Weissman, 2009). La forma leve de SHO se caracteriza por niveles elevados de E2 y P4 denominándose también como "SHO químico". En esta etapa, los ovarios presentan un leve aumento de tamaño, con un diámetro inferior a 5 cm, y los síntomas, si existen, son mínimos. La forma moderada de SHO incluye síntomas como hinchazón, distensión abdominal, malestar, náuseas, vómitos y diarrea. Los ovarios muestran un aumento de tamaño más notorio, con diámetros entre 5 y 12 cm. Esta condición requiere una vigilancia más estrecha y, potencialmente, un tratamiento más intensivo. La forma severa de SHO se identifica por diámetros ováricos superiores a 12 cm y puede incluir complicaciones graves como ascitis masiva, hidrotórax, derrame pericárdico, disfunción renal y hemoconcentración. Esta es una situación médica crítica que demanda una acción médica inmediata y exhaustiva (Blumenfeld, 2018).

Las actualizaciones recientes a esta clasificación han incorporado nuevos criterios y una categoría adicional para reflejar con mayor precisión el espectro de gravedad del SHO es la detección de ascitis leve mediante sonografía transvaginal se ha agregado para mejorar la identificación y clasificación de la severidad del SHO. Se ha introducido una forma crítica y potencialmente mortal del SHO dentro de la categoría severa, destacando la posibilidad de que el SHO evolucione hacia una condición crítica. Esta categoría incluye síntomas como edema generalizado (anasarca), disfunción hepática, síndrome de dificultad respiratoria aguda, ascitis tensa, hemoconcentración severa con un hematocrito superior al 55% y leucocitosis superior a 35,000 células/mm³ (Blumenfeld, 2018).

El VEGF se ha identificado como uno de los principales factores involucrados en la patología del SHO (Derckx et al., 1987). El VEGF, una citoquina angiogénica que estimula potencialmente al endotelio vascular juega un papel crucial en el crecimiento de los folículos, la función del cuerpo lúteo y la angiogénesis ovárica. Existe una correlación entre los niveles de VEGF y la severidad del SHO (Lightman et al., 1987), y se ha observado que el VEGF recombinante induce efectos análogos a los del SHO, los cuales pueden ser revertidos mediante el uso de un antisuero específico (Soares et al., 2008). Investigaciones muestran que la hCG incrementa la expresión de VEGF en las células granulosas humanas y aumenta las concentraciones séricas de VEGF (Pellicer et al., 1999). Otros

muchos factores podrían participar, actuando directa o indirectamente a través del VEGF, incluidos la angiotensina II, el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), el EGF, los TGF α y β , el bFGF, el PDGF, la interleucina-1 beta (IL-1 β) y la interleucina-6 (IL-6) (Delvigne, 2003).

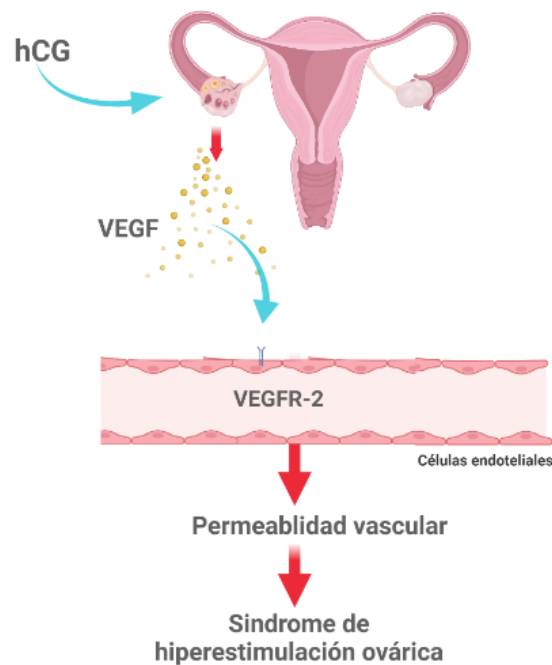


Figura 5. Desarrollo del síndrome de hiperestimulación ovárica. La estimulación con gonadotropinas exógenas al ovario (hCG) provoca la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el cual tiene como blanco al receptor VEGFR-2 presente en las células endoteliales, la unión del VEGF a su receptor tiene como consecuencia el incremento de la permeabilidad vascular. Created with BioRender.com

VEGF y vías de señalización

El VEGF desempeña un papel crucial como regulador principal en la formación y función de los vasos sanguíneos, influenciando significativamente procesos celulares como la proliferación, supervivencia y migración en las células endoteliales. Dentro de la familia VEGF, se encuentran diversas variantes como los VEGFs A al D de vertebrados, el factor de crecimiento placentario (PlGF), el VEGF-E originario de parapoxvirus y el VEGF-F derivado de veneno de serpiente, ofreciendo un espectro amplio de actividades biológicas y funciones en el cuerpo (Simons et al., 2016). El VEGF-A, en particular, presenta varias isoformas producto del corte y empalme alternativo, las cuales varían en masa molecular y propiedades biológicas, destacando por su capacidad para unirse a los proteoglicanos de heparán sulfato en la superficie celular, con implicaciones directas en la angiogénesis y la vasculogénesis, así como en la permeabilización vascular (Leung et al., 1989).

La expresión de VEGF se incrementa en condiciones de hipoxia, activación oncogénica y estímulos citoquímicos, jugando un rol decisivo en la proliferación y migración de células endoteliales, así como en la inhibición de la apoptosis. Este factor es fundamental en la vasculogénesis y promueve el crecimiento de tumores sólidos a través de la angiogénesis tumoral, marcando su importancia en patologías asociadas a una angiogénesis anormal (Neufeld et al., 1999). Así, la inhibición de la señalización de VEGF representa una estrategia prometedora contra una amplia variedad de tumores.

La regulación transcripcional de VEGF involucra a factores de transcripción clave como el factor inducible por hipoxia alfa (HIF-1 α), AP-1 y Sp-1, los cuales interactúan directamente con el promotor de VEGF, siendo modulados por el óxido nítrico y citoquinas a través de distintas vías de señalización (Choi et al., 2011; Kimura et al., 2000). Mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores también pueden elevar la transcripción de VEGF, destacando la complejidad de su regulación y la importancia de estas interacciones en contextos fisiológicos y patológicos (Blancher et al., 2001).

La inducción de VEGF en células bajo condiciones de hipoxia o isquemia se atribuye a la activación del factor de transcripción HIF-1, que promueve la transcripción del gen VEGF. Elementos específicos en el gen VEGF median esta activación (Forsythe et al., 1996). La vía de señalización proteínas morfogenéticas óseas (BMP)/Smad también regula la transcripción de VEGF, con Smad1 y Smad5 desempeñando roles distintivos en la respuesta a BMP en embriones de pez cebra, lo que ilustra la diversidad de mecanismos reguladores de la expresión de VEGF (He & Chen, 2005). Además, CXCL8/ Interleucina-8 (IL-8), un quimioatrayente proa-angiogénico e inflamatorio, eleva los niveles de VEGF en células endoteliales a través de la activación autocrina de VEGFR-2, en un proceso que requiere la activación del factor de necrosis tumoral de factor nuclear Kappa B (NF κ B) pero no de HIF1 α , resaltando la participación del complejo Carma3/Bcl10/Malt1 (CBM) en este mecanismo regulador (Martin et al., 2009).

Los receptores de estrógeno alfa (ER α) y beta (ER β) ejercen una influencia transcripcional significativa sobre la expresión del VEGF tanto en células endometriales como en células de cáncer de mama. Este hallazgo demuestra que VEGF actúa como un gen objetivo de ambos receptores de estrógeno, lo que sugiere la existencia de un mecanismo complejo y diferenciado a través del cual dichos receptores modulan tanto la angiogénesis como el crecimiento tumoral. La regulación depende de la presencia de estrógeno o tamoxifeno, subrayando la complejidad de la regulación

transcripcional de VEGF y su relevancia tanto en los procesos angiogénicos normales como en la patología tumoral (Buteau-Lozano et al., 2002; Mueller et al., 2000).

La relevancia del VEGF se acentúa por su papel crucial en la proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales. Este papel se ve potenciado por la diversidad de sus isoformas, desempeñando un papel fundamental en la angiogénesis y el desarrollo vascular. El entendimiento de cómo el VEGF interactúa con sus receptores, especialmente mediante vías de señalización que incluyen la activación de c-Src y las respuestas endoteliales subsiguientes, ha abierto nuevas posibilidades para el desarrollo de estrategias terapéuticas enfocadas en la angiogénesis y la permeabilidad vascular (Neufeld et al., 1999).

Existen diversas formas de VEGF que interactúan con tres principales receptores de tirosina quinasa: VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (KDR/flk-1) y VEGFR-3. Estos receptores, que se expresan casi exclusivamente en las células endoteliales, comparten una estructura general similar, incluyendo siete repeticiones de dominios de homología a inmunoglobulina en su región extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de quinasa de tirosina dividido. Sin embargo, se diferencian en su modo de activación, señalización y efectos biológicos (Simons et al., 2016). Además, las células endoteliales también expresan los correceptores neuropilina-1 (NPR-1) y neuropilina-2 (NPR-2), que se unen específicamente a VEGF-A₁₆₅, resaltando aún más la especificidad de la señalización del VEGF (Gluzman-Poltorak et al., 2000).

El VEGFR-2, establece interacciones complejas con diversas proteínas como neuropilinas, proteoglicanos, integrinas y fosfatasa de proteínas de tirosina. La endocitosis y el tráfico de VEGFR-2, así como la interacción con otras cascadas de señalización endotelial, son fundamentales para la señalización efectiva de VEGFR-2 (Simons et al., 2016). Este sistema VEGF/VEGFR-2 es fundamental en procesos como la vasculogénesis y la angiogénesis, impulsando la proliferación, migración y supervivencia celular, y culminando en la formación de nuevos vasos. La unión de VEGF a VEGFR-2 desencadena la dimerización del receptor, su activación mediante trans-autofosforilación de la quinasa de tirosina, e inicia cascadas de señalización intracelular que median una amplia gama de respuestas biológicas y procesos patológicos relacionados con la angiogénesis. Puntos de fosforilación clave en los dominios intracelulares de VEGFR-2 son esenciales para mediación de estos procesos de señalización (Wang et al., 2021).

Se cree que la unión del ligando induce la dimerización de VEGFR. Sin embargo, se ha demostrado que existen dímeros de VEGFR-2 preformados con un cierto nivel de actividad quinasa *in vitro*

(Sarabipour et al., 2016.). El dímero se estabiliza mediante la unión del ligando a través de varios puntos de contacto entre los diferentes dominios del receptor. Además, la unión del ligando induce un cambio a una configuración particular de los dominios transmembrana, que se acompaña de una rotación de los dímeros (Lemmon & Schlessinger, 2010), de importancia crítica para la activación completa de la actividad quinasa. Diferentes ligandos pueden influir de manera diferente en el grado de rotación de las moléculas del receptor y, por lo tanto, en el grado de activación del receptor. Por ejemplo, se ha demostrado que VEGF-B carece de la capacidad de rotar óptimamente su receptor, VEGFR-1, en comparación con PlGF, y por lo tanto es un activador más débil de la señalización de VEGFR-1 (Anisimov et al., 2013).

VEGF-A se une simultáneamente a NRPs y VEGFRs en las células endoteliales, induciendo la formación de complejos NRP-VEGFR. Sin embargo, la configuración de los complejos NRP1/VEGF-A/VEGFR-2 no es conocida (Fantin et al., 2014). La activación de VEGFR-2, a su vez, induce la fosforilación de tirosina de integrina- $\beta 3$ y dirige las interacciones entre los dos (West et al., 2012). La activación VEGFR-2 activa vías de señalización intracelular que son cruciales para la biología endotelial. Estas incluyen la vía de fosfolipasa $C\gamma$ (PLC γ)–ERK1/2, que tiene un papel central durante el desarrollo vascular y en la arteriogénesis en adultos (Okabe et al., 2014; Shibuya, 2013); la vía PI3K–AKT–mTOR, que es crucial para la supervivencia celular, la regulación vascular y la regulación de la función de barrera (Zhuang et al., 2013); y Src y las pequeñas GTPasas, que están involucradas en la forma celular y la migración celular, así como en la regulación de las uniones endoteliales y la función de barrera vascular (Rodrigues & Granger, 2015). Además de estos eventos de señalización ampliamente estudiados, VEGFR-2 activa otras vías que son poco comprendidas. Estas incluyen las quinasas de estrés, como p38 MAPK, STATs y la señalización dependiente de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Simons et al., 2016). Los VEGFs son reguladores fundamentales de la permeabilidad vascular, desempeñando un papel crucial tanto en condiciones normales como patológicas. Incrementan la permeabilidad a través de mecanismos que incluyen la activación del receptor VEGF-2, la entrada de calcio, la activación de PLC γ y la subsiguiente activación de la sintasa de óxido nítrico. Este proceso involucra múltiples proteínas señalizadoras, evidenciando la complejidad de la regulación de la permeabilidad vascular por los VEGFs (Bates, 2010). Además, el VEGF estimula la formación de fibras de estrés y adhesiones focales en células endoteliales mediante la activación de diversas vías de señalización, como la proteína quinasa 2 activada por estrés/p38 (SAPK2/p38) y la quinasa de adhesión focal (FAK), lo que mejora la migración celular (Rousseau et al., 2000). Este factor también induce la expresión de moléculas de adhesión, como ICAM-1, VCAM-

1 y E-selectina, a través de la activación de NF- κ B en células endoteliales, un proceso que depende de ciertas vías de señalización, pero no de óxido nítrico ni ERK/MEK (Kim et al., 2001).

La activación de VEGFR-2 por VEGF conduce a la endocitosis de VE-cadherina, un componente crítico de las uniones adherentes endoteliales, perturbando así la función de barrera endotelial. Este proceso involucra la activación de Rac y la fosforilación mediada por Src, lo que facilita la internalización de VE-cadherina y el desmontaje de las uniones intercelulares (Gavard & Gutkind, 2006). Además, se ha demostrado que VEGF altera la permeabilidad paracelular a través de la modificación post-traduccional de ocludina y la fosforilación de ZO-1, afectando la organización de estas proteínas y comprometiendo la integridad de las uniones estrechas (Antonetti et al., 1999; W. Wang et al., 2001) (Fig. 6).

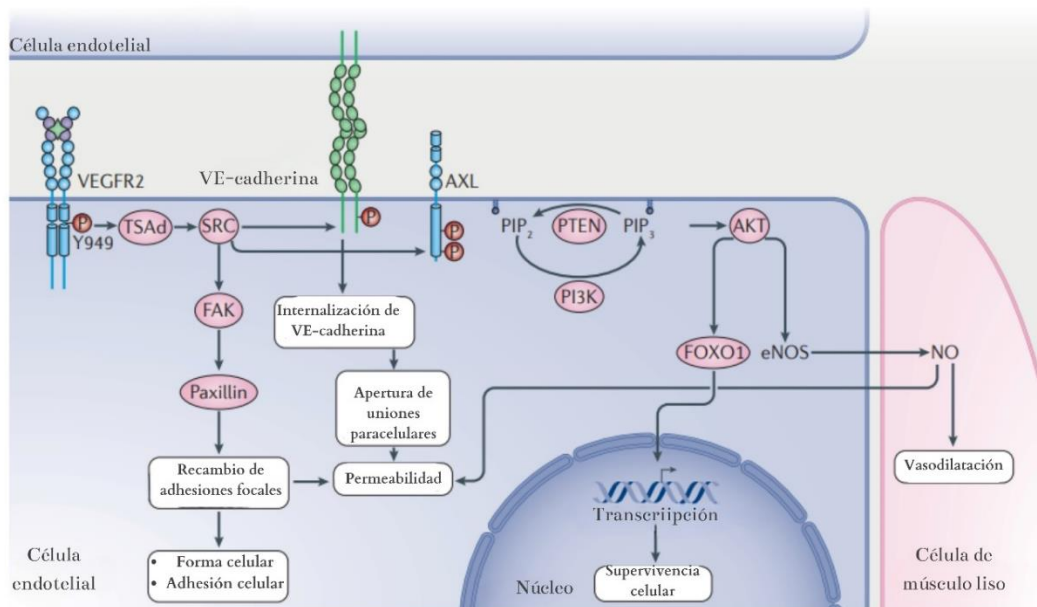


Figura 6. Representación esquemática de la señalización activada por VEGF en VEGFR2–Src–AKT. La fosforilación de Y949 en VEGFR2 conduce a la activación de Src en las uniones célula-célula y a eventos subsiguientes de señalización que determinan la forma celular, la supervivencia y la permeabilidad de los vasos. Además de la señalización dentro de las células endoteliales, la activación de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) mediada por AKT induce la señalización de óxido nítrico (NO) en las células de músculo liso adyacentes, llevando a la vasodilatación. cPKC, proteína quinasa C convencional; DAG, diacilglicerol; RE, retículo endoplásmico; FAK, quinasa de adhesión focal; FOXO1, proteína de la caja O de forkhead 1; IP3, inositol 1,4,5-trifosfato; PIP2, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; PIP3, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato; TSA, adaptador específico de células T; VE-cadherina, cadherina endotelial vascular. (Tomado y modificado de Simons et al, 2016)

Los estudios también han vinculado la expresión de VEGF con el aumento de la permeabilidad vascular en enfermedades como la diabetes mellitus, el cáncer y condiciones inflamatorias, destacando su importancia en la patología de estas afecciones y sugiriendo que la modulación de

las vías de VEGF podría ofrecer potencial terapéutico (Heinolainen et al., 2017; Phoenix et al., 2022; Wautier & Wautier, 2022). Investigaciones adicionales han encontrado un aumento de VEGF en el líquido folicular de pacientes con SHO, así como un efecto inhibitor de la dopamina sobre la fosforilación de VEGFR-2 y ciertas proteínas de adhesión celular, lo que reduce la permeabilidad sin afectar otros procesos celulares (Chen et al., 2010). Estos hallazgos subrayan el papel de VEGF en la regulación de la permeabilidad vascular y sugieren que una comprensión detallada de sus mecanismos de acción es fundamental para el desarrollo de intervenciones terapéuticas eficaces en enfermedades caracterizadas por alteraciones en la permeabilidad vascular (Fig. 7).

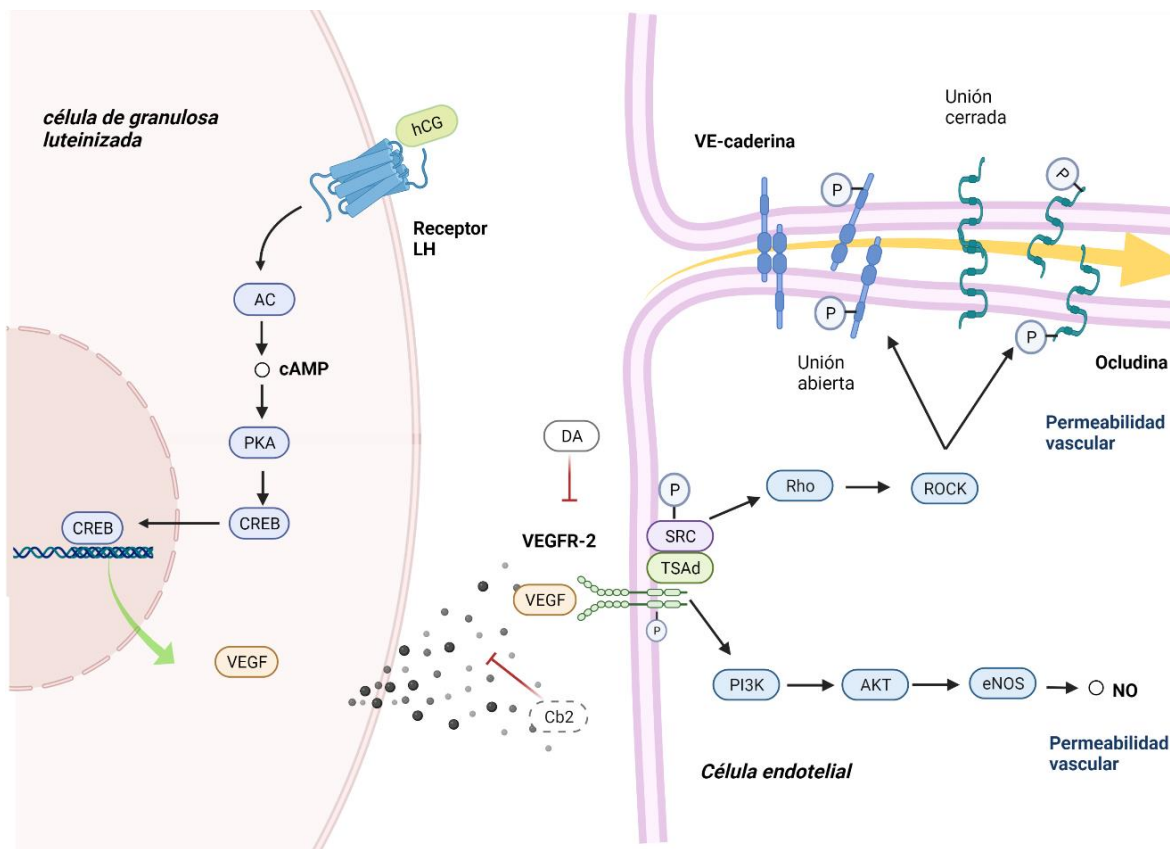


Figura 7. Permeabilidad vascular regulada por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), efecto de la dopamina (DA) y cabergolina (Cb2): agonista RDA2 en el SHO. La estimulación con gonadotropinas exógenas incrementa la secreción de VEGF por unión al receptor de la hormona luteinizante (LH), el VEGF activa a su receptor 2 (VEGFR-2), incrementando así la permeabilidad vascular por aumento del óxido nítrico (NO) y por fosforilación de proteínas de adhesión celular (VE-caderina y ocludina). DA y Cb2 disminuyen la permeabilidad vascular al disminuir la secreción del VEGF y la fosforilación del VEGFR-2. Created with BioRender.com

Receptores de dopamina y vías de señalización

Los cinco receptores de dopamina (RDA) se agrupan en dos categorías principales: tipo 1 (RDA1) y tipo 2 (RDA2). La familia RDA1, que comprende los subtipos RDA1 y RDA5, se caracteriza por su asociación con proteínas G_s que inician la cascada de señalización para la producción de cAMP como su principal mecanismo de acción (Beaulieu & Gainetdinov, 2011). En contraposición, los receptores pertenecientes a la familia RDA2 (subtipos RDA2, RDA3 y RDA4) actúan inhibiendo la síntesis de cAMP, estimulando los canales de K^+ y disminuyendo la entrada de iones Ca^{2+} por canales dependientes del voltaje, mediante la interacción con proteínas G ($G_{\alpha i}$ y $G_{\alpha o}$) (Jaber et al., 1996).

El RDA1 promueve la activación del AC a través de su interacción con proteínas de unión a nucleótidos de guanosina (proteínas G), facilitando la conversión de ATP en cAMP. Este cAMP interactúa con las subunidades reguladoras de la PKA, desencadenando la liberación de subunidades catalíticas que fosforilan diversos sustratos (Sunahara & Taussig, 2002; J. Zhang et al., 2009). En este complejo sistema de señalización mediado por la dopamina y la PKA, se destaca la fosfoproteína regulada por cAMP y dopamina de 32 kDa (DARPP-32). La fosforilación de DARPP-32 en la treonina-34 por PKA inhibe la fosfatasa de proteínas 1 (PP1), mientras que su fosforilación en la treonina-75 por la quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) inhibe a la PKA (Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Rajput et al., 2009), creando un circuito de retroalimentación en la activación de PKA. Este proceso, junto con la inhibición de PP1 por PKA, regula la fosforilación de una variedad de canales y receptores, incluyendo los de ácido 3,5-hidroximetil-4-isoxazol-propiónico (AMPA), ácido γ -aminobutírico A (GABAA) y N-metil-D-aspartato (NMDA) (Hernandez-Lopez et al., 2000). La activación del receptor de dopamina D1 reduce las corrientes de los receptores GABA(A) en las neuronas de tamaño mediano del neocórtex a través de una cascada de señalización PKA/DARPP-32/PP1 (Flores-Hernández et al., 2000). Además, la dopamina mejora las corrientes de NMDA en las neuronas disociadas de tamaño mediano del estriado, lo cual es mediado por los receptores D1 y DARPP-32 (Flores-Hernández et al., 2002). La PKA, actuando directamente o mediante DARPP-32, regula las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) 1 y 2, componentes cruciales para orquestar modificaciones en la expresión génica. Esta compleja red de señalización está vinculada estrechamente a trastornos patológicos, incluyendo la enfermedad de Parkinson (Santini et al., 2012).

La familia de receptores RDA2, que incluye a los subtipos RDA2, RDA3 y RDA4, se caracteriza por su efecto inhibitorio sobre el adenilato ciclasa, lo que lleva a una reducción en la actividad de PKA y

DARPP-32 (Chio et al., 1994). En particular, el receptor RDA2, que se presenta en dos variantes debido al empalme alternativo del ARN mensajero, modula los canales de potasio GIRK cruciales para las respuestas eléctricas neuronales, a través de la activación de los receptores acoplados a las proteínas $G_{\alpha i/o}$ (Pillai et al., 1998).

Además, el RDA2 facilita la activación de importantes vías de señalización celular asociadas con la proliferación, especialmente la cascada de señalización de la quinasa de proteína activada por mitógenos (MAPK). Se ha observado una activación significativa de ERK1/2 en varias líneas celulares, incluidas HEK-293, COS 7 y células de glioma C6, con variaciones sutiles en la intensidad de la activación de ERK/MAPK entre los subtipos RDA2 y RDA4 en comparación con RDA3 (Beom et al., 2004). Durante la internalización del receptor, el complejo GPCRs- β -arrestin facilita la activación de ERK/MAPK, destacándose el papel del complejo RDA2- β -arrestin en la activación de ERK, un evento no observado durante la activación de RDA3. De este modo, el RDA2 coordina la activación de ERK mediante las isoformas $G_{\alpha i/o}$ y el complejo RDA2R- β -arrestin (Basu et al., 2013). Adicionalmente, la estimulación de RDA2 inicia señalizaciones potentes de la quinasa de proteínas B (PKB), con evidencia convincente en entornos *in vivo* de la activación de PKB en el estriado tras la administración de agonistas de RDA2 (Mangili et al., 2021).

Dopamina en el ovario

Los estudios han revelado que la norepinefrina (NE), es una catecolamina fundamental para el desarrollo folicular, la producción de esteroides y la función del cuerpo lúteo, presenta niveles significativos en el ovario (Battista & Condon, 1986; Bronzi et al., 2015). Asimismo, la dopamina, otra catecolamina de importancia, y sus receptores desempeñan un papel regulador en diversos tejidos ováricos (Gay et al., 2004; King et al., 2005; Mayerhofer et al., 2000; Rey-Ares et al., 2007).

La dopamina y RDA1 se encuentran en el cuerpo lúteo del ovario humano, así como en los ovarios de diversas especies, incluidas yeguas, ratas y conejos (King et al., 2005; Mayerhofer et al., 2000; Parillo et al., 2014; Rey-Ares et al., 2007). En las células granulosas, cuatro de los cinco receptores de dopamina están presentes, siendo RDA2 particularmente importante (Rey-Ares et al., 2007). Esta distribución de receptores se replica en ratas, donde se ha observado la actividad de los RDA1 y RDA2 (Mayerhofer et al., 2000). Tanto en humanos como en primates, las células granulosas manifiestan la expresión de DARPP-32 y PP1, evidenciando un intrincado mecanismo de regulación dopaminérgica en el ovario (Mayerhofer et al., 1999).

El mecanismo de recaptación de dopamina en el ovario incorpora elementos como el transportador de dopamina (DAT), la catecol-O-metiltransferasa (COMT), las monoaminooxidasas A y B (MAO-A y B), y el transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2) en células granulosas humanas. Investigaciones en ratas Wistar y Sprague-Dawley han demostrado la coexpresión de DAT y VMAT2 (Greiner et al., 2008; Saller et al., 2014). Adicionalmente, se ha encontrado que los ovocitos de *Macaca mulatta* utilizan la dopamina como precursor para la síntesis de norepinefrina, mediante la acción de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) presente en estos (Mayerhofer et al., 1998).

Aunque el rol fisiológico exacto de la dopamina en el ovario aún no se ha determinado con precisión, las investigaciones actuales proponen su implicación en la regulación de una amplia gama de funciones ováricas. El estudio de los efectos fisiológicos de las catecolaminas en el ovario se inició hace décadas (Domínguez et al., 1982). La inhibición farmacológica de los RDAs ha sido asociada con fallos en la ovulación, un proceso que depende de manera compleja del día específico dentro del ciclo estral y del momento en que se realiza la administración de los antagonistas (Domínguez et al., 1987; Venegas-Meneses et al., 2015).

Una investigación adicional ha subrayado la importancia crítica del sistema RDA en la coordinación de la ovulación en el momento previsto del estro. En un estudio, se reportó el uso de tres antagonistas dopaminérgicos específicos: el haloperidol, un antagonista no selectivo; el SCH23390, un antagonista de RDA1; y la sulpirida, un antagonista de RDA2, los cuales fueron inyectados en la bursa ovárica en distintas fases del ciclo estral. Tanto la sulpirida como el haloperidol mostraron efectos similares, inhibiendo la ovulación cuando es administrada en las fases de estro y diestro. Además, este estudio presentó un hallazgo intrigante: los sujetos tratados con haloperidol experimentaron un incremento significativo en la expresión de TH, sugiriendo un aumento potencial en la síntesis de dopamina. Sin embargo, la expresión de DARPP-32 se vio incrementada bajo estas condiciones experimentales (Venegas-Meneses et al., 2015).

La compleja función del cuerpo lúteo, esencial en la reproducción, se explora mediante el estudio de la dopamina y de sus receptores en cuerpos lúteos de conejos pseudopreñados en distintas fases de desarrollo. Un experimento reveló la influencia de agonistas de dopamina específicos para RDA1 y RDA3 en cuerpos lúteos cultivados durante la pseudopreñez. Al inicio del desarrollo luteal, el agonista de RDA1, dihidrexidina hidrocloreuro, induce una significativa liberación hormonal, actuando como agente luteotrópico que aumenta los niveles de P4 y PGE2, esenciales para la fertilidad. En contraste, el agonista de RDA3, 7-hidroxi-PIPAT maleato, modula de manera diferente

el proceso, actuando en fases medias y tardías como agente luteolítico, reduciendo la P4 y elevando los niveles de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), marcando el inicio de la regresión luteal (Parillo et al., 2014). Estos resultados muestran una modulación dual por el sistema dopamina/RDA, evidenciando su rol en la dinámica del cuerpo lúteo *in vitro*, donde RDA1 promueve la luteotropía y RDA3 dirige la luteólisis.

