



Facultad de Ciencias Químicas

Efecto de la administración de Capsaicina 1nM sobre el útero de cobayas Hartley en un modelo de síndrome de ovario poliquístico inducido con Letrozole

MARZO 2020

Tesis presentada para obtener el grado de:
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Presenta:

Cintia Abigail Zerón Alvarado

Director de Tesis:

D.C. Victorino G. S. Alatraste Bueno

Laboratorio de Neuroendocrinología

Departamento de Análisis clínicos FCQ-BUAP

"Todo aquel que esta seriamente comprometido con el cultivo de la ciencia, llega a convencerse de que en todas las leyes del universo esta manifiesto un espíritu infinitamente superior al hombre, y ante el cual nosotros con nuestro poderes debemos sentirnos humildes"
Albert Einstein.

Agradecimientos

A mi director de tesis Dr. Victorino G.S. Alatraste Bueno por sus enseñanzas y guía durante este trabajo y por alentarme a seguir adelante.

A la comisión revisora conformada por la M.C. Alicia Lozada, M.C. Martha Alicia Salgado y el M.C. Juan Márquez por sus comentarios y observaciones que ayudaron a enriquecer mi trabajo.

A las personas que me apoyaron dándome aliento, ánimo y amor incondicional durante esta etapa: Mis padres, Alex, Raquel y Diana. No lo hubiera logrado sin ustedes.

ÍNDICE

Resumen	5
1. Introducción	6
1.1 Síndrome de ovario poliquístico	6
1.2 Relevancia clínica	6
1.3 Tejidos involucrados	7
1.3.1 Ovario	7
1.3.2 Útero	9
1.4 Receptores de potencial transitorio a vanilloide tipo 1 (TRPV1)	12
1.4.1 Bioquímica de los receptores TRPV1	13
1.4.2 Biología de los receptores TRPV1	13
1.4.3 Importancia celular de los receptores TRPV1	14
1.5 Uso de la Capsaicina como herramienta farmacológica en el estudio del receptor TRPV1	15
1.6 Implicaciones TRPV1 en el útero y su uso en SOP	16
1.7 Letrozole como inductor del SOP	17
2 Justificación	18
3 Hipótesis	19
4 Objetivos	19
4.1 Objetivo general	19
4.2 Objetivos particulares	19
5 Metodología	20
5.1 Diagrama de trabajo	20
5.2 Materiales y métodos	19
5.2.1 Animales	21
5.2.2 Inducción del farmacológica del síndrome de ovario poliquístico	21
5.2.3 Administración de Capsaicina	21
5.2.4 Primera apertura vaginal	21
5.2.5 Obtención de úteros	21
5.2.6 Técnicas histológicas	21
5.2.7 Tinciones	22
5.2.8 Medición del grosor de capas uterinas, conteo de glándulas endometriales	22
5.2.9 Medición del grosor de colágeno en las capas uterinas	22
5.2.10 Inmunohistoquímica para TRPV1	22
5.2.11 Conteo de células positivas a TRPV1	22
5.2.12 Pruebas estadísticas	23
6 Resultados	24
6.1 Inicio de la Primera apertura vaginal (PAV)	24
6.2 Medición del grosor de capas uterinas y número de glándulas uterinas en cobayas Hartley con SOP	24
6.3 Medición del grosor de colágeno de las capas uterinas de cobayas Hartley con SOP	29
6.4 Conteo de células positivas a TRPV1 en las capas uterinas y glándulas endometriales de cobayas Hartley con SOP	31
7 Discusión de resultados	37
8 Conclusiones	43
9 Perspectivas	43
10 Referencias	44

Resumen

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es un desorden neuroendocrino frecuente y la causa principal de infertilidad por anovulación. El SOP puede ser tratado farmacológicamente y quirúrgicamente, sin embargo, los síntomas de la anovulación, los trastornos de implantación y las pérdidas de embarazo continúan. En el útero se ha reportado que el SOP afecta el endometrio y aumenta la tasa de hiperplasia endometrial y cáncer de endometrio. Se sabe que altera de manera negativa el desarrollo celular uterino, provocando un crecimiento no deseado, por lo que esto podría estar implicado en los problemas de implantación. Estudios indican que a concentraciones bajas de Capsaicina, los receptores TRPV1 son un modulador positivo del desarrollo folicular. Debido a las características bioquímicas, el receptor TRPV1 es un canal de catión no selectivo dependiente de ligando con alta permeabilidad a Ca^{+2} . Se ha encontrado el receptor TRPV1 en el útero, así como en las fibras sensoriales que lo inervan, por lo cual, nuestro objetivo fue conocer el efecto de los receptores TRPV1 en el desarrollo celular uterino de cobayas Hartley inducidas con síndrome de ovario poliquístico. Para este trabajo se emplearon 20 cobayas Hartley que fueron obtenidas de madres gestantes y clasificadas aleatoriamente en los diferentes grupos experimentales. Se formaron cuatro grupos, el grupo Control (animales intactos; n=5), el grupo Vehículo (0.6 UI de solución Hartman vía oral; n=5) diariamente por 20 días, el grupo Letrozole (1mg/kg de peso de Letrozole vía oral; n=5) diariamente por 20 días y Letrozole/Capsaicina (Letrozole 1 mg/kg de peso de Letrozole vía oral; n=5) diariamente por 20 días y Capsaicina 1nM vía subcutánea por 20 días diariamente. Al finalizar los tratamientos las cobayas se anestesiaron con CO₂ y se perfundieron con SSI y PBS-paraformaldehído (PBS-PF) al 4% por vía intracardiaca. Se obtuvieron los úteros, los cuales se incluyeron en parafina y se realizaron cortes histológicos que fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina, otros con la tinción de Tricromica de Masson y a otros se les realizó la técnica de inmunohistoquímica para TRPV1. Como resultados se obtuvo que el tratamiento con Capsaicina disminuyó el grosor del útero, en especial del endometrio y epitelio ciliar, disminuyó la hiperplasia endometrial, así como disminuyó el número de glándulas endometriales y modificó su tamaño y la forma irregular de las estructuras durante el SOP, indicadores de mejoría y factor positivo para la prevención del cáncer endometrial, y aumentó el número de células positivas al receptor TRPV1 en el perimetrio, endometrio y epitelio ciliar. Concluimos que el tratamiento con Capsaicina puede modular el desarrollo celular uterino de cobayas Hartley durante el SOP.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Síndrome de Ovario Poliquístico

El síndrome de ovario poliquístico (*SOP*) es un desorden neuroendocrino frecuente y la principal causa de infertilidad por anovulación (Azziz *et al.*, 2004). Originalmente fue descrito como un cuadro clínico caracterizado por la presencia de ovarios con pequeños quistes, amenorrea, hirsutismo y obesidad (Stein, Leventhal, 1935) (Chiliquinga Villacis Sixto *et al.*, 2017). En 1990, el *National Institutes of Health* (NIH) lo definió como la "presencia de hiperandrogenismo asociado a anovulación crónica sin otra causa específica de enfermedad adrenal o hipofisiaria que curse con irregularidades menstruales o exceso de andrógenos", sin considerar el aspecto morfológico de los ovarios (Badawy, Elnashar, 2011) y se diagnostica en 6-10% de las mujeres en edad reproductiva (Asunción *et al.*, 2000; Bozdog *et al.*, 2016). Posteriormente, las sociedades europeas y norteamericana de reproducción crearon los criterios de Rotterdam donde se propuso una nueva definición del síndrome: oligovulación y/o anovulación, hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico e incorporó la presencia de morfología de ovarios poliquísticos a través de la ultrasonografía. Se diagnostica con *SOP* a las mujeres en edad reproductiva que cuenten con la presencia de dos de las 3 características mencionadas anteriormente (Rotterdam, 2004). Bajo este nuevo criterio, 19% de las mujeres en edad reproductiva son diagnosticadas con este síndrome (March *et al.*, 2010; Yildiz *et al.*, 2012).

La anovulación o la oligovulación son los principales síntomas del *SOP*. Además, algunos de los quistes producen andrógenos, lo cual causa hiperandrogenismo, dando como resultado la virilización o expresión de caracteres masculinos en las mujeres. Los signos visibles de hiperandrogenismo incluyen aumento de peso, grasa abdominal y subcutánea, hirsutismo (vello facial y corporal), alopecia de patrón masculino (pérdida de cabello), clitoromegalia (agrandamiento del clitoris), voz profunda, seborrea (piel grasa), acné, etc. (Madnani *et al.*, 2013).

Aparte de las características morfológicas, existen otras alteraciones. La resistencia a la insulina es un síntoma muy importante en el *SOP* que puede desencadenar en hiperinsulinemia, lo cual puede conducir a diabetes mellitus (Sirmans *et al.*, 2013). El alto nivel de insulina es el responsable del aumento en el depósito de grasa del área abdominal, por lo cual, la mayoría de las mujeres con *SOP* tiene un índice de masa corporal (IMC) igual o mayor a 30. Otras comorbilidades del *SOP* son hipertensión, problemas cardiovasculares y dislipidemia (Teede *et al.*, 2010).

1.2 Relevancia clínica

El *SOP* es una endocrinopatía alarmante. No es una enfermedad única, sino que abarca un grupo de ellas, cuyos casos están en un fuerte aumento. No solo perjudica la fertilidad en las mujeres, sino que afecta su estado general de salud, que perdura más allá de la menopausia (Patel, 2018).

Se ha observado que los complejos trastornos endocrinos y metabólicos que se desarrollan en el *SOP* también afectan el endometrio y aumentan la tasa de hiperplasia endometrial y cáncer de endometrio 2–3 veces (Barry *et al.*, 2014; Gottschau *et al.*, 2015). En el *SOP*, se informa infertilidad debido a anovulación y baja calidad de ovocitos. Aunque la ovulación se trata farmacológica y quirúrgicamente, los trastornos de implantación y las pérdidas de embarazo continúan. Además, se informa un aumento del riesgo de aborto asociado con obesidad, razones cardiovasculares y metabólicas en *SOP* (Pratip *al.*, 2013). Además, se han informado las anormalidades del fenotipo y la función endometrial y se sugiere que el aborto puede ocurrir debido a estos cambios endometriales

(Wang et al., 2001; Giudice et al., 2006). Sin embargo, la tasa de incidencias entre el SOP y abortos espontáneos sigue siendo incierto debido a su amplia variación en diferentes estudios (Rai et al., 2000).

En la actualidad, desafortunadamente, no hay medicamentos aprobados por la “Food and Drug Administration, FDA” con el propósito único de tratar el SOP (Vitek et al., 2015). Además, hay pocos fármacos indicados y aprobados para el tratamiento de los síntomas como la anovulación, el hirsutismo, la alopecia y el acné; pero ningún tratamiento para las afectaciones celulares del útero y sus problemas de implantación, esto debido a la falta de estudios a profundidad. El SOP es una enfermedad dificultosa desde el punto de vista del manejo clínico y un reto desde el punto de vista de la investigación científica, además de ser, en ocasiones, una vivencia frustrante para las mujeres (Carazo-Hernández et al., 2014).

1.3 Tejidos involucrados en el SOP

1.3.1 Ovario

El ovario es un órgano par, que funciona como una glándula sexual femenina. Secreta hormonas endocrinas, principalmente estradiol y progesterona. Ambas hormonas son las responsables de las características femeninas, además de promover la foliculogénesis (desarrollo de ovocitos y folículos).

En las cobayas los ovarios son de color blanco amarillento, tienen forma oval ligeramente aplanada, están presentes de forma caudal al polo ventral del riñón, poseen un tamaño aproximado de 3-6 x 2-4 x 2-3 mm. Los oviductos se proyectan lateralmente a la bolsa ovárica hacia el mismo extremo del cuerno uterino, tienen unos 6 mm de largo y 1mm de diámetro, poseen un gran infundíbulo (Bitzinger, 2008).

El epitelio superficial cuboidal que recubre a los ovarios se denomina epitelio germinal. Directamente debajo de este epitelio se localiza la túnica albugínea que es una capa de tejido conjuntivo denso fibroso con células fusiformes. Su función es eminentemente protectora. Cada ovario se subdivide en:

- Corteza: abarca la mayor parte del ovario, está formada por el estroma, tejido similar al conectivo, pero con una gran cantidad de células respecto a la matriz extracelular, y posee pocas fibras reticulares y de colágeno. El estroma está altamente vascularizado. Entre las células del estroma se encuentran los folículos ováricos en distinto estado de maduración.
- Médula: tejido conectivo fibroelástico laxo con una vascularización muy abundante, al igual que contiene varios vasos linfáticos y nervios (Megías et al., 2019).

Los folículos se localizan en la corteza, tienen distintos estadios de desarrollo, contienen al ovocito que está rodeado de células de la granulosa en una o varias capas, estas células nutren al ovocito durante su desarrollo y secretan estrógenos a medida que el ovocito aumenta de tamaño. Las distintas etapas del desarrollo folicular son las siguientes:

- Folículo primordial: los folículos primordiales son aquellos que presentan el ovocito rodeado de una monocapa celular, constituida en lo general por 4 a 8 células de la granulosa de forma fusiforme.
- Folículo primario: el ovocito se caracteriza por estar rodeados de una capa de células de la granulosa esféricas; a medida que el folículo crece crea una capa de glucoproteínas

denominada zona pelúcida, que se forma entre el ovocito y la granulosa. La capa externa de la granulosa está rodeada por la teca folicular.

- Folículo secundario: la teca se diferencia en dos regiones; teca interna, vascularizada de células secretoras cuboides y teca externa o capa de tejido conectivo y fibras de colágeno. En el folículo secundario, la granulosa inicia la secreción de líquido folicular compuesto por inhibina, folistatina, activina, progesterona y estradiol.
- El folículo de Graaf, también denominado folículo terciario antral maduro o preovulatorio, es un folículo de mayor tamaño que contiene líquido folicular y está listo para romperse y liberar al ovocito en la ovulación.
- Cuerpo lúteo: El cuerpo lúteo también denominado cuerpo amarillo, se forma después de la ovulación y tiene células transformadas de un folículo de Graaf. Produce progesterona, estrógenos, relaxina e inhibina.
- Cuerpo Albicans: El cuerpo lúteo se degenera y se convierte en tejido de cicatrización.

Solamente una pequeña fracción de los folículos ováricos presente en el ovario fetal logrará completar su maduración hasta alcanzar la etapa de ovulación, de forma tal que su destino más común es el de sufrir atresia. La atresia folicular es un proceso mediante el cual los folículos se degeneran y son invadidos por macrófagos antes de llegar a la etapa de folículo maduro. La atresia folicular puede afectar al folículo en cualquier parte del desarrollo. Este proceso permite la ovulación única en cada ciclo menstrual o estral.

Cuando la atresia afecta un folículo primordial, el contorno del oocito se hace irregular y las células de la granulosa disminuyen de volumen separándose unas de otras. El oocito y células de la granulosa entran en autólisis, dejando un espacio que es rápidamente ocupado por células de estroma. En los folículos en crecimiento, el proceso degenerativo es similar, observándose una zona pelúcida muy resistente. Esta se vuelve ondulada y plegada después del comienzo de la atresia debido al colapso del folículo, pero el material que la forma persiste por más tiempo que las células foliculares. Cuando la atresia afecta a un folículo muy avanzado en su crecimiento se forma gran cantidad de material en degeneración, que provoca la migración de macrófagos. Mientras se eliminan los restos del folículo atrésico, las células del tejido conjuntivo invaden la zona y forman un área colagenosa. Estas fibras son finalmente reabsorbidas y sustituidas por estroma (McGee et al., 2000; Knight et al., 2006).