En células de ovario de hámster chino transfretadas con receptores RDA2 de rata, muestran que el quinpirole, un agonista de RDA2, incrementa notablemente la liberación de ácido araquidónico. Sin embargo, esta liberación se ve significativamente reducida por la presencia de sulpirida, un antagonista de RDA2 (Kanterman et al., 1991). Este sistema celular también demuestra que la dopamina potencia la liberación de ácido araquidónico, un precursor crítico de PGE₂ (Nilsson et al., 1998). De forma reveladora, el antagonista eticloprida, al interactuar con RDA2, limita efectivamente la producción de PGE₂, destacando cómo la dopamina puede influir en el metabolismo de los eicosanoides a través de la activación de RDA2 (Hellstrand et al., 2002). Estos descubrimientos subrayan la compleja interacción entre los receptores RDA2, la dopamina y el metabolismo eicosanoide, lo que podría tener profundas implicaciones en la comprensión de estos mecanismos en procesos biológicos relevantes.

La administración de cabergolina, agonista del RDA2, a perras durante la fase de anestro, ha demostrado ser efectiva en elevar los niveles de LH plasmática y en inducir el desarrollo folicular. Es destacable que, contrariamente a lo que podría esperarse, la cabergolina no redujo los niveles de prolactina en plasma (Spattini et al., 2007). En una línea similar, se ha encontrado que la dopamina incrementa los niveles de oxitocina y P4 en el cuerpo lúteo, subrayando su influencia en el sistema reproductivo (Kotwica et al., 1996). Además, investigaciones en las que se eliminó el gen DARPP-32 en ratones mostraron una disminución en los niveles de P4, resaltando la importancia de este gen en la regulación hormonal (Mayerhofer et al., 2004). Estos resultados sugieren un papel crítico de los receptores RDA2 y la dopamina en la regulación hormonal, esencial para el correcto funcionamiento del sistema reproductivo (Fig. 8).

En células granulosas luteales humanas, se observó que el agonista selectivo de RDA1, SKF-38393, incrementaba tanto los niveles intracelulares de cAMP como los de P4 en el medio de cultivo, aunque sin demostrar una correlación directa con la síntesis de P4. Además, tanto la dopamina como SKF-38393 provocaron un aumento en la fosforilación de residuos de treonina de DARPP-32 (Mayerhofer et al., 1999). En investigaciones posteriores con el mismo modelo celular, tanto la hCG

como la dopamina potenciaron la fosforilación de DARPP-32 en los residuos de treonina. Mientras que la hCG estimulaba la producción de esteroides en células granulosas luteinizadas de mono y células luteales, la dopamina no tuvo un efecto significativo en la producción de P4, ni basal ni estimulada por hCG (Mayerhofer et al., 2000), sugiriendo que la dopamina no participa directamente en la síntesis hormonal.

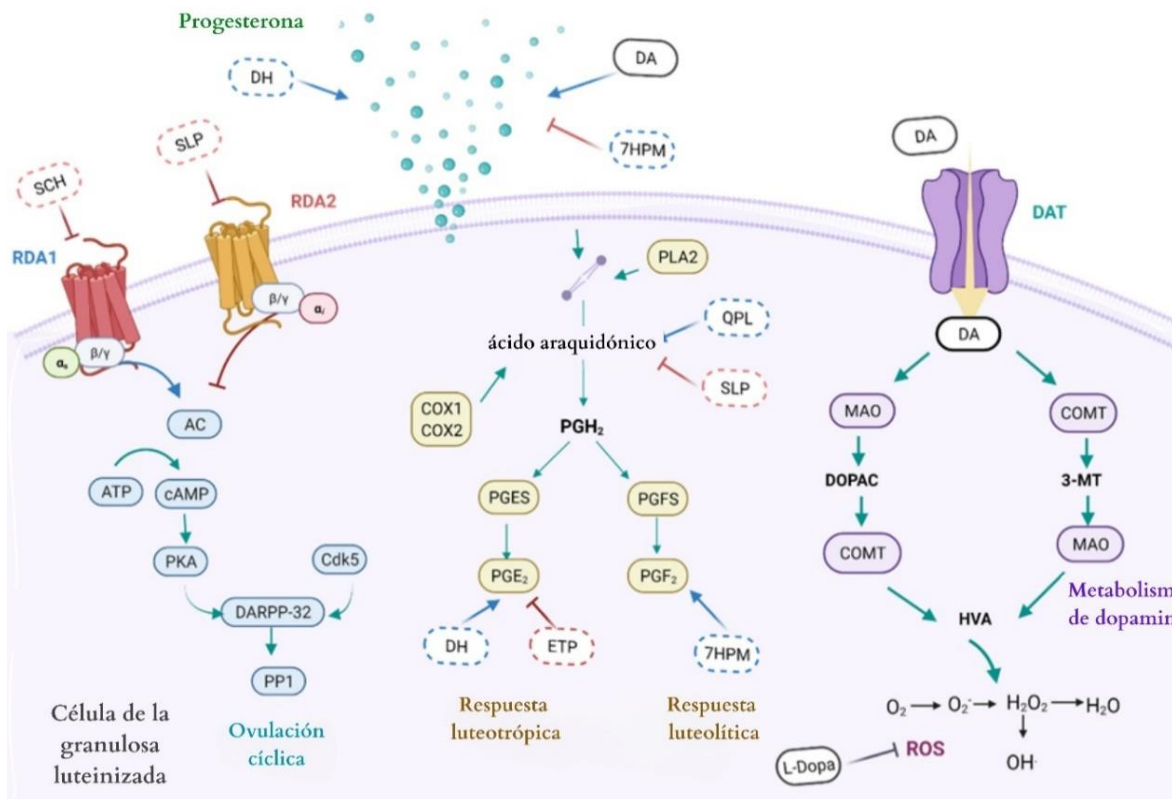


Figura 8. La participación de la dopamina (negro), agonistas dopaminérgicos (azul) y antagonistas (rojo) en la función ovárica. La dopamina y su interacción con los agonistas y antagonistas dopaminérgicos juegan roles cruciales en la función ovárica. Específicamente, se ha vinculado a los antagonistas SCH y SLP con casos de fallo ovulatorio. Por el contrario, DH y ETP han demostrado la capacidad de potenciar la liberación de PGE₂, induciendo así una respuesta luteotrófica. En contraste, 7HPM ha sido identificado como un agente que incrementa la liberación de PGF₂, generando una respuesta luteolítica. Además, se ha implicado a la dopamina en la estimulación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), mientras que, de manera intrigante, la L-Dopa muestra el potencial para mitigar la producción de ROS.

Agonistas: DH (dihidroxiifenilalanina, RDA1), 7HPM (7-hidroxi-PIPAT maleato, RDA3), QPL (quinpirol, RDA2). Antagonistas: SCH (SCH23390, RDA1), SLP (sulpirida, RDA2), ETP (eticloprida, RDA2).

En células granulosas luteales humanas, se observó que el agonista selectivo de RDA1, SKF-38393, incrementaba tanto los niveles intracelulares de cAMP como los de P4 en el medio de cultivo,

aunque sin demostrar una correlación directa con la síntesis de P4. Además, tanto la dopamina como SKF-38393 provocaron un aumento en la fosforilación de residuos de treonina de DARPP-32 (Mayerhofer et al., 1999). En investigaciones posteriores con el mismo modelo celular, tanto la hCG como la dopamina potenciaron la fosforilación de DARPP-32 en los residuos de treonina. Mientras que la hCG estimulaba la producción de esteroides en células granulosas luteinizadas de mono y células luteales, la dopamina no tuvo un efecto significativo en la producción de P4, ni basal ni estimulada por hCG (Mayerhofer et al., 2000), sugiriendo que la dopamina no participa directamente en la síntesis hormonal.

Es interesante notar que la dopamina estimula la producción de ROS en células granulosas humanas, un efecto que se atenúa efectivamente con el uso de bloqueadores de DAT y MAO-A/B, así como con antioxidantes. Contrariamente, los agonistas de RDA1 y RDA2 no inducen la producción de ROS, y la presencia de dopamina en el líquido folicular no desencadena la apoptosis. En contraposición, la L-DOPA reduce la generación de ROS y mejora la supervivencia de las células granulosas cultivadas, en marcado contraste con la dopamina, que disminuye la viabilidad celular. Actuando como un antioxidante, la L-DOPA ofrece beneficios a las células granulosas, mientras que los efectos de la dopamina ovárica parecen ser adversos (Blohberger et al., 2016).

Las investigaciones iniciadas en la década de 1980 han sido fundamentales para explorar los efectos fisiológicos de las catecolaminas en el ovario, destacando como la inhibición farmacológica de los RDAs puede llevar a fallos ovulatorios, dependiendo de la fase del ciclo estral. Los RDAs tienen un papel crucial en la regulación de la ovulación en el momento preciso del estro. Experimentos que emplearon agonistas y antagonistas de los RDA han revelado variaciones en las respuestas hormonales, subrayando tanto efectos luteotrópicos como acciones luteolíticas. La dopamina, presente en el cuerpo lúteo, muestra una interacción significativa con los receptores RDA3 durante las etapas de pseudopreñez. En modelos celulares, la influencia de la dopamina se extiende al metabolismo de los eicosanoides y a la producción de ROS. La contribución de la dopamina al incremento de la LH, la regulación de la P4 y la modulación de las ROS, junto con su compleja interacción con diversos receptores, ofrece una visión detallada de su papel en la función ovárica.

Sistema dopaminérgico en patologías ováricas

Cáncer de ovario

La dopamina ha mostrado una notable eficacia en reducir el crecimiento de diversos tipos de tumores malignos en modelos experimentales con ratones, gracias a su capacidad para inhibir la proliferación de células tumorales y potenciar la respuesta inmune (Wick, 1978, 1981). Es significativo que una amplia gama de células tumorales exprese receptores de dopamina y el DAT, sugiriendo una interacción directa con la dopamina (Ganguly et al., 2010; Ishibashi et al., 1994; Moreno-Smith et al., 2011). Además, se ha observado que ciertos tipos de tumores incrementan su actividad cuando se reduce la función dopaminérgica en las células endoteliales, revelando una dimensión adicional en esta compleja dinámica (Basu & Dasgupta, 2000). Curiosamente, las concentraciones de dopamina en el microambiente tumoral son consistentemente inferiores a las presentes en tejidos sanos, lo que podría tener implicaciones relevantes para el desarrollo y avance del cáncer (Chakroborty et al., 2004). La expresión de receptores de dopamina en distintos tipos de células tumorales, junto con la interacción entre los niveles de dopamina y el entorno tumoral, indica una relación compleja y significativa en la evolución y progresión de tumores, incluidos los ováricos.

Las células endoteliales y las células de cáncer de ovario manifiestan la expresión de todos los receptores de dopamina, a excepción del RDA3, que no se encuentra en las células de cáncer de ovario. La dopamina desempeña un papel crucial al disminuir los niveles de cAMP y suprimir la activación de la quinasa Src, que es inducida por el VEGF en células de cáncer de ovario (Moreno-Smith et al., 2011). En el contexto del cáncer de ovario se ha observado que una baja expresión de DARPP-32, en combinación con una alta expresión de PP1 y Cdk5, está asociada con una menor supervivencia de las pacientes (Martin et al., 2020). Además, la dopamina promueve el reclutamiento de pericitos a través de la ruta de señalización RDA1-cAMP-PKA en células de cáncer de ovario (Moreno-Smith et al., 2013). Un estudio en ratones singénicos con células tumorales ováricas que secretan VEGF, inducido por inyección intraperitoneal, reveló una reducción en la angiogénesis tras el tratamiento con dopamina (Basu et al., 2001). Esta evidencia subraya el impacto significativo de la dopamina y sus receptores en la modulación del microambiente tumoral y la progresión del cáncer de ovario, ofreciendo perspectivas para potenciales terapias dirigidas.

La dopamina, junto con el agonista de RDA2 bromocriptina, han mostrado una capacidad notable para suprimir la expresión de VEGF en células de cáncer de ovario (Moreno-Smith et al., 2011). Del mismo modo, la apomorfina, otro agonista dirigido a los receptores de dopamina RDA1 y RDA2, ha

demostrado una reducción significativa en la proliferación y producción de ATP de células de cáncer de ovario. Notablemente, la apomorfina desencadena apoptosis mitocondrial dependiente de caspasas y provoca una disfunción mitocondrial considerable en células de cáncer de ovario humano (Lee et al., 2020).

La administración de tioridazina, un antagonista de RDA2, ha sido efectiva en inhibir la proliferación de células de cáncer de ovario tanto en modelos experimentales como *in vitro*. La tioridazina promueve la apoptosis y la autofagia mediante la alteración de la vía de señalización AKT/ERK y estimula la producción de ROS, así como el daño al ADN. Este proceso también resulta en la reducción de factores cruciales como el factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2 fosforilado (p-Nrf2), oxigenasa-1 de hemo (HO-1), NADPH quinona deshidrogenasa 1 (NQO1) y HIF1 α (Yong et al., 2020). El HIF-1 α , al unirse a la región promotora de VEGF, juega un papel crucial en la activación de la proliferación y migración de células endoteliales (Yang et al., 2015). Un estudio adicional confirmó los efectos antitumorales y antiangiogénicos de la tioridazina, mostrando que, en xenoinjertos de tumores ováricos en ratones, no solo disminuyó la fosforilación de VEGFR-2, sino que también inhibió la vía de señalización PI3K/mTOR (Park et al., 2014).

La tioridazina ha demostrado ejercer un efecto inhibitorio en la vía PI3K/Akt, lo que resulta en la inducción de efectos citotóxicos en células de cáncer de ovario y el consecuente detenimiento del crecimiento celular (Rho et al., 2011). Varias fenotiazinas, incluida la tioridazina, han inducido la muerte celular por apoptosis y han limitado el crecimiento de las células de cáncer de ovario de manera dosis-dependiente. El mecanismo subyacente a este efecto implica la supresión de eventos cruciales de fosforilación que afectan a la quinasa de proteína S6 ribosomal (p70S6K), mTOR, glucógeno sintasa quinasa-3 beta (GSK-3 β), quinasa de proteína C delta (PKC- δ) y Akt, especialmente en contextos estimulados por el EGF (Choi et al., 2008).

La dopamina y sus receptores desempeñan un papel fundamental en la modulación de aspectos críticos del cáncer de ovario, tales como la proliferación celular y la angiogénesis. Los antagonistas de RDA2 se destacan como agentes anticancerígenos eficaces, capaces de bloquear vías esenciales para el crecimiento y la angiogénesis tumoral, lo que los posiciona como opciones prometedoras para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer.

Síndrome de ovario poliquístico

El SOP es uno de los trastornos endocrinos más comunes entre mujeres en edad fértil, presentando una combinación de síntomas como hiperandrogenismo, anovulación y resistencia a la insulina (Patel, 2018). Es notable el hallazgo de que las concentraciones de NE y dopamina son superiores en el líquido folicular de pacientes con SOP comparadas con las de mujeres sin este trastorno (Musali et al., 2016).

En el SOP, se aprecian alteraciones significativas en el sistema dopaminérgico ovárico, incluyendo un incremento en las concentraciones de dopamina y un aumento en la transcripción de DAT, MAO-A, y MAO-B (Saller et al., 2014). Estas modificaciones también comprenden una disminución en la expresión de RDA2 y un incremento en la producción de metabolitos de dopamina, así como una reducción en la secreción de VEGF tras el tratamiento con cabergolina, un agonista de RDA2 (Gómez et al., 2011). Adicionalmente, se ha observado que en células de la granulosa luteinizadas de mujeres con SOP bajo tratamiento de FIV muestran una regulación al alza y una liberación excesiva de VEGF durante la fase lútea posterior a la inducción ovulatoria (Agrawal et al., 2002), lo que subraya la complejidad de las interacciones hormonales y moleculares en este síndrome.

En otro estudio, datos de microarreglos revelaron un aumento notable en la actividad de MAO-A dentro de las células granulosas luteinizadas (LGCs) entre pacientes con SOP. Interesantemente, tanto en LGCs con SOP como en aquellas sin SOP tratadas con cabergolina, se observó un aumento en la expresión de MAO-A. Este hallazgo se acompaña de cambios distintivos en las vías de señalización de AKT y MAPK, donde las LGCs sin SOP mostraron una tendencia al alza, mientras que aquellas con SOP presentaron una disminución después del tratamiento con cabergolina (Ferrero et al., 2018). Además, el tratamiento con cabergolina en mujeres con SOP no solo mejoró la perfusión sanguínea uterina sino también contribuyó a la regulación del ciclo menstrual (Mohammadbygi et al., 2013). En casos de SOP con hiperprolactinemia, la administración de L-DOPA y bromocriptina redujo los niveles de LH y prolactina, disminuyendo la resistencia vascular y aumentando el flujo sanguíneo uterino (Prelević et al., 1987). La cabergolina, utilizada en pacientes con SOP y hiperprolactinemia leve, logró restablecer la regularidad menstrual de manera efectiva (Ghaneei et al., 2015). Por otro lado, se encontró que la dopamina estimula la secreción de la hormona de crecimiento (GH) en mujeres con SOP (Piaditis et al., 1995).

En pacientes con SOP, la dopamina indujo un aumento en la generación ROS en células granulosas luteinizadas humanas. No obstante, la inhibición de DAT y MAO demostró ser efectiva en reducir los

niveles de ROS (Saller et al., 2014). Un estudio sugiere que la correlación entre los altos niveles de dopamina en pacientes con SOP y una disminución en las concentraciones de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato de hidrógeno (NADPH) podría indicar una activación excesiva del sistema simpático en SOP, además de una interacción directa con las gonadotropinas y la prolactina, lo que podría interferir en la foliculogénesis a través de la generación de ROS (Hamed et al., 2022). Estos hallazgos subrayan la complejidad de las interacciones hormonales y moleculares en el SOP, ofreciendo perspectivas para intervenciones terapéuticas específicas.

Los estudios revisados revelan una compleja interacción entre los receptores dopaminérgicos y los diversos aspectos relacionados con el SOP. En pacientes con SOP, se han identificado alteraciones notables dentro del sistema dopaminérgico ovárico, que incluyen variaciones en la expresión de receptores y enzimas implicadas en el metabolismo de la dopamina. El uso de fármacos como los agonistas de RDA2 ha demostrado tener efectos reguladores sobre la función ovárica y la perfusión sanguínea uterina en mujeres con SOP. No obstante, queda claro que la dinámica entre el sistema dopaminérgico y el SOP es intrincadamente compleja, subrayando la necesidad de investigaciones adicionales para desentrañar completamente su papel y sus consecuencias en esta condición endocrina multifacética.

Especies reactivas de oxígeno y balance óxido-reducción

Las ROS son generadas durante el metabolismo del oxígeno dando origen a tres principales radicales: ion superóxido, peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (Halliwell et al., 1992). Estos radicales son inestables y altamente reactivos; interactúan con ácidos nucleicos, lípidos, proteínas, carbohidratos o cualquier otra molécula cercana provocando una serie de reacciones en cadena que resultan en daño y muerte celular (Evans et al., 2004).

Las ROS son generadas por diferentes vías de manera natural en los organismos. Algunas ROS son producidas por reacciones no enzimáticas, como la vía reacción de Fenton en presencia de metales iónicos de transición (Chiu, 2014). Las reacciones biológicas que transfieren electrones y las reacciones de oxigenasas, las cuales utilizan al oxígeno molecular como sustrato, también generan cantidades importantes de ROS. Desde la cadena transportadora de electrones se producen ROS en condiciones fisiológicas. Otro sistema conocido que produce ROS a través de sistemas enzimáticos son las Xantina deshidrogenasas, las cuales están relacionadas con el sistema de metabolismo de las

purinas (Harrison, 2002). La generación de ROS por el sistema P540 es importante en la síntesis de hormonas esteroideas (Fujii et al., 2005).

Se ha demostrado que las ROS actúan sobre proteínas de señalización celular, modificando vías de señalización relacionadas con crecimiento, proliferación y muerte celular (Mittler et al., 2011). Las ROS interactúan con NF- κ B, activando su vía por la inactivación de I κ B α ; también interactúan con la vía de las MAPK, ya que pueden activar los receptores del EGF y PDGF, los cuales activan principalmente la vía de ERK (Poillet-Perez et al., 2015). Las ROS también actúan sobre la vía de la PI3K/Akt involucrada en funciones críticas para la célula como la síntesis de proteínas, la progresión del ciclo celular, proliferación, apoptosis, autofagia y resistencia a fármacos en respuesta a factores de crecimiento, hormonas y citoquinas (Sarbasov et al., 2005). Las ROS inactivan al homólogo de tensina (PTEN), el cual regula la síntesis de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) e inhibe la activación de Akt, mediante la oxidación de residuos de cisteína (Leslie & Downes, 2002). Recientemente también se ha demostrado que la subunidad reguladora de PKA es objetivo de oxidación por las ROS sobre la cisteína 17, la cual permite la formación de un puente disulfuro entre dos subunidades, provoca la disociación del complejo de PKA (Papa et al., 2012).

En un estado fisiológico, el nivel de las ROS celulares es estable en un equilibrio dinámico y este equilibrio se modula por medio de procesos celulares que las producen y las eliminan. Existen dos sistemas antioxidantes: enzimáticos y no enzimáticos (Agarwal et al., 2005). La principal categoría de las enzimas antioxidantes es el superóxido dismutasa (SOD) que de acuerdo con el metal que contienen se clasifican en dos grupos: SDO1 (contienen Cu y Zn) y SDO2 (contienen Mn). La SOD2, en la matriz mitocondrial convierte el superóxido que no puede difundirse a través de las membranas, en H₂O₂ que luego se reduce a agua por la catalasa. En cambio, la SOD1 reduce principalmente el superóxido del espacio intermembrana y el citosol a H₂O₂. Además, la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión S-transferasa pi (GST-pi), la metalotioneína-3 (MT3), la ferritina de cadena pesada (FHC) y la dihidrodiol deshidrogenasa (DDH1 o AKR1C1) también juegan un papel decisivo en el proceso antioxidante (Meloni & Vašák, 2011). Los antioxidantes no enzimáticos están determinados por la ingesta dietética, siendo vitaminas y minerales como vitamina C, vitamina E, selenio, zinc, taurina, hipotaurina, glutatión, beta caroteno y caroteno (Agarwal et al., 2005).

Papel de las ROS en la función ovárica

En estudios realizados en animales y humanos, se ha mostrado la presencia de las ROS en el tracto reproductivo femenino, ovarios, oviducto e incluso en embriones. Estos compuestos han sido involucrados en funciones reproductivas como la maduración del ovocito, esteroidogénesis ovárica, la función del cuerpo lúteo y la luteólisis (Fujii et al., 2005). El ovario es un órgano activo metabólicamente, está bajo una continua variedad de estrés. Durante el desarrollo folicular se forman ROS cuando se producen estrógenos debido al aumento en la actividad de citocromo P450 (Ortega-Camarillo et al., 1999). Las ROS tienen un papel durante la ovulación que en algunos aspectos es similar al proceso de inflamación (Espey, 1980). La ovulación es suprimida ante la presencia de agentes que inhiben la respuesta inflamatoria. Las ROS son generadas durante la inflamación y es lógico pensar que existe una relación entre la producción de ROS y la ruptura folicular (Espey et al., 1982) (Fig. 9).

Marcadores del estrés oxidativo como la SOD1, SOD2, GPx, γ -glutamyl sintetasa han sido investigados en ovario. La expresión de varios biomarcadores de estrés oxidativo ha demostrado que se encuentran en ovarios humanos en estado fisiológico sano (Suzuki et al., 1999). Todas las etapas foliculares han sido examinadas para la expresión de SOD incluyendo folículos primordiales, primarios, preantrales, antrales y folículos atrésicos (Shiotani et al., 1991; Suzuki et al., 1999). Existe una correlación entre la expresión de la proteína de unión a Ad4 (Ad4BP) y SOD, lo cual sugiere una relación entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la esteroidogénesis (Suzuki et al., 1999). Se encontró la presencia de SOD en células de la teca interna de folículos antrales (Shiotani et al., 1991), y la presencia de Ad4BP en los núcleos de células de la teca y la granulosa, la cual es un factor de transcripción esteroidogénico que induce la transcripción de la enzima P450 esteroidogénica (Suzuki et al., 1999). Tanto las células de la granulosa humana como las células lúteas responden al peróxido de hidrógeno; por ejemplo, la producción de P4 y E2 se reduce cuando se agrega peróxido de hidrógeno a un cultivo de células lúteas estimuladas por hCG. Existe un delicado equilibrio entre las ROS y las enzimas antioxidantes en los tejidos ováricos. Las enzimas antioxidantes neutralizan la producción de ROS y protegen al ovocito (Behrman et al., 2001).

El papel de las ROS en el tejido ovárico sigue siendo un tema de debate. Las ROS pueden ser moléculas importantes de señales fisiológicas de las células del ovario (Finkel, 2011). Un estudio hecho en ratones inyectados con antioxidantes en la bursa ovárica demostró que las ROS son necesarias para los eventos ovulatorios, incluyendo la expansión del *cumulus* y la producción de P4 inducida por LH en los folículos preovulatorios. Los antioxidantes disminuyeron también la tasa de

ovocitos liberados. En células de la granulosa, las ROS actúan como mediadores de la LH, del factor de crecimiento epidérmico y de la señalización vía de MAPK lo que implica que, al menos en los roedores, las ROS son necesarias en el ovario (Agarwal et al., 2012; Shkolnik et al., 2011).

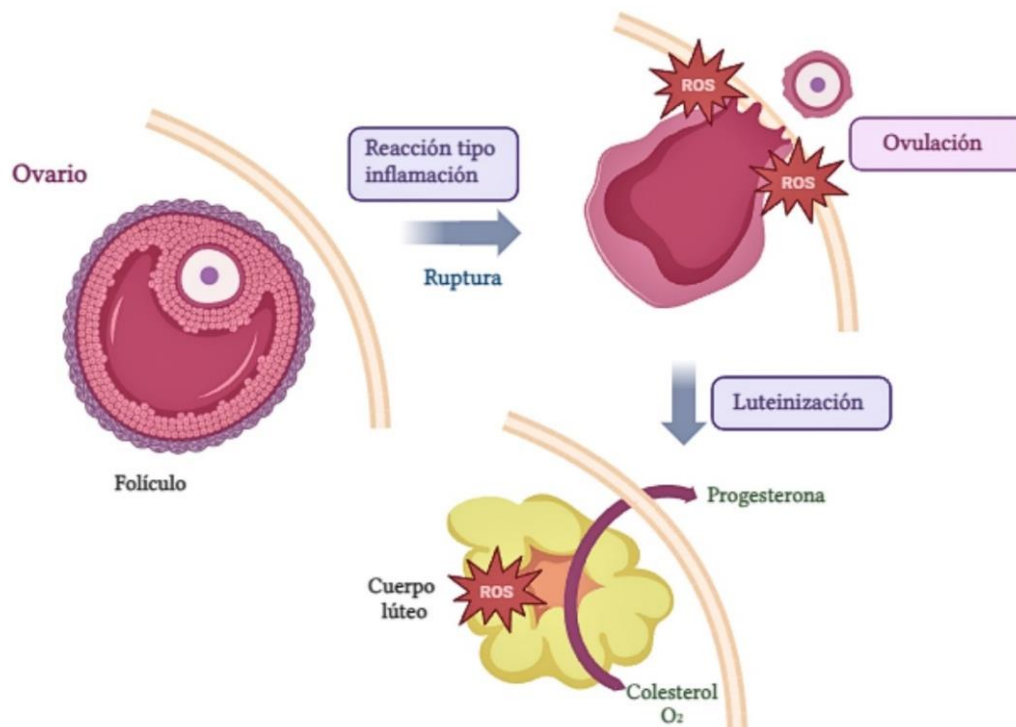


Figura 9. Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la ovulación y la esteroidogénesis en el cuerpo lúteo. La ovulación es un proceso tipo inflamatorio. Las ROS se producen localmente durante la ruptura folicular y pueden estar involucradas durante el proceso de ovulación. Las ROS son generadas también por el cuerpo lúteo por la vía de la monooxigenasa durante la síntesis de hormonas esteroides. (Basado en Fujii et al, 2005) Created with Biorender.

La hipoxia de las células de la granulosa incrementa la concentración de ROS; sin embargo, es un evento normal durante el crecimiento de folículos ováricos (Tropea et al, 2006). Asimismo la limitación de oxígeno es conocida por estimular la angiogénesis folicular y se ha probado que una falla de la angiogénesis en los folículos ováricos contribuye a la atresia folicular (Zelevnik, 2004). Además, se sabe que las ROS puede actuar como transductores de señal o mensajeros intracelulares de la respuesta angiogénica (Pearlstein et al., 2002).

Por otra parte, se ha probado que el incremento de las ROS se asocia a la disminución de la producción de hormonas esteroides (Kodaman & Behrman, 2001) y además se encuentran relacionadas a diversas patologías, por ejemplo, en el síndrome de ovario poliquístico, las ROS se encuentran incrementadas mientras que la concentración de enzimas antioxidantes disminuye (Palacio et al., 2006). Además, se han encontrado aumentadas en el líquido folicular de pacientes

con endometriosis (Ebisch et al., 2006). Por otro lado, en pacientes infértiles se ha mostrado que en el fluido peritoneal las ROS están incrementadas y las enzimas antioxidantes disminuidas (Polak et al., 2001). El envejecimiento aparentemente está asociado con la disminución de la eficacia del sistema antioxidante ovárico (Ebisch et al., 2006).

El impacto negativo del estrés oxidativo en las técnicas de reproducción asistida, como la FIV/ICSI y la maduración *in vitro*, compromete la calidad de los gametos y el desarrollo embrionario. Por ello, la suplementación antioxidante se está investigando como una estrategia potencial para optimizar los resultados de estas técnicas (Agarwal et al., 2008). Sin embargo, es necesario realizar más estudios en humanos para confirmar su efectividad

En conjunto, la evidencia señala el estrés oxidativo como un factor crítico en la infertilidad femenina, lo que indica que estrategias enfocadas en su manejo podrían mejorar significativamente los resultados reproductivos. Es imperativo llevar a cabo más investigaciones, especialmente mediante ensayos controlados aleatorios, para establecer tratamientos efectivos que incluyan el uso de antioxidantes en la mejora de la salud reproductiva femenina.

Dopamina, VEGF y ROS

La dopamina está intrínsecamente asociada con la amplificación de la producción de ROS y el estrés oxidativo subsiguiente, una conexión subrayada por la actividad aumentada de la NADPH oxidasa (Armando et al., 2007; Y. Yang et al., 2012) la MAO y la DAT (Saller et al., 2014). En contraste, la activación de los receptores RDA2 ha sido documentada por sus efectos antioxidantes. La administración de cabergolina, un agonista RDA2, induce un aumento discernible en la actividad del sistema de glutatión dentro del estriado, fomentando así un estado de neuroprotección (Yoshioka et al., 2002). Además, los ratones que carecen del receptor RDA2 ($RDA2^{-/-}$) muestran una escalada observable en el estrés oxidativo (Armando et al., 2007).

En el contexto de la dinámica renal, la producción de ROS emerge como un factor central en la patogénesis intrincada de la hipertensión (Wilcox, 2005). Los ratones $RDA2^{-/-}$ han surgido como un modelo significativo, revelando un aumento conspicuo en el estrés oxidativo íntimamente ligado a una actividad aumentada de la NADPH oxidasa renal y la sobreexpresión de Nox-1, Nox-2 y Nox-4. La alteración del gen RDA2 desencadena inequívocamente una amplificación en la generación de ROS y estrés oxidativo (Armando et al., 2007). Sin embargo, los conductos exactos a través de los cuales RDA2 ejerce su poder regulatorio sobre la actividad y expresión de la NADPH oxidasa permanecen envueltos en incertidumbre. Un aspecto interesante que vale la pena explorar es la

posible implicación de la paraoxonasa 2 (PON2), un actor significativo en contrarrestar la producción de ROS renales, contribuyendo potencialmente a la preservación de los niveles fisiológicos de presión arterial. Notablemente, PON2 emerge como un mediador parcial, descifrando la intrincada danza inhibitoria ejecutada por RDA2 en los frentes de expresión de la NADPH oxidasa, modulación de la actividad y la subsiguiente producción de ROS (Yang et al., 2012).

Además, en el contexto de los ratones RDA2^{-/-}, se observa un declive conspicuo en la expresión de la enzima antioxidante vital oxigenasa de hemo 2 (HO-2) dentro del riñón. Esta revelación intrigante subraya la interacción intrincada entre los sistemas prooxidantes y antioxidantes que orquestan la regulación compleja de la producción de ROS bajo la influencia del receptor RDA2. La importancia de esta interacción se resalta aún más por la normalización exitosa de la presión arterial elevada en ratones RDA2^{-/-} a través de intervenciones dirigidas. La administración de apocinina, un inhibidor de la NADPH oxidasa, o hemina, un potente inductor de HO-1, ha demostrado ser efectiva en mitigar los efectos hipertensivos (Armando et al., 2007). Cambiando el enfoque a una perspectiva alternativa, los efectos de la dopamina y los agonistas de RDA1 sobre el estrés oxidativo dentro de las células del músculo liso vascular han captado la atención. Las bajas concentraciones de dopamina o agonistas de RDA1 han exhibido la capacidad notable de reducir el estrés oxidativo. Este impacto terapéutico se puede atribuir a la activación de PKA, que posteriormente orquesta la supresión de fosfolipasa D (PLD) y PKC (Yasunari et al., 2000).

En modelos *in vivo*, la expresión de Nox2 o Nox4 está elevada en la neoformación vascular en modelos de isquemia en ratones (Al-Shabrawey et al., 2005; Tojo et al., 2005; Vallet et al., 2005). Ratones transgénicos con sobreexpresión de p22phox exhiben una producción aumentada de ROS vasculares, contribuyendo así a la expresión de VEGF y la neovascularización dentro del ateroma experimental (Khatri et al., 2004). Ratones *knockout* de NADPH oxidasa o la inhibición de ROS proporcionan evidencia convincente de que los ROS originados por la NADPH oxidasa juegan un papel fundamental en el proceso de angiogénesis posnatal (Ushio-Fukai, 2006). Además, la sobreexpresión de Nox1 resulta en un aumento de la expresión de VEGF y su receptor, junto con una actividad aumentada de la metaloproteinasas de matriz a través de niveles elevados de ROS. Esto, a su vez, fomenta la angiogénesis tumoral (Arbiser et al., 2002).

El aumento de ROS llevó a un incremento en la apoptosis de células granulosa, estrechamente vinculado a la disminución de factores antiapoptóticos como Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1, junto con un aumento de la molécula BH3-única Puma. Además, el H₂O₂ incrementó los niveles del factor nuclear

eritroide 2 relacionado con factor 2 (Nrf2) y facilitó la activación de la quinasa N-terminal c-Jun (JNK), junto con la acumulación de p53, todo facilitado a través de la generación de ROS. El antioxidante N-acetilcisteína (NAC) intervino impidiendo la muerte celular desencadenada por H₂O₂, logrado al desactivar JNK y restringir la acumulación de p53 a través de la inhibición de la producción de ROS (Yang et al., 2017).

Una variedad de patologías reproductivas exhibe niveles elevados de estrés oxidativo, incluyendo endometriosis (Assaf et al., 2022), SOP (Saller et al., 2014), SHO (Duraker et al., 2021), cáncer de ovario (Stieg et al., 2022) e incluso casos de infertilidad (L. Wang et al., 2021). Estos hallazgos enfatizan cómo la perturbación en la producción de ROS contribuye al desarrollo de trastornos ováricos.

La dopamina exhibe efectos divergentes en la producción de ROS en diferentes tejidos: promoviendo ROS a través de las proteínas Nox en el riñón y la actividad de las MAO en el ovario. Su modulación de la secreción de VEGF conduce a una reducción de la activación de VEGFR-2, disminuyendo la permeabilidad vascular en condiciones ováricas como el cáncer, SHO y SOP. Por el contrario, el VEGF realiza la producción de ROS mediada por la NADPH oxidasa, mientras que los ROS activan VEGFR-2 en células endoteliales. Esta interacción compleja sugiere la posible implicación de la dopamina en patologías ováricas, como el SOP, al influir en la producción de ROS y la actividad de la NADPH oxidasa, afectando posteriormente la señalización de VEGF. Teniendo en cuenta estas interacciones, la dopamina y los RDA podrían tener un potencial terapéutico para trastornos ováricos caracterizados por la desregulación de VEGF y el estrés oxidativo.

ANTECEDENTES

Sistema dopaminérgico ovárico en el SHO

El SHO es una complicación que surge de los tratamientos de reproducción asistida. Se caracteriza por manifestar una serie de síntomas entre los que se incluyen la hemoconcentración, ascitis y desbalances electrolíticos. En sus manifestaciones más graves, el SHO puede conducir a insuficiencia renal, eventos tromboembólicos y, en situaciones extremas, la muerte (Blumenfeld, 2018). Un factor determinante en la patogénesis del SHO es la función del VEGF. Estudios realizados en modelos murinos han demostrado que la administración de gonadotropinas en diferentes dosis incrementa la producción de VEGF, la expresión del receptor VEGFR-2 y la permeabilidad vascular (Gómez et al., 2003). Es relevante mencionar que en modelos de animales ovariectomizados a los que se les

administraron gonadotropinas, no se observó un incremento significativo ni en la producción de VEGF ni en la permeabilidad vascular (Gómez et al., 2002), resaltando el rol crítico del ovario como el blanco principal de la hiperestimulación inducida por gonadotropinas.

La cabergolina ha demostrado ser efectiva en modelos murinos con SHO, logrando reducir la permeabilidad vascular en dosis bajas sin afectar negativamente la proliferación de vasos sanguíneos luteales (Gomez et al., 2006). De la misma forma, se ha encontrado que el agonismo de RDA2 puede disminuir la permeabilidad vascular a través de una reducción en la secreción de VEGF ovárico, según se evidencia en estudios con modelos murinos. En particular, el tratamiento con cabergolina en ratas con SHO no modificó los niveles de expresión del mRNA de VEGF ovárico (Ferrero et al., 2014).

Durante la fase lútea tardía se observó una disminución en la expresión de RDA2 en secciones de ovario humano. La cabergolina tiene la capacidad de reducir la producción de VEGF en células granulosas luteinizadas humanas de manera dependiente de la dosis (Ferrero et al., 2014). En estudios *in vitro*, los agonistas de RDA2 resultaron efectivos en regular la secreción de VEGF. Los estudios *in vitro* mostraron que los agonistas de RDA2 son efectivos en la regulación de la secreción de VEGF. No obstante, al inhibir las vías de señalización convencionales Gi/Go, Gz, y AKT/ β -Arrestin, no se observaron cambios en la secreción de VEGF, lo que sugiere que las vías de señalización tradicionales de RDA2 no están implicadas en la mediación de esta secreción de VEGF (Ferrero et al., 2015). Estos descubrimientos revelan que la interacción entre el sistema dopaminérgico y la patogénesis del SHO es compleja, abriendo posibilidades de nuevas rutas para el tratamiento y manejo de esta afección.

Además del incremento de VEGF en el fluido folicular de pacientes con SHO, se ha detectado también un aumento en los niveles de IL-8. Tanto VEGF como IL-8 ejercen una regulación sobre la permeabilidad endotelial a través de la ruta de señalización de VEGFR-2, implicando la activación de Rho/Rock, la polimerización de actina, y la fosforilación de VE-cadherina y ocludina. Estos procesos resultan en la disociación de las uniones adherentes y estrechas. De forma notable, la dopamina interfiere con la señalización de VEGFR-2, aunque sin impactar la migración y la formación de tubos en células granulosas luteinizadas (Chen et al., 2010).

En el ámbito clínico, la cabergolina ha demostrado ser efectiva en la reducción del volumen de ascitis y la permeabilidad vascular (Alvarez et al., 2007). El empleo de agonistas de RDA2 también ha mostrado ser prometedor en la moderación de la incidencia del SHO; sin embargo, es importante destacar que su efecto en la reducción de casos graves de SHO no ha demostrado significancia

estadística (Alvarez et al., 2007). Un estudio aleatorizado, que incluyó a mujeres sometidas a tratamientos de reproducción asistida, encontró que la cabergolina está vinculada a una notable prevención del SHO de inicio temprano (Carizza et al., 2008). De manera significativa, el uso de dosis bajas de agonistas dopaminérgicos se ha asociado con una disminución de casi el 50% en el riesgo de desarrollar SHO (Shaltout et al., 2012). Aunque estos hallazgos son alentadores, es crucial señalar que, aunque la cabergolina parece ser efectiva en disminuir la incidencia de SHO de inicio temprano en ciclos de FIV con agonistas de GnRH, podría no ser suficiente para prevenir completamente la aparición de SHO grave (Jellad et al., 2017). Sumado a lo anterior, en un meta-análisis de ensayos aleatorizados que compararon la efectividad profiláctica de la cabergolina frente a la ausencia de tratamiento en ciclos de FIV/ICSI, la cabergolina logró una reducción estadísticamente significativa en la incidencia del SHO, con una disminución absoluta del riesgo del 12%. No obstante, es importante destacar que este análisis no encontró pruebas concluyentes de una reducción en la ocurrencia de SHO grave (Youssef et al., 2010).

Por otra parte, la quinagolida, un agonista de RDA2 no derivado de la ergolina ha demostrado ser prometedor en aliviar la ascitis y en la prevención del SHO en pacientes con alto riesgo de SHO sometidas a ICSI, sin comprometer la tasa de embarazo clínico (Alhalabi et al., 2012). Un estudio aleatorizado y doble ciego subraya la eficacia de la quinagolida en prevenir el SHO moderado a grave de inicio temprano, aunque se advierte que dosis elevadas, sin una titulación adecuada, se asociaron a una baja tolerancia (Busso et al., 2010). La quinagolida ha mostrado ser más efectiva que la cabergolina en prevenir el SHO en pacientes de alto riesgo de padecer SHO bajo tratamiento de ICSI (Taheripanah et al., 2018).

En resumen, la prevención y el manejo del SHO en pacientes que se someten a técnicas de reproducción asistida requieren una diversidad de enfoques farmacológicos, enfocados tanto en reducir la incidencia como la severidad del SHO. La cabergolina y la quinagolida han mostrado ser efectivos en este sentido, minimizando la incidencia de SHO y aliviando los síntomas en pacientes de alto riesgo. No obstante, es esencial considerar la dosificación óptima y la tolerancia a estos medicamentos, especialmente en el caso de la quinagolida.

Estrés oxidativo en el SHO

En la literatura existente se encuentran limitados estudios enfocados específicamente en los marcadores de estrés oxidativo en el SHO. La mayoría de las investigaciones se han dirigido hacia el

SOP y otras condiciones relacionadas con la fertilidad; sin centrarse directamente en el SHO. Un estudio examinó las alteraciones oxidativas no enzimáticas de proteínas en el líquido folicular de mujeres fértiles, contrastando ciclos naturales con ciclos estimulados hormonalmente. Se encontró que los ciclos naturales mostraban una glucosilación proteica reducida, indicando una protección superior contra la oxidación de proteínas en ciclos sin estimulación. Esto sugiere que la estimulación ovárica podría incrementar el estrés oxidativo, deteriorando la calidad de los ovocitos y, potencialmente, contribuyendo al desarrollo de SHO (Pérez-Ruiz et al., 2018). Dado que el SHO y el SOP comparten ciertas vías patogénicas, resulta pertinente considerar investigaciones sobre el estrés oxidativo en SOP. Un meta-análisis reveló que mujeres con SOP tienen niveles elevados de marcadores de estrés oxidativo, sin relación con el sobrepeso. Esto indica que el estrés oxidativo podría desempeñar un rol en la etiología del SOP, lo cual podría tener implicaciones en el desarrollo de SHO en estas pacientes (Murri et al., 2013). Por otro lado, un estudio evaluó el estrés oxidativo durante la estimulación ovárica en mujeres, con y sin SOP, sometidas a ICSI. Los hallazgos mostraron que las mujeres con SOP experimentaban estrés oxidativo sistémico tras la estimulación ovárica, señalando que el SOP, y posiblemente el tratamiento asociado, podría elevar el riesgo de SHO debido al incremento en el estrés oxidativo (Mahsa Poormoosavi et al., 2021). Otro estudio que investigó marcadores de estrés oxidativo en pacientes con SHO severo, sometidas a ciclos de TRA, encontró niveles aumentados de dichos marcadores. Aunque este estudio no midió específicamente las ROS, sugiere un aumento del estrés oxidativo en estos pacientes (Duraker et al., 2021). Estos hallazgos sugieren que el estrés oxidativo juega un papel significativo en el desarrollo de SHO, especialmente en contextos de estimulación ovárica. La gestión del estrés oxidativo, mediante estrategias antioxidantes, podría ser una vía para mitigar el riesgo y la severidad del SHO en tratamientos de reproducción asistida.

A pesar de que la evidencia específica sobre el uso de antioxidantes en la prevención o tratamiento del SHO es escasa, existen investigaciones que destacan los beneficios de antioxidantes como la NAC en contextos de estimulación ovárica. Estos estudios resaltan principalmente su capacidad protectora contra el daño por estrés oxidativo y su potencial para favorecer la supervivencia y función folicular. Uno de estos estudios examinó el impacto de la NAC en la autotransplantación heterotópica de ovarios en ratones, revelando una mejora significativa en la viabilidad celular y un aumento en la proporción de células en fase S. Esto indica una potenciación de la supervivencia folicular y del desarrollo, así como de la estructura y función de los ovarios trasplantados, mediante la atenuación del estrés oxidativo y la apoptosis (Mahmoodi et al., 2015). Otro estudio exploró los

efectos protectores de la NAC sobre el daño por isquemia-reperfusión en xenotransplantes de tejido ovárico humano, encontrando que la administración diaria de NAC disminuía dicha lesión y promovía la supervivencia folicular. Esto se logró través de la activación del sistema de defensa antioxidante y la implementación de efectos antiinflamatorios y antiapoptóticos, sugiriendo que la NAC podría ser una opción prometedora para proteger los folículos ováricos de la lesión por isquemia-reperfusión, lo que a su vez podría reducir la pérdida de folículos tras la trasplatación (Olesen et al., 2021).

Adicionalmente, el uso de NAC ha demostrado ser beneficioso para mejorar la calidad de los ovocitos y minimizar el daño oxidativo en modelos animales sometidos a hiperestimulación ovárica controlada repetida (Fan et al., 2022). En otro estudio, la administración oral de NAC como complemento al letrozol en pacientes SOP, una condición frecuentemente vinculada con SHO, mostró que la NAC es un coadyuvante seguro y eficaz. Este tratamiento aumentó las tasas de embarazo sin casos de SHO en el grupo tratado con NAC (Mostajeran et al., 2018).

Aunque estos estudios no se centran directamente en el SHO, sugieren que la NAC posee un potencial significativo para mejorar los resultados reproductivos bajo condiciones de estrés oxidativo y disfunción ovárica. La aplicación de NAC en el manejo del SHO podría ofrecer beneficios teóricos para las pacientes, reduciendo el estrés oxidativo y mejorando la calidad ovárica, lo cual, a su vez, podría atenuar algunos factores contribuyentes al desarrollo del SHO.

Mecanismo de acción de la NAC

Un antioxidante es definido como una sustancia capaz de prevenir o retardar el daño celular inducido por radicales libres. Estos compuestos ejercen su acción protectora mediante diversos mecanismos, siendo los más sobresalientes la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), donde donan un átomo de hidrógeno para neutralizar los radicales libres; la transferencia de electrones de un solo electrón (SET), a través de la cual ceden un electrón a un radical libre; y la capacidad de actuar como quelantes de metales de transición, evitando así la generación de radicales libres mediada por metales. Tales procesos son cruciales en la defensa contra el daño celular provocado por radicales libres (Santos-Sánchez et al., 2019). Además, la formación de aditivos radicales, en el cual los antioxidantes transfieren primero un protón y luego un electrón a los radicales libres, juegan un papel importante en la estabilización de estos últimos, disminuyendo su reactividad (Marković, 2016). La inhibición de la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno destaca la

relevancia de los antioxidantes en el control de las vías de señalización celular involucradas en los procesos inflamatorios y oxidativos (Ivanova et al., 2020).

La NAC se distingue por su amplio espectro de acción terapéutica, que incluye desde la modulación de la transmisión glutamatérgica hasta la neuroprotección y la reducción de la inflamación, su efectividad se atribuye a su influencia sobre las vías glutamatérgica, neurotróficas e inflamatorias, los niveles del antioxidante glutatión, la apoptosis y la función mitocondrial, resaltando su potencial en el manejo de diversas condiciones asociadas al estrés oxidativo y trastornos neuropsiquiátricos (Berk et al., 2013). Actúa eficazmente eliminando especies reactivas como el ácido hipocloroso y el radical hidroxilo, lo que es esencial para la protección contra el estrés oxidativo y la prevención del daño celular (Skvarc et al., 2017). Su papel como precursor del glutatión es clave en la modulación de las rutas neurotróficas e inflamatorias, subrayando su importancia en el tratamiento de trastornos neurológicos (Bavarsad Shahripour et al., 2014). En situaciones de sobredosis de acetaminofén, la NAC promueve la desintoxicación al suministrar cisteína para la síntesis de glutatión y posiblemente al formar aductos con metabolitos tóxicos, lo que facilita la desintoxicación y protege contra el daño hepático (Skvarc et al., 2017). Su habilidad para inhibir la ferroptosis en casos de accidentes cerebrovasculares, dirigirse a lípidos tóxicos derivados de la lipooxigenasa y ofrecer protección contra el accidente cerebrovascular hemorrágico resalta su valor terapéutico (Karuppagounder et al., 2018). Adicionalmente, investigaciones computacionales han validado su acción antioxidante, demostrando su eficacia en la abstracción del átomo de hidrógeno del grupo SH, lo que coincide con las observaciones experimentales sobre su mecanismo de acción (Agnihotri & Mishra, 2009).

JUSTIFICACIÓN

La elevación de las ROS en más de 100 patologías, incluyendo trastornos reproductivos como el SOP, endometriosis e infertilidad, destaca la necesidad de explorar nuevas estrategias terapéuticas. En el contexto del SOP, se observa no solo un incremento en las ROS sino también en el VEGF, elevando el riesgo de desarrollar SHO, mientras que una menor expresión de RDA2 sugiere una posible similitud en el aumento de ROS en el SHO. Esta interrelación evidencia el papel modulador del sistema dopaminérgico ovárico en la angiogénesis ovárica y sus alteraciones en patologías como el SHO y el SOP. Aunque los agonistas de RDA2, como la cabergolina, ofrecen mejoría en el SHO, su ineficacia en casos severos y los efectos secundarios gastrointestinales de opciones como la quinagolida, subrayan la urgencia de abordajes terapéuticos innovadores. Por ello, este estudio propone

administrar un antioxidante, con el fin de atenuar los síntomas del SHO, ofreciendo una vía prometedora hacia el tratamiento de este y otros trastornos reproductivos relacionados con el estrés oxidativo.

HIPÓTESIS

La desregulación del estado óxido-reducción en el ovario es un factor clave en el desarrollo del síndrome de hiperestimulación ovárica. Comparado con el efecto de un agonista dopaminérgico, el empleo de un antioxidante no solo puede restaurar este balance, sino que también se espera que neutralice de manera más efectiva los impactos negativos generados por la elevada expresión de VEGF en esta patología.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el estado óxido-reducción en un modelo de síndrome de hiperestimulación ovárica, explorar la eficacia de un antioxidante en la prevención del síndrome y contrastar sus efectos con los de un agonista dopaminérgico.

Objetivos particulares

1. Realizar un análisis *in silico* para investigar la interacción entre dos distintos agonistas del receptor RDA2 y su potencial interacción con el VEGFR-2.
2. Determinar la condición del sistema óxido-reducción utilizando un modelo animal del síndrome de hiperestimulación ovárica.
3. Analizar el impacto de un antioxidante en la manifestación de los signos característicos del síndrome de hiperestimulación ovárica.
4. Comparar los efectos de un antioxidante y un agonista dopaminérgico de RDA2 en la modulación de los signos característicos del síndrome de hiperestimulación ovárica.

METODOLOGÍA

Análisis *in silico*

Acoplamiento proteína-proteína

El protocolo de acoplamiento proteína-proteína se basa en la disposición aleatoria de complejos en el sitio de unión, seguida de una minimización de energía tratando las estructuras como rígidas, y culmina con la simulación de los modelos más prometedores considerando el espacio de torsión. En

este estudio, se utilizaron las proteínas RDA2 en combinación con risperidona (PDB ID: 6CM4, resolución de rayos X: 2.87 Å) y VEGFR-2 asociado con VEGF (PDB ID: 3V2A, resolución de rayos X: 3.20 Å). El procedimiento de acoplamiento se realizó utilizando el software HADDOCK.

Acoplamiento Molecular

El acoplamiento molecular, también conocido como "*docking*", es una técnica clave para prever cómo una molécula pequeña interactúa con una proteína, facilitando la comprensión del comportamiento de los ligandos en el sitio de unión específico de interés. Este proceso se divide en dos fases principales: primero, se pronostica la conformación, posición y orientación del ligando; segundo, se evalúa su afinidad por el sitio de unión, proporcionando así una base para caracterizar la interacción ligando-proteína.

Preparación de las proteínas

Para este estudio, las proteínas seleccionadas se extrajeron de la base de datos Protein Data Bank (rcsb.org), incluyendo el RDA2 en unión con risperidona (PDB ID: 6CM4, resolución de rayos X: 2.87 Å) y el RDA2 en complejo con la proteína Gi acoplada a bromocriptina (PDB ID: 7JVR, resolución por microscopía electrónica: 2.80 Å). La preparación de estas proteínas se realizó mediante el software Chimera 1.16 (Pettersen et al., 2004), procediendo a la eliminación de todos los componentes no proteicos para aislar la estructura proteica pura. Seguidamente, se procedió a la adición de hidrógenos y la aplicación de las cargas de Kollman utilizando AutodockTools 1.5.7 (Morris et al., 2009).

Preparación de los ligandos

Los ligandos seleccionados para el estudio, dopamina (CID: 681), cabergolina (CID: 54746) y quinagolida (CID: 3086401), se obtuvieron de la base de datos PubChem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov). Para cada uno de los ligandos, se llevó a cabo una minimización de estructura empleando el software Avogadro 1.2 (Hanwell et al., 2012). Posteriormente, se añadieron hidrógenos y se calcularon las cargas de Gasteiger a través de AutodockTools 1.5.7, preparándolos para el análisis posterior.

Docking

Para la identificación y comparación del sitio activo del RDA2 con lo reportado en la literatura, se empleó el software ProteinsPlus, desarrollado por la Universidad de Hamburgo (<https://proteins.plus>). Esta herramienta permitió posicionar de manera precisa la caja de acoplamiento ("grid box"), asegurando la inclusión de aminoácidos clave como Asp114, Ile184, Ser193, Ser194, Ser197, Phe289 y Phe390. La ejecución del docking molecular se llevó a cabo utilizando una combinación de herramientas: AutoDock, AutoDock Vina y AutoDock Tools 1.5.7. Para la visualización y análisis detallado de los resultados obtenidos a través de AutoDock Vina, se utilizó el software Discovery Studio 2021, facilitando la interpretación de las interacciones ligando-proteína.

Análisis in vivo

Modelo de SHO in vivo

Se utilizaron ratas hembra Wistar de 22 días de edad, alojadas en un entorno con iluminación controlada (ciclos de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad) y con acceso ilimitado a agua y alimento balanceado.

Protocolos de tratamiento hormonal

En este estudio se utilizaron ratas Wistar hembras inmaduras de 22 días de edad. Las ratas fueron clasificadas en tres grupos distintos. Los grupos y sus respectivos procedimientos se describen a continuación: (1) grupo intacto (n= 6) que recibió una inyección de 10 unidades internacionales (10UI), de jeringa para insulina, de solución salina isotónica al 0.9% (SSI 10 UI) en los días 24 y 26 de vida a las 9:00 h. (2) grupo control (n= 6) administradas con gonadotropina coriónica equina (PMSG) (Zoetis q-1196-421, México) (10 UI) en el día 24 de vida a las 9:00 h, seguido de una inyección de gonadotropina coriónica humana (hCG) (Sigma, C-0434, Alemania) 48 horas después (10 UI) en el día 26 de vida a las 9:00 h. (3) grupo SHO (n= 96) inyecctadas con de PMSG (10 UI) desde el día 22 hasta el 25 de vida a las 9:00 h diariamente, seguido por una inyección de hCG (10 UI) en el día 26 de vida a las 9:00 h (Fig. 10).

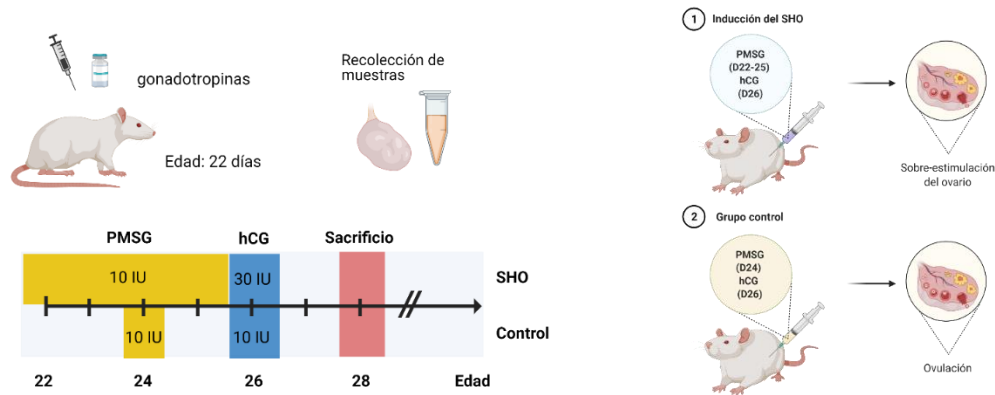


Figura 10. Desarrollo del modelo del síndrome de hiperestimulación ovárica en rata Wistar. Los grupos se dividieron en dos grupos generales. 1) El grupo SHO recibirá 10 IU de PMSG por cuatro días consecutivos iniciando en el día 22, al día 26 recibirá 30 IU de hCG; 2) el grupo control realizará la administración de al día 24 de 10 IU de PMSG y al día 26 10 IU de hCG. Created with BioRender.com

Técnica de la microinyección

Las ratas del grupo SHO fueron distribuidas en diferentes grupos de acuerdo con la dosificación de NAC (25 µg/kg, 50 µg/kg, 100 µg/kg y 200 µg/kg de peso corporal) o de cabergolina (100 µg/kg, 60 µg/kg, 40 µg/kg y 20 µg/kg) (Tabla 1). A las 24 horas de haber administrado la hCG, los animales se sedaron con isoflurano. Posteriormente, se expuso la bursa ovárica para la inyección de NAC o cabergolina, según correspondiese, utilizando una jeringa Hamilton. La microinyección se llevó a cabo con una bomba de perfusión a una velocidad de 2.12 µL/s, asegurando la infiltración completa de la solución aproximada de 20 µL por ovario. Tras una pausa de 20 segundos para permitir la absorción del compuesto, se retiró cuidadosamente la aguja del microinyector. En paralelo, el grupo control recibió 20 µL de solución salina isotónica en cada ovario mediante el mismo procedimiento. Concluida la microinyección, se procedió a la limpieza del área quirúrgica con una solución antiséptica de clorhexidina al 2%, reubicando el órgano dentro de la cavidad peritoneal. Las incisiones se cerraron con sutura de seda y, como medida final, se aplicó solución de sulfato de plata en aerosol sobre la herida para favorecer la cicatrización.

Procedimiento post-Tratamiento y autopsia de los animales

Tras la administración de los tratamientos correspondientes a cada grupo experimental, el sacrificio de los animales se realizó 48 horas después de la aplicación de hCG. En el caso de aquellos sujetos a quienes se les administró NAC o cabergolina, el sacrificio tuvo lugar 24 horas post-tratamiento. Durante la autopsia, se recolectaron muestras de ovarios y plasma sanguíneo para su posterior análisis, registrando además el peso de los animales y de los ovarios extraídos.

Tabla 1. Descripción de los grupos experimentales y tratamientos administrados. Se muestra el número de animales utilizados en cada grupo. Se emplearon el suero de yegua preñada (PMSG) y la hormona coriónica humana (hCG) para los tratamientos hormonales, mientras que la cabergolina (Cb) y la N-acetilcisteína (NAC) se administraron el día 28 por microinyección en la bursa ovárica.