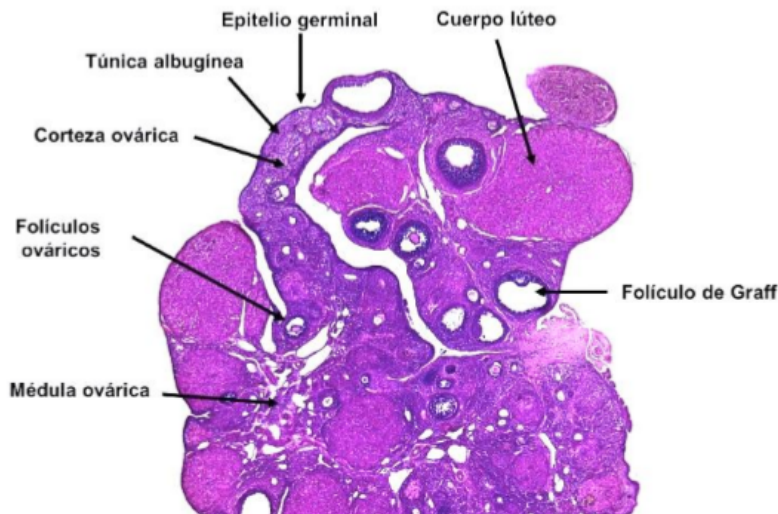


Fig. 1 Corte histológico de ovario de rata Wistar. Micrografía representativa de corte histológico teñido con hematoxilina & eosina. Amplificación, 4X (Soriano Vázquez 2019).

Irrigación del ovario

La irrigación sanguínea de los ovarios se da a través de las arterias ováricas, originadas a partir de la aorta a nivel del origen de las arterias renales, o como ramas de las arterias renales, por troncos comunes con las arterias renales. Las ramas de ovario y las trompas forman bobinas en espiral en torno a su eje longitudinal cuando se acercan al ovario. El drenaje venoso del ovario se da a través de varias venas pequeñas. En el hilio generalmente se unen con un gran afluente del útero para formar una sola vena ovárica correspondiente a la arteria ovárica. Estas venas están en contacto cercano con las arterias correspondientes. En el pedículo ovárico, las ramas arteriales ováricas comúnmente se encuentran en espiral alrededor de los afluentes venosos ováricos. La vena ovárica derecha finalmente se une a la vena cava y la vena ovárica izquierda se abre en la vena renal izquierda (Hossain & O'shea, 1983).

Inervación del ovario

El ovario está inervado por el plexo ovárico, formado por fibras del sistema nervioso autónomo que provienen de los plexos aórticos abdominales y renales. Estas fibras son vasomotoras y también sensitivas y transmiten el dolor de origen ovárico.

1.3.2 Útero

El útero de los roedores posee una anatomía bicornes, está formada por dos cuernos uterinos los cuales convergen hacia la región caudal formando el cuerpo uterino, el cual continúa hasta el cuello uterino (Mossman, 1977).

El útero es la estructura dentro de la cual se implanta el óvulo fertilizado para desarrollarse durante el embarazo. El óvulo luego se implanta en el endometrio, donde recibe alimento de los vasos sanguíneos desarrollados exclusivamente para ese fin. A medida que el embrión crece y madura, el útero se expande para soportar el embarazo. (Shirasuna & Iwata, 2017).

En las cobayas, los cuernos uterinos se suspenden por los ligamentos anchos de la pared abdominal dorso lateral. El cuerpo uterino es de unos 12 mm de longitud y unos 10 mm de diámetro, disminuyendo en tamaño de craneal a caudal. El cuerpo posee unos 45 mm de longitud debido a un

ligamento intercornual bien desarrollado. Los cuernos uterinos se unen en el cuello uterino y el cérvix los abre a la vagina. El cuello del útero se caracteriza por una serie de pequeñas crestas de mucosa que se extienden caudo medial a sus paredes laterales para converger en la línea media ventral. El cuello del útero es de unos 25 mm de largo, aproximadamente 14 mm de diámetro cranealmente y 5 mm de diámetro en su extremo caudal (Wagner, 2014).

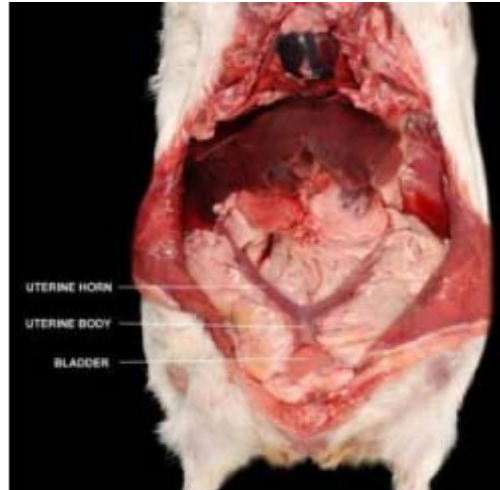


Fig. 2 Sistema reproductivo de la cobaya hembra (Bishop, 2000).

La pared del útero está formada por tres capas de tejido:

- Perimetrio: cobertura externa y delgada de tejido conectivo que se halla por debajo del peritoneo cubriendo el útero.
- Miometrio: capa media y gruesa de músculo liso constituido por tres capas: una capa externa de fibras longitudinales, una capa media plexiforme en la que predominan las fibras circulares y una capa interna donde predominan las fibras longitudinales.
- Endometrio: membrana mucosa que tapiza la cavidad uterina. Está formado por glándulas tubulares simples revestidas por epitelio cilíndrico ciliado y rodeado por estroma. Presenta dos capas: una capa funcional que se disgrega en cada menstruación, y una capa basal que no presenta cambios funcionales (Ross, 2008).

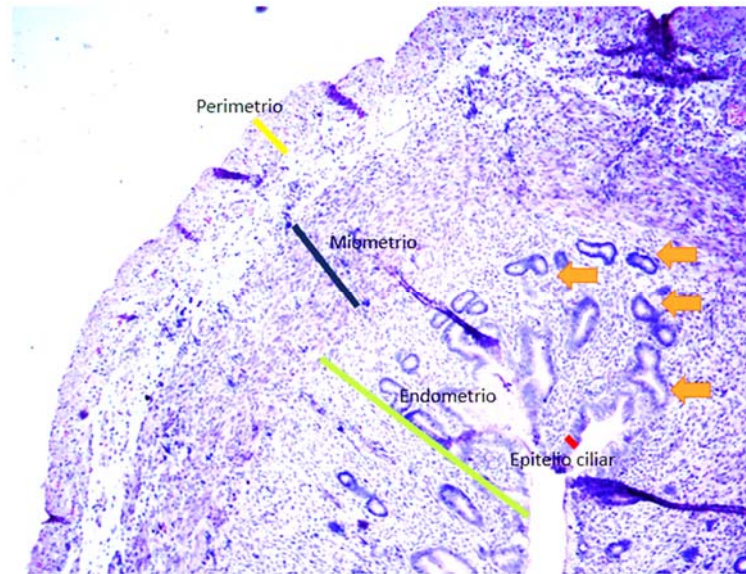


Fig. 3 Microfotografía de útero de cobaya Hartley en sección transversal teñido con Hematoxilina-Eosina a 10X. La línea amarilla representa la capa del perimetrio, la línea negra la capa de miometrio, la línea verde la capa del endometrio y la línea roja representa el epitelio ciliar uterino. Las glándulas uterinas están señaladas por flechas naranjas (Foto tomada en el Laboratorio de Neuroendocrinología de la FCQ-BUAP).

Irrigación del útero de la cobaya

El útero de cobaya, así como sus oviductos, reciben suministro de sangre de un asa arterial formada por la anastomosis de la arteria uterina con la arteria ovárica ipsilateral. La arteria uterina en ambos lados surge de la arteria ilíaca interna aproximadamente 0-5 cm después de su origen y es su primera sucursal importante. Las arterias ováricas surgen de la aorta aproximadamente el mismo nivel que las arterias renales (es decir, entre la parte caudal de la decimotercera vértebra torácica y la mitad de la primera vértebra lumbar), que puede ser simple o doble para cada riñón.

Ocasionalmente, la arteria ovárica derecha comparte un tallo común con una arteria renal. El útero es suplido por arterias que surgen en forma radial desde el asa arterial utero-ovárica, corrida de 1 a 3 cm en el mesometrio, y se ramifica y anastomosa libremente en la pared uterina. Una vena relativamente ancha corre desde la parte más lateral del asta uterina. En el lado derecho, la vena ovárica ingresa a la vena cava junto con la vena renal. Las venas uterinas se unen invariablemente a las venas ilíacas externas ipsilaterales junto con las venas ilíacas internas (N. Egnud, 1974).

Inervación del útero de la cobaya

El útero es suplido por nervios simpáticos, parasimpáticos y sensoriales que inervan principalmente los vasos sanguíneos y el músculo liso miometral. En cobayas y humanos, una parte considerable de la inervación simpática del cuerpo uterino y del cuello uterino surge de las neuronas en el plexo pélvico ubicado en la unión útero-vaginal. La densidad de inervación es más pesada en el extremo tubárico del asta uterina y el cuello uterino que en las partes principales del asta/cuerpo uterino. Los nervios colinérgicos al útero se originan principalmente en los ganglios paracervicales y entran al útero a través del plexo pélvico. Existe una considerable variación entre especies en la densidad de los nervios colinérgicos uterinos, que está bien desarrollada en ratones y humanos, pero

casi ausente en cobayas. NPY co-localiza con acetilcolina (Ach) en neuronas de los ganglios paracervicales que inervan el cuello uterino. El miometrio está inervado por fibras aferentes inmunorreactivas para una gama de co-transmisores que incluyen SP, CGRP, VIP, NOS, neuroquinina A, galanina (GAL) y secretoneurina.

En la mayoría de las especies de mamíferos, el endometrio está mal inervado por fibras nerviosas autónomas y aferentes, y los presentes están principalmente asociados con los vasos sanguíneos. En las cobayas, las capas endometriales basales y funcionales contienen nervios positivos a la acetilcolinesterasa que pueden estar involucrados en el control de la secreción endometrial. Muchas fibras nerviosas CGRP-ir viajan profundamente en el endometrio de la rata cerca de las glándulas uterinas (Brauer & Smith, 2015).

Las fibras sensoriales que inervan al útero están compuestas principalmente por fibras C y A δ , las cuales provienen de los DRGs de las regiones espinales L1-L5 y S1-S3 (Aguado, 2002; Chaban, 2008). La mayor parte de los nociceptores viscerales son terminaciones libres de fibras aferentes amielínicas, y se piensa que participan en las sensaciones generadas como el dolor de trabajo de parto en el caso del útero (Cervero et al., 1999). Estas terminaciones nerviosas no sólo tienen una función receptora, sino que también son capaces de liberar sustancias por “activación antidrómica”, entre ellas sustancia P (SP) y glutamato, y a causa de la cercanía de estas terminaciones a pequeños vasos sanguíneos y a mastocitos, se origina vasodilatación y extravasación plasmática (Dray et al., 1994). Se ha reportado que dichas fibras sensoriales expresan receptores TrkA, TrkB y CGR α , además de receptores que son miembros de la familia de receptores de potencial transitorio (TRP) como los receptores TRPV1, TRPV4, TRPV6 y TRPC1. En los mamíferos, el NGF, BDNF y el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), a través de sus receptores TrkA, TrkB y el receptor a GDNF- α (GFR α) respectivamente, activan a las fibras sensoriales (Ernsberger, 2009). Además, los receptores TRP integran información sobre el estado de vascularización de órganos periféricos y perciben estiramiento y presión. Dicha información es transmitida al SNC por medio de las vías nerviosas ascendentes (Aguado, 2002), sin embargo, el papel de los receptores TRPV1 en el desarrollo del útero es desconocido (Xu, et al, 2008).

1.4 Receptores de potencial transitorio a vanilloide tipo 1 (TRPV1)

La superfamilia de los receptores de potencial transitorio (TRP) se ha asociado con una variedad de funciones biológicas. Los miembros de esta superfamilia son principalmente permeables a los cationes, especialmente al Ca⁺², que es necesario para muchos procesos celulares, incluida la proliferación celular, la transcripción génica y la muerte celular (Zsombok, 2013). Los canales TRP se pueden dividir en siete subfamilias: familia TRP clásica o canónica (TRPC); familia relacionada con la melastatina (TRPM); familia relacionada con policistina (TRPP); familia de anquirina (TRPA); familia relacionada con mucolipina (TRPML); familia potencial no mecanorreceptor C (TRPN); y familia vanilloide (TRPV). La familia TRPV tiene 6 miembros: TRV1-TRPV6 (Nilius et al., 2007).

TRPV1 es un canal de catión no selectivo dependiente de ligando con alta permeabilidad a Ca⁺². Su activación puede ser mediada por Capsaicina, toxina resinífera, olvanil (ligandos exógenos) (Capsaicina EC₅₀ \approx 0.7 μ M), temperaturas cerca de 42°C, pH <6.0, estiramiento, presión, estímulos eléctricos, ligandos endógenos como anandamida, N-araquidonil-dopamina, bradicinina e histamina (Caterina et al., 1997; Vennekens et al., 2008).

1.4.1 Bioquímica de los receptores TRPV1

La proteína TRPV1 está conformada por seis dominios transmembrana que abarcan la membrana con un circuito hidrofóbico corto que forma un poro para cationes divalentes y monovalentes ($\text{Ca}^{+2} > \text{Mg}^{+2} > \text{Na}^{+} \approx \text{K}^{+} \approx \text{Cs}^{+}$) entre los dominios transmembrana quinto y sexto, un dominio N-terminal intracelular con seis repeticiones de anquirina (ARD), que son sitios de unión proteína-proteína y un residuo de dominio C-terminal intracelular con diversos sitios de fosforilación, los cuales pueden sensibilizar o desensibilizar al receptor. El sitio de unión a vanilloides se encuentra en la región S4 (Abdel-Salam, 2014).

Los receptores TRPV1 están en su forma activa como monómeros, homotetrameros y/o heterotetrameros en cuyo caso pueden asociarse con subunidades de los receptores TRPV3 o TRPV4 (Smith y Lewin, 2009).

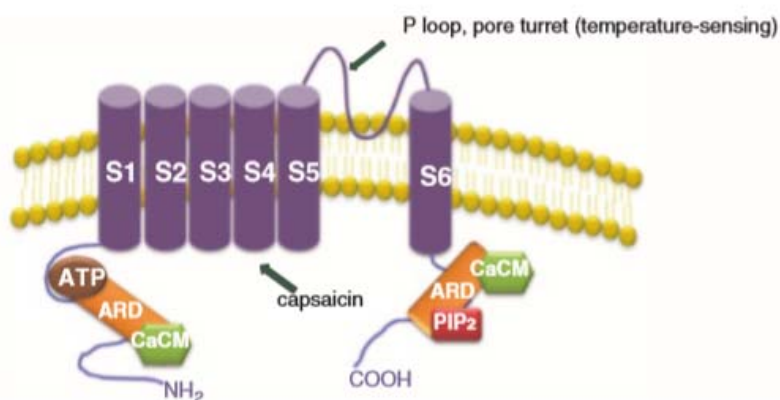


Fig. 4 Modelo del receptor TRPV1. Está conformado por seis dominios transmembrana, donde entre el dominio 5 y 6 se localiza el poro catiónico. Los dominios N-terminal y C-terminal son intracelulares. (Abdel-Salam, 2014).

1.4.2 Biología de los receptores TRPV1

TRPV1 se identificó por primera vez en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) y el ganglio trigémino (TG). También se expresa altamente en las terminales nerviosas espinales y periféricas, así como en diversos tejidos periféricos como los pulmones, tráquea, células del músculo liso de la vejiga urinaria, queratinocitos, endotelio vascular, hígado, folículos pilosos, células epiteliales gástricas, intestinos, fibroblastos, mastocitos, macrófagos y útero (Pedersen et al., 2005; Kunert-Keil et al., 2006; Nilius, et al., 2006; Lee et al., 2009; Kechagias et al., 2005; Agopyan et al., 2003; Vriens al., 2004; Golech et al., 2004).