Grupos	Día 22 al 25 de edad	Día 26 de edad	Día 27 de edad	No. de animales
Intacto	10 UI SSI (día 24)	10 UI SSI	-----	6
Control	10 UI PMSG (día 24)	10 UI hCG	-----	12
SHO	10 UI PMSG (diarios)	30 UI hCG	-----	12
Cb20	10 UI PMSG (diarios)	30 UI hCG	Cabergolina 20 µg/kg	6
Cb40	10 UI PMSG (diarios)	30 UI hCG	Cabergolina 40 µg/kg	12
Cb60	10 UI PMSG (diarios)	30 UI hCG	Cabergolina 60 µg/kg	6
Cb100	10 UI PMSG (diarios)	30 UI hCG	Cabergolina 100 µg/kg	6
NAC25	10 UI PMSG (diarios)	30 UI hCG	N-acetilcisteína 25 µg/kg	12
NAC50	10 UI PMSG (diarios)	30 UI hCG	N-acetilcisteína 50 µg/kg	6
NAC100	10 UI PMSG (diarios)	30 UI hCG	N-acetilcisteína 100 µg/kg	6
NAC200	10 UI PMSG (diarios)	30 UI hCG	N-acetilcisteína 200 µg/kg	12
SSI	10 UI PMSG (diarios)	30 UI hCG	Solución salina isotónica	12
SHAM	10 UI PMSG (diarios)	30 UI hCG	Cirugía simulada	6
Total	Inyección subcutánea		Microinyección	114

Evaluación del peso corporal, masa ovárica y masa uterina

Antes de la eutanasia, se registró con precisión el peso corporal de cada animal. Posteriormente, los ovarios y el útero fueron meticulosamente extirpados y pesados. La masa uterina se determinó inmediatamente después de la extirpación. Los tejidos ováricos derecho e izquierdo se pesaron por separado utilizando una balanza analítica de precisión y las mediciones se registraron. Para fines analíticos, se calculó la masa media de los ovarios pareados y se utilizó en las evaluaciones subsiguientes.

Evaluación de la permeabilidad vascular

Para evaluar la permeabilidad vascular en los animales, se administró un volumen de 0.2 mL de solución de azul de Evans (EB) a 5 mM por inyección en la vena de la cola. Transcurridos 30 minutos desde la administración, se procedió a llenar la cavidad peritoneal con 5 mL de solución salina isotónica al 0.9%, realizando un masaje suave durante 30 segundos para facilitar la distribución. Acto seguido, se extrajo cuidadosamente el fluido peritoneal, recogiéndolo en un tubo que contenía 0.05 mL de NaOH 1N para su procesamiento. Tras centrifugar a 900xg durante 12 minutos, se separó el

sobrenadante. La concentración de azul de Evans presente se determinó mediante espectrometría a 610 nm, y los resultados se expresaron en microgramos de EB por 100g de peso corporal.

Procesamiento de homogeneizados de tejido ovárico

Los ovarios de cada grupo experimental fueron homogeneizados para la extracción de proteínas triturándolos en nitrógeno líquido con mortero y pistilo. A continuación, se suspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y la mezcla se centrifugó a 4 °C durante 45 minutos a 12,000 × g. El sobrenadante se recogió cuidadosamente y el pellet resultante se descartó. Las concentraciones de proteínas en el sobrenadante se determinaron utilizando el ensayo de proteínas de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.), siguiendo el protocolo del fabricante.

Cuantificación de lipoperoxidación: MDA y 4HDA

La concentración de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxiacualquenos (4-HDA) se midió utilizando el método de Gerard-Monnier. A 100 µL del sobrenadante ovárico se añadieron 650 µL de solución 1 (N-metil-2-fenilindol, 10.3 mM en acetonitrilo y metanol), 100 µL de agua destilada y 150 µL de ácido metanosulfónico. Tras homogeneizar y una incubación de una hora a 45°C en baño maría, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 15 minutos. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro a 586 nm, calculando las concentraciones de MDA y 4-HDA mediante interpolación en una curva estándar de MDA (1,1,3,3-tetrametoxipropano, de 0.5 a 5 µM) establecida en cada ensayo.

Cuantificación de nitritos

La estimación de la producción de óxido nítrico se basó en la medición de nitritos (NO₂⁻) en los sobrenadantes ováricos, empleando el método de Griess. El reactivo de Griess, compuesto por volúmenes iguales de dihidrocloruro de N-1-naftiletildiamino (0.1% en agua destilada) y sulfanilamida (1.32% en ácido acético glacial al 60%) se añadió a las muestras. La absorbancia se determinó a 540 nm en un espectrofotómetro (Biorad SmartSpect 3000). Las concentraciones de nitritos se calcularon interpolando los valores de absorbancia en una curva estándar de NaNO₂ (de 0.5 a 10 µM), que se estableció de forma paralela en cada análisis.

Histología ovárica y conteo de folículos

Las muestras de ovario se fijaron inmediatamente en solución de Bouin para preservar la morfología del tejido, se deshidrataron secuencialmente y luego se incluyeron en parafina. Se prepararon secciones de 10 μm de grosor y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para la visualización estructural. Las secciones teñidas se examinaron bajo un microscopio de luz equipado con una cámara digital a 10x. Los folículos se enumeraron y categorizaron en tres tipos según su etapa de desarrollo: preantrales (PFs), antrales (AFs) y preovulatorios (POs). También se contaron los cuerpos lúteos (CLs) en cada sección. Toda la sección se examinó de manera metódica para contar estas estructuras ováricas, y los resultados se expresaron como el porcentaje de cada tipo en relación con el número total de estructuras ováricas identificadas, con la suma de todas las estructuras definidas como el 100%.

Medición de la concentración de VEGF-A en suero

La cuantificación de la concentración de VEGF-A en suero se llevó a cabo mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) tipo Sandwich, específicamente diseñado para detectar VEGF-A de rata (Sigma RAB0511, EE. UU.). Previo al análisis, se prepararon las muestras de suero siguiendo estrictamente el protocolo proporcionado por el fabricante. Se añadieron 100 μL de cada estándar y muestra a los pozos designados, seguido de una incubación de 2.5 h a temperatura ambiente. Posteriormente, los pozos fueron lavados cuidadosamente en cuatro ocasiones con solución de lavado 1X. A continuación, se introdujeron 100 μL del anticuerpo de detección ya preparado en cada pozo, y estos se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, con una agitación suave para asegurar una distribución uniforme del anticuerpo. Después de esta etapa, se procedió a un nuevo ciclo de lavado, repitiendo el proceso anterior cuatro veces para eliminar cualquier residuo que pudiera interferir en los resultados. Seguidamente, se añadieron 100 μL de la solución de Estreptavidina previamente preparada a cada uno de los pozos, incubándolos por 45 minutos bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación mencionadas.

Tras completar esta incubación, se llevó a cabo otro ciclo de lavado, también cuatro veces, para preparar los pozos para la adición del siguiente reactivo. Se distribuyeron 100 μL del reactivo de sustrato TMB en cada pozo, procediendo a una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, manteniendo una agitación suave. Este paso es crucial para el desarrollo de la señal. Finalmente, se agregaron 50 μL de la solución de paro a cada pozo, y la absorbancia fue leída inmediatamente a 450 nm. El ensayo presenta un límite de detección que inicia en 2 pg/mL y una

curva estándar que abarca de 2 a 200 pg/mL. Los resultados, expresados en picogramos por mililitro (pg/mL), se obtuvieron a partir de mediciones realizadas por duplicado, siguiendo las recomendaciones del manual del kit.

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media \pm SEM. El análisis de datos se realizó utilizando el software GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, EE. UU.). Para los datos con distribución normal, la significancia estadística se determinó utilizando la prueba ANOVA, seguida de la prueba de comparación de Tukey. Un valor de $p < 0.05$ se consideró como indicativo de significancia estadística.

RESULTADOS

Estudio *in silico*

Interacción entre el RDA2 y el VEGFR-2

El análisis entre las subunidades de la estructura resultante del acoplamiento (Fig 11) se realizó con ayuda del servidor PISA (Krissinel & Henrick, 2007). Fue calculado el área de interfase, la energía libre de interacción entre las dos subunidades y su valor P, el número de puentes de hidrógeno y de puentes salinos. No se observaron puentes disulfuro.

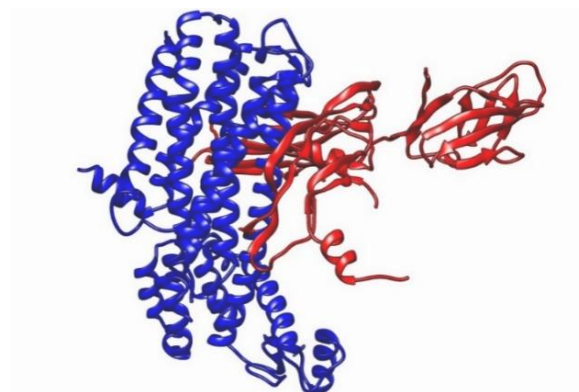


Figura 11. Representación del acoplamiento del RDA2 con el VEGFR2, se observa en azul al RDA2 y en rojo al VEGFR-2. Chimera 1.16.

La interfase mostrada entre ambos receptores corresponde a un área de 1098.5 Å², la cual pertenece a la interacción entre 36 residuos del RDA2 y 34 del VEGFR-2, el valor de P fue de 0.408, este valor representa que tan usual es la presencia de dicha interfase, valores menores a 0.5 corresponden a interfases frecuentes (Tabla 2), como la presente en la estructura.

Tabla 2. Propiedades de la interfase en el modelo de la estructura formada por los dos receptores RDA2-VEGFR-2.

Interfaz	No. residuos	Área (Å ²)	ΔG (Kcal/mol)	ΔG P-Value	No. Puentes de hidrógeno	No. Puentes salinos
A/B (RDA2-VEGFR-2)	36/34	1098.5	-15.1	0.408	2	4

La interfase analizada mostró la presencia de 2 puentes de hidrogeno en la posición 151 y 199 del RDA2 con el residuo 107 y 41 del VEGFR-2, además de 4 puentes salinos ubicados en el residuo 151 y 398 con el residuo 107, 257 y 44 del VEGFR-2 (Tabla 3).

Tabla 3. Residuos de la interfase que forman puentes de hidrógeno o puentes salinos.

Tipo de puente	Residuo del RDA2	Distancia (Å)	Residuo del VEGFR-2
Hidrógeno	ARG 151	2.01	LYS 107
	TYR 199	1.47	ASP 41
Salino	ARG 151	2.90	LYS 107
	HIS 398	3.16	ASP 257
	HIS 398	2.90	ASP 257
	HIS 398	2.85	GLU 44

Acoplamiento molecular entre dos agonistas dopaminérgicos y dopamina con el RDA2

En el análisis del acoplamiento se tomaron en cuenta los resultados mostrados por AutoDock y AutoDock Vina, en ambos casos se llevó a cabo el análisis de las interacciones entre ambos agonistas y dopamina con el RDA2 sólo, el RDA2 acoplado a la proteína Gi y a la estructura resultante del acoplamiento proteína-proteína entre el RDA2 y el VEGFR-2. Posteriormente identificamos todos los residuos que poseían alguna interacción, se determinó la distancia y la energía de cada interacción. La literatura reporta como residuos importantes para la unión y activación de dopamina a la Asp114 en TM3, así como a la serina 193, 194 y 197 en TM5 (Yin, et al., 2020). Los resultados del acoplamiento en ambas estructuras, con o sin proteína Gi, mostraron un puente de hidrógeno presente en la Asp114, los demás residuos variaron, pero en la estructura acoplado a la proteína Gi, un residuo presente, la Phe390, se ha reportado como indispensable para la unión de agonistas dopaminérgicos como la bromocriptina, la cual es una agonista derivada de la ergolina como lo es también la cabergolina (Yin, et al., 2020) (Fig. 12).

En el caso de la cabergolina, se encontró el residuo Asp114 formando diferentes interacciones en las tres estructuras estudiadas, mientras que la Phe389 aparece acoplado al RDA2 sin importar la presencia de la proteína Gi, residuo antes reportado para el reconocimiento de otro agonista derivado de la ergolina, la bromocriptina. Por otra parte, en la estructura formado por RDA2-VEGFR-2 se muestra el residuo Ile184 del TM7, la cual ha sido reportada para ligandos triciclos que se acoplan al RDA2 (Fig. 13).

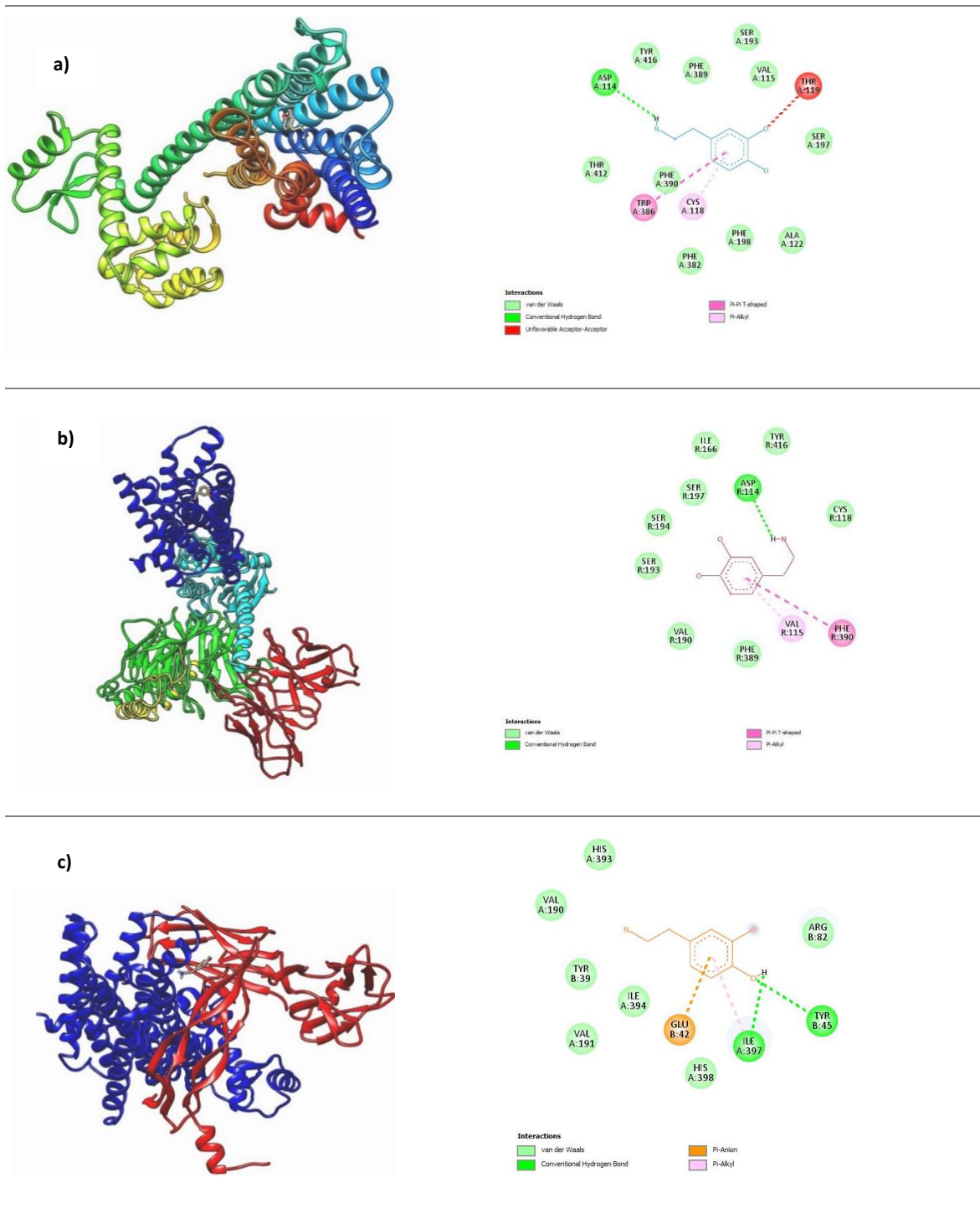
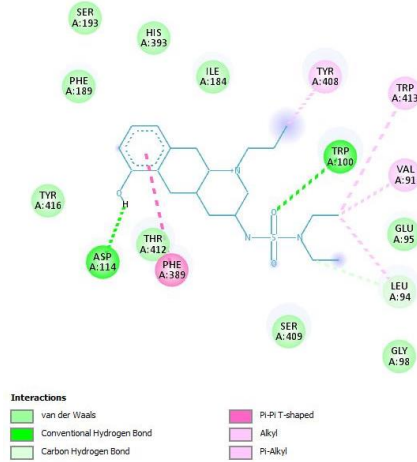
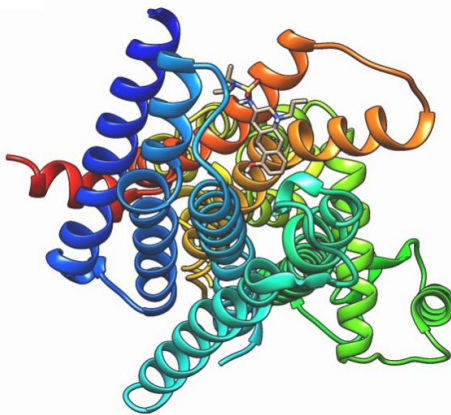
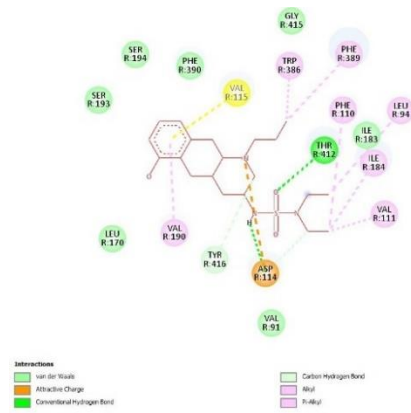
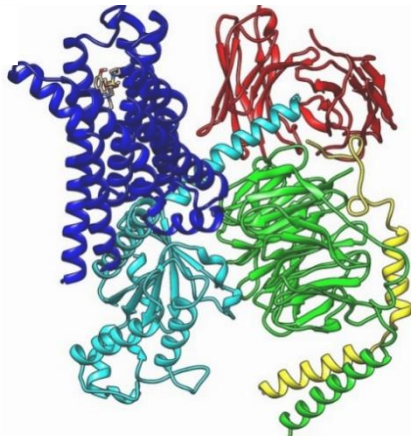


Figura 12. Interacciones de dopamina con el RDA2 sólo (a), con el RDA2 acoplado a la proteína Gi (b) y con la estructura formada del acoplamiento proteína-proteína del RDA2 con el VEGFR-2 (c). los diferentes tipos de enlaces en las estructuras de las proteínas se distinguen por colores específicos: el verde indica enlaces de hidrógeno convencionales, el magenta representa los enlaces Pi-Pi T-shaped, el naranja muestra los enlaces Pi-Alkyl, y el amarillo simboliza las interacciones de van der Waals. Las interacciones fueron visualizadas con DiscoveryStudio 2021.

a)



b)



c)

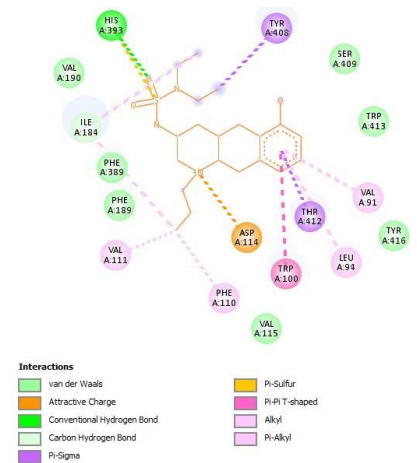
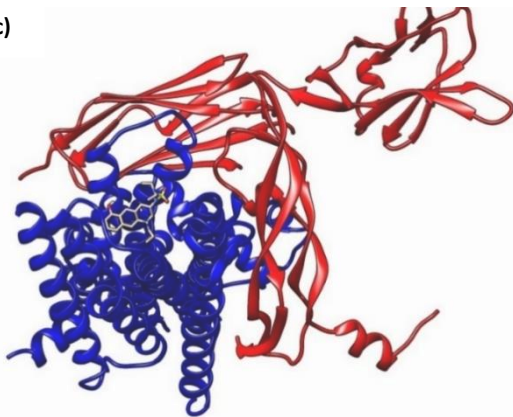


Figura 13. Interacciones de cabergolina con el RDA2 sólo (a), con el RDA2 acoplado a la proteína Gi (b) y con la estructura formada del acoplamiento proteína-proteína del RDA2 con el VEGFR-2. los diferentes tipos de enlaces en las estructuras de las proteínas se distinguen por colores específicos: el verde indica enlaces de hidrógeno convencionales, el magenta representa los enlaces Pi-Pi T-shaped, el naranja muestra los enlaces Pi-Alkyl, el amarillo simboliza las interacciones de van der Waals y el morado indica enlaces Pi-Sigma. Las interacciones fueron visualizadas con DiscoveryStudio 2021.

Para la quinagolida, los residuos encontrados fueron especialmente variables según la estructura, la Phe389 y Val91 se conservan en todas las estructuras. En presencia de la proteína G, se muestran 2 puentes de hidrógeno entre la Asp114 y Thr412, los cuales se pierden en la última estructura. (Fig. 14). AutoDock cuantifica y evalúa la energía libre resultante de la interacción proteína ligando mediante el algoritmo genético Lamarckiano. Mientras que, AutoGrid, ejecuta un precálculo de las afinidades atómicas y establece las condiciones del acoplamiento molecular. Este programa proporciona información sobre la energía de unión, la eficacia del ligando, la constante de inhibición y la energía intramolecular para distintas conformaciones, normalmente 10. Los parámetros fueron analizados estadísticamente para las distintas conformaciones del RDA2 acoplado a la proteína Gi con los tres ligandos. La energía de unión cuantifica la afinidad del complejo ligando-proteína, una variación negativa de la energía de Gibbs significa una mayor estabilidad del complejo proteína-ligando. Dopamina presenta diferencias significativas respecto a los agonistas del RDA2, la estabilidad en la formación del complejo proteína-ligando es más favorable para los agonistas que para la dopamina (Tabla 4). La energía intermolecular es la energía entre los átomos en diferentes moléculas. Otra vez, dopamina muestra diferencias significativas respecto a los dos agonistas RDA2. Siendo menos favorable comparado a los otros ligandos. En cuanto a la energía de solvatación, esta hace referencia a la pérdida de energía electrostática y/o Van de Waals dentro de la interacción entre el ligando o la proteína. Los cambios presentes en la energía de solvatación entres los tres ligandos muestran que la interacción con la proteína es distinta en todos los casos (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros del resultado del acoplamiento por AutoDock de los tres ligandos al RDA2 acoplado a la proteína Gi.

Ligando	Energía de unión	Eficacia del ligando	Constante de inhibición (μM)	Energía intramolecular	Energía de solvatación
Dopamina	$-6.17 \pm 0.08^{***}$	$-0.55 \pm 0.004^{***}$	$34.26 \pm 2.74^{***}$	$-7.59 \pm 0,05^{***}$	$-5.46 \pm 0.9^{***}$
Cabergolina	-8.72 ± 0.15	-0.31 ± 0.005	$0,52 \pm 0.11$	$-11.04 \pm 0.18^*$	$-10.35 \pm 0.9^*$
Quinagolida	-8.22 ± 0.18	-0.30 ± 0.006	$1,37 \pm 0.35$	-10.42 ± 0.19	-9.92 ± 0.14

Media \pm SEM ***P<0.001 comparado con cabergolina y quinagolida, *P<0.005 comparado con quinagolida.; ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey.

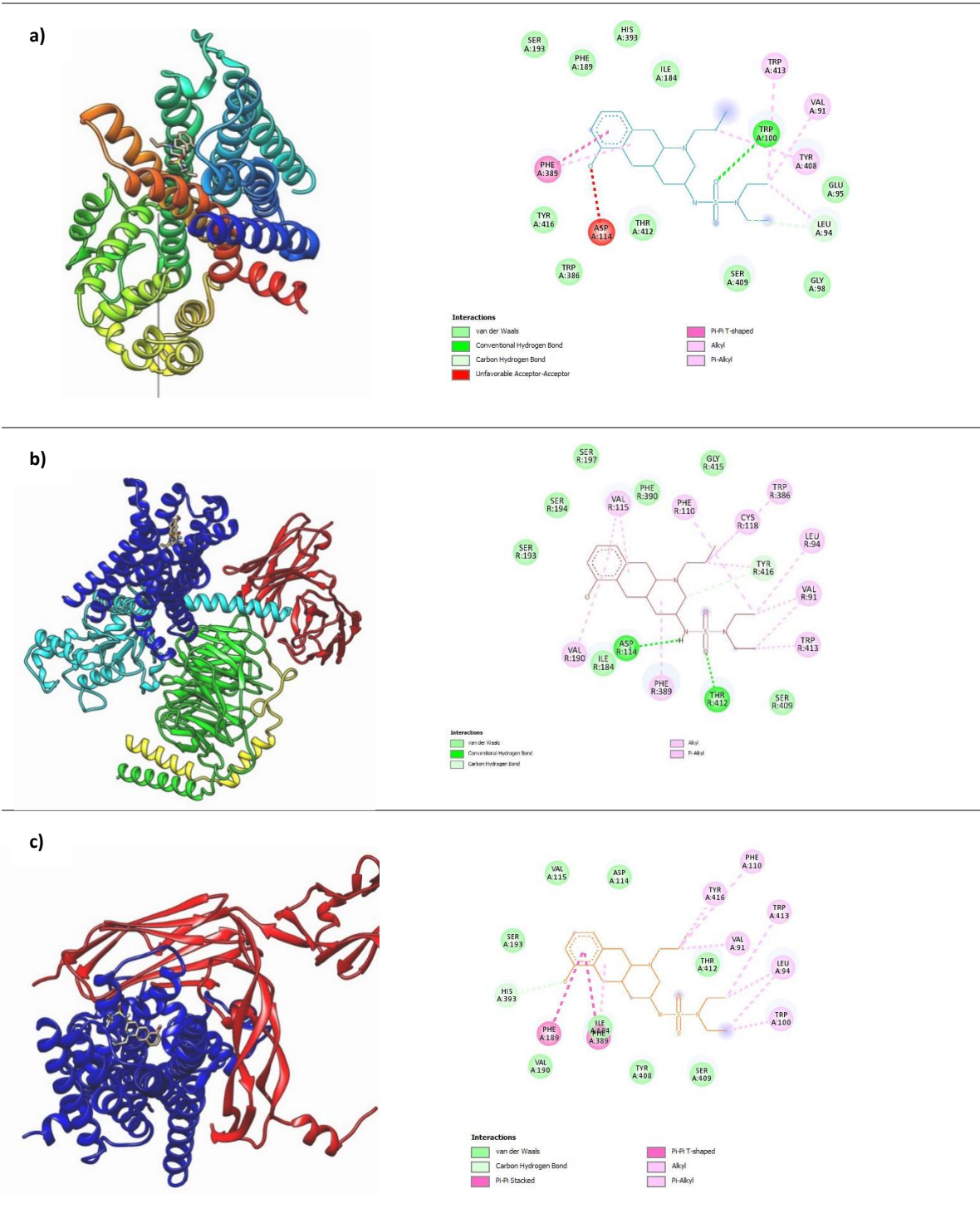


Figura 14. Interacciones de quinagolida con el RDA2 sólo (a), con el RDA2 acoplado a la proteína Gi (b) y con la estructura formada del acoplamiento proteína-proteína del RDA2 con el VEGFR-2. los diferentes tipos de enlaces en las estructuras de las proteínas se distinguen por colores específicos: el verde indica enlaces de hidrógeno convencionales y el magenta representa los enlaces. Las interacciones fueron visualizadas con DiscoveryStudio 2021.

La constante de inhibición nos permite estimar la afinidad del ligando a la proteína, entre mayor el resultado es menos afín. Una vez más dopamina exhibe cambios significativos respecto a los dos agonistas, los agonistas se unen con mayor afinidad al receptor RDA2 (Tabla 4).

Estudio *in vivo*

Validación del modelo *in vivo* del SHO

En este estudio, se estableció con éxito un modelo del SHO, como lo demuestran los aumentos significativos en marcadores fisiológicos como el peso corporal (SHO: 68.0 ± 1.7 vs control: 54.2 ± 5.1 gramos; $p < 0.05$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey), el peso ovárico (SHO: 289.8 ± 25.1 vs control: 92.8 ± 11.7 mg/100 g de peso corporal; $p < 0.001$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey), el peso uterino (SHO: 286.8 ± 21.2 vs control: 210.9 ± 6.1 mg/100 g de peso corporal; $p < 0.001$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey) (Fig. 15), la permeabilidad vascular abdominal (SHO: 10.8 ± 0.4 vs control: 2.7 ± 0.2 μ g EB/100 g de peso corporal; $p < 0.001$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey) (Fig. 16b). Además, se observó un aumento marcado en los niveles de VEGF-A (SHO: 150.4 ± 20.7 vs control: 68.6 ± 16.8 pg/mL; $p < 0.01$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey) (Fig. 16a), confirmando la validez del modelo.

En comparación con el grupo intacto, que no recibió estimulación de gonadotropinas, el grupo control exhibió aumentos sustanciales en los pesos relativos del ovario (control: 92.8 ± 11.7 vs intacto: 18.9 ± 1.5 mg/100 g de peso corporal; $p < 0.001$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey) y del útero (control: 210.9 ± 6.1 vs intacto: 107.9 ± 3.3 mg/100 g de peso corporal; $p < 0.001$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey) (Fig. 15). Sin embargo, estas alteraciones no estuvieron acompañadas por cambios en la concentración de VEGF-A (control: 68.6 ± 16.8 vs intacto: 43.8 ± 0.1 pg/mL; $p < 0.01$, ns) (Fig. 16a) o en la permeabilidad vascular (control: 2.7 ± 0.2 vs intacto: 2.7 ± 0.4 μ g EB/100 g de peso corporal; ns) (Fig. 16b), lo que afirma el papel del grupo control como una línea base consistente para la comparación. La ausencia de cambios en el grupo intacto confirma la especificidad del método de inducción de SHO.

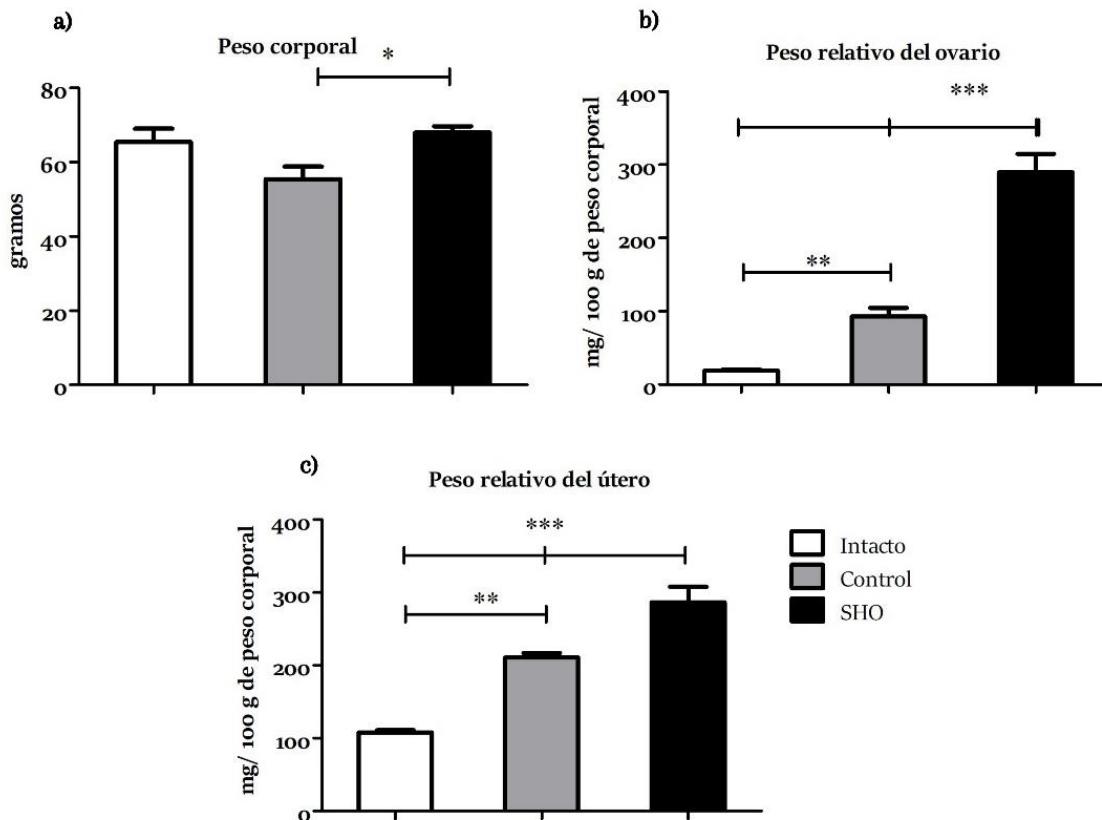


Figura 15. Validación del modelo de SHO a través de marcadores fisiológicos clave. Los animales con SHO mostraron aumentos significativos en el peso corporal (a), peso del ovario (b) y peso del útero (c), en comparación con el grupo control. El grupo control también mostró un aumento en el peso del ovario y del útero en comparación con el grupo intacto. (n=6) Media \pm SEM, *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey.

Marcadores de estrés oxidativo incrementados asociados con el SHO

En nuestro estudio, observamos cambios bioquímicos significativos en ratas afectadas por el SHO. Específicamente, el grupo con SHO mostró un aumento estadísticamente significativo en los niveles de lipoperoxidación comparado tanto con los grupos intacto como con el de control útero (SHO: 0.52 ± 0.01 vs control: 0.35 ± 0.3 ; $p < 0.01$ y vs intacto: 0.29 ± 0.3 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; $p < 0.001$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey) (Fig. 16c). Asimismo, las concentraciones de nitritos fueron particularmente elevadas en el grupo con SHO en comparación con los grupos intacto y control (SHO: 0.61 ± 0.05 vs control: 0.22 ± 0.2 y vs intacto: 0.33 ± 0.04 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; $p < 0.001$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey) (Fig. 16d). Aunque hubo diferencias en el peso ovárico entre los grupos (Fig. 15b), una comparación directa de los grupos de control e intacto no mostró cambios significativos en los niveles de lipoperoxidación (control: 0.35 ± 0.3 vs intacto: 0.29 ± 0.3 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de

proteína; ns) (Fig. 16c) y nitritos (control: 0.22 ± 0.2 vs intacto: 0.33 ± 0.04 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; ns) (Fig. 16d), sugiriendo que estas perturbaciones bioquímicas estaban primordialmente asociadas con el SHO.

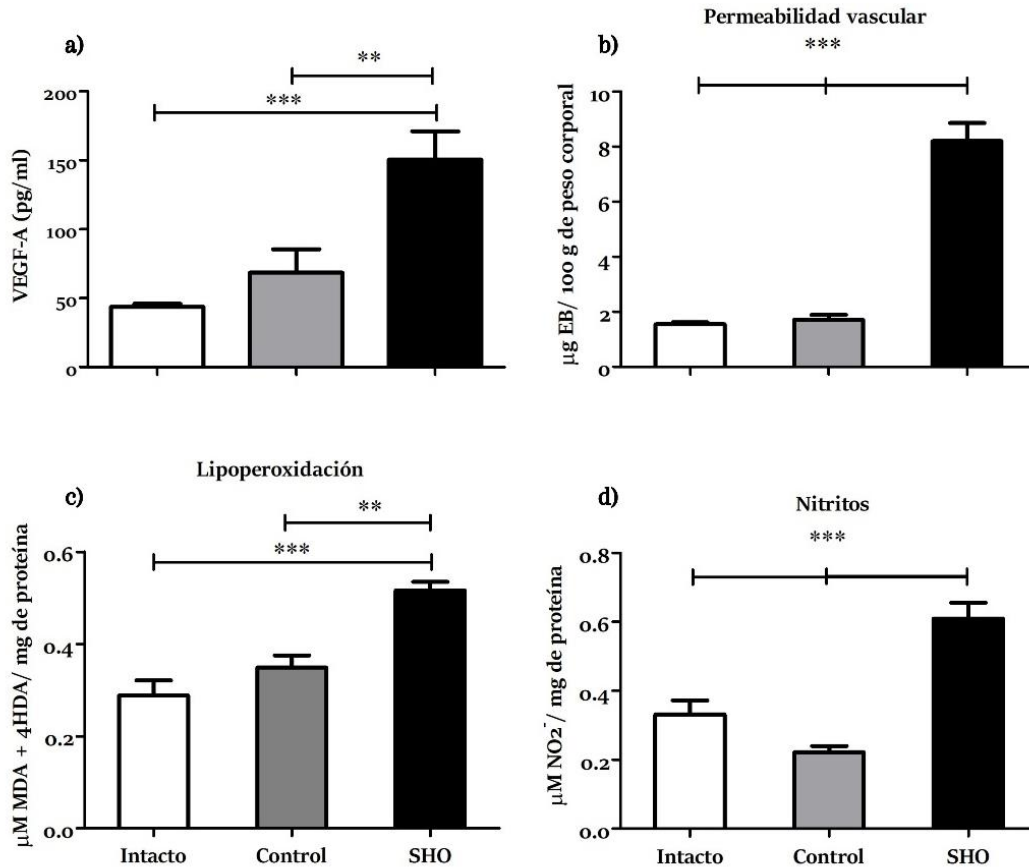


Figura 16. Análisis comparativo de biomarcadores en modelos de SHO. (a) Niveles de VEGF-A en suero: Se registran aumentos significativos en modelos SHO frente a los controles e intactos. (b) Permeabilidad vascular: Mayor en SHO, en comparación con los otros grupos. (c) Lipoperoxidación: Los modelos SHO muestran una elevación notoria respecto a los controles e intactos. (d) Niveles de nitritos: También elevados en SHO comparado con los grupos control e intacto. (n=6)) Media \pm SEM, *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey.

El SHO produce cambios en la distribución de la población folicular y de cuerpos lúteos

El impacto del SHO en la morfología ovárica fue evaluado en el modelo de rata utilizando la técnica de tinción HE en secciones de tejido ovárico para enumerar folículos en varias etapas de desarrollo. Nuestro análisis indicó una reducción significativa en el número de folículos preantrales (PFs) (SHO: 21.6 ± 0.8 vs control: 28.3 ± 1.1 % de PFs; $p<0.05$, t de student) y folículos antrales (AFs) (SHO: 28.2 ± 1.6 vs control: 42.3 ± 2.8 % de AFs; $p<0.01$, t de student) en el grupo SHO en comparación con el grupo de control. Por el contrario, el grupo SHO exhibió un mayor número de estructuras de cuerpos lúteos (CLs) (SHO: 40.9 ± 1.5 vs control: 12.1 ± 0.8 % de CLs; $p<0.001$, t de student) (Fig. 17).

Estos hallazgos destacan las alteraciones sustanciales en la estructura del tejido ovárico atribuibles al SHO, sugiriendo una posible interrupción en la foliculogénesis normal debido a la condición.

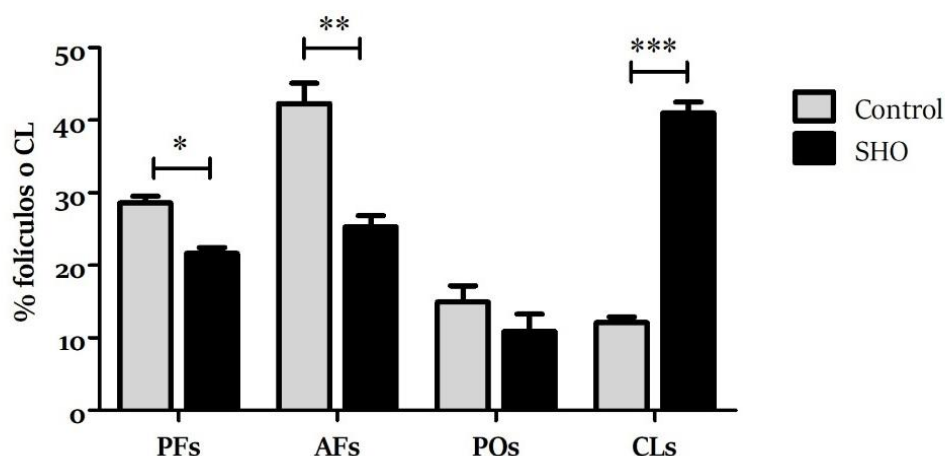


Figura 17. Dinámica folicular de animales con SHO en comparación con el grupo control. En el grupo con SHO, hubo una reducción significativa en el porcentaje de folículos preantrales y antrales, junto con un aumento en el porcentaje de cuerpo lúteo en comparación con el grupo control. Grupos experimentales: CL (cuerpo lúteo), AF (folículo antral), PF (folículo preantral) y PO (folículo preovulatorio). (n=6) Media \pm SEM, *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001, t de student.

La cabergolina y la NAC reducen la permeabilidad vascular de manera dosis dependiente a través de la disminución de VEGF-A

La administración de cabergolina causó una reducción significativa en la permeabilidad vascular a una dosis de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal (CB 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 4.1 ± 0.6 vs SSI: 10.3 ± 0.8 y vs SHAM: 11.2 ± 1.0 μg EB/100 g de peso corporal; $p < 0.001$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey), con reducciones adicionales observadas a 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (CB60 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 5.4 ± 0.7 vs SSI: 10.3 ± 0.8 y vs SHAM: 11.2 ± 1.0 μg EB/100 g de peso corporal; $p < 0.001$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey) y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (CB 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 3.4 ± 0.3 vs SSI: 10.3 ± 0.8 y vs SHAM: 11.2 ± 1.0 μg EB/100 g de peso corporal; $p < 0.001$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey), en comparación con los grupos SSI y SHAM (Fig. 18a). Esta reducción estuvo asociada con una disminución en los niveles séricos de VEGF-A (CB 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 24.8 ± 9.8 vs SSI: 175.3 ± 23.5 pg/mL ; $p < 0.001$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey) (Fig. 19a).

La NAC, a partir de una dosis de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (NAC 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 3.1 ± 0.3 vs SSI: 10.3 ± 0.8 y vs SHAM: 11.2 ± 1.0 μg EB/100 g de peso corporal; $p < 0.001$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey), también condujo a una disminución marcada en la permeabilidad vascular, un efecto que se mantuvo con una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (NAC 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 5.4 ± 1.3 vs SSI: 10.3 ± 0.8 ; $p < 0.01$, y vs SHAM: 11.2 ± 1.0 μg EB/100 g de peso corporal; $p < 0.05$, ANOVA de una vía seguida de prueba de

Tukey) en comparación con los grupos SSI y SHAM. Sin embargo, en concentraciones de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (NAC 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 7.2 ± 1.5 vs SSI: 10.3 ± 0.8 y vs SHAM: 11.2 ± 1.0 μg EB/100 g de peso corporal; ns) y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (NAC 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 10.7 ± 0.7 vs SSI: 10.3 ± 0.8 y vs SHAM: 11.2 ± 1.0 μg EB/100 g de peso corporal; ns), no se observó un efecto significativo sobre la permeabilidad vascular (Fig. 18b).

De manera similar, mientras que la concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (NAC 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 81.5 ± 11.8 vs SSI: 150.4 ± 20.7 pg/mL; $p < 0.01$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey) redujo los niveles séricos de VEGF-A, la concentración más alta probada (NAC 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 122.7 ± 15.4 vs SSI: 150.4 ± 20.7 pg/mL; ns) no produjo cambios significativos (Fig. 19a). Tampoco se observaron diferencias significativas en la permeabilidad vascular (SHO: 10.8 ± 0.4 vs SSI: 10.3 ± 0.8 y vs SHAM: 11.23 ± 1.0 μg EB/100 g de peso corporal; ns) (Fig. 18a) o los niveles de VEGF-A (SHO: 150.4 ± 20.7 vs SSI: 150.4 ± 20.7 pg/mL; ns) entre los grupos SHO, SSI y SHAM (Fig. 19a).

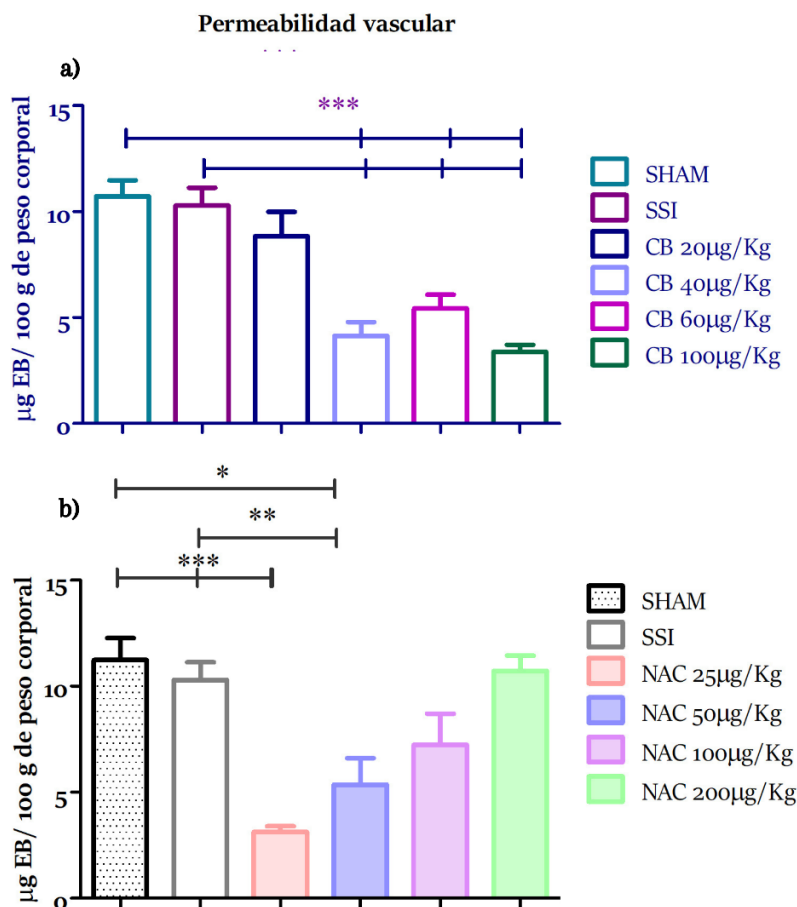


Figura 18. Efecto diferencial de la cabergolina (CB) y la N-acetilcisteína (NAC) en la permeabilidad vascular asociada al SHO: (a) La cabergolina logró una reducción significativa de la permeabilidad vascular ovárica comenzando con dosis de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en comparación con el grupo que recibió solución salina isotónica (SSI). (b) La N-acetil-L-cisteína demostró ser eficaz en la disminución de la permeabilidad vascular especialmente en las dosis más bajas examinadas. (n=6) Media \pm SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey.

La NAC atenúa las alteraciones inducidas por el SHO sobre los parámetros ováricos y uterinos en contrastante al agonista dopaminérgico

El tratamiento con NAC redujo significativa el peso ovárico a dosis de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (NAC 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 261.7 \pm 19.7 vs SSI: 367.2 \pm 15.6; $p < 0.05$, y vs SHAM: 408.8 \pm 31.8 mg/100 g de peso corporal; $p < 0.001$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey) y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal (NAC 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 280.3 \pm 22.9 vs SHAM: 408.8 \pm 31.8 mg/100 g de peso corporal; $p < 0.01$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey), en comparación con la inyección de solución salina SSI y los grupos SHAM (Fig. 20). Una reducción significativa similar en el peso uterino también se observó en las dosis de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (NAC 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 224.6 \pm 17.4 vs SSI: 306.9 \pm 8.7 y vs SHAM: 318.9 \pm 11.4 mg/100 g de peso corporal; $p < 0.01$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey) y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso (NAC 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 218.7 \pm 27.8 vs SSI: 306.9 \pm 8.7; $p < 0.05$, y vs SHAM: 318.9 \pm 11.4 mg/100 g de peso corporal; $p < 0.01$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey) (Fig. 21).

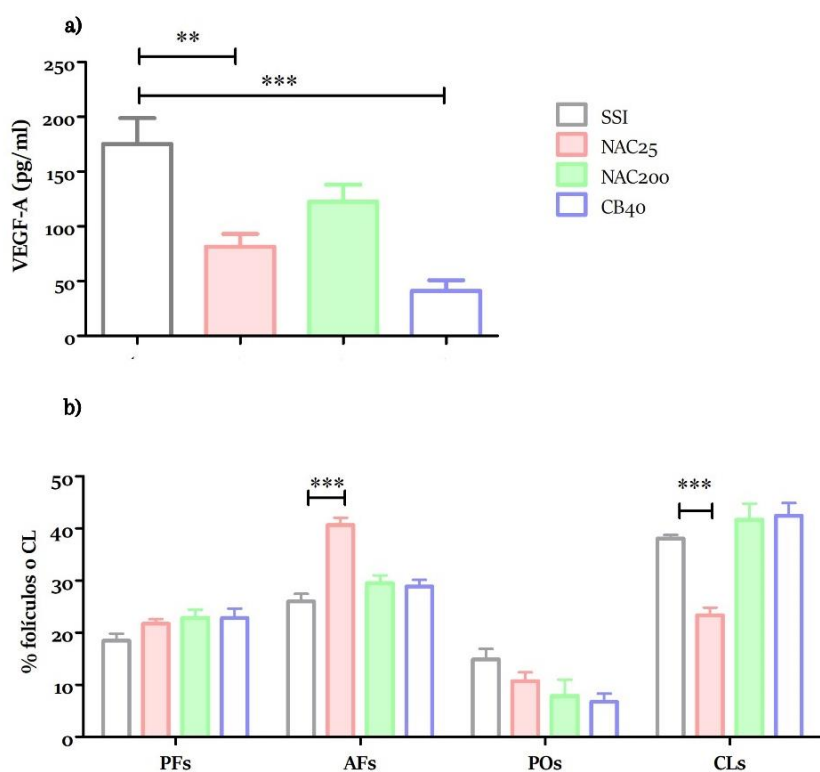


Figura 19. Efectos de la administración local de N-acetilcisteína (NAC) sobre la concentración de VEGF-A y la morfología ovárica en ratas afectadas por SHO: (a) El tratamiento con NAC condujo a una disminución de los niveles de VEGF-A, con reducciones similares a las observadas con la administración de CB, especialmente en la concentración más baja administrada. (b) En cuanto a la distribución de folículos o cuerpos lúteos (CL), el tratamiento antioxidante incrementó los porcentajes de folículos antrales (AF) en comparación con el grupo tratado con solución salina SSI, mientras que los porcentajes de CL experimentaron una disminución significativa. (n=6) Media \pm SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey.

Por el contrario, el agonista dopaminérgico no demostró un efecto significativo en el peso ovárico kg (CB 40µg/kg: 344.7 ± 25.5 vs SSI: 367.2 ± 15.6 y vs SHAM: 408.8 ± 31.8 mg/100 g de peso corporal; ns) (Fig. 18b) o uterino (CB 40µg/kg: 311.8 ± 21.8 vs SSI: 306.9 ± 8.7 y vs SHAM: 318.9 ± 11.4 mg/100 g de peso corporal; p<0.01, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey) (Fig. 19b).

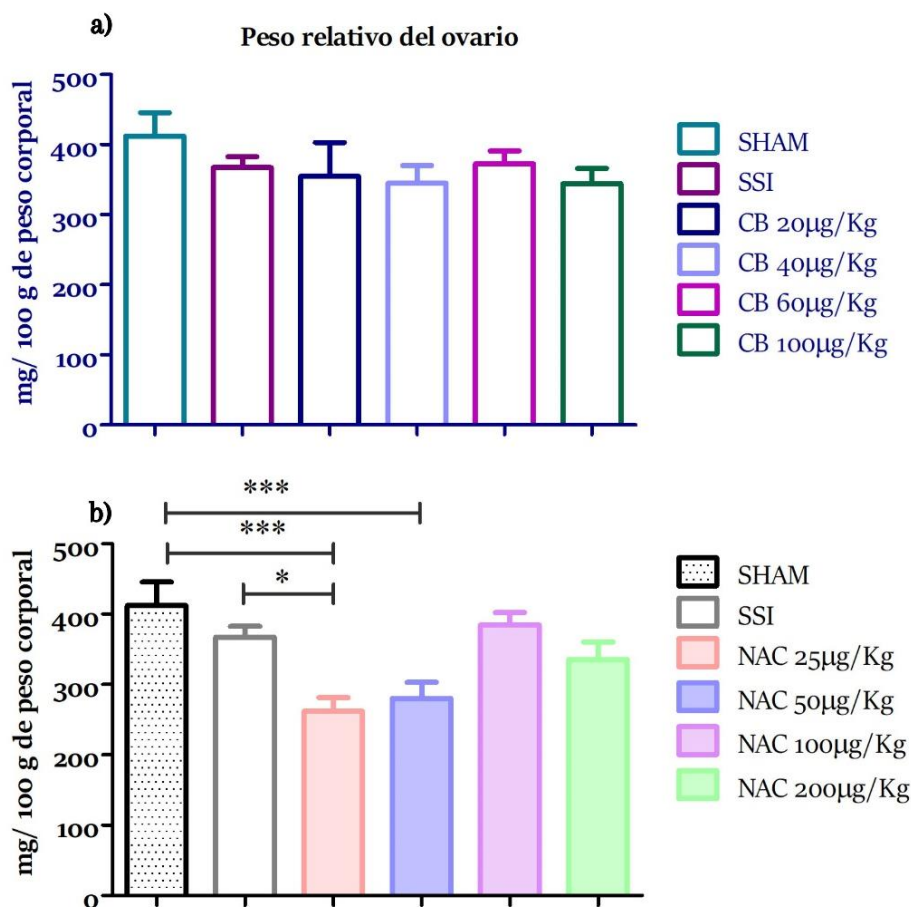


Figura 20. Impacto diferencial de la cabergolina (CB) (a) y la N-acetil-L-cisteína (NAC) (b) en el peso ovárico inducido por SHO en un Modelo de Rata con SHO. La NAC en dosis bajas disminuyó el peso ovárico en comparación con el grupo que recibió solución salina isotónica (SSI), a diferencia de la CB, que no mostró efecto. (n=6) Media ± SEM, *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey.

Adicionalmente, la administración de NAC a una dosis de 25 µg/kg estuvo asociada con un aumento en la proporción de AFs (NAC 25µg/kg: 40.7 ± 1.4 vs SSI: 26.0 ± 1.4 % de AFs; p<0.001, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey) y un porcentaje disminuido de CLs (NAC 25µg/kg: 23.4 ± 1.5 vs SSI: 38.1 ± 0.6 % de CLs; p<0.001, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey) en comparación con el grupo SSI (Fig. 19b). Sin embargo, estas tendencias no se observaron en dosis más altas del antioxidante. Por el contrario, el agonista dopaminérgico no demostró un efecto significativo en la morfología de estas estructuras ováricas, en la proporción de AFs (CB 40µg/kg:

28.8 ± 1.4 vs SSI: 26.0 ± 1.4 % de AFs; p<0.001, ns) ni en la de CLs (CB 40µg/kg: 42.5 ± 1.5 vs SSI: 38.1 ± 0.6 % de CLs; ns) (Fig. 20b).

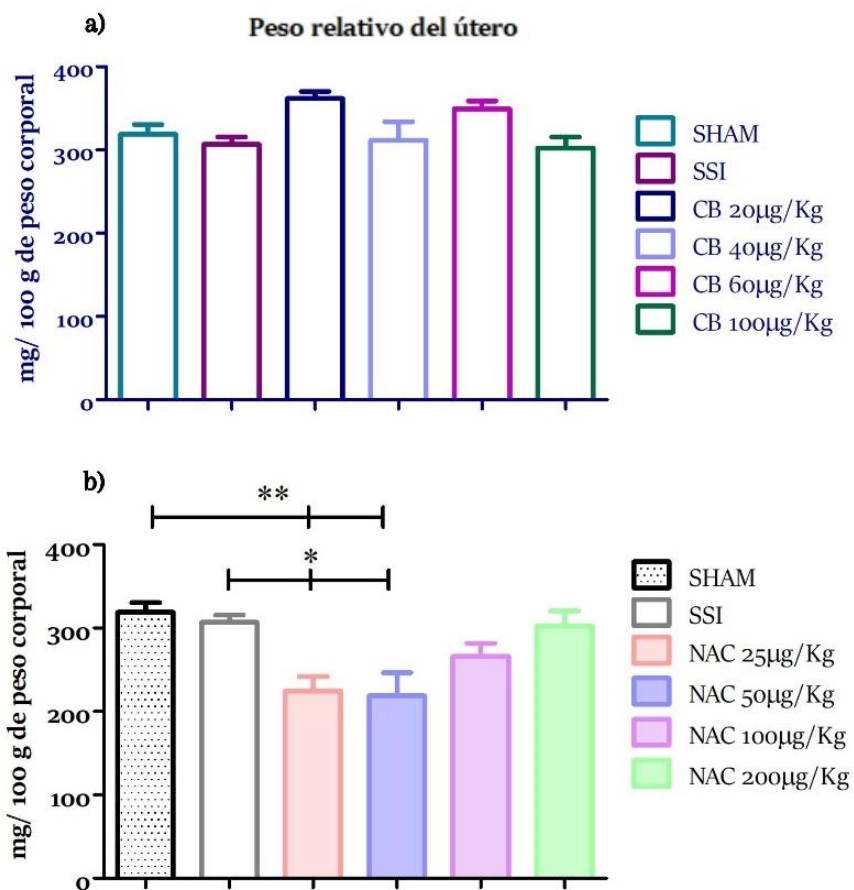


Figura 21. Impacto diferencial de la cabergolina (CB) (a) y la N-acetilcisteína (NAC) (b) en el peso del útero inducido por SHO en un Modelo de Rata con SHO. La NAC en dosis bajas disminuyó el peso uterino en comparación con el grupo que recibió solución salina isotónica (SSI), a diferencia de la CB, que no mostró efecto. (n=6) Media ± SEM, *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey.

Altas dosis de NAC mitigan la lipoperoxidación y los niveles de NO, exhibiendo efectos contrastantes en comparación con la cabergolina

La administración de NAC a una dosis de 200 µg/kg de peso corporal atenuó significativamente la lipoperoxidación (NAC 200µg/kg: 0.21 ± 0.01 vs SSI: 0.35 ± 0.07; p<0.01, y vs SHAM: 0.32 ± 0.02 µM/mg de proteína; p<0.05, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey). Por el contrario, dosis más bajas no produjeron efectos significativos. Los niveles de óxido nítrico, inferidos a partir de la formación de nitrito, también se redujeron significativamente en dosis que comienzan en 100 µg/kg de peso corporal (NAC 200µg/kg: 0.64 ± 0.05 vs SSI: 1.53 ± 0.28 µM/mg de proteína; p<0.05, ANOVA

de una vía seguida de prueba de Tukey), con la disminución sostenida en la dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal (NAC 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0.61 ± 0.09 vs SSI: 1.53 ± 0.28 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; $p < 0.05$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey) comparados con el grupo SSI. No se observaron cambios significativos en la lipoperoxidación en las dosis más bajas de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (NAC 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0.34 ± 0.02 vs SSI: 0.35 ± 0.07 ; ns) y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal (NAC 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0.31 ± 0.03 vs SSI: 0.35 ± 0.07 ; ns) o en los niveles de nitritos a las mismas dosis, 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (NAC 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 1.23 ± 0.23 vs SSI: 1.53 ± 0.28 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; ns) y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal (NAC 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0.97 ± 0.07 vs SSI: 1.53 ± 0.28 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; ns), indicando una relación dosis-respuesta. Mientras tanto, la cabergolina no mostró un efecto significativo en la lipoperoxidación (CB 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0.32 ± 0.05 vs SSI: 0.35 ± 0.07 ; ns) o los niveles de óxido nítrico en ninguna de las concentraciones probadas (CB 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0.88 ± 0.31 vs SSI: 1.53 ± 0.28 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; ns) (Fig. 22).

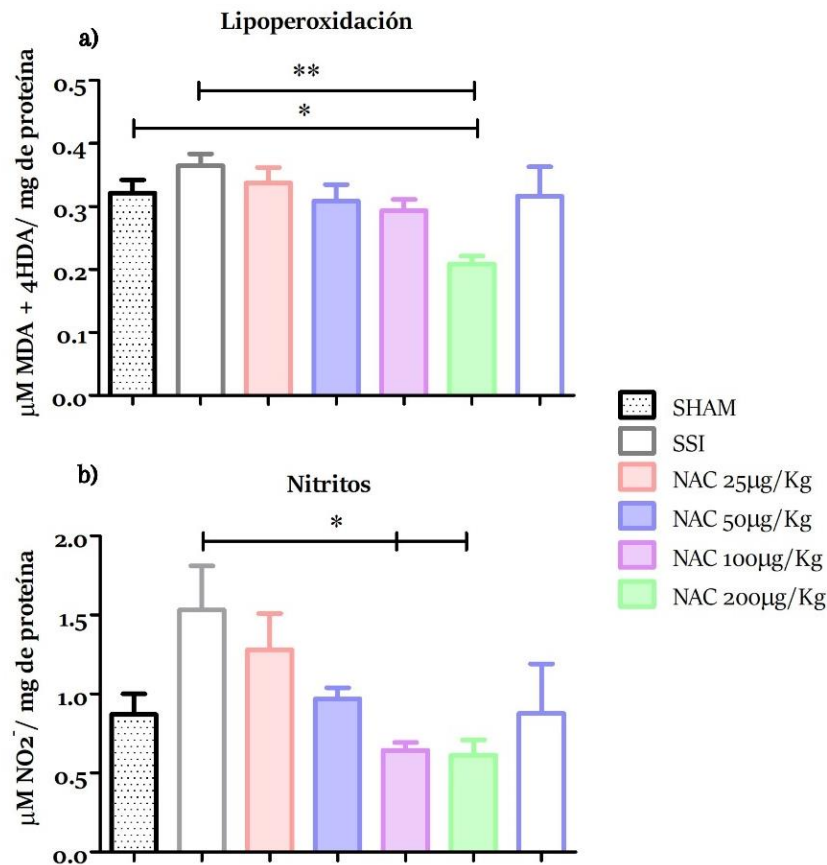


Figura 22. Efectos de la administración local de N-acetil-L-cisteína sobre la lipoperoxidación (a) y los niveles de óxido nítrico (b) en ratas con SHO. (a) Se registró una disminución significativa en los marcadores de lipoperoxidación, específicamente MDA + 4HDA, en la concentración más alta del antioxidante administrada, en comparación con los grupos SSI y SHAM. (b) Adicionalmente, se observó una reducción en los niveles de óxido nítrico a partir de una dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ frente al grupo SSI. (n=6) Media \pm SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey.