Las funciones de los receptores TRPV1 en los órganos periféricos son diversas, permiten la motilidad en células ciliadas de los bronquios y bronquiolos (Groth et al, 2006). En la vejiga urinaria, responden a la presión y al estiramiento por cambios en el volumen de llenado, permiten la relajación del esfínter y el vaciamiento de la orina (De Schepper et al, 2008). En queratinocitos se ha propuesto que mantienen un papel sensorial (Birder et al., 2001). En los mastocitos su activación podría liberar mediadores proalérgicos de mastocitos (Stander et al., 2004). En los folículos pilosos y en la médula espinal intervienen en la proliferación y diferenciación celular por medio de la activación de la vía de la proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa A (PKA), que a su vez activan al factor de

transcripción nuclear κ B (NF- κ B) (Nilius et al, 2006; Vennekens et al, 2008; Lee et al, 2009; Bodó et al., 2005).

1.4.3 Importancia celular del receptor TRPV1

La activación de los receptores TRPV1 permite la entrada de los cationes, despolarizando la membrana celular de las fibras aferentes C y A δ y con ello se liberan péptidos como la SP, el CGRP, glutamato (G) y péptido intestinal vasoactivo (VIP). En las neuronas de la asta dorsal de la médula espinal, estos péptidos permiten la transmisión nociceptiva hacia el SNC (Messeguer et al, 2006; Wirkner et al, 2007).

En los tejidos periféricos, se ha propuesto que las diferentes acciones se realizan por medio de la activación de los receptores TRPV1 al permitir la entrada de Ca^{2+} y activar vías de señalización que permiten la motilidad mediada por calmodulina quinasa II (CaMKII) y dineína, también aumentan la proliferación y diferenciación celular por medio de la PKC, PKA y la CaMKII y por medio del factor de transcripción NF- κ B (Jara-Oseguera, et al, 2008; Vennekens, et al, 2008; Taylor, et al, 2009).

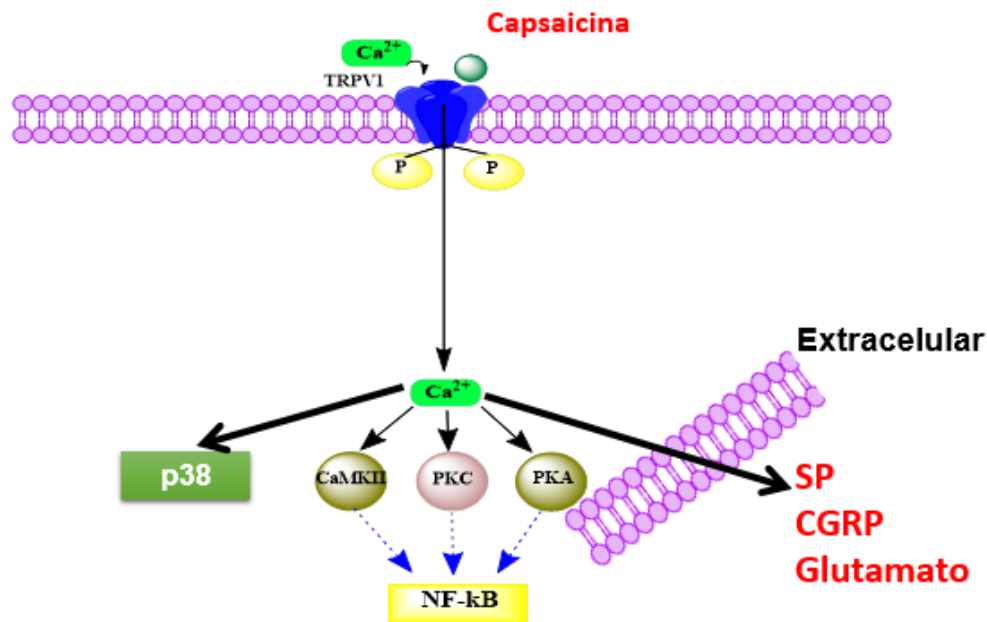


Fig.5 Mecanismo de acción del receptor TRPV1 en la proliferación celular y transmisión celular. Modificado de Alatraste et al., 2013.

Estas acciones están reguladas por la sensibilización o desensibilización de los receptores TRPV1 en donde participan la PKA, PKC y CaMKII. La fosforilación de PKA potencia las respuestas de TRPV1 al reducir la desensibilización inducida por agonistas. La desensibilización del receptor depende de la presencia de Ca^{2+} extracelular, y se caracteriza por una disminución profunda de la actividad de su canal tras la estimulación agonista repetitiva. PKA ejerce su acción a través del rescate parcial de receptores desensibilizados por fosforilación directa de los aminoácidos S116 y T370 en el dominio N-terminal y de la Ser774 y Ser820 de la región C-terminal del receptor. La fosforilación mediada por CaMKII, junto con la desfosforilación del receptor inducida por calcineurina, contribuye notablemente a determinar su estado de activación y desensibilización. (Messeguer et al., 2006). La

desensibilización del receptor TRPV1 protege a las células de la necrosis y también produce analgesia en los tejidos dañados. La sensibilización de los receptores TRPV1 es promovida por la PKC a través de la fosforilación de la T704 y S800 de la región C-terminal (Vellani et al., 2001). La sensibilización permite la entrada de Ca^{2+} en concentraciones mayores a lo basal, proceso que permite la activación de PKC dependiente de Ca^{2+} y también activan factores de transcripción que promueven la diferenciación y la proliferación de las células (Diogenes et al, 2006; Leffler et al, 2008).

1.5 Uso de la Capsaicina como herramienta farmacológica en el estudio del receptor TRPV1

La capsaicina (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida) es el principal agente de las especies de pimiento. Esta especie se ha convertido en una especie culinaria popular en todo el mundo, especialmente en Latinoamérica y el sur de Asia. El pimiento se conoce con varios nombres como chile, pimiento rojo, pimentón, pimienta de cayena, tabasco, jalapeño o con su antiguo nombre aji. (Srinivasan, 2016; Chapa-Oliver et al., 2016; Abdel-Salam, 2014).

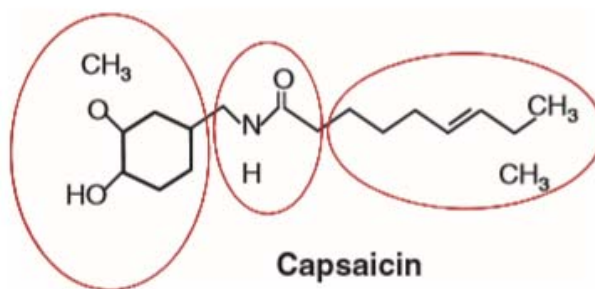


Fig. 6 Estructura química de la capsaicina. La capsaicina tiene tres restos principales: vanillyl (grupo metilcatecol), enlace amida y una cadena lateral de alquilo (Abdel-Salam, 2014).

La capsaicina produce dolor e inflamación cuando se coloca sobre la piel o las membranas mucosas. Esta respuesta es consecuencia de la activación de los receptores de canales de cationes no selectivos dentro de los nociceptores C y A δ e induce la liberación de péptidos y otros transmisores desde sus terminales periféricos y centrales.

La capsaicina se une al canal de la proteína TRPV1 en la región intracelular S2-S4 con alta afinidad mediada por interacciones entre el grupo vanilloide de capsaicina y el anillo de benceno de residuos aromáticos (Jordt y Julius 2002). La ARD de la región N-terminal contiene un sitio de unión a ATP y un sitio de unión a Ca-calmodulina (Lishko et al. 2007). El fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) se une al extremo C del receptor e inhibe la activación de canales (Prescott y Julius 2003). ATP o PIP2 evitan la desensibilización a las aplicaciones repetidas de capsaicina, mientras que calmodulina tiene el efecto contrario (Lishko et al. 2007).

A dosis altas de capsaicina se activa la corriente de Ca^{+2} que conduce a la necrosis de las células, sin embargo, a dosis bajas, hay despolarización de la membrana lo que produce la liberación de péptidos como el CGRP y la SP (Tominaga y Tominaga, 2005). Por estos antecedentes, la capsaicina se ha usado como agente para causar denervación o para estimular de manera específica a las fibras sensoriales que poseen los receptores TRPV1 (Bonnington y McNaughton, 2003; Messeguer, et al, 2006; Erdost et al, 2009). Estudios previos realizados en el laboratorio de neuroendocrinología de la FCQ-BUAP, han encontrado, que en las cobayas, la capsaicina a dosis

altas atrasa la pubertad y disminuye la cantidad de receptores TRPV1 en los ovarios, en el DRGs y en la médula espinal (Luna et al, 2013).

1.6 Implicaciones TRPV1 en el útero y su uso en SOP

Las neuronas que inervan al útero se encuentran en la región lumbar (L1) y sacra (S1-S3) de la médula espinal y expresan receptores TRPV1 Y P2X3, receptores purinérgicos dependientes de ATP, ambos están implicados en el dolor, estas neuronas también inervan al colón y al recto. Estos hallazgos fueron interpretados por la interacción cruzada de las fibras sensoriales que ocurre a nivel de los DRG, lo que explica los síndromes de dolor funcional que afecta a varios órganos de la pelvis a la vez (Chaban, 2008).

En la endometriosis es muy común la coexistencia del síndrome de colon irritable, la cistitis y la fibromialgia, esto puede ser explicado por la interacción cruzada de las fibras sensoriales explicada anteriormente. En la adenomiosis hay invasión de glándulas endometriales y de células del estroma del miometrio que contribuyen al crecimiento del útero. Las mujeres presentan dismenorrea, menorragia y baja fertilidad. Es una enfermedad que compromete a las terminales nerviosas periféricas de las prostaglandinas E2 (PGE2) y los prostanoides E que sensibilizan a los receptores TRPV1 produciendo hiperalgesia y dolor. Estas manifestaciones clínicas coinciden con el aumento en la expresión de los receptores TRPV1 y receptores a oxitocina (OTR) en las células musculares del útero. Durante esta enfermedad, el aumento de la inmunorreactividad a los receptores TRPV1 Y OTR se ha asociado con la gravedad de la dismenorrea. Otros marcadores para el diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad son los marcadores neuronales PGP9.5, NGFp75. Es aceptado que el crecimiento neuronal anormal en el útero contribuye a las disfunciones y a la infertilidad. Sin embargo, se requieren más estudios para esclarecer la posible relación de los eventos morfológicos y funcionales del útero relacionados con este tópico (Nie et al., 2010; Newman et al., 2013).

Durante el SOP se ha registrado un aumento en la tasa de hiperplasia endometrial. La hiperplasia ocurre por la proliferación de las glándulas endometriales con tamaño y forma irregular, aumenta la razón glándula/estroma (Usandizaga-Pombo, 1966). Esta patología si no se trata, progresa y se convierte en cáncer endometrial, el riesgo aumenta en las mujeres con obesidad (Charalampakis et al., 2016).

La migración, la adhesión, la proliferación y la neuroangiogénesis son procesos complejos en los que el calcio se describe como un regulador importante (Wei et al., 2012; Capiod, 2011). Por lo tanto, los canales iónicos son candidatos interesantes para regular estos procesos, ya que la activación de los canales iónicos puede modular las concentraciones de calcio intracelular. La superfamilia de canales de potencial receptor transitorio (TRP) se presenta como un buen candidato para regular estos procesos. (Deliot et al., 2015; Becchetti et al., 2010). Pueden ser activados por una variedad de estímulos y están ampliamente distribuidos por todo el cuerpo. En las biopsias endometriales, se ha demostrado que la expresión del canal TRP fluctúa a lo largo del ciclo menstrual. Además, los altos niveles de ARNm para TRPV2, TRPV4, TRPC1 / 4, TRPC6, TRPM4 y TRPM7, y la expresión funcional de TRPV2, TRPV4, TRPC6 y TRPM7 fue ilustrada en células primarias del estroma endometrial humano (hESC). Desafortunadamente, la regulación de los canales TRP por las hormonas sexuales esteroideas en el endometrio solo se ha estudiado para una cantidad limitada de canales y estos estudios no incluyen al receptor TRPV1 (De Clercq et al., 2015).

1.7 Letrozole como inductor del SOP

Los ovarios poliquísticos pueden crearse *de novo* como resultado de la administración de andrógenos exógenos o secundariamente al exceso de andrógenos endógenos (Pache et al., 1991; Azziz et al., 1994). La maduración folicular anormal o la aceleración de la atresia folicular se ha informado en presencia de niveles elevados de andrógenos intraovarianos (Poretsky, 1991). Por lo tanto, el exceso de andrógenos intraováricos como resultado de hiperandrogenemia circulante o esteroidogénesis anormal puede resultar en un desarrollo folicular anormal y ovario poliquístico. La testosterona y la androstenediona son convertidas en estradiol y estrona, respectivamente, por la aromatasas P450, que se expresa en placenta, ovario y testículo, así como en una amplia variedad de tejidos humanos (Corbin et al., 1999). El *Letrozole* es un inhibidor no esteroide de la aromatasas, el cual al disminuir la actividad de esta enzima produce un aumento en la producción de andrógenos ováricos y desarrollo del SOP.

Independientemente del modelo, la producción excesiva de andrógenos y hormona luteinizante (LH) se consideran la característica bioquímica más importante del SOP (Abbott et al., 2002). En el modelo del *Letrozole* los niveles de testosterona y LH son notablemente elevados. Los altos niveles de testosterona reflejan la acumulación de andrógenos debido al bloqueo de la conversión de andrógenos en estrógenos, al igual que la estimulación de las células de la teca interna por la elevación de LH. En mujeres con SOP, la razón predominante de las altas concentraciones de LH se debe a la retroalimentación negativa anormal en la secreción de LH mediada por estradiol o progesterona. Por otro lado, en el modelo del *Letrozole* la reducción de la producción de estrógenos aumenta la liberación de LH por el hipotálamo y la hipófisis, además, la disminución de la producción de progesterona refleja la anovulación, esto es consistente con los datos reportados en mujeres con SOP (Hasan et al., 2004). Ratas inducidas a SOP con *Letrozole* muestran un incremento en peso corporal y en peso de los ovarios, además de alteraciones en el ciclo estral y la presencia de varios quistes atrésicos pequeños (Radha et al., 2010).

2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente existen diversas patologías de gran relevancia médica pero poco conocidas desde el punto de vista biológico, siendo el síndrome de ovario poliquístico una de ellas. El SOP es un problema neuroendocrino y es la principal causa de infertilidad en mujeres de edad reproductiva debido a la anovulación.

El SOP puede ser tratado farmacológicamente y quirúrgicamente, sin embargo, los síntomas de la anovulación, los trastornos de implantación y las pérdidas de embarazo continúan.

Por otra parte, en la misma patología del SOP, no se ha estudiado a profundidad las afectaciones que pueda tener el útero. En el útero se ha reportado que el SOP afecta el endometrio y aumenta la tasa de hiperplasia endometrial y cáncer de endometrio. Se sabe que altera de manera negativa el desarrollo celular uterino, provocando un crecimiento no deseado, por lo que esto podría estar implicado en los problemas de implantación.

En nuestro laboratorio hemos estudiado la participación de los receptores TRPV1 en el desarrollo folicular, siendo que concentraciones altas de capsaicina promueven un déficit en el desarrollo folicular en los ovarios de cobayas tratadas con ella. Además, que en estos mismos animales, el inicio de la pubertad se retrasa. Otros estudios indican que a concentraciones bajas de capsaicina, los receptores TRPV1 son un modulador positivo del desarrollo folicular. Debido a las características bioquímicas, el receptor TRPV1 es un canal de catión no selectivo dependiente de ligando con alta permeabilidad a Ca^{+2} . Se ha encontrado el receptor TRPV1 en el útero, así como en las fibras sensoriales que lo inervan.

Por lo cual, la estimulación de los receptores TRPV1 en úteros de cobayas inducidas con SOP podría ayudarnos a entender el papel de dichos receptores y su uso en este tipo de patologías.