DISCUSIÓN

Estudio *in silico*

La investigación *in silico* de las dinámicas interacción entre RDA2 y VEGFR-2, complementada por análisis de acoplamiento molecular de agonistas específicos del RDA2, ha desvelado las complejidades inherentes a las interacciones receptor-ligando. Estas tienen importantes consecuencias para el desarrollo de terapias específicas. Se ha identificado una interfaz clave entre RDA2 y VEGFR-2, caracterizada por la formación de puentes de hidrógeno y puentes salinos, pero notablemente ausente de puentes disulfuro. Esto indica una interacción específica y funcionalmente relevante que es crucial para la señalización y la regulación de procesos biológicos mediados por estos receptores (Sinha et al., 2009). La especificidad de estas interacciones indica que la estabilidad de la interacción depende de fuerzas no covalentes, evidenciada por la ausencia de puentes disulfuro, lo cual es clave para la modulación de la actividad del receptor.

El empleo de herramientas computacionales, como AutoDock y AutoDock Vina, ha permitido una exploración detallada de los residuos esenciales en la unión y activación del RDA2 por agonistas, incluidos la dopamina, la cabergolina y la quinagolida. Residuos como Asp114 y Phe390 han sido identificados como críticos para la afinidad y especificidad del ligando, confirmando estudios anteriores (Di Stasi et al., 2019) y resaltando la importancia de las interacciones precisas en el diseño de fármacos que modulen con exactitud la actividad del RDA2.

La comparación entre la dopamina y otros agonistas del RDA2 ha demostrado diferencias significativas en la energía de unión, eficacia del ligando y constantes de inhibición, donde los agonistas cabergolina y quinagolida exhiben mayor afinidad y estabilidad en la formación del complejo receptor-ligando que la dopamina natural. Esto enfatiza el potencial de los agonistas del RDA2 en el desarrollo de enfoques terapéuticos que requieren una modulación exacta de la actividad del RDA2. Se ha observado experimentalmente que el receptor RDA2 colocaliza con VEGFR-2 en células endoteliales, y muestra una interacción reducida con la proteína tirosina fosfatasa con dominios SH2 (SHP-2) (Sinha et al., 2009). Sumado a lo anterior, la administración de VEGF reduce la colocalización RDA2-VEGFR-2, mientras que la dopamina incrementa la colocalización de SHP-2 con RDA2, lo que lleva a un aumento en la fosforilación de SHP-2. Este proceso está vinculado al incremento de la actividad fosfatasa de SHP-2, específicamente inhibiendo VEGFR-2 al actuar sobre las tirosinas Y951, Y996 e Y1059, sin influir en Y1175 (Sinha et al., 2009). Estos resultados sugieren

una compleja interacción entre RDA2, VEGFR-2, y SHP2, que varía con la presencia de dopamina o VEGF, afectando la función de VEGFR-2.

La heterodimerización de VEGFR-2 con otros receptores de la misma familia, como VEGFR-1 o VEGFR-3, es vital para la regulación de la función receptora y la homeostasis celular, dependiendo del ligando específico presente (Cai et al., 2017; Cudmore et al., 2012; Di Stasi et al., 2019). Este panorama complejo de interacciones no solo resalta la importancia de la colocalización y fosforilación en la regulación de las funciones del receptor, sino que también expone la compleja red de señalización celular implicada en la homeostasis endotelial, presentando un potencial significativo como blanco en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

Este estudio aporta evidencia valiosa sobre la importancia de la especificidad molecular en la unión al RDA2 y destaca el potencial de los agonistas del RDA2 para mejorar las terapias existentes, proporcionando una base sólida para el desarrollo futuro de fármacos más eficaces y específicos. La manipulación selectiva de estas interacciones ofrece enfoques novedosos para tratar enfermedades relacionadas con la disfunción de estos receptores o sus vías de señalización asociadas, enfatizando el potencial terapéutico de la interacción específica entre RDA2 y VEGFR-2.

Estudio *in vivo*

El modelo de SHO en ratas utilizado en nuestro estudio replicó las condiciones definidas por metodologías establecidas por otros autores (Ferrero et al., 2014). Este modelo se caracteriza por niveles elevados de VEGF-A y un aumento en la permeabilidad vascular. Concomitantemente con estos cambios se observan aumentos en el peso corporal, uterino y ovárico (Elia et al., 2013). El grupo de control recibió gonadotropinas en dosis más bajas, consistentes con las dosis en estudios comparativos (Zhai et al., 2017). Al examinar, el grupo de control mostró un aumento en los pesos ovárico y uterino en comparación con el grupo intacto (Ferrero et al., 2014; Gómez et al., 2003). En particular, el grupo de control no mostró un aumento correspondiente en la permeabilidad vascular, VEGF-A, niveles de óxido nítrico o lipoperoxidación, estableciéndolo como una línea base apropiada para comparación.

En el modelo inducido por SHO, observamos un marcado aumento en los niveles de óxido nítrico, evidenciado por el aumento en iones de nitrito. El aumento observado en la permeabilidad vascular en el SHO está relacionado con la regulación al alza de VEGF-A y la activación de su receptor, VEGFR-2 (Ferrero et al., 2014). En el VEGFR-2 humano, la fosforilación de los residuos de tirosina 949 (Y949) y 951 (Y951) inicia la activación del óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), desencadenando una

cascada de eventos de señalización en células musculares lisas adyacentes al endotelio. Esta cascada es crítica para las vías de señalización de la quinasa de proteína 3-quinasa de fosfoinositida y B (PI3K-Akt) que dependen del flujo vascular (Jin et al., 2003; Li et al., 2016). Estas vías son esenciales para la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad vascular (Simons et al., 2016) y juegan un papel significativo en el proceso de remodelación vascular (Rudic et al., 1998). Los estrógenos influyen además estas vías mediante la regulación al alza de la actividad de eNOS mediada por vías de señalización no genómicas como la PI3K y la Akt. Esta activación está modulada por la PKC y la PKA (Förstermann & Sessa, 2012; Kim et al., 2008). Los niveles elevados de estrógenos son un hallazgo común en casos clínicos de SHO, estos niveles elevados pueden explicar el aumento en la concentración de iones de nitrito observados en modelos de SHO, ya que los estrógenos modulan la actividad de eNOS y la producción de NO (Baser et al., 2022; Elia et al., 2013; Zhai et al., 2017), lo que puede explicar el aumento en la concentración de iones de nitrito observado en nuestro modelo de SHO.

El análisis de la lipoperoxidación estimado por las concentraciones de MDA + 4-HDA, indicó una elevación en el grupo SHO en relación con el grupo de control. La lipoperoxidación es un proceso en el que las moléculas de oxígeno se añaden a las cadenas acilo insaturadas de lípidos, aumentando así su capacidad hidrofílica y difusión hacia la superficie de la membrana (Clemente et al., 2020). Esta alteración facilita el acceso de enzimas como las ciclooxigenasas y lipooxigenasas a sus sustratos lipídicos, catalizando la producción de metabolitos que impulsan la inflamación y apoyan la unión de proteínas y receptores a lípidos oxidados (Dias et al., 2020). La degradación de peróxidos lipídicos produce aldehídos como el 4-hidroxinonenal (4-HNE) y MDA, que son contribuyentes significativos a esta clase (Ayala et al., 2014), estos aldehídos afectan profundamente la integridad estructural de las bicapas lipídicas alterando las interacciones lipídicas, gradientes de iones, fluidez y permeabilidad (Catalá & Díaz, 2016; Gaschler & Stockwell, 2017). Además, otros estudios han mostrado que concentraciones de MDA en un rango de 150 a 250 μM pueden inducir una reducción dependiente de la dosis en la impedancia eléctrica total de monocapas de células endoteliales, implicando un aumento en la permeabilidad endotelial (Samsonov et al., 2017).

En el contexto del SHO, la expresión y actividad de NOS no acoplada se regulan al alza, llevando a un aumento en óxido nítrico y, posteriormente, en la producción de peroxinitrito (ONOO⁻). Este evento es un precursor de la formación de especies reactivas de nitrógeno (RNS) y mediadores inflamatorios. En tales escenarios, eNOS puede funcionar como una fuente de peroxinitrito,

contribuyendo a un aumento significativo en el estrés oxidativo (Dias et al., 2020). El aumento observado en los niveles de nitritos y lipoperoxidación en el grupo de ratas con SHO sugiere un estrés oxidativo amplificado dentro del síndrome.

Los antioxidantes son esenciales para mitigar la lipoperoxidación. Pueden terminar reacciones en cadena radicales, que no son dependientes de enzimas, interactuando con radicales peroxilo alquilo o alcoxilo (Clemente et al., 2020). Nuestra investigación examinó los efectos de un antioxidante en el SHO. Observamos que la NAC redujo los niveles de óxido nítrico y lipoperoxidación en su dosis más alta administrada. Además, la NAC proporciona una defensa contra ROS, aumentando ligeramente el H₂S y las especies de azufre dentro de la célula. Este aumento se debe a la liberación gradual de cisteína de la NAC, que promueve la generación continua de productos de azufre que confieren protección más allá del GSH (Pedre et al., 2021). Sin embargo, es notable que la disminución en la lipoperoxidación en estas dosis no correspondió a una disminución en la permeabilidad vascular.

La permeabilidad vascular es una característica distintiva del SHO y está influenciada por varios factores, incluyendo la activación de eNOS y la proteína Src (Simons et al., 2016). Dentro de las adhesiones focales, la señalización es mediada por transductores como la FAK y su sustrato paxilina. Aunque la activación de Src puede seguir a FAK, la fosforilación de FAK mediada por Src es esencial para modular la forma y adhesión celular después de la exposición a VEGF-A (Westhoff et al., 2004). La Src también modifica las uniones adherentes endoteliales al fosforilar VE-cadherina como respuesta a VEGF-A (Gómez et al., 2004). Esta fosforilación desencadena la endocitosis de VE-cadherina, interrumpiendo las uniones adherentes, aumentando así la permeabilidad vascular (Li et al., 2016).

El agonismo de RDA2 reduce la permeabilidad vascular al disminuir la secreción de VEGF-A en un modelo murino (Ferrero et al., 2014; Monaghan-Benson & Burridge, 2009). En entornos clínicos, la administración de cabergolina ha estado asociada con una reducción en el volumen de ascitis y la permeabilidad vascular (Alvarez et al., 2007). Aunque el agonista RDA2 ha mostrado moderar la incidencia de SHO, no alteró significativamente las tasas de SHO severo (Alvarez et al., 2007). Nuestros datos sugieren que la administración directa de cabergolina a la bursa ovárica disminuye específicamente la permeabilidad vascular y los niveles de VEGF-A, indicando un efecto localizado dentro del ovario. Sin embargo, la cabergolina no afectó otros parámetros estudiados, como el peso ovárico, lipoperoxidación, niveles de iones de nitrito y morfología ovárica. En contraste, la

administración del antioxidante en bajas concentraciones condujo a una reducción tanto en los niveles de VEGF-A como en la permeabilidad vascular, sin cambiar significativamente la lipoperoxidación o los niveles de óxido nítrico. Esto es consistente con la evidencia de que la NAC puede mitigar ROS en células endoteliales de manera dosis-responsiva, incluso en presencia de VEGF-A (Shukla et al., 2016).

La NAC también ha demostrado regular al alza la expresión de proteínas de adhesión celular, incluyendo VE-cadherina, ocludina y β -catenina, y proteger contra alteraciones inducidas por radiación ionizante (Zhu et al., 2012). Además, inhibe la fosforilación de VE-cadherina y β -catenina, un proceso que típicamente es estimulado por VEGF-A (Ebrahimi et al., 2023; Shukla et al., 2016). Estudios involucrando autoinjertos ováricos en ratones han indicado que la NAC suprime el mRNA de VEGF-A poco después del injerto, con un aumento marcado siete días después del injerto, que luego se atenúa en presencia de estrógenos (Scotti et al., 2014). La reducción en la concentración de VEGF-A observada en nuestro estudio, efectuada por el tratamiento con antioxidantes de baja dosis, apoya estos hallazgos. Dosis más altas no produjeron este efecto. Este fenómeno puede estar relacionado con la acción moduladora de la NAC sobre las proteínas de adhesión celular (Zhu et al., 2012) y sugiere que la eficacia del antioxidante en dosis más bajas podría depender del entorno celular (Scotti et al., 2014), especialmente dada la reducción observada en el estrés oxidativo en dosis elevadas. Sin embargo, es importante considerar que nuestros resultados reflejan los niveles de la proteína VEGF-A y no su mRNA. Esto sugiere que mecanismos postranscripcionales y postraduccionales podrían estar involucrados, influyendo en la expresión de VEGF-A que estarían relacionados con los cambios encontrados en distintas dosis de NAC.

En este estudio, el grupo SHO exhibió un aumento notable en el número de CLs, lo que sugiere una elevación inducida por gonadotropinas en las tasas de ovulación en comparación con el grupo de control. También observamos una disminución en la proporción de folículos preantrales y antrales, mientras que el número de folículos preovulatorios no se vio afectado significativamente. Estos hallazgos están de acuerdo con informes previos que han documentado un aumento en CLs y una reducción en el conteo folicular después de la inducción de SHO en modelos animales (Elia et al., 2013; Navot et al., 1992). Correspondientemente, el SHO en humanos se caracteriza por el desarrollo de múltiples CLs (Navot et al., 1992).

La administración con NAC, una terapia antioxidante, redujo significativamente el peso ovárico. Este resultado está asociado con cambios en la distribución de la morfología ovárica. Hubo una reducción

en el porcentaje de CLs, indicando una disminución potencial en la tasa de ovulación. La disminución concurrente en folículos antrales sugiere que la NAC puede influir en las etapas tempranas de la foliculogénesis, posiblemente restaurando las funciones ovulatorias normales. Apoyando nuestros hallazgos, otras investigaciones han indicado que la NAC aumenta el número de folículos preantrales en autoinjertos ováricos, lo que es consistente con los efectos moduladores que observamos en el desarrollo folicular (Scotti et al., 2014).

CONCLUSIONES

1. La identificación de una interfaz clave entre RDA2 y VEGFR-2, caracterizada por puentes de hidrógeno y puentes salinos pero ausente de puentes disulfuro, subraya una interacción específica y funcionalmente relevante para la señalización y regulación de procesos biológicos. Esta especificidad sugiere que la estabilidad de la interacción depende de fuerzas no covalentes, lo cual es crucial para la modulación de la actividad del receptor. Mientras que, al comparar la dopamina con agonistas del RDA2, se observa que estos últimos presentan mayor afinidad y estabilidad en la formación del complejo receptor-ligando, lo que indica su potencial superior para el desarrollo de terapias precisas.
2. La administración de NAC a dosis altas redujo los niveles de óxido nítrico y lipoperoxidación, demostrando su eficacia como antioxidante. Sin embargo, esta reducción no se correlacionó necesariamente con una disminución en la permeabilidad vascular, sugiriendo que los efectos antioxidantes de la NAC pueden no ser los responsables directos de la mejora en todos los signos del SHO. Además, la NAC a dosis bajas no solo mitigó la permeabilidad vascular y redujo los niveles de VEGF-A, sino que también mostró un efecto protector sobre el desarrollo folicular, indicando su potencial para restaurar la función ovulatoria normal. Esto sugiere que los beneficios terapéuticos de la NAC en el manejo del SHO podrían deberse a otros mecanismos más allá de su capacidad antioxidante.
3. El efecto de la NAC para reducir marcadores de estrés oxidativos o los niveles de VEGF-A, así como su impacto en la permeabilidad vascular y la morfología ovárica, que depende de la dosis administrada subraya la importancia de optimizar las dosis para maximizar los beneficios terapéuticos sin inducir efectos adversos. Estos hallazgos refuerzan la idea de que los antioxidantes, especialmente la NAC, representan una estrategia prometedora para tratar o aliviar algunos aspectos del SHO, aunque es necesario profundizar en la investigación para entender completamente su mecanismo de acción y eficacia en distintos aspectos del síndrome.

4. En comparación con la cabergolina, la NAC no solo mostró una reducción en la permeabilidad vascular y en los niveles de VEGF-A, sino que también demostró efectos beneficiosos adicionales, como la disminución del peso ovárico y uterino. Además, la NAC parece tener un efecto protector sobre el desarrollo folicular, estos resultados sugieren que la NAC podría ofrecer un enfoque más completo para el tratamiento del SHO, proporcionando beneficios que van más allá de los ofrecidos por la cabergolina.













PERSPECTIVAS

- Evaluación continua de la morfología ovárica: Realizar estudios que monitoreen la morfología ovárica a lo largo de todo el ciclo reproductivo podría proporcionar detalles detallados sobre las dinámicas de la foliculogénesis y la ovulación bajo condiciones normales y patológicas. Esto ayudaría a identificar etapas críticas donde intervenciones como la NAC podrían ser más efectivas.
- Desarrollo de un modelo adulto de SHO en ratas: Con el objetivo de simular más fielmente las condiciones patológicas del SHO en mujeres adultas, se propone el desarrollo de un modelo animal utilizando ratas adultas. Este enfoque ayudaría a evaluar la efectividad de nuevas terapias y tratamientos en un entorno que imita de cerca las condiciones humanas, permitiendo así una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes y la optimización de las intervenciones terapéuticas.
- Estudio de administración oral e intramuscular de NAC y agonistas de RDA2: Investigar la eficacia y seguridad de la administración oral e intramuscular de NAC y agonistas de RDA2 en modelos animales. Esta transición hacia métodos de administración que son más fácilmente aplicables a humanos podría facilitar la extrapolación de los resultados de los estudios preclínicos a la práctica clínica
- Tratamiento profiláctico con NAC: Explorar el uso de NAC como un tratamiento profiláctico en modelos animales y eventualmente en ensayos clínicos podría determinar su eficacia en prevenir o mitigar los síntomas del SHO antes de que estos se manifiesten completamente.
- Estudios de interacción de fármacos combinados: Investigar cómo la combinación de NAC con otros fármacos podría mejorar la eficacia del tratamiento para el SHO. Por ejemplo, la combinación de NAC con agonistas de RDA2 podría tener efectos sinérgicos, ofreciendo una estrategia terapéutica más robusta.

- Estudios comparativos de eficacia entre NAC, moduladores de GnRH y letrozol: Realizar estudios comparativos para evaluar la eficacia de la NAC frente a otros tratamientos establecidos como los moduladores de GnRH y el letrozol, que son comúnmente utilizados en el manejo del SHO. Además, sería valioso examinar los efectos secundarios y la calidad de vida de los pacientes, proporcionando así una comparativa holística que puede informar las decisiones de tratamiento.
- Análisis molecular: Profundizar en los mecanismos moleculares y genéticos que subyacen a la interacción entre RDA2 y VEGFR-2, así como las alteraciones en la expresión y la actividad de estas proteínas en diferentes condiciones patológicas. Esto podría llevar a la identificación de biomarcadores para el diagnóstico precoz o la progresión del SHO.
- Exploración de la regulación endotelial y vascular: Dado que la permeabilidad vascular juega un papel crucial en el SHO, estudiar más a fondo cómo los tratamientos afectan la integridad y función endotelial podría ofrecer nuevas vías para la intervención terapéutica.
- Ensayos clínicos: Basándose en los resultados prometedores de la NAC en modelos animales, sería crucial validar estos hallazgos mediante ensayos clínicos. Estos estudios podrían enfocarse en la eficacia, seguridad, y la dosificación óptima de estos compuestos en humanos, comparando sus efectos con los tratamientos estándar.

Research Article

Efficacy of Local N-Acetylcysteine Administration in Mitigating OHSS Parameters: A Comparative Analysis With Dopaminergic Agonist in the OHSS Model

Dulce Elena Letras-Luna ¹, **Nora Hilda Rosas-Murrieta** ², **Nidia Gary Pazos-Salazar** ³,
Jorge Flores-Hernández ⁴, **Francisco Castelán** ^{5,6}, **Berenice Venegas** ⁷,
Alfonso Díaz ⁴, **Samuel Treviño** ⁸, **Daniel Juárez-Serrano** ⁹,
Wendy Argelia García-Suastegui ¹, **Anabella Handal-Silva** ¹
and **José Luis Morán-Perales** ¹

¹Department of Biology and Reproductive Toxicology, Institute of Sciences (ICUAP), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

²Biochemistry and Molecular Biology Laboratory, Chemistry Center, Institute of Sciences (ICUAP), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

³Department of Microbiology, Faculty of Chemical Sciences, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

⁴Institute of Physiology, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

⁵Department of Cell Biology and Physiology, Institute of Biomedical Research, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

⁶Tlaxcala Center for Behavioral Biology, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico

⁷Faculty of Biological Science, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

⁸Laboratory of Metabolomics and Chronic Degenerative Diseases, Institute of Physiology, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

⁹Department of Biochemistry-Food Science, Faculty of Chemical Sciences, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

Correspondence should be addressed to José Luis Morán-Perales; jose Luis.moran@correo.buap.mx

Received 14 December 2023; Revised 5 October 2024; Accepted 25 October 2024

Academic Editor: Malgorzata Kotula Balak

Copyright © 2024 Dulce Elena Letras-Luna et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Participación en congresos 2021

Simposio Interno XXVI

La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla,
La Facultad de Ciencias Químicas, El Instituto de Ciencias y
El Posgrado en Ciencias Químicas

Otorgan la presente

Constancia a :

Dulce Elena Letras Luna Nora Hilda Rosas Murrieta

José Luis Morán Perales

por su contribución:

Papel de los receptores dopaminérgicos de los tejidos ováricos de la rata adulta en el síndrome de hiperestimulación ovárica

en el Simposio interno XXVI del posgrado del en ciencias químicas
"Pensar Bien para Vivir Mejor"
H.Puebla de Zaragoza, del 09 al 12 de noviembre de 2021

Dr. Guillermo Sbrano Mora
Secretario académico



Dra. Sara Morstel Smith
Coordinadora

Participación en congresos 2022

XXVI SIMPOSIO INTERNO
POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, La Facultad de Ciencias Químicas, El Instituto de Ciencias y El Posgrado en Ciencias Químicas

Otorgan la presente

Constancia a :

Letras Luna Dulce Elena Morán Perales Jose Luis

Rosas Murrieta Nora Hilda

por su contribución:

Estudio de los receptores dopaminérgicos en los tejidos ováricos de la rata en el síndrome de hiperestimulación ovárica

en el Simposio interno XXVII del posgrado del en Ciencias Químicas
"Pensar Bien para Vivir Mejor"
H.Puebla de Zaragoza, del 07 al 10 de noviembre de 2022

Dra. Jacqueline Jiménez Hernández
Secretaria académica



Dr. Guillermo Sbrano Mora
Coordinador

Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A. C.

Mesa Directiva 2021-2023
Presidenta
Dra. Ma. del Carmen Cortés Sánchez

Vicepresidenta
Dra. Margarita Martínez Gómez

Secretario
Dr. Francisco Castellán

Tesorero
Dr. José Everardo Avelino Cruz

Asociación Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas
Presidenta
Dr. Luis Sobrevía
Secretario General
Dr. Ernesto Alejandro Aiello

LXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas

Congreso Internacional 2022 de la Asociación Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas

Certificate of Presentation
to

Letras Luna, Dulce Elena; Garcia Suastegui, Wendy Argelia; Handal Silva, Anabella; Moran-Perales Jose Luis; Rosas Murrieta, Nora Hilda

By the Organizing Committee of the LXV National Congress of the Mexican Society of Physiological Sciences (SMCF) and the 2022 Meeting of the Latin American Association of Physiological Sciences (ALACF)

for the presentation entitled
CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE UNIÓN DE AGONISTAS DE LA DOPAMINA AL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO TIPO 2.

Puebla, Pue., (Mexico), October 8, 2022

Dra. Carmen Cortés
SMCF
President

Dr. Luis Sobrevía
ALACF
President



Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C.



SACRAMENTO NO. 413
COL. INSURGENTES BORJA
DEL BENTO JUÁREZ
C.P. 03100
CDMX
TEL: (55) 96225742
WWW.SMB.ORG.MX
FACEBOOK:
facebook.com/RedSMB

MESA DIRECTIVA 2021-2022

PRESIDENTA
Dra. Susana María Teresa Hernández Sotomayor

VICEPRESIDENTE
Dr. Agustín Guerrero Hernández

SECRETARIA TESORERA
Dra. Bertha María Josefina González Padgett

SUBSECRETARIA TESORERA
Dra. María del Lourdes Garza Cuevas

SOCIOS FUNDADORES

Dr. Bárbara Aránguez López
Dr. Esteban Castro Cuadras
Dr. Guillermo Canabal Sandoval
Dr. Juan José Canabal
Dr. Carlos del Río Estrada
Dr. Silvestre Franco Pineda
Dr. María Guzmán Hernández
Dr. Jesús González García
Dr. Jesús Kumate Rodríguez
Dr. José López Gálvez
Dr. Guillermo Martínez Pineda
Dr. Raúl Ochoa Salazar
Dr. Estela de Jesús Cortés
Dr. Guillermo Sotomayor Acevedo

Se otorga la presente

CONSTANCIA a:
Dulce Elena Letras Luna

Quien asistió y presentó el trabajo:

Characterization of the docking mechanism of dopamine agonist on the dopamine receptor 2

Por: Dulce Elena Letras Luna, José Luis Morán Perales, Nora Hilda Rosas Murrieta, Wendy Argelia García Suastegui y Anabella Handal Silva

En la modalidad de cartel durante el
XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica
16 - 21 de octubre de 2022, Mérida, Yucatán

Atentamente
Por el Comité Organizador

Dra. Teresa Hernández Sotomayor
Presidenta



Participación en congresos 2023



El Posgrado en Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
En el marco del XXVIII Simposio Interno otorga la presente

Constancia a:
Dulce Elena Letras Luna, José Luis Morán Perales y Nora Hilda Rosas Murrieta

Por su presentación con el trabajo:
Estudio de los receptores dopaminérgicos en los tejidos ováricos de la rata en el síndrome de hiperestimulación ovárica

Puebla, Pue. 13 al 16 de noviembre del 2023

Dr. Jesús Guillermo Soriano Moro
Coordinador

Dra. Jacqueline Jiménez Herr
Secretaría Acac



LA ACADEMIA DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN A.C.

TENEMOS EL HONOR DE OTORGAR LA PRESENTE CONSTANCIA A
Letras Luna D. E., Castelán F., Morán Perales J.L., Rosas Murrieta N.H., García Suástegui W.A. & Handal Silva A.

POR SU PARTICIPACIÓN CON EL CARTEL
EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN LOCAL DE LA N-ACETILCISTEÍNA EN EL SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA

XLVIII Reunión Anual del AIBIR
DEL 13 AL 16 DE AGOSTO DE 2023
CENTRO CULTURAL UNIVERSITARIO, UMSNH MORELIA, MICHOACÁN.