3. HIPÓTESIS

La estimulación del receptor TRPV1 con capsaicina en úteros modula el desarrollo celular uterino de cobayas Hartley inducidas con síndrome de ovario poliquístico.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

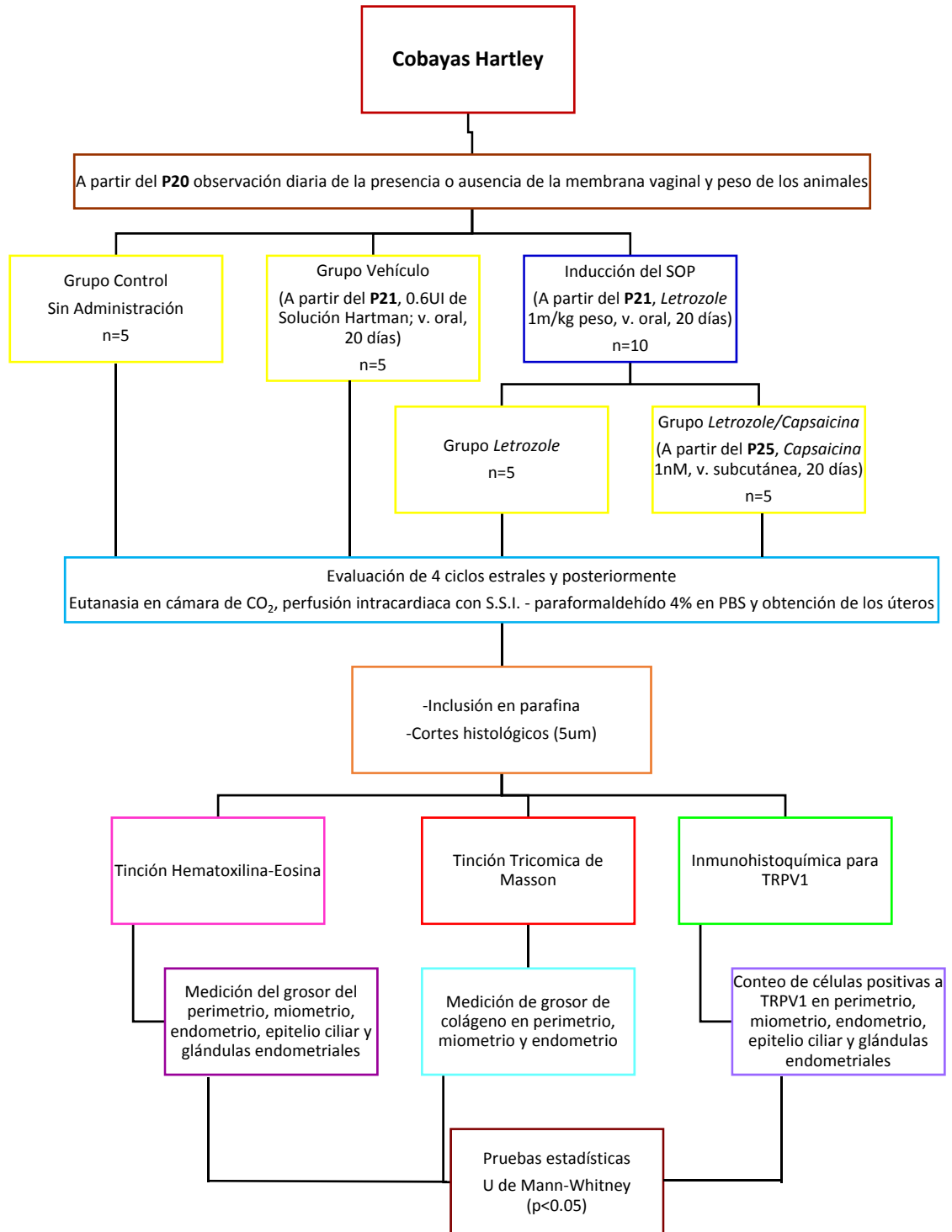
Conocer el efecto de los receptores TRPV1 en el desarrollo celular uterino de cobayas Hartley inducidas con síndrome de ovario poliquístico.

4.2 Objetivos particulares

1. Inducir síndrome de ovario poliquístico a un grupo de cobayas Hartley.
2. Conocer el inicio de la pubertad de cobayas Hartley inducidas con síndrome de ovario poliquístico.
3. Medir por análisis microscópico el grosor del perimetrio de cobayas Hartley inducidas con síndrome de ovario poliquístico.
4. Medir por análisis microscópico el grosor del miometrio de cobayas Hartley inducidas con síndrome de ovario poliquístico.
5. Medir por análisis microscópico el grosor del endometrio de cobayas Hartley inducidas con síndrome de ovario poliquístico.
6. Localizar y contar por inmunohistoquímica a las células positivas al receptor TRPV1 en las diferentes capas uterinas de cobayas Hartley inducidas con síndrome de ovario poliquístico.

5. METODOLOGÍA

5.1 Diagrama de trabajo



5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Animales

Se trabajó con 20 cobayas Hartley, mantenidas con ciclos de luz-oscuridad de 12-12 horas, con alimento y agua a libre acceso en el Bioterio Claude Bernard de la BUAP. Las cobayas fueron obtenidas de madres gestantes y clasificadas aleatoriamente en los diferentes grupos experimentales. Se formaron cuatro grupos, el grupo control (animales intactos; n=5), el grupo vehículo (0.6 UI de solución Hartman vía oral; n=5) diariamente por 20 días, el grupo *Letrozole* (1mg/kg de peso de *Letrozole* vía oral; n=5) diariamente por 20 días y *Letrozole/Capsaicina* (*Letrozole* 1 mg/kg de peso de *Letrozole* vía oral; n=5) diariamente por 20 días y *Capsaicina* 1nM vía subcutánea por 20 días diariamente.

5.2.2 Inducción farmacológica del síndrome de ovario poliquístico

Para ambos grupos con *Letrozole* y *Letrozole/Capsaicina* a partir del día Posnatal 21 (P21) se les administró *Letrozole* vía oral (1mg/Kg). Durante este periodo se observó diariamente su peso y cambios observados.

5.2.3 Administración de Capsaicina

La administración de *Capsaicina* se realizó, para el grupo *Letrozole/Capsaicina*, 4 días posteriores al inicio del tratamiento con *Letrozole* (P25). La *Capsaicina* 1nM, se administró vía subcutánea, en la zona dorsal entre la vertebras L4-L5, por 20 días.

5.2.4 Primera apertura vaginal

La primera apertura vaginal (PAV) se tomó observando a partir del día Postnatal 20 (P20) y a simple vista la zona ano-genital de las cobayas con el fin de observar la presencia o ausencia de la membrana vaginal.

5.2.5 Obtención de úteros

La eutanasia de las cobayas se realizó posterior a la evaluación de 4 ciclos estrales. Las cobayas fueron anestesiadas en una cámara de CO₂ y posteriormente se realizó una perfusión vía intracardiaca con solución salina isotónica (SSI) y después con paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos (PBS). Después se realizó la disección de úteros.

5.2.6 Técnicas histológicas

Los tejidos obtenidos se almacenaron en paraformaldehído al 4% en PBS para completar la fijación. Después se deshidrataron en alcohol a diferentes concentraciones (70%, 96% y 100%), se sumergieron en xilol y se infiltraron en parafina líquida. Se hicieron bloques de parafina para

posteriormente hacer cortes histológicos con un grosor de 5µm en un micrótomo de deslizamiento Leica SM2010R. Los cortes se colocaron en portaobjetos, 3 cortes en cada portaobjetos. Se obtuvieron 6 portaobjetos con sus tejidos para finalmente realizar la tinción de Hematoxilina-Eosina, Tricromica de Masson e Inmunohistoquímica.

5.2.7 Tinciones

En el presente trabajo se usaron dos tinciones histológicas: Hematoxilina-Eosina y Tricromica de Masson.

5.2.8 Medición del grosor de capas uterinas, conteo de glándulas endometriales

La tinción de Hematoxilina-Eosina se utilizó para la medición de perimetrio, miometrio, endometrio, epitelio ciliar uterino y conteo de glándulas endometriales. Se tomaron aleatoriamente 8 campos del cuerno izquierdo, 8 campos del cuerpo uterino y 8 del cuerno derecho de los diferentes cortes teñidos con Hematoxilina-Eosina y se realizaron 5 mediciones por campo con el objetivo de 10X con ayuda del software Motic Images plus 3.0.

5.2.9 Medición del grosor de colágeno en las capas uterinas

La tinción Tricromica de Masson se utilizó para medir el grosor de colágeno del perimetrio, miometrio y endometrio. Se tomaron aleatoriamente 8 campos del cuerno izquierdo, 8 campos del cuerpo uterino y 8 del cuerno derecho de los diferentes cortes teñidos con Tricromica de Masson y se realizaron 5 mediciones por campo con el objetivo de 10X con ayuda del software Motic Images plus 3.0.

5.2.10 Inmunohistoquímica para TRPV1

Los cortes histológicos se desparafinaron, hidrataron y lavaron con solución de PBS, posteriormente, la recuperación antigénica se realizó con buffer de citratos (0.1 mM, pH=6). Los tejidos se permeabilizaron con PBS-Triton-100X al 2% y las proteínas se bloquearon con albúmina bovina libre de IgG al 0.5% en PBS-T. A continuación, los cortes histológicos se incubaron por 18 horas con el anticuerpo monoclonal de ratón anti receptor a capsaicina (Millipore®) (1:50) a 4°C, posteriormente por 2 horas 30 minutos con el anticuerpo secundario goat anti-mouse igG-FITC (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) (1:200). Los núcleos de las células se marcaron con yoduro de propidio (Millipore®) (1:1000) por 3 minutos. Finalmente, los cortes fueron lavados, montados con Vectashield y sellados con barniz para uñas. Las muestras se mantuvieron a 4 °C en oscuridad hasta la toma de fotografías. La fluorescencia se detectó con un microscopio Leica DM100 que tiene acoplada una cámara con la que se tomaron fotografías con el programa ProgRes.

5.2.11 Conteo de células positivas a TRPV1

Por cada grupo se realizaron 4 ensayos y se contaron las células positivas al receptor TRPV1 en 12 campos representativos a 20X usando la herramienta “cell counter” del software ImageJ. Se

consideraron células positivas a TRPV1 cuando se observó el núcleo color rojo con un punto o más en la periferia color verde. Las áreas seleccionadas para el conteo celular fueron perimetrio, miometrio, endometrio, epitelio ciliar uterino y glándulas endometriales.

5.2.12 Pruebas estadísticas

Los datos se expresaron como las medias \pm EEM. Los datos fueron sometidos a una prueba U de Mann-Whitney, donde dos grupos se consideraron diferentes cuando la probabilidad entre ellos fue $*p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Inicio de la Primera Apertura Vaginal (PAV)

La PAV para el grupo Control fue a los 29.3 ± 2.5 días, para el grupo Vehículo fue a los 30.5 ± 1.9 días. En el grupo *Letrozole* la PAV tuvo un retraso significativo a 40.3 ± 2.2 días* en comparación al grupo Control y para el grupo de *Letrozole/Capsaicina* hubo un adelanto de la PAV a 27.3 ± 1.5 días* en comparación con el grupo *Letrozole*. * < p 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

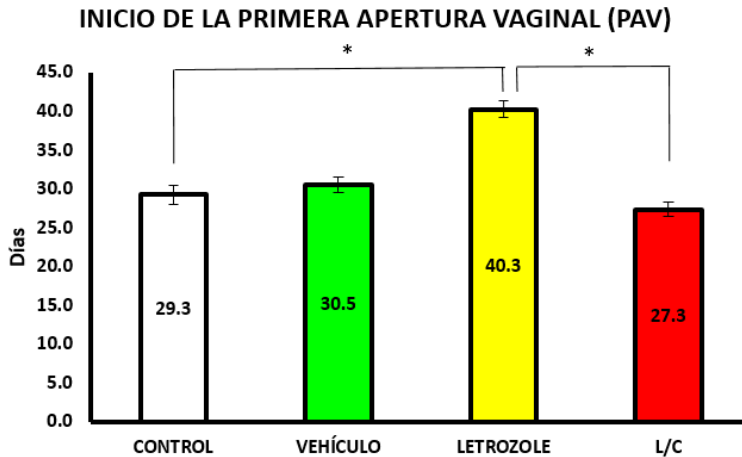


Fig.7 Inicio de la Primera Apertura Vaginal (PAV) □ Control, ■ Vehículo, ■ *Letrozole* y ■ *Letrozole/Capsaicina*. Las barras representan el promedio \pm EEM * < p 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

6.2 Medición del grosor de capas uterinas y número de glándulas uterinas en cobayas Hartley con SOP.

Para el análisis morfométrico se tomaron fotografías a 10x y se realizó la medición como se describe en la parte metodológica, a continuación, se encuentran las gráficas de los promedios de cada capa uterina y posteriormente un panel de microfotografías representativas del grosor de cada capa.

Perimetrio

El análisis morfométrico de la capa del perimetrio indicó para el grupo Control un grosor de $161.2 \pm 7.7 \mu\text{m}$, para el grupo Vehículo fue de $146.5 \pm 6.6 \mu\text{m}$, para el grupo *Letrozole* fue de $164.3 \pm 7.9 \mu\text{m}$. Para el grupo de *Letrozole/Capsaicina* hubo una disminución significativa a $89.3 \pm 4.8 \mu\text{m}$ * en comparación con el grupo Control y con el grupo *Letrozole*. * < p 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

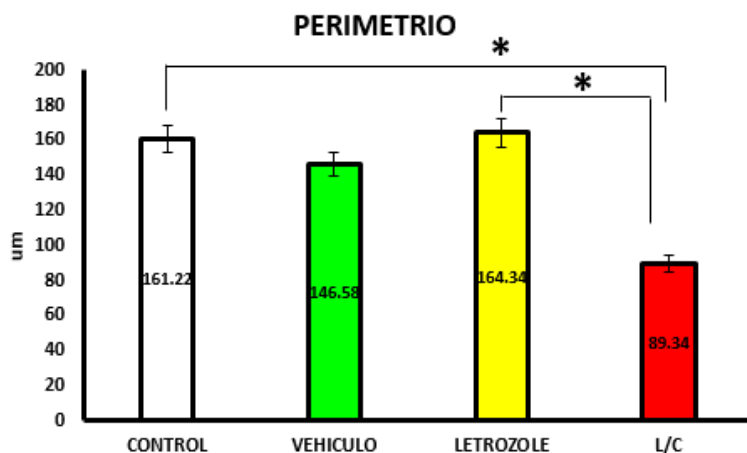


Fig.8 Grosor de la capa uterina del perimetrio (um) de cobayas Hartley de los grupos Control, Vehículo, Letrozole y Letrozole/Capsaicina. Las barras representan el promedio \pm EEM * < p 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

Miometrio

El grosor de la capa del miometrio para el grupo Control fue de $337.9 \pm 22.2 \mu\text{m}$. En los grupos Vehículo, Letrozole y Capsaicina se observa una disminución significativa en el grosor de la capa en comparación al grupo Control. Para el grupo Vehículo fue de $202.2 \pm 8.5 \mu\text{m}^*$, para el grupo Letrozole fue de $228.5 \pm 7.3 \mu\text{m}^*$ y para el grupo de Letrozole/Capsaicina hubo una disminución significativa a $170.7 \pm 7.6 \mu\text{m}^*$ en comparación tanto al grupo Control como al grupo Letrozole. * < p 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

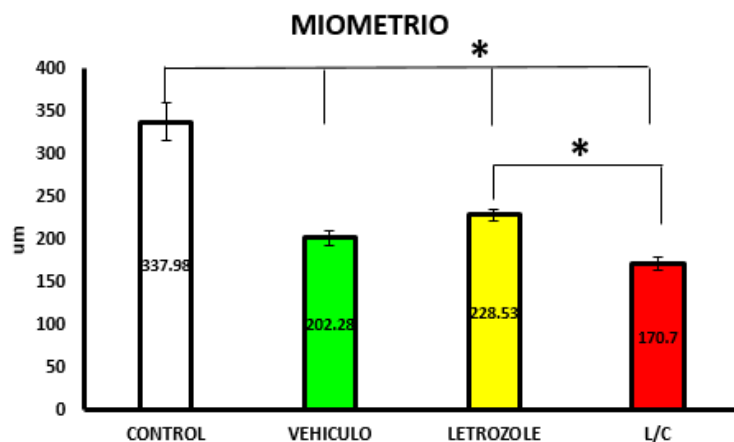


Fig.9 Grosor de la capa uterina del miometrio (um) de cobayas Hartley de los grupos Control, Vehículo, Letrozole y Letrozole/Capsaicina. Las barras representan el promedio \pm EEM * < p 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