Dra. Carmen Yolanda Aceves Velasco
PRESIDENTE

Dra. Maricela Luna Muñoz
SECRETARIA

Divulgación



2022



2023

BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, A., & Allamaneni, S. S. (2004). Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reproductive BioMedicine Online*, 9(3), 338–347. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)62151-7](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)62151-7)
- Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B. J., Shaman, A., & Gupta, S. (2012). The effects of oxidative stress on female reproduction: A review. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 10, 49. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-49>
- Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 3, 28. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28>
- Agarwal, A., Krajcir, N., Chowdary, H., & Gupta, S. (2008). Female Infertility and Assisted Reproduction: Impact of Oxidative Stress. *Current Women's Health Reviews*, 4(1), 9–15. <https://doi.org/10.2174/157340408783572105>
- Agnihotri, N., & Mishra, P. C. (2009). Mechanism of scavenging action of N-acetylcysteine for the OH radical: A quantum computational study. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 113(35), 12096–12104. <https://doi.org/10.1021/jp903604s>
- Agrawal, R., Jacobs, H., Payne, N., & Conway, G. (2002). Concentration of vascular endothelial growth factor released by cultured human luteinized granulosa cells is higher in women with polycystic ovaries than in women with normal ovaries. *Fertility and Sterility*, 78(6), 1164–1169. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(02\)04242-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(02)04242-5)
- Alhalabi, M., Samawi, S., Kafri, N., Sharif, J., Saker, A., & Othman, A. (2012). Role of quinagolide (NORPROLAC) in preventing ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) in high risk intracytoplasmic sperm injection (ICSI) patients. *Fertility and Sterility*, 98(3), S103. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.378>
- Al-Shabrawey, M., Bartoli, M., El-Remessy, A. B., Platt, D. H., Matragoon, S., Behzadian, M. A., Caldwell, R. W., & Caldwell, R. B. (2005). Inhibition of NAD(P)H oxidase activity blocks vascular endothelial growth factor overexpression and neovascularization during ischemic retinopathy. *The American Journal of Pathology*, 167(2), 599–607. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63001-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63001-5)
- Alvarez, C., Alonso-Muriel, I., García, G., Crespo, J., Bellver, J., Simón, C., & Pellicer, A. (2007). Implantation is apparently unaffected by the dopamine agonist Cabergoline when administered to prevent ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing assisted reproduction treatment: A pilot study. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 22(12), 3210–3214. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem315>
- Alvarez, C., Martí-Bonmatí, L., Novella-Maestre, E., Sanz, R., Gómez, R., Fernández-Sánchez, M., Simón, C., & Pellicer, A. (2007). Dopamine agonist cabergoline reduces hemoconcentration and ascites in hyperstimulated women undergoing assisted reproduction. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(8), 2931–2937. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-0409>
- Anisimov, A., Leppänen, V.-M., Tvorogov, D., Zarkada, G., Jeltsch, M., Holopainen, T., Kaijalainen, S., & Alitalo, K. (2013). The basis for the distinct biological activities of vascular endothelial growth factor receptor-1 ligands. *Science Signaling*, 6(282), ra52. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003905>
- Antonetti, D. A., Barber, A. J., Hollinger, L. A., Wolpert, E. B., & Gardner, T. W. (1999). Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(33), 23463–23467. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.23463>
- Arbiser, J. L., Petros, J., Klafner, R., Govindajaran, B., McLaughlin, E. R., Brown, L. F., Cohen, C., Moses, M., Kilroy, S., Arnold, R. S., & Lambeth, J. D. (2002). Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(2), 715–720. <https://doi.org/10.1073/pnas.022630199>
- Armando, I., Wang, X., Villar, V. A. M., Jones, J. E., Asico, L. D., Escano, C., & Jose, P. A. (2007). Reactive oxygen species-dependent hypertension in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 49(3), 672–678. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000254486.00883.3d>

- Assaf, L., Eid, A. A., & Nassif, J. (2022). Role of AMPK/mTOR, mitochondria, and ROS in the pathogenesis of endometriosis. *Life Sciences*, *306*, 120805. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120805>
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2014*, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Baser, E., Aydogan Kirmizi, D., Ozelci, R., Aldemir, O., Dilbaz, B., Dilbaz, S., & Moraloglu Tekin, O. (2022). Neutrophil:lymphocyte and estradiol:progesterone ratios as predictive markers for ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Reproduction, Fertility, and Development*, *34*(3), 343–349. <https://doi.org/10.1071/RD21182>
- Basu, D., Tian, Y., Bhandari, J., Jiang, J. R., Hui, P., Johnson, R. L., & Mishra, R. K. (2013). Effects of the dopamine D2 allosteric modulator, PAOPA, on the expression of GRK2, arrestin-3, ERK1/2, and on receptor internalization. *PLoS One*, *8*(8), e70736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070736>
- Basu, S., & Dasgupta, P. S. (2000). Dopamine, a neurotransmitter, influences the immune system. *Journal of Neuroimmunology*, *102*(2), 113–124. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(99\)00176-9](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(99)00176-9)
- Basu, S., Nagy, J. A., Pal, S., Vasile, E., Eckelhoefer, I. A., Bliss, V. S., Manseau, E. J., Dasgupta, P. S., Dvorak, H. F., & Mukhopadhyay, D. (2001). The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nature Medicine*, *7*(5), 569–574. <https://doi.org/10.1038/87895>
- Bates, D. O. (2010). Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. *Cardiovascular Research*, *87*(2), 262–271. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq105>
- Battista, P. J., & Condon, W. A. (1986). A role for alternative pathway catecholamines in the regulation of steroidogenesis in cow luteal cells. *Journal of Reproduction and Fertility*, *78*(1), 275–280. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0780275>
- Baumgarten, S. C., Convissar, S. M., Fierro, M. A., Winston, N. J., Scoccia, B., & Stocco, C. (2014). IGF1R signaling is necessary for FSH-induced activation of AKT and differentiation of human Cumulus granulosa cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *99*(8), 2995–3004. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1139>
- Bavarsad Shahripour, R., Harrigan, M. R., & Alexandrov, A. V. (2014). N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: Mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain and Behavior*, *4*(2), 108–122. <https://doi.org/10.1002/brb3.208>
- Beaulieu, J.-M., & Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological Reviews*, *63*(1), 182–217. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>
- Behrman, H. R., Kodaman, P. H., Preston, S. L., & Gao, S. (2001). Oxidative stress and the ovary. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, *8*(1 Suppl Proceedings), S40-42. [https://doi.org/10.1016/s1071-5576\(00\)00106-4](https://doi.org/10.1016/s1071-5576(00)00106-4)
- Ben-Ami, I., Freimann, S., Armon, L., Dantes, A., Strassburger, D., Friedler, S., Raziell, A., Seger, R., Ron-El, R., & Amsterdam, A. (2006). PGE2 up-regulates EGF-like growth factor biosynthesis in human granulosa cells: New insights into the coordination between PGE2 and LH in ovulation. *Molecular Human Reproduction*, *12*(10), 593–599. <https://doi.org/10.1093/molehr/gal068>
- Beom, S., Cheong, D., Torres, G., Caron, M. G., & Kim, K.-M. (2004). Comparative studies of molecular mechanisms of dopamine D2 and D3 receptors for the activation of extracellular signal-regulated kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(27), 28304–28314. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403899200>
- Berk, M., Malhi, G. S., Gray, L. J., & Dean, O. M. (2013). The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. *Trends in Pharmacological Sciences*, *34*(3), 167–177. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.01.001>
- Blancher, C., Moore, J. W., Robertson, N., & Harris, A. L. (2001). Effects of ras and von Hippel-Lindau (VHL) gene mutations on hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha, HIF-2alpha, and vascular endothelial growth factor expression and their regulation by the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. *Cancer Research*, *61*(19), 7349–7355.

- Blohberger, J., Buck, T., Berg, D., Berg, U., Kunz, L., & Mayerhofer, A. (2016). L-DOPA in the human ovarian follicular fluid acts as an antioxidant factor on granulosa cells. *Journal of Ovarian Research*, *9*(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s13048-016-0269-0>
- Blumenfeld, Z. (2018). The Ovarian Hyperstimulation Syndrome. In *Vitamins and Hormones* (Vol. 107, pp. 423–451). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.01.018>
- Borumandnia, N., Alavi Majd, H., Khadembashi, N., & Alaii, H. (2022). Worldwide trend analysis of primary and secondary infertility rates over past decades: A cross-sectional study. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, *20*(1), 37–46. <https://doi.org/10.18502/ijrm.v20i1.10407>
- Brännström, M., Lind, A. K., & Dahm-Kähler, P. (2010). Ovulation: A Molecular View. In D. T. Carrell & C. M. Peterson (Eds.), *Reproductive Endocrinology and Infertility: Integrating Modern Clinical and Laboratory Practice* (pp. 119–132). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1436-1_9
- Bronzi, C. D., Orozco, A. S. V., Rodriguez, D., Rastrilla, A. M., Sosa, Z. Y., & Casais, M. (2015). Noradrenaline modulates the presence of gonadotropin-releasing hormone in ovary. The importance of its interrelation on the ovarian steroidogenesis and apoptosis on dioestrus II in rat. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *154*, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.06.005>
- Busso, C., Fernández-Sánchez, M., García-Velasco, J. A., Landeras, J., Ballesteros, A., Muñoz, E., González, S., Simón, C., Arce, J.-C., & Pellicer, A. (2010). The non-ergot derived dopamine agonist quinagolide in prevention of early ovarian hyperstimulation syndrome in IVF patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *25*(4), 995–1004. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq005>
- Buteau-Lozano, H., Ancelin, M., Lardeux, B., Milanini, J., & Perrot-Applanat, M. (2002). Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by estradiol and tamoxifen in breast cancer cells: A complex interplay between estrogen receptors alpha and beta. *Cancer Research*, *62*(17), 4977–4984.
- Cai, M., Wang, K., Murdoch, C. E., Gu, Y., & Ahmed, A. (2017). Heterodimerisation between VEGFR-1 and VEGFR-2 and not the homodimers of VEGFR-1 inhibit VEGFR-2 activity. *Vascular Pharmacology*, *88*, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2016.11.007>
- Calvo, J. P., Rodríguez, Y. P., & Figueroa, L. Q. (2020). Infertilidad y factores que favorecen su aparición. *Revista Medica Sinergia*, *5*(5), Article 5. <https://doi.org/10.31434/rms.v5i5.485>
- Carizza, C., Abdelmassih, V., Abdelmassih, S., Ravizzini, P., Salgueiro, L., Salgueiro, P. T., Jine, L. T., Nagy, P., & Abdelmassih, R. (2008). Cabergoline reduces the early onset of ovarian hyperstimulation syndrome: A prospective randomized study. *Reproductive Biomedicine Online*, *17*(6), 751–755. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60401-4](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60401-4)
- Castillo, J. C., Haahr, T., Martínez-Moya, M., & Humaidan, P. (n.d.). Gonadotropin-releasing hormone agonist ovulation trigger—Beyond OHSS prevention. *Upsala Journal of Medical Sciences*, *125*(2), 138–143. <https://doi.org/10.1080/03009734.2020.1737599>
- Catalá, A., & Díaz, M. (2016). Editorial: Impact of Lipid Peroxidation on the Physiology and Pathophysiology of Cell Membranes. *Frontiers in Physiology*, *7*, 423. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00423>
- Chakraborty, D., Sarkar, C., Mitra, R. B., Banerjee, S., Dasgupta, P. S., & Basu, S. (2004). Depleted dopamine in gastric cancer tissues: Dopamine treatment retards growth of gastric cancer by inhibiting angiogenesis. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *10*(13), 4349–4356. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0059>
- Chen, S.-U., Chou, C.-H., Lin, C.-W., Lee, H., Wu, J.-C., Lu, H.-F., Chen, C.-D., & Yang, Y.-S. (2010). Signal mechanisms of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in ovarian hyperstimulation syndrome: Dopamine targets their common pathways. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *25*(3), 757–767. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep432>

- Chio, C. L., Lajiness, M. E., & Huff, R. M. (1994). Activation of heterologously expressed D3 dopamine receptors: Comparison with D2 dopamine receptors. *Molecular Pharmacology*, *45*(1), 51–60.
- Chiu, D. T.-Y. (2014). Oxidative stress in biology and medicine. *Biomedical Journal*, *37*(3), 97–98. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.134087>
- Choi, J. H., Yang, Y. R., Lee, S. K., Kim, S.-H., Kim, Y.-H., Cha, J.-Y., Oh, S.-W., Ha, J.-R., Ryu, S. H., & Suh, P.-G. (2008). Potential inhibition of PDK1/Akt signaling by phenothiazines suppresses cancer cell proliferation and survival. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1138*, 393–403. <https://doi.org/10.1196/annals.1414.041>
- Choi, S. B., Park, J. B., Song, T.-J., & Choi, S. Y. (2011). Molecular mechanism of HIF-1-independent VEGF expression in a hepatocellular carcinoma cell line. *International Journal of Molecular Medicine*, *28*(3), 449–454. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2011.719>
- Clemente, S. M., Martínez-Costa, O. H., Monsalve, M., & Samhan-Arias, A. K. (2020). Targeting Lipid Peroxidation for Cancer Treatment. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *25*(21), 5144. <https://doi.org/10.3390/molecules25215144>
- Cudmore, M. J., Hewett, P. W., Ahmad, S., Wang, K.-Q., Cai, M., Al-Ani, B., Fujisawa, T., Ma, B., Sissaoui, S., Ramma, W., Miller, M. R., Newby, D. E., Gu, Y., Barleon, B., Weich, H., & Ahmed, A. (2012). The role of heterodimerization between VEGFR-1 and VEGFR-2 in the regulation of endothelial cell homeostasis. *Nature Communications*, *3*, 972. <https://doi.org/10.1038/ncomms1977>
- Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: Critical control points. *Cell*, *116*(2), 205–219. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00046-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00046-7)
- Delvigne, A. (2003). Review of clinical course and treatment of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Human Reproduction Update*, *9*(1), 77–96. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmg005>
- Derkx, F. H., Alberda, A. T., Zeilmaker, G. H., & Schalekamp, M. A. (1987). High concentrations of immunoreactive renin, prorenin and enzymatically-active renin in human ovarian follicular fluid. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, *94*(1), 4–9. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1987.tb02243.x>
- Di Stasi, R., Diana, D., De Rosa, L., Fattorusso, R., & D'Andrea, L. D. (2019). Biochemical and Conformational Characterization of Recombinant VEGFR2 Domain 7. *Molecular Biotechnology*, *61*(11), 860–872. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00211-4>
- Dias, I. H. K., Milic, I., Heiss, C., Ademowo, O. S., Polidori, M. C., Devitt, A., & Griffiths, H. R. (2020). Inflammation, Lipid (Per)oxidation, and Redox Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, *33*(3), 166–190. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8022>
- Dissen, G. A., Hill, D. F., Costa, M. E., Les Dees, C. W., Lara, H. E., & Ojeda, S. R. (1996). A role for trkA nerve growth factor receptors in mammalian ovulation. *Endocrinology*, *137*(1), 198–209. <https://doi.org/10.1210/endo.137.1.8536613>
- Domínguez, R., Gaitán, C. M., Méndez, S. A., & Ulloa-Aguirre, A. (1987). Effects of catecholaminergic blockade by haloperidol or propranolol at different stages of the oestrous cycle on ovulation and gonadotrophin levels in the rat. *The Journal of Endocrinology*, *113*(1), 37–44. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1130037>
- Domínguez, R., Riboni, L., Zipitría, D., & Revilla, R. (1982). Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat? *The Journal of Endocrinology*, *95*(2), 175–180. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0950175>
- Duraker, R., Guven, E. S. G., Dilbaz, S., Mentese, A., Aydin, S., & Guven, S. (2021). Oxidative stress status in severe OHSS patients who underwent long agonist protocol intracytoplasmic sperm injection cycles. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, *48*(2), Article 2. <https://doi.org/10.31083/j.ceog.2021.02.5507>
- Ebisch, I. M. W., Peters, W. H. M., Thomas, C. M. G., Wetzels, A. M. M., Peer, P. G. M., & Steegers-Theunissen, R. P. M. (2006). Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *21*(7), 1725–1733. <https://doi.org/10.1093/humrep/del081>

- Ebrahimi, F., Zavareh, S., & Nasiri, M. (2023). The Combination of Estradiol and N-Acetylcysteine Reduces Ischemia-Reperfusion Injuries of Mice Autografted Ovarian Tissue. *Biopreservation and Biobanking*. <https://doi.org/10.1089/bio.2022.0184>
- Elia, E. M., Quintana, R., Carrere, C., Bazzano, M. V., Rey-Valzacchi, G., Paz, D. A., & Pustovrh, M. C. (2013). Metformin decreases the incidence of ovarian hyperstimulation syndrome: An experimental study. *Journal of Ovarian Research*, *6*(1), 62. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-6-62>
- Eppig, J. J., Wigglesworth, K., & Pendola, F. L. (2002). The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(5), 2890–2894. <https://doi.org/10.1073/pnas.052658699>
- Erickson, G. F., & Shimasaki, S. (2001). The physiology of folliculogenesis: The role of novel growth factors. *Fertility and Sterility*, *76*(5), 943–949. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)02859-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)02859-X)
- Espey, L. L. (1980). Ovulation as an inflammatory reaction—A hypothesis. *Biology of Reproduction*, *22*(1), 73–106. <https://doi.org/10.1095/biolreprod22.1.73>
- Espey, L. L., & Richards, J. S. (2006). CHAPTER 11—Ovulation. In J. D. Neill (Ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)* (pp. 425–474). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50016-6>
- Espey, L. L., Stein, V. I., & Dumitrescu, J. (1982). Survey of antiinflammatory agents and related drugs as inhibitors of ovulation in the rabbit. *Fertility and Sterility*, *38*(2), 238–247.
- Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Cooke, M. S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: Induction, repair and significance. *Mutation Research*, *567*(1), 1–61. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.11.001>
- Fan, L., Guan, F., Ma, Y., Zhang, Y., Li, L., Sun, Y., Cao, C., Du, H., & He, M. (2022). N-Acetylcysteine improves oocyte quality through modulating the Nrf2 signaling pathway to ameliorate oxidative stress caused by repeated controlled ovarian hyperstimulation. *Reproduction, Fertility, and Development*, *34*(10), 736–750. <https://doi.org/10.1071/RD22020>
- Fantin, A., Herzog, B., Mahmoud, M., Yamaji, M., Plein, A., Denti, L., Ruhrberg, C., & Zachary, I. (2014). Neuropilin 1 (NRP1) hypomorphism combined with defective VEGF-A binding reveals novel roles for NRP1 in developmental and pathological angiogenesis. *Development (Cambridge, England)*, *141*(3), 556–562. <https://doi.org/10.1242/dev.103028>
- Ferrero, H., Díaz-Gimeno, P., Sebastián-León, P., Faus, A., Gómez, R., & Pellicer, A. (2018). Dysregulated genes and their functional pathways in luteinized granulosa cells from PCOS patients after cabergoline treatment. *Reproduction (Cambridge, England)*, *155*(4), 373–381. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0027>
- Ferrero, H., García-Pascual, C. M., Gaytán, M., Morales, C., Simón, C., Gaytán, F., Pellicer, A., & Gómez, R. (2014). Dopamine receptor 2 activation inhibits ovarian vascular endothelial growth factor secretion in an ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) animal model: Implications for treatment of OHSS with dopamine receptor 2 agonists. *Fertility and Sterility*, *102*(5), 1468-1476.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.07.1240>
- Ferrero, H., García-Pascual, C. M., Pellicer, N., Simón, C., Pellicer, A., & Gómez, R. (2015). Dopamine agonist inhibits vascular endothelial growth factor protein production and secretion in granulosa cells. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, *13*, 104. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0102-4>
- Findlay, J. K., & Drummond, A. E. (1999). Regulation of the FSH Receptor in the Ovary. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *10*(5), 183–188. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(98\)00144-1](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(98)00144-1)
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of Cell Biology*, *194*(1), 7–15. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102095>
- Flores-Hernández, J., Cepeda, C., Hernández-Echeagaray, E., Calvert, C. R., Jokel, E. S., Fienberg, A. A., Greengard, P., & Levine, M. S. (2002). Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons:

- Role of D1 receptors and DARPP-32. *Journal of Neurophysiology*, 88(6), 3010–3020.
<https://doi.org/10.1152/jn.00361.2002>
- Flores-Hernandez, J., Hernandez, S., Snyder, G. L., Yan, Z., Fienberg, A. A., Moss, S. J., Greengard, P., & Surmeier, D. J. (2000). D(1) dopamine receptor activation reduces GABA(A) receptor currents in neostriatal neurons through a PKA/DARPP-32/PP1 signaling cascade. *Journal of Neurophysiology*, 83(5), 2996–3004.
<https://doi.org/10.1152/jn.2000.83.5.2996>
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal*, 33(7), 829–837, 837a–837d. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
- Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., & Semenza, G. L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and Cellular Biology*, 16(9), 4604–4613. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.9.4604>
- Fujii, J., Iuchi, Y., & Okada, F. (2005). Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 3, 43.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-43>
- Ganguly, S., Basu, B., Shome, S., Jadhav, T., Roy, S., Majumdar, J., Dasgupta, P. S., & Basu, S. (2010). Dopamine, by acting through its D2 receptor, inhibits insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced gastric cancer cell proliferation via up-regulation of Krüppel-like factor 4 through down-regulation of IGF-IR and AKT phosphorylation. *The American Journal of Pathology*, 177(6), 2701–2707. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100617>
- Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>
- Gavard, J., & Gutkind, J. S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nature Cell Biology*, 8(11), 1223–1234. <https://doi.org/10.1038/ncb1486>
- Gay, E. A., Urban, J. D., Nichols, D. E., Oxford, G. S., & Mailman, R. B. (2004). Functional selectivity of D2 receptor ligands in a Chinese hamster ovary hD2L cell line: Evidence for induction of ligand-specific receptor states. *Molecular Pharmacology*, 66(1), 97–105. <https://doi.org/10.1124/mol.66.1.97>
- Ghaneei, A., Jowkar, A., Hasani Ghavam, M. R., & Ghaneei, M. E. (2015). Cabergoline plus metformin therapy effects on menstrual irregularity and androgen system in polycystic ovary syndrome women with hyperprolactinemia. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 13(2), 93–100.
- Gluzman-Poltorak, Z., Cohen, T., Herzog, Y., & Neufeld, G. (2000). Neuropilin-2 and Neuropilin-1 Are Receptors for the 165-Amino Acid Form of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and of Placenta Growth Factor-2, but Only Neuropilin-2 Functions as a Receptor for the 145-Amino Acid Form of VEGF *. *Journal of Biological Chemistry*, 275(24), 18040–18045. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909259199>
- Golan, A., & Weissman, A. (2009). Symposium: Update on prediction and management of OHSS. A modern classification of OHSS. *Reproductive Biomedicine Online*, 19(1), 28–32. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60042-9](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60042-9)
- Gómez, R., Ferrero, H., Delgado-Rosas, F., Gaytan, M., Morales, C., Zimmermann, R. C., Simón, C., Gaytan, F., & Pellicer, A. (2011). Evidences for the existence of a low dopaminergic tone in polycystic ovarian syndrome: Implications for OHSS development and treatment. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(8), 2484–2492.
<https://doi.org/10.1210/jc.2011-0075>
- Gomez, R., Gonzalez-Izquierdo, M., Zimmermann, R. C., Novella-Maestre, E., Alonso-Muriel, I., Sanchez-Criado, J., Remohi, J., Simon, C., & Pellicer, A. (2006). Low-dose dopamine agonist administration blocks vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated vascular hyperpermeability without altering VEGF receptor 2-dependent luteal angiogenesis in a rat ovarian hyperstimulation model. *Endocrinology*, 147(11), 5400–5411.
<https://doi.org/10.1210/en.2006-0657>

- Gómez, R., Lima, I., Simón, C., & Pellicer, A. (2004). Administration of low-dose LH induces ovulation and prevents vascular hyperpermeability and vascular endothelial growth factor expression in superovulated rats. *Reproduction (Cambridge, England)*, *127*(4), 483–489. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00129>
- Gómez, R., Simón, C., Remohí, J., & Pellicer, A. (2002). Vascular endothelial growth factor receptor-2 activation induces vascular permeability in hyperstimulated rats, and this effect is prevented by receptor blockade. *Endocrinology*, *143*(11), 4339–4348. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220204>
- Gómez, R., Simón, C., Remohí, J., & Pellicer, A. (2003). Administration of moderate and high doses of gonadotropins to female rats increases ovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-2 expression that is associated to vascular hyperpermeability. *Biology of Reproduction*, *68*(6), 2164–2171. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.010801>
- Gougeon, A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: Facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*, *17*(2), 121–155. <https://doi.org/10.1210/edrv-17-2-121>
- Greiner, M., Paredes, A., Rey-Ares, V., Saller, S., Mayerhofer, A., & Lara, H. E. (2008). Catecholamine uptake, storage, and regulated release by ovarian granulosa cells. *Endocrinology*, *149*(10), 4988–4996. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1661>
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., & Cross, C. E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *119*(6), 598–620.
- Hamed, E. A., Sayyed, H. G., Abbas, A. M., Gaber, M. M. A., & Aleem, H. M. A. E. (2022). Nesfatin-1, Dopamine, and NADPH levels in Infertile Women with Polycystic Ovary Syndrome: Is There a Relationship Between Their Levels and Metabolic and Hormonal Variables. *Journal of Reproduction & Infertility*, *23*(3), 160–168. <https://doi.org/10.18502/jri.v23i3.10006>
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, *4*(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
- Harrison, R. (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now? *Free Radical Biology & Medicine*, *33*(6), 774–797. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00956-5](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00956-5)
- He, C., & Chen, X. (2005). Transcription regulation of the vegf gene by the BMP/Smad pathway in the angioblast of zebrafish embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *329*(1), 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.01.133>
- Heinolainen, K., Karaman, S., D'Amico, G., Tammela, T., Sormunen, R., Eklund, L., Alitalo, K., & Zarkada, G. (2017). VEGFR3 Modulates Vascular Permeability by Controlling VEGF/VEGFR2 Signaling. *Circulation Research*, *120*(9), 1414–1425. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.310477>
- Hellstrand, M., Eriksson, E., & Nilsson, C. L. (2002). Dopamine D(2) receptor-induced COX-2-mediated production of prostaglandin E(2) in D(2)-transfected Chinese hamster ovary cells without simultaneous administration of a Ca(2+)-mobilizing agent. *Biochemical Pharmacology*, *63*(12), 2151–2158. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)01020-1](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(02)01020-1)
- Hernandez-Lopez, S., Tkatch, T., Perez-Garci, E., Galarraga, E., Bargas, J., Hamm, H., & Surmeier, D. J. (2000). D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[β]1-IP3-calcineurin-signaling cascade. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*(24), 8987–8995. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-24-08987.2000>
- Hsueh, A. J. W., Billig, H., & Tsafirri, A. (1994). Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process*. *Endocrine Reviews*, *15*(6), 707–724. <https://doi.org/10.1210/edrv-15-6-707>
- Huang, J. Y. J., & Rosenwaks, Z. (2014). Assisted Reproductive Techniques. In Z. Rosenwaks & P. M. Wassarman (Eds.), *Human Fertility: Methods and Protocols* (pp. 171–231). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0659-8_8

- Ishibashi, M., Fujisawa, M., Furue, H., Maeda, Y., Fukayama, M., & Yamaji, T. (1994). Inhibition of growth of human small cell lung cancer by bromocriptine. *Cancer Research*, *54*(13), 3442–3446.
- Ivanova, A., Gerasimova, E., & Gazizullina, E. (2020). Study of Antioxidant Properties of Agents from the Perspective of Their Action Mechanisms. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *25*(18), 4251. <https://doi.org/10.3390/molecules25184251>
- Jaber, M., Robinson, S. W., Missale, C., & Caron, M. G. (1996). Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology*, *35*(11), 1503–1519. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(96\)00100-1](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(96)00100-1)
- Jain, M., & Singh, M. (2024). Assisted Reproductive Technology (ART) Techniques. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK576409/>
- Jellad, S., Haj Hassine, A., Basly, M., Mrabet, A., Chibani, M., & Rachdi, R. (2017). Vascular endothelial growth factor antagonist reduces the early onset and the severity of ovarian hyperstimulation syndrome. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, *46*(1), 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.jgyn.2016.04.002>
- Jin, Z.-G., Ueba, H., Tanimoto, T., Lungu, A. O., Frame, M. D., & Berk, B. C. (2003). Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 by fluid shear stress regulates activation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation Research*, *93*(4), 354–363. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000089257.94002.96>
- Kanterman, R. Y., Mahan, L. C., Briley, E. M., Monsma, F. J., Sibley, D. R., Axelrod, J., & Felder, C. C. (1991). Transfected D2 dopamine receptors mediate the potentiation of arachidonic acid release in Chinese hamster ovary cells. *Molecular Pharmacology*, *39*(3), 364–369.
- Karuppagounder, S. S., Alin, L., Chen, Y., Brand, D., Bourassa, M. W., Dietrich, K., Wilkinson, C. M., Nadeau, C. A., Kumar, A., Perry, S., Pinto, J. T., Darley-USmar, V., Sanchez, S., Milne, G. L., Pratico, D., Holman, T. R., Carmichael, S. T., Coppola, G., Colbourne, F., & Ratan, R. R. (2018). N-acetylcysteine targets 5 lipoxygenase-derived, toxic lipids and can synergize with prostaglandin E2 to inhibit ferroptosis and improve outcomes following hemorrhagic stroke in mice. *Annals of Neurology*, *84*(6), 854–872. <https://doi.org/10.1002/ana.25356>
- Khatri, J. J., Johnson, C., Magid, R., Lessner, S. M., Laude, K. M., Dikalov, S. I., Harrison, D. G., Sung, H.-J., Rong, Y., & Galis, Z. S. (2004). Vascular oxidant stress enhances progression and angiogenesis of experimental atheroma. *Circulation*, *109*(4), 520–525. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000109698.70638.2B>
- Kim, I., Moon, S. O., Kim, S. H., Kim, H. J., Koh, Y. S., & Koh, G. Y. (2001). Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(10), 7614–7620. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009705200>
- Kim, J., Sato, M., Li, Q., Lydon, J. P., Demayo, F. J., Bagchi, I. C., & Bagchi, M. K. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a target of progesterone regulation in the preovulatory follicles and controls ovulation in mice. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(5), 1770–1782. <https://doi.org/10.1128/MCB.01556-07>
- Kim, K. H., Moriarty, K., & Bender, J. R. (2008). Vascular cell signaling by membrane estrogen receptors. *Steroids*, *73*(9–10), 864–869. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2008.01.008>
- Kimura, H., Weisz, A., Kurashima, Y., Hashimoto, K., Ogura, T., D'Acquisto, F., Addeo, R., Makuuchi, M., & Esumi, H. (2000). Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: Control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood*, *95*(1), 189–197.
- King, S. S., Campbell, A. G., Dille, E. A., Roser, J. F., Murphy, L. L., & Jones, K. L. (2005). Dopamine receptors in equine ovarian tissues. *Domestic Animal Endocrinology*, *28*(4), 405–415. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.02.001>
- Kodaman, P. H., & Behrman, H. R. (2001). Endocrine-regulated and protein kinase C-dependent generation of superoxide by rat preovulatory follicles. *Endocrinology*, *142*(2), 687–693. <https://doi.org/10.1210/endo.142.2.7961>

- Kotwica, J., Skarzynski, D., Bogacki, M., & Miszkiewicz, G. (1996). Influence of dopamine as noradrenaline precursor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro. *British Journal of Pharmacology*, *118*(7), 1669–1674. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15590.x>
- Krissinel, E., & Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of Molecular Biology*, *372*(3), 774–797. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.022>
- Lee, J.-Y., Ham, J., Lim, W., & Song, G. (2020). Apomorphine facilitates loss of respiratory chain activity in human epithelial ovarian cancer and inhibits angiogenesis in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, *154*, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.05.001>
- Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. *Cell*, *141*(7), 1117–1134. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>
- Leslie, N. R., & Downes, C. P. (2002). PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling. *Cellular Signalling*, *14*(4), 285–295. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(01\)00234-0](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(01)00234-0)
- Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V., & Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science (New York, N.Y.)*, *246*(4935), 1306–1309. <https://doi.org/10.1126/science.2479986>
- Li, X., Padhan, N., Sjöström, E. O., Roche, F. P., Testini, C., Honkura, N., Sáinz-Jaspeado, M., Gordon, E., Bentley, K., Philippides, A., Tolmachev, V., Dejana, E., Stan, R. V., Vestweber, D., Ballmer-Hofer, K., Betsholtz, C., Pietras, K., Jansson, L., & Claesson-Welsh, L. (2016). VEGFR2 pY949 signalling regulates adherens junction integrity and metastatic spread. *Nature Communications*, *7*, 11017. <https://doi.org/10.1038/ncomms11017>
- Lightman, A., Tarlatzis, B. C., Rzasca, P. J., Culler, M. D., Caride, V. J., Negro-Vilar, A. F., Lennard, D., DeCherney, A. H., & Naftolin, F. (1987). The ovarian renin-angiotensin system: Renin-like activity and angiotensin II/III immunoreactivity in gonadotropin-stimulated and unstimulated human follicular fluid. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *156*(4), 808–816. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(87\)90336-x](https://doi.org/10.1016/0002-9378(87)90336-x)
- Lunenfeld, B., & Insler, V. (1993). Follicular development and its control. *Gynecological Endocrinology*, *7*(4), 285–291. <https://doi.org/10.3109/09513599309152514>
- Mahmoodi, M., Soleimani Mehranjani, M., Shariatzadeh, S. M. A., Eimani, H., & Shahverdi, A. (2015). N-acetylcysteine improves function and follicular survival in mice ovarian grafts through inhibition of oxidative stress. *Reproductive Biomedicine Online*, *30*(1), 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.09.013>
- Mahsa Poormoosavi, S., Behmanesh, M. A., Varzi, H. N., Mansouri, S., & Janati, S. (2021). The effect of follicular fluid selenium concentration on oocyte maturation in women with polycystic ovary syndrome undergoing in vitro fertilization/Intracytoplasmic sperm injection: A cross-sectional study. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, *19*(8), 689–698. <https://doi.org/10.18502/ijrm.v19i8.9616>
- Mangili, F., Giardino, E., Treppiedi, D., Barbieri, A. M., Catalano, R., Locatelli, M., Lania, A. G., Spada, A., Arosio, M., Mantovani, G., & Peverelli, E. (2021). Beta-Arrestin 2 Is Required for Dopamine Receptor Type 2 Inhibitory Effects on AKT Phosphorylation and Cell Proliferation in Pituitary Tumors. *Neuroendocrinology*, *111*(6), 568–579. <https://doi.org/10.1159/000509219>
- Marković, Z. (2016). Study of the mechanisms of antioxidative action of different antioxidants. *Journal of Serbian Society for Computational Mechanics*, *10*(1), 135–150. <https://doi.org/10.5937/jsscm1601135M>
- Martin, D., Galisteo, R., & Gutkind, J. S. (2009). CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NFkappaB through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(10), 6038–6042. <https://doi.org/10.1074/jbc.C800207200>
- Martin, S. G., Zhang, S., Yang, S., Saidy, B., Deen, S., & Storr, S. J. (2020). Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein 32kDa (DARPP-32), protein phosphatase-1 and cyclin-dependent kinase 5 expression in ovarian cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *24*(16), 9165–9175. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15553>

- Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., & Stevens, G. A. (2012). National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Medicine*, *9*(12), e1001356. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001356>
- Mayerhofer, A., Fritz, S., Grünert, R., Sanders, S. L., Duffy, D. M., Ojeda, S. R., & Stouffer, R. L. (2000). D1-Receptor, DARPP-32, and PP-1 in the primate corpus luteum and luteinized granulosa cells: Evidence for phosphorylation of DARPP-32 by dopamine and human chorionic gonadotropin. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *85*(12), 4750–4757. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.12.7084>
- Mayerhofer, A., Fritz, S., Mani, S., Rajendra Kumar, T., Thalhammer, A., Ingrassia, P., Fienberg, A. A., & Greengard, P. (2004). Ovarian function and morphology after deletion of the DARPP-32 gene in mice. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, *112*(8), 451–457. <https://doi.org/10.1055/s-2004-821205>
- Mayerhofer, A., Hemmings, H. C., Snyder, G. L., Greengard, P., Boddien, S., Berg, U., & Brucker, C. (1999). Functional dopamine-1 receptors and DARPP-32 are expressed in human ovary and granulosa luteal cells in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *84*(1), 257–264. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.1.5378>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(18), 10990–10995. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10990>
- Meloni, G., & Vašák, M. (2011). Redox activity of α -synuclein-Cu is silenced by Zn₇-metallothionein-3. *Free Radical Biology & Medicine*, *50*(11), 1471–1479. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.003>
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., & Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: The new wave? *Trends in Plant Science*, *16*(6), 300–309. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.007>
- Mohammadbygi, R., Yousefi, S. R., Shahghaybi, S., Zandi, S., Sharifi, K., & Gharibi, F. (2013). Effects of Cabergoline administration on uterine perfusion in women with polycystic ovary syndrome. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, *29*(4), 919–922. <https://doi.org/10.12669/pjms.294.3558>
- Monaghan-Benson, E., & Burrige, K. (2009). The regulation of vascular endothelial growth factor-induced microvascular permeability requires Rac and reactive oxygen species. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(38), 25602–25611. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.009894>
- Moreno-Smith, M., Lee, S. J., Lu, C., Nagaraja, A. S., He, G., Rupaimoole, R., Han, H. D., Jennings, N. B., Roh, J.-W., Nishimura, M., Kang, Y., Allen, J. K., Armaiz, G. N., Matsuo, K., Shahzad, M. M. K., Bottsford-Miller, J., Langley, R. R., Cole, S. W., Lutgendorf, S. K., ... Sood, A. K. (2013). Biologic effects of dopamine on tumor vasculature in ovarian carcinoma. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *15*(5), 502–510. <https://doi.org/10.1593/neo.121412>
- Moreno-Smith, M., Lu, C., Shahzad, M. M. K., Pena, G. N. A., Allen, J. K., Stone, R. L., Mangala, L. S., Han, H. D., Kim, H. S., Farley, D., Berestein, G. L., Cole, S. W., Lutgendorf, S. K., & Sood, A. K. (2011). Dopamine blocks stress-mediated ovarian carcinoma growth. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *17*(11), 3649–3659. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2441>
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, *30*(16), 2785. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Mostajeran, F., Tehrani, H. G., & Rahbary, B. (2018). N-Acetylcysteine as an Adjuvant to Letrozole for Induction of Ovulation in Infertile Patients with Polycystic Ovary Syndrome. *Advanced Biomedical Research*, *7*(1), 100. https://doi.org/10.4103/abr.abr_157_17
- Mueller, M. D., Vigne, J. L., Minchenko, A., Lebovic, D. I., Leitman, D. C., & Taylor, R. N. (2000). Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, 97(20), 10972–10977.
<https://doi.org/10.1073/pnas.200377097>

- Murri, M., Luque-Ramírez, M., Insenser, M., Ojeda-Ojeda, M., & Escobar-Morreale, H. F. (2013). Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 19(3), 268–288. <https://doi.org/10.1093/humupd/dms059>
- Musali, N., Özmen, B., Şükür, Y. E., Ergüder, B. İ., Atabekoğlu, C. S., Sönmezer, M., Berker, B., & Aytaç, R. (2016). Follicular fluid norepinephrine and dopamine concentrations are higher in polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 32(6), 460–463. <https://doi.org/10.3109/09513590.2015.1130808>
- Navot, D., Bergh, P. A., & Laufer, N. (1992). Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies: Prevention and treatment. *Fertility and Sterility*, 58(2), 249–261. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)55188-7](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)55188-7)
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., & Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(1), 9–22.
- Nilsson, C. L., Hellstrand, M., Ekman, A., & Eriksson, E. (1998). Direct dopamine D2-receptor-mediated modulation of arachidonic acid release in transfected CHO cells without the concomitant administration of a Ca²⁺-mobilizing agent. *British Journal of Pharmacology*, 124(8), 1651–1658. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702025>
- Nussey, S., & Whitehead, S. (2001). The gonad. In *Endocrinology: An Integrated Approach*. BIOS Scientific Publishers. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK29/>
- Okabe, K., Kobayashi, S., Yamada, T., Kurihara, T., Tai-Nagara, I., Miyamoto, T., Mukouyama, Y., Sato, T. N., Suda, T., Ema, M., & Kubota, Y. (2014). Neurons limit angiogenesis by titrating VEGF in retina. *Cell*, 159(3), 584–596. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.025>
- Olesen, H. Ø., Pors, S. E., Jensen, L. B., Grønning, A. P., Lemser, C. E., Nguyen Heimbürger, M. T. H., Mamsen, L. S., Getreu, N., Christensen, S. T., Andersen, C. Y., & Kristensen, S. G. (2021). N-acetylcysteine protects ovarian follicles from ischemia-reperfusion injury in xenotransplanted human ovarian tissue. *Human Reproduction*, 36(2), 429–443. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa291>
- Ombelet, W. (2009). Reproductive healthcare systems should include accessible infertility diagnosis and treatment: An important challenge for resource-poor countries. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 106(2), 168–171. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2009.03.033>
- Ortega-Camarillo, C., Guzmán-Grenfell, A. M., & Hicks, J. J. (1999). Oxidation of gonadotrophin (PMSG) by oxygen free radicals alters its structure and hormonal activity. *Molecular Reproduction and Development*, 52(3), 264–268. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199903\)52:3<264::AID-MRD3>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199903)52:3<264::AID-MRD3>3.0.CO;2-G)
- Palacio, J. R., Iborra, A., Ulcova-Galova, Z., Badia, R., & Martínez, P. (2006). The presence of antibodies to oxidative modified proteins in serum from polycystic ovary syndrome patients. *Clinical and Experimental Immunology*, 144(2), 217–222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03061.x>
- Pangas, S. A., & Rajkovic, A. (2006). Transcriptional regulation of early oogenesis: In search of masters. *Human Reproduction Update*, 12(1), 65–76. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi033>
- Papa, S., Rasmø, D. D., Technikova-Dobrova, Z., Panelli, D., Signorile, A., Scacco, S., Petruzzella, V., Papa, F., Palmisano, G., Gnoni, A., Micelli, L., & Sardanelli, A. M. (2012). Respiratory chain complex I, a main regulatory target of the cAMP/PKA pathway is defective in different human diseases. *FEBS Letters*, 586(5), 568–577. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.09.019>
- Parillo, F., Maranesi, M., Mignini, F., Marinelli, L., Di Stefano, A., Boiti, C., & Zerani, M. (2014). Evidence for a dopamine intrinsic direct role in the regulation of the ovary reproductive function: In vitro study on rabbit corpora lutea. *PLoS One*, 9(8), e104797. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104797>

- Park, M. S., Dong, S. M., Kim, B.-R., Seo, S. H., Kang, S., Lee, E.-J., Lee, S.-H., & Rho, S. B. (2014). Thioridazine inhibits angiogenesis and tumor growth by targeting the VEGFR-2/PI3K/mTOR pathway in ovarian cancer xenografts. *Oncotarget*, 5(13), 4929–4934. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2063>
- Parrott, J. A., & Skinner, M. K. (1999). Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, 140(9), 4262–4271. <https://doi.org/10.1210/endo.140.9.6994>
- Patel, S. (2018). Polycystic ovary syndrome (PCOS), an inflammatory, systemic, lifestyle endocrinopathy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 182, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.04.008>
- Pearlstein, D. P., Ali, M. H., Mungai, P. T., Hynes, K. L., Gewertz, B. L., & Schumacker, P. T. (2002). Role of mitochondrial oxidant generation in endothelial cell responses to hypoxia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(4), 566–573. <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000012262.76205.6a>
- Pedre, B., Barayeu, U., Ezeriņa, D., & Dick, T. P. (2021). The mechanism of action of N-acetylcysteine (NAC): The emerging role of H2S and sulfane sulfur species. *Pharmacology & Therapeutics*, 228, 107916. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107916>
- Pellicer, A., Albert, C., Mercader, A., Bonilla-Musoles, F., Remohí, J., & Simón, C. (1999). The pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome: In vivo studies investigating the role of interleukin-1beta, interleukin-6, and vascular endothelial growth factor. *Fertility and Sterility*, 71(3), 482–489. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(98\)00484-1](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(98)00484-1)
- Pérez-Ruiz, I., Meijide, S., Hernández, M.-L., Navarro, R., Larreategui, Z., Ferrando, M., Ruiz-Larrea, M.-B., & Ruiz-Sanz, J.-I. (2018). Analysis of Protein Oxidative Modifications in Follicular Fluid from Fertile Women: Natural Versus Stimulated Cycles. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 7(12), 176. <https://doi.org/10.3390/antiox7120176>
- Petterson, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Phoenix, K. N., Yue, Z., Yue, L., Cronin, C. G., Liang, B. T., Hoepfner, L. H., & Claffey, K. P. (2022). PLCβ2 Promotes VEGF-Induced Vascular Permeability. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 42(10), 1229–1241. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.122.317645>
- Piaditis, G. P., Kounadi, T. G., Rangou, D. B., Trovas, G. P., Kaklas, N. A., Tzonou, A. J., & Chlouverakis, C. S. (1995). Dysfunction of the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in women with polycystic ovarian syndrome. *Clinical Endocrinology*, 42(6), 635–640. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.1995.tb02691.x>
- Picton, H., Briggs, D., & Gosden, R. (1998). The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 145(1–2), 27–37. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(98\)00166-x](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(98)00166-x)
- Pillai, G., Brown, N. A., McAllister, G., Milligan, G., & Seabrook, G. R. (1998). Human D2 and D4 dopamine receptors couple through betagamma G-protein subunits to inwardly rectifying K⁺ channels (GIRK1) in a *Xenopus* oocyte expression system: Selective antagonism by L-741,626 and L-745,870 respectively. *Neuropharmacology*, 37(8), 983–987. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(98\)00092-6](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(98)00092-6)
- Poillet-Perez, L., Despouy, G., Delage-Mourroux, R., & Boyer-Guittaut, M. (2015). Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biology*, 4, 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.12.003>
- Polak, G., Koziół-Montewka, M., Gogacz, M., Błaszowska, I., & Kotarski, J. (2001). Total antioxidant status of peritoneal fluid in infertile women. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 94(2), 261–263. [https://doi.org/10.1016/s0301-2115\(00\)00352-3](https://doi.org/10.1016/s0301-2115(00)00352-3)
- Prelević, G. M., Würzburger, M. I., & Perić, L. A. (1987). Acute effects of L-dopa and bromocriptine on serum PRL, LH and FSH levels in patients with hyperprolactinemic and normoprolactinemic polycystic ovary syndrome. *Journal of Endocrinological Investigation*, 10(4), 389–395. <https://doi.org/10.1007/BF03348155>

- Rajkovic, A., Pangas, S. A., Ballow, D., Suzumori, N., & Matzuk, M. M. (2004). NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science (New York, N.Y.)*, *305*(5687), 1157–1159. <https://doi.org/10.1126/science.1099755>
- Rajput, A. H., Voll, A., Rajput, M. L., Robinson, C. A., & Rajput, A. (2009). Course in Parkinson disease subtypes: A 39-year clinicopathologic study. *Neurology*, *73*(3), 206–212. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181ae7af1>
- Ren, Y., Suzuki, H., Jagarlamudi, K., Golnoski, K., McGuire, M., Lopes, R., Pachnis, V., & Rajkovic, A. (2015). Lhx8 regulates primordial follicle activation and postnatal folliculogenesis. *BMC Biology*, *13*, 39. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0151-3>
- Rey-Ares, V., Lazarov, N., Berg, D., Berg, U., Kunz, L., & Mayerhofer, A. (2007). Dopamine receptor repertoire of human granulosa cells. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, *5*, 40. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-5-40>
- Rho, S. B., Kim, B.-R., & Kang, S. (2011). A gene signature-based approach identifies thioridazine as an inhibitor of phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K)/AKT pathway in ovarian cancer cells. *Gynecologic Oncology*, *120*(1), 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.10.003>
- Richards, J. S., & Ascoli, M. (2018). Endocrine, Paracrine, and Autocrine Signaling Pathways That Regulate Ovulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *29*(5), 313–325. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.02.012>
- Rimon-Dahari, N., Yerushalmi-Heinemann, L., Alyagor, L., & Dekel, N. (2016). Ovarian Folliculogenesis. In R. P. Pipek (Ed.), *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development* (pp. 167–190). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31973-5_7
- Rizk, B., Aboulghar, M., Smitz, J., & Ron-El, R. (1997). The role of vascular endothelial growth factor and interleukins in the pathogenesis of severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Human Reproduction Update*, *3*(3), 255–266. <https://doi.org/10.1093/humupd/3.3.255>
- Rodrigues, S. F., & Granger, D. N. (2015). Blood cells and endothelial barrier function. *Tissue Barriers*, *3*(1–2), e978720. <https://doi.org/10.4161/21688370.2014.978720>
- Rousseau, S., Houle, F., Kotanides, H., Witte, L., Waltenberger, J., Landry, J., & Huot, J. (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(14), 10661–10672. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.14.10661>
- Rudic, R. D., Shesely, E. G., Maeda, N., Smithies, O., Segal, S. S., & Sessa, W. C. (1998). Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *The Journal of Clinical Investigation*, *101*(4), 731–736. <https://doi.org/10.1172/JCI1699>
- Russell, D. L., Doyle, K. M. H., Ochsner, S. A., Sandy, J. D., & Richards, J. S. (2003). Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(43), 42330–42339. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300519200>
- Russell, D. L., & Robker, R. L. (2007). Molecular mechanisms of ovulation: Co-ordination through the cumulus complex. *Human Reproduction Update*, *13*(3), 289–312. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml062>
- Saller, S., Kunz, L., Berg, D., Berg, U., Lara, H., Urra, J., Hecht, S., Pavlik, R., Thaler, C. J., & Mayerhofer, A. (2014). Dopamine in human follicular fluid is associated with cellular uptake and metabolism-dependent generation of reactive oxygen species in granulosa cells: Implications for physiology and pathology. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *29*(3), 555–567. <https://doi.org/10.1093/humrep/det422>
- Samsonov, M. V., Khapchaev, A. Y., Vorotnikov, A. V., Vlasik, T. N., Yanushevskaya, E. V., Sidorova, M. V., Efremov, E. E., Lankin, V. Z., & Shirinsky, V. P. (2017). Impact of Atherosclerosis- and Diabetes-Related Dicarboxyls on Vascular Endothelial Permeability: A Comparative Assessment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 1625130. <https://doi.org/10.1155/2017/1625130>

- Santini, E., Feyder, M., Gangarossa, G., Bateup, H. S., Greengard, P., & Fisone, G. (2012). Dopamine- and cAMP-regulated Phosphoprotein of 32-kDa (DARPP-32)-dependent Activation of Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) and Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Signaling in Experimental Parkinsonism. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(33), 27806–27812. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.388413>
- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., Hernández-Carlos, B., Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. In *Antioxidants*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85270>
- Sarabipour, S., Ballmer-Hofer, K., & Hristova, K. (n.d.). VEGFR-2 conformational switch in response to ligand binding. *eLife*, 5, e13876. <https://doi.org/10.7554/eLife.13876>
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5712), 1098–1101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>
- Scotti, L., Abramovich, D., Pascuali, N., Irusta, G., Meresman, G., Tesone, M., & Parborell, F. (2014). Local VEGF inhibition prevents ovarian alterations associated with ovarian hyperstimulation syndrome. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 144 Pt B, 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.08.013>
- Shaltout, A., Shohyab, A., & Youssef, M. A. F. M. (2012). Can dopamine agonist at a low dose reduce ovarian hyperstimulation syndrome in women at risk undergoing ICSI treatment cycles? A randomized controlled study. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 165(2), 254–258. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2012.08.008>
- Shibuya, M. (2013). VEGFR and Type-V RTK Activation and Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(10), a009092. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009092>
- Shiotani, M., Noda, Y., Narimoto, K., Imai, K., Mori, T., Fujimoto, K., & Ogawa, K. (1991). Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in the human ovary. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 6(10), 1349–1353. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137267>
- Shkolnik, K., Tadmor, A., Ben-Dor, S., Nevo, N., Galiani, D., & Dekel, N. (2011). Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4), 1462–1467. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017213108>
- Shukla, P. K., Gangwar, R., Manda, B., Meena, A. S., Yadav, N., Szabo, E., Balogh, A., Lee, S. C., Tigyi, G., & Rao, R. (2016). Rapid disruption of intestinal epithelial tight junction and barrier dysfunction by ionizing radiation in mouse colon in vivo: Protection by N-acetyl-L-cysteine. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 310(9), G705–715. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00314.2015>
- Simons, M., Gordon, E., & Claesson-Welsh, L. (2016). Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(10), 611–625. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.87>
- Sinha, S., Vohra, P. K., Bhattacharya, R., Dutta, S., Sinha, S., & Mukhopadhyay, D. (2009). Dopamine regulates phosphorylation of VEGF receptor 2 by engaging Src-homology-2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 18), 3385–3392. <https://doi.org/10.1242/jcs.053124>
- Skvarc, D. R., Dean, O. M., Byrne, L. K., Gray, L., Lane, S., Lewis, M., Fernandes, B. S., Berk, M., & Marriott, A. (2017). The effect of N-acetylcysteine (NAC) on human cognition—A systematic review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 78, 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.04.013>
- Soares, S. R., Gómez, R., Simón, C., García-Velasco, J. A., & Pellicer, A. (2008). Targeting the vascular endothelial growth factor system to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Human Reproduction Update*, 14(4), 321–333. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn008>
- Spattini, G., Borghi, V., Thuróczy, J., Balogh, L., Scaramuzzi, R. J., & De Rensis, F. (2007). Follicular development and plasma concentrations of LH and prolactin in anestrus female dogs treated with the dopamine agonist cabergoline. *Theriogenology*, 68(6), 826–833. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.007>

- Stieg, D. C., Wang, Y., Liu, L.-Z., & Jiang, B.-H. (2022). ROS and miRNA Dysregulation in Ovarian Cancer Development, Angiogenesis and Therapeutic Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6702. <https://doi.org/10.3390/ijms23126702>
- Su, Y.-Q., Nyegaard, M., Overgaard, M. T., Qiao, J., & Giudice, L. C. (2006). Participation of mitogen-activated protein kinase in luteinizing hormone-induced differential regulation of steroidogenesis and steroidogenic gene expression in mural and cumulus granulosa cells of mouse preovulatory follicles. *Biology of Reproduction*, 75(6), 859–867. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.052613>
- Sunahara, R. K., & Taussig, R. (2002). Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: Multiplicities of signaling. *Molecular Interventions*, 2(3), 168–184. <https://doi.org/10.1124/mi.2.3.168>
- Sunderam, S. (2020). Assisted Reproductive Technology Surveillance—United States, 2017. *MMWR. Surveillance Summaries*, 69. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6909a1>
- Suzuki, T., Sugino, N., Fukaya, T., Sugiyama, S., Uda, T., Takaya, R., Yajima, A., & Sasano, H. (1999). Superoxide dismutase in normal cycling human ovaries: Immunohistochemical localization and characterization. *Fertility and Sterility*, 72(4), 720–726. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(99\)00332-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(99)00332-5)
- Taheripanah, R., Vasef, M., Zamaniyan, M., & Taheripanah, A. (2018). Comparison of Cabergoline and Quinagolide in Prevention of Severe Ovarian Hyperstimulation Syndrome among Patients Undergoing Intracytoplasmic Sperm Injection. *International Journal of Fertility & Sterility*, 12(1), 1–5. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2018.5259>
- Tojo, T., Ushio-Fukai, M., Yamaoka-Tojo, M., Ikeda, S., Patrushev, N., & Alexander, R. W. (2005). Role of gp91phox (Nox2)-containing NAD(P)H oxidase in angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Circulation*, 111(18), 2347–2355. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000164261.62586.14>
- Toyoda, S., Miyazaki, T., Miyazaki, S., Yoshimura, T., Yamamoto, M., Tashiro, F., Yamato, E., & Miyazaki, J. (2009). Sohlh2 affects differentiation of KIT positive oocytes and spermatogonia. *Developmental Biology*, 325(1), 238–248. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.019>
- Ushio-Fukai, M. (2006). Redox signaling in angiogenesis: Role of NADPH oxidase. *Cardiovascular Research*, 71(2), 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.04.015>
- Vallet, P., Charnay, Y., Steger, K., Ogier-Denis, E., Kovari, E., Herrmann, F., Michel, J.-P., & Szanto, I. (2005). Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia. *Neuroscience*, 132(2), 233–238. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.12.038>
- Vander Borgh, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry*, 62, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>
- Venegas-Meneses, B., Padilla, J. F., Juárez, C. E., Morán, J. L., Morán, C., Rosas-Murrieta, N. H., Handal, A., & Domínguez, R. (2015). Effects of ovarian dopaminergic receptors on ovulation. *Endocrine*, 50(3), 783–796. <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0636-4>
- Wang, L., Tang, J., Wang, L., Tan, F., Song, H., Zhou, J., & Li, F. (2021). Oxidative stress in oocyte aging and female reproduction. *Journal of Cellular Physiology*, 236(12), 7966–7983. <https://doi.org/10.1002/jcp.30468>
- Wang, W., Dentler, W. L., & Borchardt, R. T. (2001). VEGF increases BMEC monolayer permeability by affecting occludin expression and tight junction assembly. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 280(1), H434–440. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.1.H434>
- Wautier, J.-L., & Wautier, M.-P. (2022). Vascular Permeability in Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3645. <https://doi.org/10.3390/ijms23073645>
- West, X. Z., Meller, N., Malinin, N. L., Deshmukh, L., Meller, J., Mahabeleshwar, G. H., Weber, M. E., Kerr, B. A., Vinogradova, O., & Byzova, T. V. (2012). Integrin β 3 Crosstalk with VEGFR Accommodating Tyrosine Phosphorylation as a Regulatory Switch. *PLoS ONE*, 7(2), e31071. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031071>

- Westhoff, M. A., Serrels, B., Fincham, V. J., Frame, M. C., & Carragher, N. O. (2004). SRC-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase couples actin and adhesion dynamics to survival signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 24(18), 8113–8133. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.18.8113-8133.2004>
- Wick, M. M. (1978). Dopamine: A novel antitumor agent active against B-16 melanoma in vivo. *The Journal of Investigative Dermatology*, 71(2), 163–164. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12546959.1>
- Wick, M. M. (1981). Levodopa and dopamine analogs: Dihydroxy and trihydroxybenzylamines as novel quinol antitumor agents in experimental leukemia in vivo. *Cancer Treatment Reports*, 65(9–10), 861–867.
- Wilcox, C. S. (2005). Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: A critical link to hypertension? *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289(4), R913–935. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00250.2005>
- Williams, C. J., & Erickson, G. F. (2000). Morphology and Physiology of the Ovary. In K. R. Feingold, B. Anawalt, M. R. Blackman, A. Boyce, G. Chrousos, E. Corpas, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, J. Hofland, S. Kalra, G. Kaltsas, N. Kapoor, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C. S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrère, ... D. P. Wilson (Eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278951/>
- Yang, H., Xie, Y., Yang, D., & Ren, D. (2017). Oxidative stress-induced apoptosis in granulosa cells involves JNK, p53 and Puma. *Oncotarget*, 8(15), 25310–25322. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15813>
- Yang, Y., Cong, H., Han, C., Yue, L., Dong, H., & Liu, J. (2015). 12-Deoxyphorbol 13-palmitate inhibits the expression of VEGF and HIF-1 α in MCF-7 cells by blocking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Oncology Reports*, 34(4), 1755–1760. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4166>
- Yang, Y., Zhang, Y., Cuevas, S., Villar, V. A., Escano, C., D Asico, L., Yu, P., Grandy, D. K., Felder, R. A., Armando, I., & Jose, P. A. (2012). Paraoxonase 2 decreases renal reactive oxygen species production, lowers blood pressure, and mediates dopamine D2 receptor-induced inhibition of NADPH oxidase. *Free Radical Biology & Medicine*, 53(3), 437–446. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.015>
- Yasunari, K., Kohno, M., Kano, H., Minami, M., & Yoshikawa, J. (2000). Dopamine as a novel antioxidative agent for rat vascular smooth muscle cells through dopamine D(1)-like receptors. *Circulation*, 101(19), 2302–2308. <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.19.2302>
- Yong, M., Yu, T., Tian, S., Liu, S., Xu, J., Hu, J., & Hu, L. (2020). Erratum: DR2 blocker thioridazine: A promising drug for ovarian cancer therapy. *Oncology Letters*, 20(5), 218. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12081>
- Yoshida, H., Takakura, N., Kataoka, H., Kunisada, T., Okamura, H., & Nishikawa, S. I. (1997). Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Developmental Biology*, 184(1), 122–137. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8503>
- Yoshioka, M., Tanaka, K. ichi, Miyazaki, I., Fujita, N., Higashi, Y., Asanuma, M., & Ogawa, N. (2002). The dopamine agonist cabergoline provides neuroprotection by activation of the glutathione system and scavenging free radicals. *Neuroscience Research*, 43(3), 259–267. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(02\)00040-8](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(02)00040-8)
- Youssef, M. A. F. M., van Wely, M., Hassan, M. A., Al-Inany, H. G., Mochtar, M., Khattab, S., & van der Veen, F. (2010). Can dopamine agonists reduce the incidence and severity of OHSS in IVF/ICSI treatment cycles? A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 16(5), 459–466. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmq006>
- Yu, J., Fu, Y., Zeng, L., Xie, P., Li, L., & Zheng, Y. (2023). Burden of female infertility in China from 1990 to 2019: A temporal trend analysis and forecasting, and comparison with the global level. *Sexual Health*, 20(6), 577–584. <https://doi.org/10.1071/SH23029>
- Zeleznik, A. J. (2004). The physiology of follicle selection. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 2, 31. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-31>
- Zhai, J., Liu, J., Zhao, S., Zhao, H., Chen, Z.-J., Du, Y., & Li, W. (2017). Kisspeptin-10 inhibits OHSS by suppressing VEGF secretion. *Reproduction (Cambridge, England)*, 154(4), 355–362. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0268>

- Zhang, J. J., Merhi, Z., Yang, M., Bodri, D., Chavez-Badiola, A., Repping, S., & van Wely, M. (2016). Minimal stimulation IVF vs conventional IVF: A randomized controlled trial. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *214*(1), 96.e1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.08.009>
- Zhang, J., Xiong, B., Zhen, X., & Zhang, A. (2009). Dopamine D1 receptor ligands: Where are we now and where are we going. *Medicinal Research Reviews*, *29*(2), 272–294. <https://doi.org/10.1002/med.20130>
- Zhang, X., Li, J., Liu, J., Luo, H., Gou, K., & Cui, S. (2013). Prostaglandin F₂ α upregulates Slit/Robo expression in mouse corpus luteum during luteolysis. *The Journal of Endocrinology*, *218*(3), 299–310. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0088>
- Zhou, G., Gu, Y., Zhou, F., Zhang, M., Zhang, G., Wu, L., Hua, K., & Ding, J. (2021). The Emerging Roles and Therapeutic Potential of Extracellular Vesicles in Infertility. *Frontiers in Endocrinology*, *12*, 758206. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.758206>
- Zhu, Y., Zhang, X.-L., Zhu, B.-F., & Ding, Y.-N. (2012). Effect of antioxidant N-acetylcysteine on diabetic retinopathy and expression of VEGF and ICAM-1 from retinal blood vessels of diabetic rats. *Molecular Biology Reports*, *39*(4), 3727–3735. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1148-9>
- Zhuang, G., Yu, K., Jiang, Z., Chung, A., Yao, J., Ha, C., Toy, K., Soriano, R., Haley, B., Blackwood, E., Sampath, D., Bais, C., Lill, J. R., & Ferrara, N. (2013). Phosphoproteomic analysis implicates the mTORC2-FoxO1 axis in VEGF signaling and feedback activation of receptor tyrosine kinases. *Science Signaling*, *6*(271), ra25. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003572>