Endometrio

El grosor de la capa del endometrio para el grupo Control fue de $813.1 \pm 35.2 \mu\text{m}$, para el grupo Vehículo fue de $786.7 \pm 22.3 \mu\text{m}$. Para el grupo Letrozole hubo un incremento significativo a $1113.2 \pm 41.2 \mu\text{m}^*$ en comparación con el grupo Control. Para el grupo de Letrozole/Capsaicina hubo una disminución significativa a $697.2 \pm 19.0 \mu\text{m}^*$ en comparación con el grupo Letrozole. * < p 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

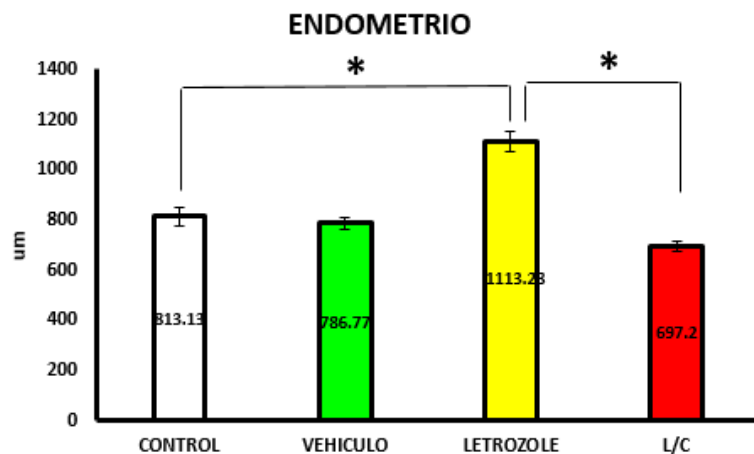


Fig.10 Grosor de la capa uterina del endometrio (um) de cobayas Hartley de los grupos Control, Vehículo, Letrozole y Letrozole/Capsaicina. Las barras representan el promedio \pm EEM * < p 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

Epitelio ciliar uterino

El grosor del epitelio ciliar uterino para el grupo Control fue de 35.13 ± 1.25 , para el grupo Vehículo fue de 34.01 ± 1.01 . Para el grupo *Letrozole* hubo un incremento significativo a $70.21 \pm 1.02^*$ en comparación al grupo Control. Para el grupo de *Letrozole/Capsaicina* hubo una disminución a $20.97 \pm 1.22^*$ en comparación con el grupo Control y con el grupo *Letrozole*. * < p 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

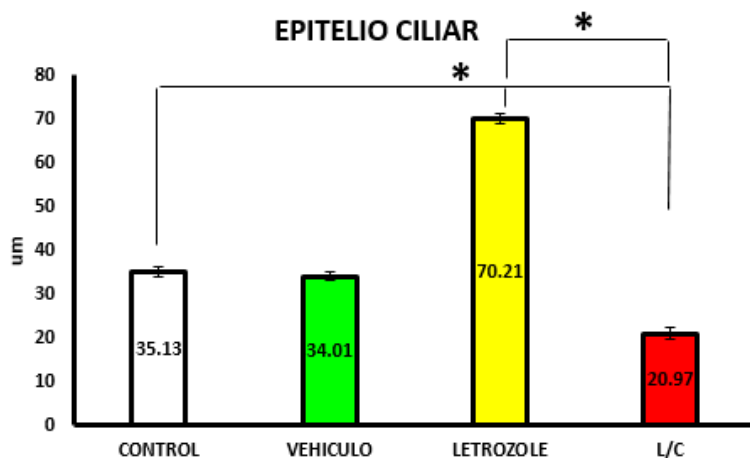


Fig.11 Grosor del epitelio ciliar uterino (um) de cobayas Hartley de los grupos Control, Vehículo, Letrozole y Letrozole/Capsaicina. Las barras representan el promedio \pm EEM * < p 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

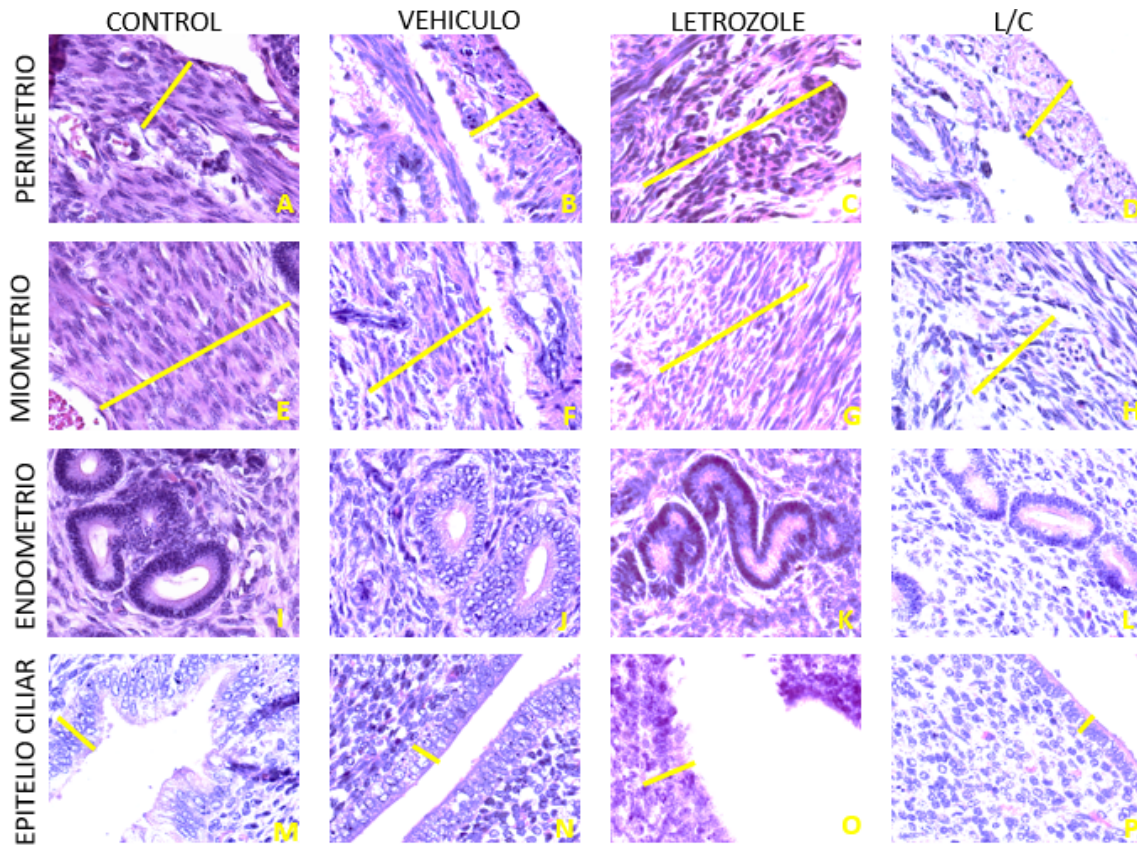


Fig.12 Microfotografías de cortes histológicos de las capas uterinas de cobayas Hartley a 5 μ m teñidas con Hematoxilina-Eosina a 40X. A, E, I y M muestran las capas uterinas del grupo control, B, F, J y N muestran las del grupo Vehículo, C, G, K y O muestran las del grupo administrado con *Letrozole* y, por último, D, H, L y P muestran las del grupo administrado con *Letrozole/Capsaicina*. Las líneas amarillas representan el grosor de cada capa uterina indicada.

Conteo de glándulas endometriales

El número de glándulas endometriales para el grupo Control fue de $77 \pm 10.6 \mu\text{m}$, para el grupo Vehículo fue de $100 \pm 3.0 \mu\text{m}$. Para el grupo *Letrozole* hubo un incremento significativo a $298 \pm 64.2 \mu\text{m}^*$ en comparación al grupo Control. Para el grupo de *Letrozole/Capsaicina* fue de $180 \pm 8.1 \mu\text{m}$. * < p 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

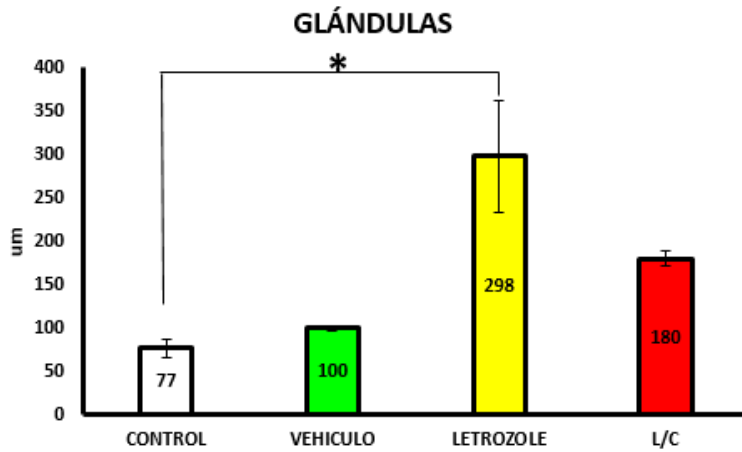


Fig.13 Número de glándulas endometriales de los grupos Control, Vehículo, *Letrozole* y *Letrozole/Capsaicina*. Las barras representan el promedio \pm EEM * $< p$ 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

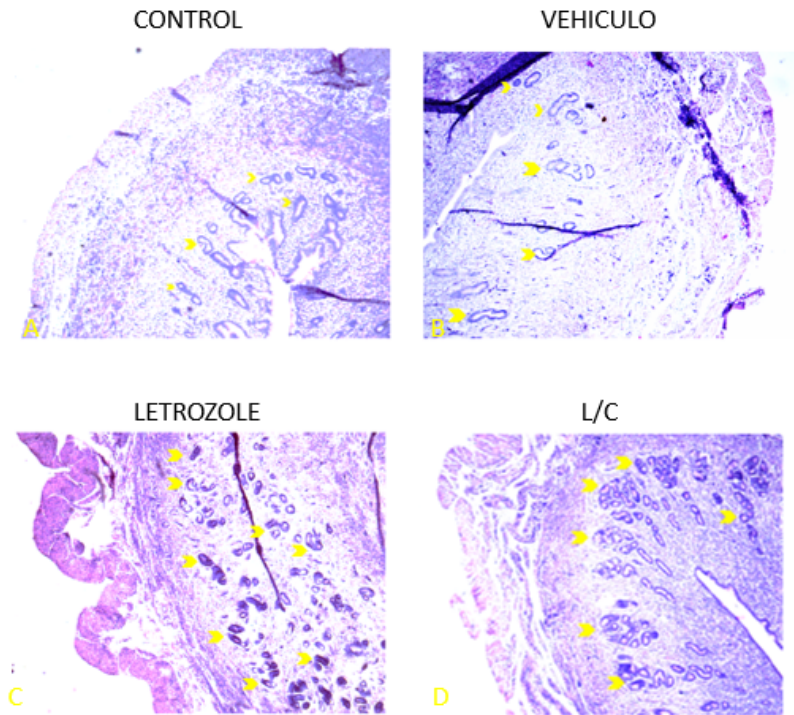


Fig. 14 Microfotografías de úteros de cobayas Hartley a 10X de los grupos Control (A), Vehículo (B), *Letrozole* (C) y *Letrozole/Capsaicina* (D). ➤ Las puntas de flecha señalan a las glándulas endometriales.

6.3 Medición del grosor de colágeno de las capas uterinas de cobayas Hartley con SOP.

Para la medición del grosor de colágeno en cada capa uterina se tomaron fotografías a 10x y se realizó la medición como se describe en la parte metodológica, a continuación, se encuentran las gráficas de los promedios de cada capa uterina y posteriormente un panel de microfotografías representativas del grosor de colágeno de cada capa uterina.

Perimetrio

El grosor de colágeno en la capa del perimetrio de para el grupo Control fue de $113.9 \pm 5.5 \mu\text{m}$, para el grupo Vehículo hubo una disminución significativa a $104.8 \pm 6.2 \mu\text{m}^*$ en comparación con el grupo Control. Para el grupo *Letrozole* fue de $126.2 \pm 7.1 \mu\text{m}$. Para el grupo de *Letrozole/Capsaicina* hubo una disminución significativa a $80.5 \pm 7.7 \mu\text{m}^*$ en comparación con el grupo Control y con el grupo *Letrozole*. * < p 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

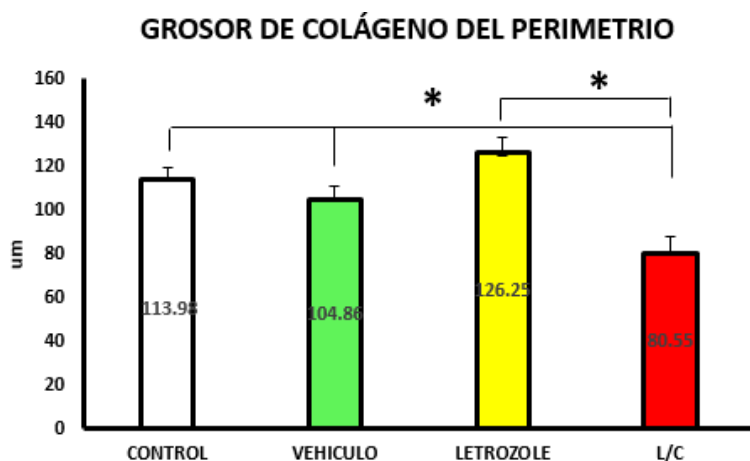


Fig.15 Grosor de colágeno en la capa del perimetrio de los grupos Control, Vehículo, *Letrozole* y *Letrozole/Capsaicina*. Las barras representan el promedio \pm EEM * < p 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

Miometrio

El grosor de colágeno en la capa del miometrio para el grupo Control fue de $105.2 \pm 5.1 \mu\text{m}$, para el grupo Vehículo hubo una disminución significativa a $86.5 \pm 4.6 \mu\text{m}^*$ en comparación con el grupo Control. Para el grupo *Letrozole* hubo un incremento significativo a $132.6 \pm 5.8 \mu\text{m}^*$ en comparación con el grupo Control. Para el grupo de *Letrozole/Capsaicina* hubo una disminución a $55.9 \pm 3.5 \mu\text{m}^*$ en comparación con el grupo Control y con el grupo *Letrozole*. * < p 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

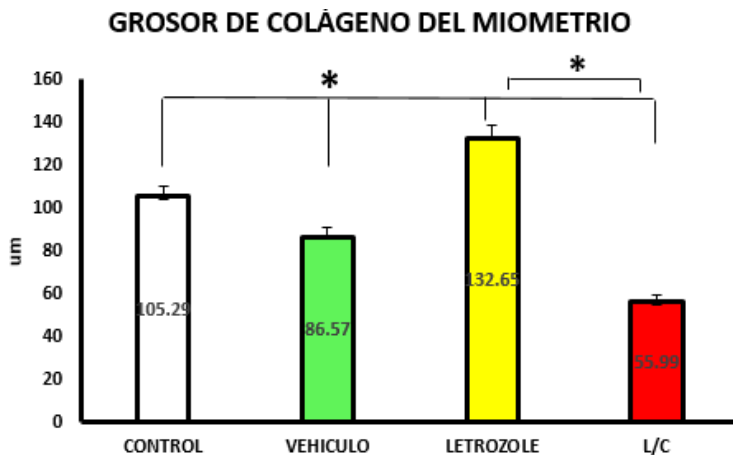


Fig.16 Grosor de colágeno en la capa del miometrio de los grupos Control, Vehículo, Letrozole y Letrozole/Capsaicina. Las barras representan el promedio \pm EEM * < p 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

Endometrio

El grosor de colágeno en la capa del endometrio para el grupo Control fue de $451.4 \pm 22.6 \mu\text{m}$, para el grupo Vehículo hubo un incremento significativo a $580 \pm 17.2 \mu\text{m}^*$ en comparación con el grupo Control. Para el grupo *Letrozole* hubo una disminución significativa a $342.4 \pm 11.5 \mu\text{m}^*$ en comparación con el grupo Control. Para el grupo de *Letrozole/Capsaicina* hubo una disminución significativa a $297 \pm 15.9 \mu\text{m}^*$ en comparación con el grupo Control y con el grupo *Letrozole*. * < p 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

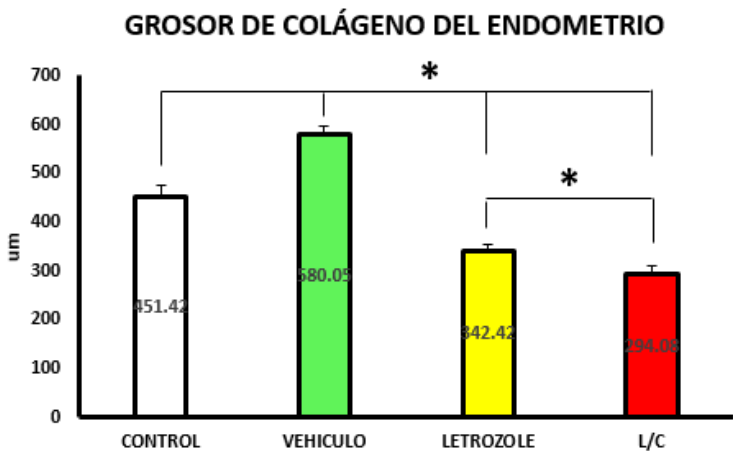


Fig.17 Grosor de colágeno en la capa del endometrio de los grupos Control, Vehículo, Letrozole y Letrozole/Capsaicina. Las barras representan el promedio \pm EEM * < p 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

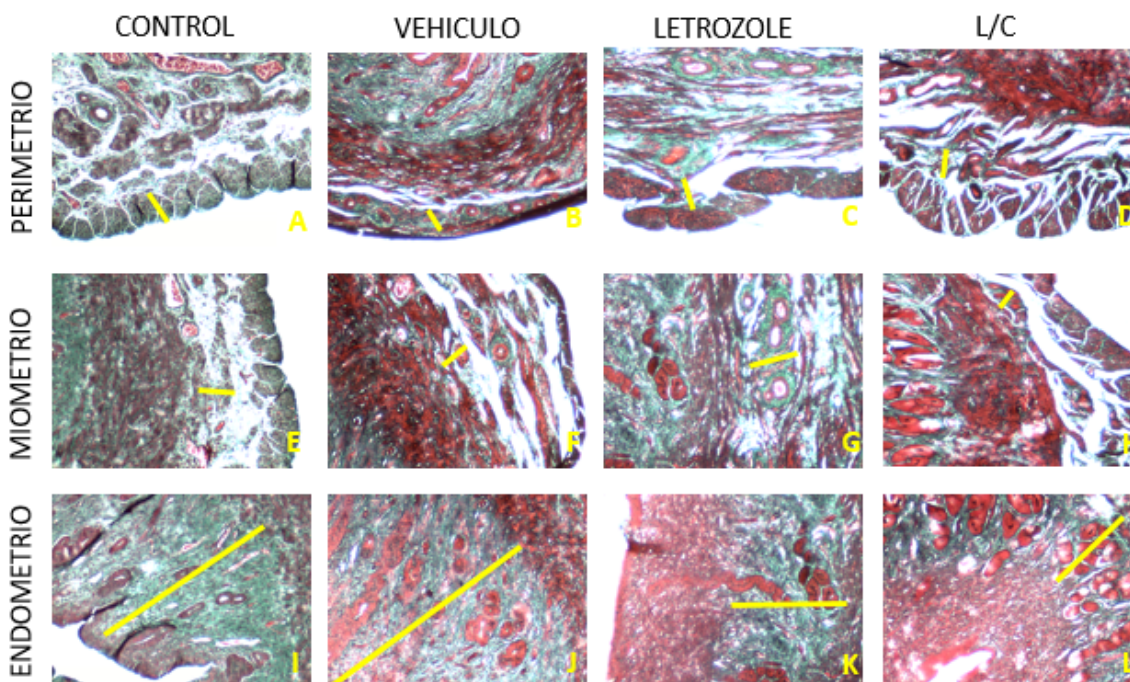


Fig. 18 Microfotografías de cortes histológicos de las capas uterinas de cobayas Hartley a 5 μ m teñidas con Tricromica de Masson a 10X. A, E e I muestran las capas uterinas del grupo control, B, F y J muestran las del grupo Vehículo, C, G y K muestran las del grupo administrado con *Letrozole* y, por último, D, H y L muestran las del grupo administrado con *Letrozole/Capsaicina*. Las líneas amarillas representan el grosor de colágeno de cada capa uterina indicada.

6.4 *Conteo de células positivas a TRPV1 en las capas uterinas y glándulas endometriales de cobayas Hartley con SOP.*

Células positivas a TRPV1 en perimetrio

El número de células positivas a TRPV1 en la capa uterina del perimetrio para el grupo Control fue de 20.57 ± 4.72 , para el grupo Vehículo fue de 24.9 ± 21.4 , para el grupo de *Letrozole* hubo una disminución significativa a $12.7 \pm 12.2^*$ con respecto al grupo Control y para el grupo de *Letrozole/Capsaicina* hubo un incremento significativo a $23.8 \pm 11.3^*$ en comparación con el grupo *Letrozole*. * < p 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

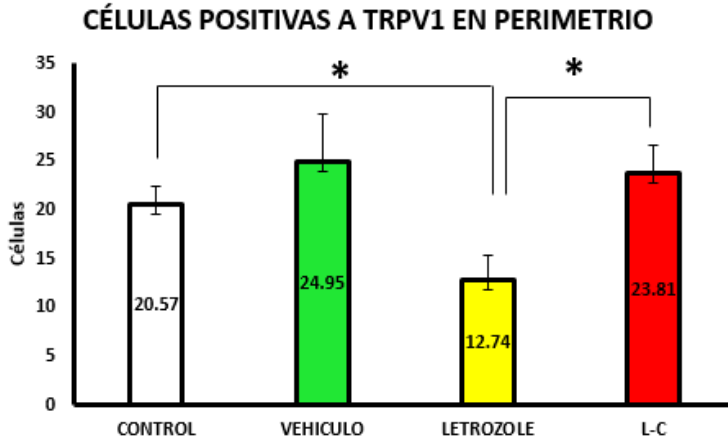


Fig. 19 Número de células positivas a TRPV1 en la capa uterina del perimetrio para los grupos □ Control, ■ Vehículo, ■ Letrozole y ■ Letrozole/Capsaicina. Las barras representan el promedio \pm EEM * $< p$ 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

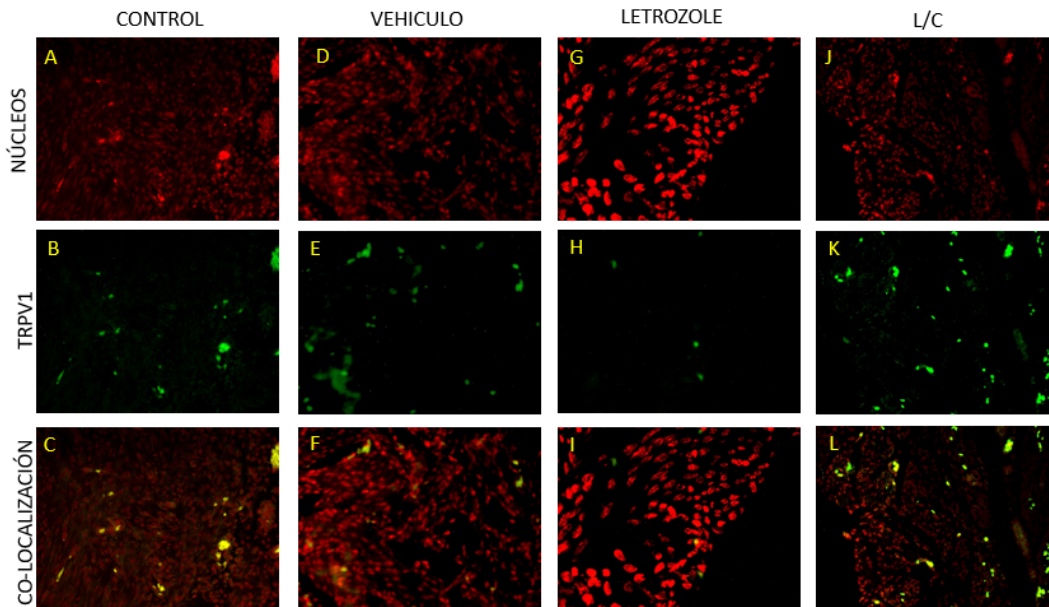


Fig. 20 Inmunohistoquímica para TRPV1 en la capa uterina del perimetrio de cobayas Hartley de los grupos Control, Vehículo, Letrozole, Letrozole/Capsaicina. B, E, H y K: Células positivas a TRPV1 marcadas con FITC se encuentran en verde. A, D, G y J: Núcleos en rojo marcados con yoduro de propidio. C, F, I y L: Co-localización entre la marca FITC y yoduro de propidio.

Células positivas a TRPV1 en miometrio

El número de células positivas a TRPV1 en la capa uterina del miometrio para el grupo control fue de 26.7 ± 12.3 , para el grupo Vehículo hubo una disminución significativa a $13.3 \pm 7.7^*$ con respecto al grupo Control, para el grupo de Letrozole hubo una disminución significativa a $14.5 \pm 9.3^*$ con respecto al grupo Control. Para el grupo de Letrozole/Capsaicina fue de 17.7 ± 6.4 . * $< p$ 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

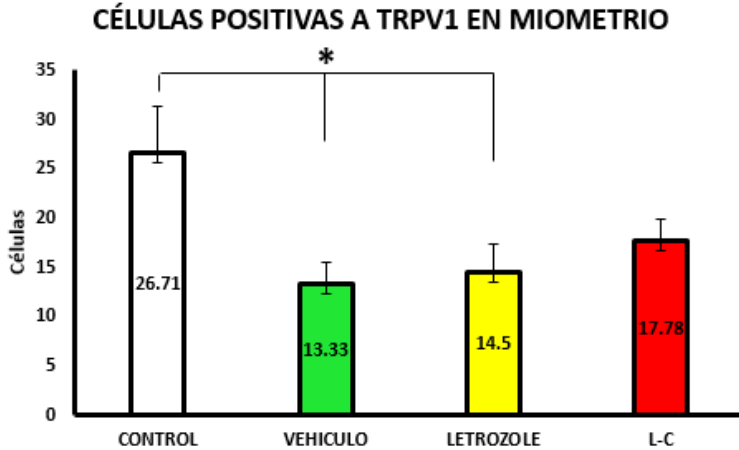


Fig. 21 Número de células positivas a TRPV1 en la capa uterina del miometrio para los grupos Control, Vehículo, *Letrozole* y *Letrozole/Capsaicina*. Las barras representan el promedio \pm EEM
* < p 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

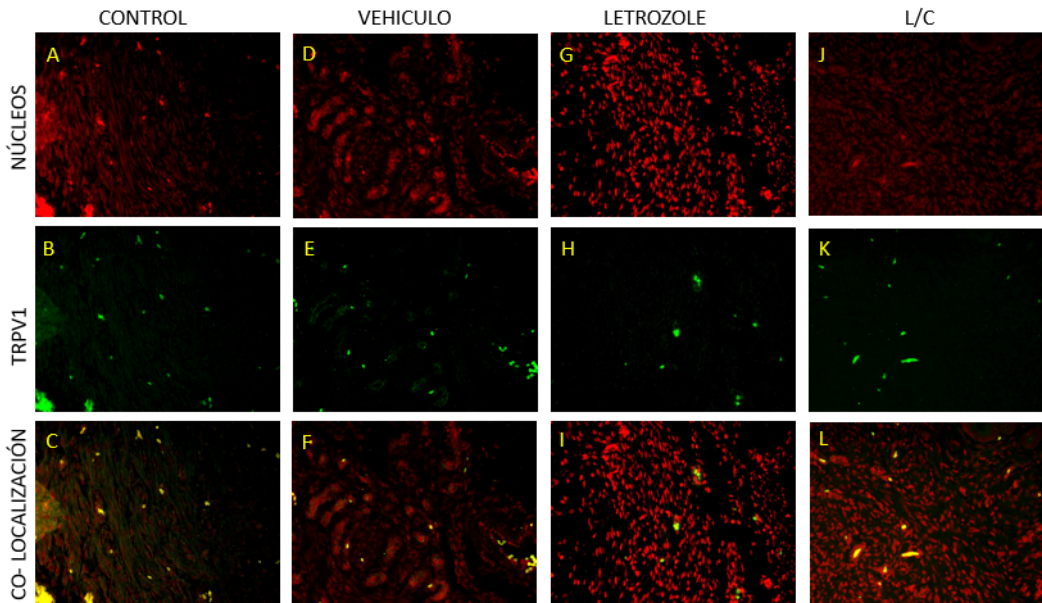


Fig. 22 Inmunohistoquímica para TRPV1 en la capa uterina del miometrio de cobayas Hartley de los grupos Control, Vehículo, *Letrozole*, *Letrozole/Capsaicina*. B, E, H y K: Células positivas a TRPV1 marcadas con FITC se encuentran en verde. A, D, G y J: Núcleos en rojo marcados con yoduro de propidio. C, F, I y L: Co-localización entre la marca FITC y yoduro de propidio.

Células positivas a TRPV1 en endometrio

El número de células positivas a TRPV1 en la capa uterina del endometrio para el grupo control fue de 42.8 ± 20.7 , para el grupo Vehículo hubo una disminución significativa a $22 \pm 15.7^*$ con respecto al grupo Control, para el grupo de *Letrozole* hubo una disminución significativa a $22.6 \pm 15.7^*$ con respecto al grupo Control. Para el grupo de *Letrozole/Capsaicina* hubo una disminución significativa con respecto al grupo Control, pero un aumento significativo con respecto al grupo *Letrozole* a 28.3 ± 11.4 . * < p 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

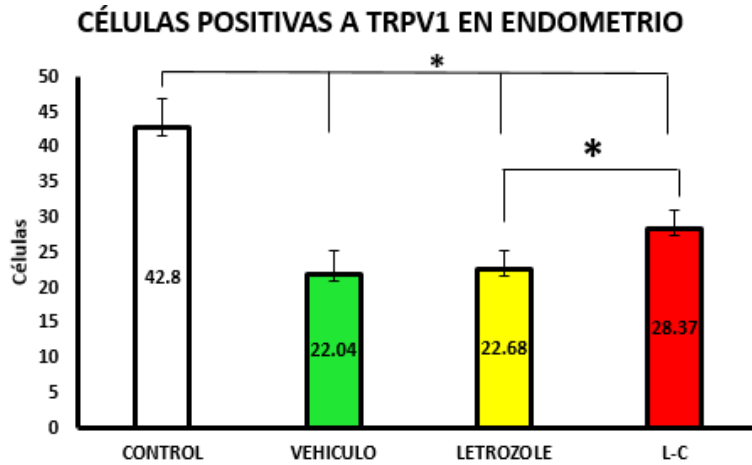


Fig. 23 Número de células positivas a TRPV1 en la capa uterina del endometrio para los grupos □ Control, ■ Vehículo, ■ Letrozole y ■ Letrozole/Capsaicina. Las barras representan el promedio \pm EEM * $< p$ 0.05, prueba U-Mann-Whitney.

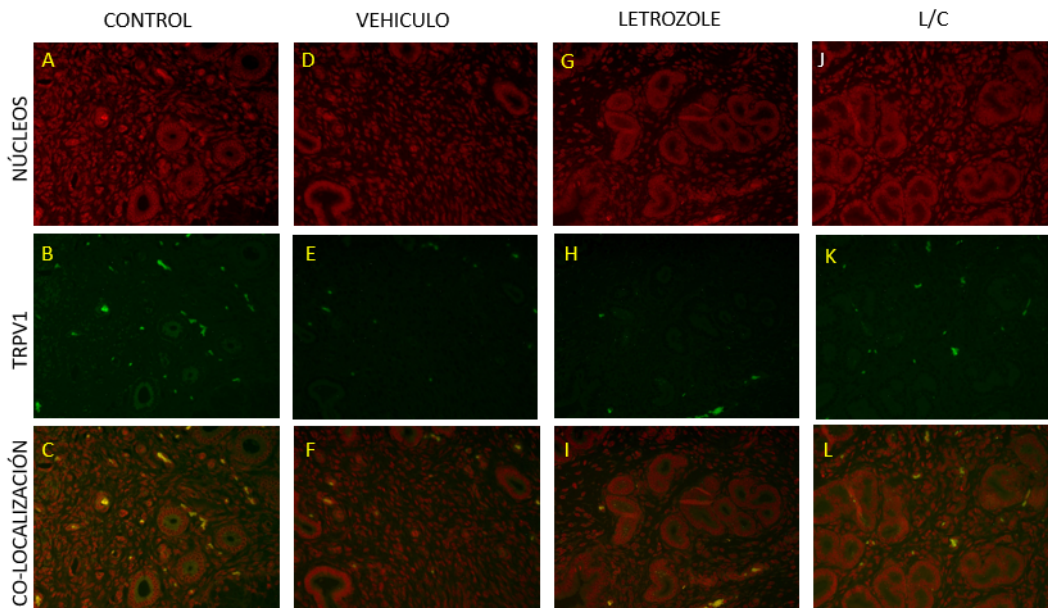


Fig. 24 Inmunohistoquímica para TRPV1 en la capa uterina del endometrio de cobayas Hartley de los grupos Control, Vehículo, Letrozole, Letrozole/Capsaicina. B, E, H y K: Células positivas a TRPV1 marcadas con FITC se encuentran en verde. A, D, G y J: Núcleos en rojo marcados con yoduro de propidio. C, F, I y L: Co-localización entre la marca FITC y yoduro de propidio.

Células positivas a TRPV1 en epitelio ciliar uterino

El número de células positivas a TRPV1 en el epitelio ciliar uterino para el grupo control fue de 27.1 ± 15.7 , para el grupo Vehículo fue de 46.7 ± 8.9 , para el grupo de Letrozole fue de 25.8 ± 19.5 y para el grupo de Letrozole/Capsaicina fue de 68.2 ± 32.4 .

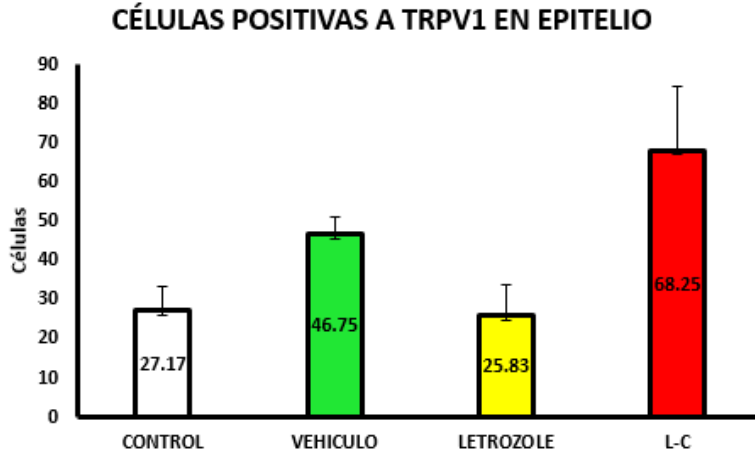


Fig. 25 Número de células positivas a TRPV1 en el epitelio ciliar uterino para los grupos Control, Vehículo, Letrozole y Letrozole/Capsaicina. Las barras representan el promedio \pm EEM.

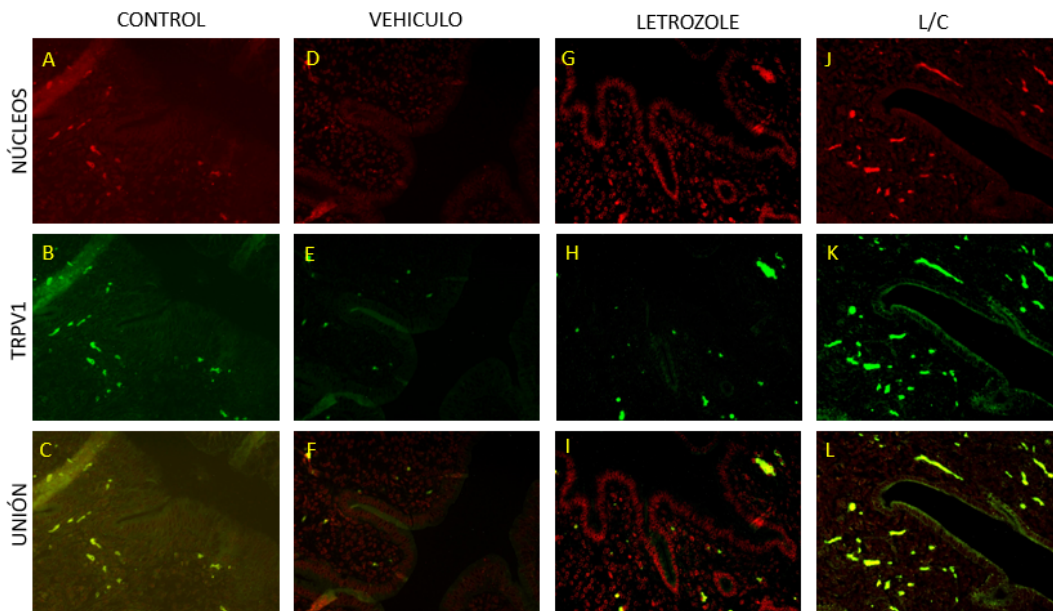


Fig. 26 Inmunohistoquímica para TRPV1 en el epitelio ciliar uterino de cobayas Hartley de los grupos Control, Vehículo, Letrozole, Letrozole/Capsaicina. B, E, H y K: Células positivas a TRPV1 marcadas con FITC se encuentran en verde. A, D, G y J: Núcleos en rojo marcados con ioduro de propidio. C, F, I y L: Co-localización entre la marca FITC y ioduro de propidio.

Células positivas a TRPV1 en glándulas uterinas

El número de células positivas a TRPV1 en glándulas uterinas para el grupo control fue de 66 ± 48.1 , para el grupo Vehículo fue de 57.5 ± 26 , para el grupo de Letrozole fue de 71.8 ± 73.1 y para el grupo de Letrozole/Capsaicina fue de 44.7 ± 32.1 .

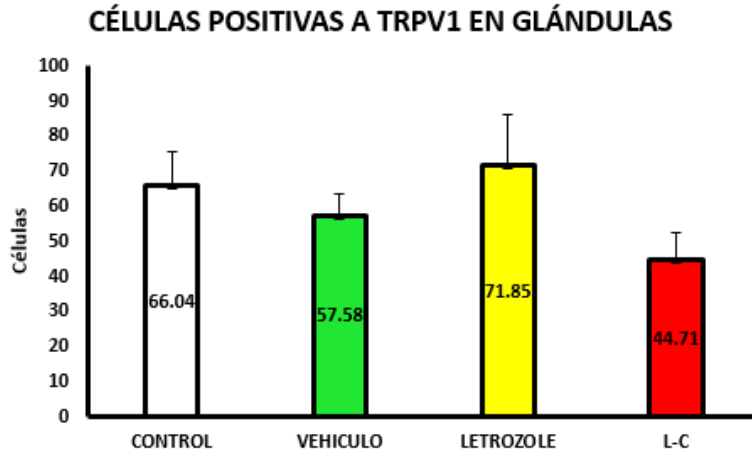


Fig. 27 Número de células positivas a TRPV1 en glándulas uterinas para los grupos Control, Vehículo, Letrozole y Letrozole/Capsaicina. Las barras representan el promedio \pm EEM.

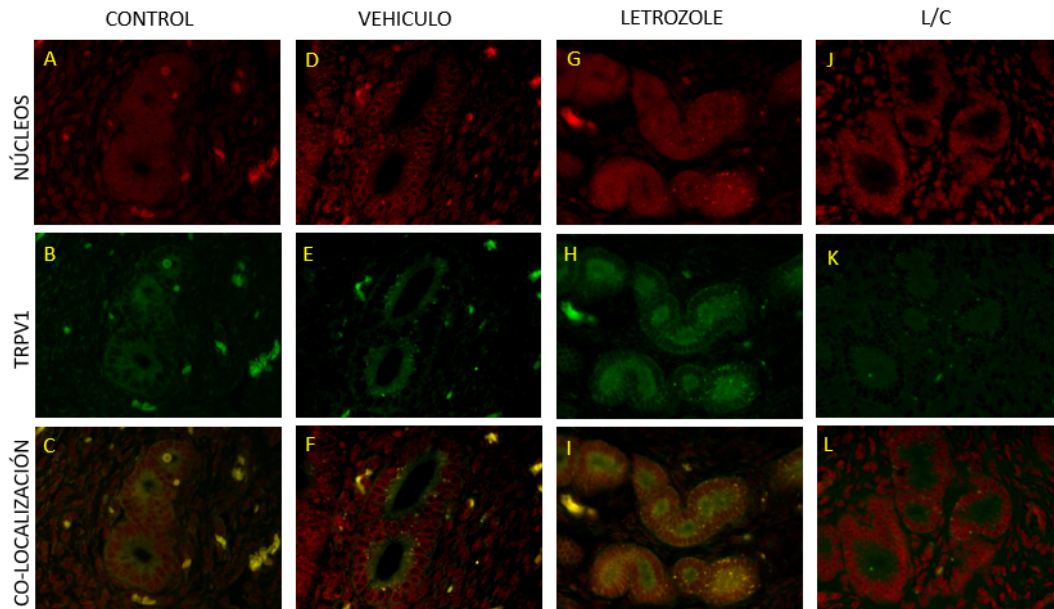


Fig. 28 Inmunohistoquímica para TRPV1 en glándulas uterinas de cobayas Hartley de los grupos Control, Vehículo, Letrozole, Letrozole/Capsaicina. B, E, H y K: Células positivas a TRPV1 marcadas con FITC se encuentran en verde. A, D, G y J: Núcleos en rojo marcados con yoduro de propidio. C, F, I y L: Co-localización entre la marca FITC y yoduro de propidio.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En esta tesis probamos el efecto de la administración de Capsaicina sobre los receptores TRPV1 presentes en el útero de cobayas Hartley inducidas a síndrome de ovario poliquístico con Letrozole. El Letrozole es un inhibidor de la aromatasa p450, la cual se encarga de la conversión de testosterona y androstenediona en estradiol. La inhibición de la enzima resulta en un aumento de andrógenos ováricos y desarrollo del SOP (Corbin et al., 1999). La PAV en los roedores marca el inicio de la pubertad, en las cobayas ocurre aproximadamente a los 33 días (Alatriste et al., 2009). En las cobayas del grupo *Letrozole* la PAV se retrasó de forma significativa en comparación con las cobayas del grupo Control, así como también se observó un aumento de peso, estas evidencias concuerdan con los datos reportados en pacientes con SOP (Teede et al., 2010). En el grupo *Letrozole/Capsaicina* la PAV disminuyó significativamente y ocurrió en días similares a lo reportado. El retraso de la PAV del grupo *Letrozole* puede explicarse debido a que múltiples líneas de evidencia sugieren que los andrógenos vía unión al receptor a andrógenos (AR) juegan un papel importante en el desarrollo de la patogénesis del SOP: 1) Los AR se encuentran a lo largo del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Brock et al., 2015). 2) El tratamiento de pacientes con SOP con flutamida antiandrogénica han reportado restaurar la regularidad de la menstruación y la ovulación, así como mejorar la sensibilidad reducida de la liberación pulsátil de GnRH por la inhibición de la retroalimentación por estradiol y progesterona (Paradisi et al., 2013). 3) La hiperactividad de los AR en hipotálamo, ovario y adipocitos ha sido propuesto como una conexión crucial en el círculo de patogénesis del SOP (Walters et al., 2018). 4) En modelos animales inducidos a SOP usando un exceso de andrógenos muestran una disminución en la inervación de neuronas kisspeptinérgicas (neuronas excitadoras de la secreción de GnRH) sobre las neuronas GnRH (Cernea et al., 2015). Por lo cual, se propone que el exceso de andrógenos produce una disminución en la inervación de las neuronas kisspeptinérgicas sobre las neuronas GnRH, provocando un desbalance en la liberación pulsátil de GnRH, que a su desencadena un incremento de secreción de LH sobre FSH, provocando una disfunción ovárica y causando el retraso de la pubertad.

Estudios previos realizados en el Laboratorio de neuroendocrinología por De la Rosa Priego en el 2018 demostraron la presencia de receptores a Kisspeptina en el útero de Ratas Wistar y como la administración de un antagonista del receptor a kisspeptina (Kiss1R) retrasa el inicio de la pubertad. Se ha mostrado que Kiss-Kiss1R participan en la regulación de la sensibilidad al dolor, puesto que la administración de Kiss provoca hiperalgesia y activa la fosforilación en la Ser800 del TRPV1, evento clave en los mecanismos de sensibilización nociceptiva periférica (Spampinato, et al., 2011). Debido a estos antecedentes proponemos que la administración de *Capsaicina* provoca un sinergismo en la activación de ambos receptores (TRPV1 Y Kiss1R) los cuales, al ser activados permiten la liberación de SP, CGRP y Glutamato por medio de las fibras sensoriales al SNC para la estimulación de las neuronas kisspeptinérgicas y el correcto funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónada permitiendo así el inicio de la pubertad.

El presente trabajo se centró en los cambios morfológicos del útero durante el SOP, para resaltar estos cambios también se detallan a continuación cambios cualitativos observados durante la evaluación microscópica del núcleo. La tinción hematoxilina-eosina es la más usada en histología. Es una coloración topográfica que sirve para el estudio de la estructura general de los tejidos, en especial de la estructura nuclear ya que permite la observación de su tamaño, forma de la cromatina y nucléolos (García Bermejo, 2006). En la Fig. 29 se muestran los tipos de estructura nuclear observados con la tinción hematoxilina-eosina.

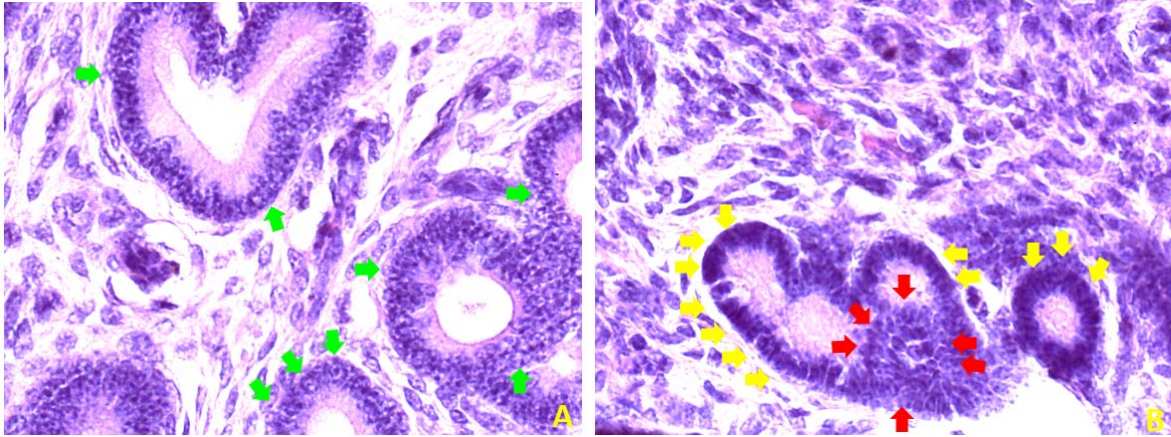


Fig. 29 Microfotografías de distintos tipos de estructura nuclear observados teñidos con Hematoxilina-Eosina a 40X. La imagen A corresponde al endometrio de una cobaya Hartley perteneciente al grupo Control, las flechas verdes muestran la estructura nuclear “normal” y la imagen B corresponde al endometrio de una cobaya Hartley perteneciente al grupo *Letrozole*, las flechas rojas muestran núcleos “picnóticos” en donde hay condensación de cromatina; las flechas amarillas muestran núcleos “cariorréxicos” en donde hay fragmentación nuclear.

Un núcleo celular contiene cromatina moderadamente condensada o cromatina descondensada en caso de células altamente activas en transcripción de genes. Un núcleo picnótico tiene un estado de alta condensación de cromatina por lo que los nucleosomas se encuentran totalmente compactados y no se permite la mitosis celular ni la síntesis de proteínas. Este estado es encontrado en células con muerte programada o en células muertas. Un núcleo cariorréxico es aquel con fragmentación del DNA, este estado ocurre después del estado de picnosis (Burgoyne, 1999). Los núcleos celulares del tejido del grupo Control muestran cromatina condensada, así como la presencia de un nucléolo grande, por lo cual esta morfología nuclear fue denominada como “núcleos sanos” y fueron usados como referencia de comparación de los otros grupos a estudiar. Los núcleos celulares del grupo *Letrozole* mostraron ser de menor tamaño en comparación con los núcleos del grupo Control, así como cromatina altamente condensada sin observación de nucléolos, estas características corresponden a un núcleo picnótico, también se observaron pocos núcleos fragmentados correspondientes a la morfología de núcleos cariorréxicos. Los núcleos del grupo *Letrozole/Capsaicina* muestran un aumento de tamaño y llegan a ser similar a los núcleos del grupo Control, así como muestran la presencia de cromatina laxa y nucléolos, los núcleos picnóticos son muy escasos.

Las técnicas histológicas para la tinción de fibras de colágenas se agrupan en las coloraciones tricrómicas, que tiñen el colágeno de tipo I que forma las gruesas fibras de colágena existentes en los espacios extracelulares y estromas orgánicos. La tinción tricrómica de Masson es un método diferencial, policrómico y empírico. Las fibras de colágena se tiñen de un tono azul-verdoso, diferenciándose de los núcleos que se tiñen de negro y las fibras elásticas ya que estas se tiñen de rojo (García Bermejo, 2006). El tejido conjuntivo se encarga principalmente de dar sostén a los tejidos. Está formado por células grandes separadas entre sí por materiales segregados por las propias células como nutrientes celulares, glicoproteínas estructurales y fluido, contiene gran cantidad de fibroblastos los cuales tienen una función secretora, fibras de colágeno, elásticas y reticulares las cuales dan

funcionalidad y soporte al tejido. Por lo tanto, esta tinción fue utilizada para medir la funcionalidad del tejido en cuanto a estiramiento, secreción y nutrición.

Efecto del SOP y el tratamiento con Capsaicina en el perimetrio

En la capa uterina del perimetrio del grupo *Letrozole* no se observó ninguna diferencia significativa en el grosor de la capa en comparación con el grupo Control, sin embargo, analizando los núcleos celulares se observa un aumento de células observándose células compactadas entre sí, así como núcleos picnóticos, sin embargo, el grosor de colágeno del grupo *Letrozole* no presentó un cambio significativo comparado con el Control, por lo cual no se puede deducir algún cambio significativo de la función celular del tejido. El número de células positivas al receptor TRPV1 del grupo *Letrozole* tuvo una disminución significativa en comparación con el grupo Control. Esta disminución de células positivas al receptor demuestra que durante el SOP se disminuye la presencia del receptor TRPV1, esta disminución puede estar relacionada con la falta de regulación celular.

En el grupo *Letrozole/Capsaicina* se observó una disminución significativa en el grosor de la capa uterina en comparación con los grupos Control y *Letrozole*. Aunque la capa es más delgada, se observa una mejoría celular, ya que hay una disminución de núcleos picnóticos, así como mayor espacio entre células comparado con la compactación celular observada en el grupo *Letrozole*. Sin embargo, se observa una disminución significativa en el grosor de colágeno, lo cual implicaría en problemas de sostén del tejido, ya que esta capa es la encargada de dar sostén y protección al útero (Ross, 2008). El número de células positivas al receptor TRPV1 es favorable, ya que aumenta en comparación de la disminución observada en el grupo *Letrozole* y este aumento llega a ser igual al número de células positivas del grupo Control. Este aumento está relacionado con la mejoría de la diferenciación celular observada.

Efecto del SOP y el tratamiento con Capsaicina en el miometrio

El útero es suplido por nervios simpáticos, parasimpáticos y sensoriales que inervan principalmente los vasos sanguíneos y el músculo liso miometral (Brauer & Smith, 2015).

En el grupo *Letrozole* se observó una disminución significativa en el grosor del miometrio, agregado a esto, se observa compactación celular y núcleos cariorréxicos. En cuanto al grosor de colágeno de la capa también se observa un aumento, sin embargo, esta capa presenta varios huecos, lo cual es grave ya que esta capa es la principal fuente de irrigación como de inervación del útero (Brauer & Smith, 2015), por lo que su compactación y falta de colágeno pueden estar involucrados en el mal funcionamiento del tejido durante el SOP, como lo es por ejemplo la disminución de la peristalsis en pacientes con SOP (Henrik et al., 2012), así como de la falta de regulación celular observada en todas las capas, principalmente en el endometrio. Esto también concuerda con la disminución de células positivas al receptor TRPV1 observadas con respecto al grupo Control, esto demuestra la falta de inervación en el tejido ya que no se da la señalización para promover la expresión del receptor TRPV1.

En el grupo *Letrozole/Capsaicina* se observó una disminución aún más notable en el grosor de la capa uterina, sin embargo, el análisis celular demuestra núcleos con cromatina laxa, así como una disminución de la proliferación celular desenfrenada en el grupo *Letrozole*, permitiendo mayor espacio entre célula y célula, lo cual parece prometedor para recuperar la irrigación e inervación del

tejido. A pesar de estas características positivas, el grosor de colágeno permanece siendo significativamente menor al compararlo con el grupo Control. Al realizar el conteo de células positivas al receptor TRPV1 no se observa diferencia significativa con el grupo Control, pero si se muestra un aumento en comparación con el grupo *Letrozole*, aunque no llega a ser significativo. El aumento del espacio entre célula y célula permite un aumento en la deficiente inervación mostrada durante el SOP, esto se sugiere podría deberse a la estimulación de los receptores TRPV1 de las fibras sensoriales, lo cual promueve procesos de neuroangiogénesis a través del factor NGF, importante para el desarrollo de fibras nerviosas, y a su vez permitiendo la señalización para promover la expresión del receptor TRPV1 en células del miometrio (Ricu et al, 2008). Además, los receptores TRP integran información sobre el estado de vascularización de órganos periféricos y perciben estiramiento y presión (Aguado, 2002), lo cual supone procesos de angiogénesis en el miometrio, ayudando al útero a mejorar su estado de vascularización. La mejoría del estado de inervación e irrigación del tejido permite el correcto desarrollo celular y funcionamiento del endometrio.

Efecto del SOP y el tratamiento con Capsaicina en el endometrio y epitelio ciliar

El endometrio es una capa uterina que regula su crecimiento por esteroides, principalmente el E2, estimula la proliferación celular y la progesterona que la inhibe (Li et al., 2014). Durante el SOP, el exceso de estrógenos y la falta de progesterona da como resultado el crecimiento descontrolado del endometrio y es la principal causa del carcinoma endometrial (Chittenden et al., 2009). La hiperplasia ocurre por la proliferación de las glándulas endometriales con tamaño y forma irregular, aumenta la razón glándula/estroma (Usandizaga-Pombo, 1966). En mujeres con SOP, el grosor endometrial ha sido sugerido como factor determinante clínico junto con edad e IMC para una biopsia endometrial. Por lo tanto, el examen de ultrasonido con biopsia endometrial en un endometrio espesor de 0.9 mm en pacientes obesas con SOP ha sido sugerido (McCormick et al., 2011).

En el grupo *Letrozole* se observó un aumento significativo a en el grosor del endometrio. Al analizar la morfología celular se observa una hiperplasia endometrial y glandular, ya que las células muestran un mayor tamaño que las comparadas al grupo Control, así como también núcleos picnóticos con aumento de basofilia nuclear, a diferencia de los núcleos del grupo Control, los cuales se ven con cromatina más laxa. Las glándulas endometriales sintetizan, transportan y secretan sustancias esenciales para la supervivencia y el desarrollo del embrión, se localizan en el estrato superior funcional del endometrio rodeadas por estroma y por el estrato inferior basal enrolladas, ramificadas y rodeadas de estroma denso (Nanjappa et al., 2015). En el grupo *Letrozole* aumentan en número a más del triple y presentan formas irregulares comparadas con las del grupo Control aparte de un aumento en celularidad de núcleos picnóticos altamente basófilos. Todo esto correlaciona con las investigaciones realizadas anteriormente sobre el endometrio durante el SOP (Usandizaga-Pombo, 1966). En cuanto al grosor del colágeno se observa una disminución significativa muy notable, esto se sugiere está involucrado con la pérdida de funcionalidad del útero y problemas de implantación reportados durante el SOP (Wang et al., 2001; Giudice et al., 2006), ya que al haber una reducción en la cantidad de colágeno hay pérdida de la funcionalidad en el estiramiento y compactación del útero durante la gestación. Estas alteraciones celulares, así como la falta de colágeno pueden verse relacionadas con las anomalías encontradas en el miometrio, ya que al haber compactación celular no permite la correcta inervación e irrigación del tejido, impidiendo la correcta señalización en procesos de proliferación y diferenciación celular, así como la vascularización correcta del estroma endometrial (Nishikori, 2005). Todo esto correlaciona con la disminución de células positivas al receptor TRPV1 en las células del endometrio.

El grupo *Letrozole/Capsaicina* muestra una disminución significativa en el grosor del endometrio mostrado durante el SOP, y no muestra diferencia significativa con el grupo Control, lo cual demuestra que el tratamiento con capsaicina reduce el estado de hiperplasia endometrial durante el SOP. El análisis celular valida estos hechos demostrando una disminución en el tamaño celular, así como núcleos con cromatina laxa con similitud a los núcleos normales. El número de glándulas disminuye significativamente a casi la mitad del número de glándulas del grupo *Letrozole*, sin embargo, no llega a disminuir al nivel del grupo Control. Las formas irregulares mostradas durante el SOP disminuyen en el grupo administrado con *Capsaicina* y se muestra una morfología muy similar al grupo Control. El número de células positivas a TRPV1 aumenta de forma significativa, lo cual refuerza que la estimulación de los receptores TRPV1 de las fibras sensoriales con *Capsaicina* promueve la neuroangiogénesis en el SOP por medio del factor NGF y a su vez, este factor también, al unirse al receptor TrkA activa a los promotores P1 y P2 del receptor TRPV1 y con ello aumenta la transcripción del gen *trpv1* (Xin et al, 2011) y promueve el tráfico de los receptores TRPV1 del retículo endoplásmico a la membrana celular en células del útero, así como sucede el SNC (Ricu et al, 2008). Estudios anteriores demuestran la expresión de marcadores neuronales como con el NGF y el TRPV1 en el endometrio, por lo tanto, se sugiere que la estimulación de neuroangiogénesis también suceda de forma similar en el útero (Newman et al., 2013). En el 2003, Alatríste propuso el siguiente mecanismo sobre la participación del NGF en el tráfico de los receptores TRPV1 del RE a la membrana celular: El NGF a través de su receptor TrkA, permite la activación de la PI3K, PKC (Morenilla-Palao et al, 2004) y la proteína SRC, las dos primeras tienen sitios de fosforilación en los dominios C terminal (Vlachová et al, 2003) y la SRC en el dominio N-terminal de los receptores TRPV1 (Van Buren et al, 2005; Zhu y Oxford, 2009). La fosforilación de estos sitios permite que los receptores TRPV1 sean transportados a la membrana celular y capten estímulos extracelulares. La activación del TRPV1 activa la corriente de Ca^{2+} que a la vez activa a las proteínas calcio calmodulina quinasa II (CAMKII), a la PKC y a la PKA dependientes de Ca^{2+} , estas proteínas activan al factor de transcripción NF κ B, el cual promueve la transcripción de genes involucrados en los procesos de diferenciación y proliferación celular (Jara-Oseguera, et al, 2008; Vennekens, et al, 2008; Taylor, et al, 2009).

El epitelio ciliar uterino juega un rol importante en la secreción de fluidos endometriales que son importantes para la sobrevivencia y transporte del óvulo. El ritmo direccional de los cilios sugiere que la acción de los cilios es para facilitar la distribución de la secreción endometrial y para impulsar corrientes de fluidos dentro del útero. En el endometrio humano el porcentaje de células ciliadas aumenta durante la fase proliferativa del endometrio. En casos de hiperplasia endometrial con altos niveles de estrógenos se ha reportado un incremento significativo en el porcentaje de células ciliadas (Tachi et al., 1969).

En el epitelio ciliar del grupo *Letrozole* se observó un aumento significativo en el grosor de la capa, así como una semi-bicapa de células hiperplásicas con ausencia de microvellosidades y núcleos picnóticos. Sin embargo, no se muestra una disminución en las células positivas al receptor TRPV1. Este cambio morfológico del epitelio se sugiere está relacionado con los problemas de implantación reportados en pacientes con SOP, ya que en la ausencia de microvellosidades no hay corrientes de fluidos dentro del útero que puedan ayudar a la motilidad del espermatozoide ni a la implantación del óvulo si llegase a ser fecundado (Giudice et al., 2006). En el grupo *Letrozole/Capsaicina* se observa una disminución significativa en el grosor de la capa comparado al grosor del grupo *Letrozole*, sin embargo, la disminución fue tal que es más delgada que el grupo Control. Del análisis celular podemos observar una reorganización de las células en una monocapa de células cuboidales con

núcleos con cromatina laxa y presencia de microvellosidades, esta morfología celular es muy parecida a la de un epitelio sano. El número de células positivas al receptor TRPV1 se vio aumentado en comparación al Control y *Letrozole*, sin embargo, este aumento no llegó a ser significativo. La presencia de microvellosidades sugiere que el epitelio ciliar ha recobrado su funcionalidad para distribuir la secreción endometrial, sin embargo, para demostrar su funcionalidad correcta es necesario realizar más estudios como lo es probar la capacidad de implantación del útero.

8. CONCLUSIONES

El tratamiento con *Capsaicina* mostró ser benéfico ya que:

- Disminuyó el grosor del útero, en especial del endometrio y epitelio ciliar.
- Disminuyó la hiperplasia endometrial, así como disminuyó el número de glándulas endometriales y modificó su tamaño y la forma irregular de las estructuras durante el SOP, indicadores de mejoría y factor positivo para la prevención del cáncer endometrial.
- Aumentó el número de células positivas al receptor TRPV1 en el perimetrio, endometrio y epitelio ciliar.
- Las células del epitelio ciliar mostraron una monocapa de células ciliadas lo cual sugiere devolver la funcionalidad del epitelio.

9. PERSPECTIVAS

- Se sugiere probar varias dosis del tratamiento con *Capsaicina*, así como tiempo de exposición en cobayas Hartley o ratas Wistar.
- Se sugiere probar la capacidad de implantación del útero de los animales a tratar.

10. REFERENCIAS

- Abdel-Salam, O. M. Capsaicin as a therapeutic molecule. Cairo: Springer, 2014.
- Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome—a hypothesis. *J Endocrinol* 2002; 174:1–5.
- Agopyan, N. et al. Vanilloid receptor activation by 2- and 10 micrometer particles induces responses leading to apoptosis in human airway epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003 192, 21–35
- Aguado IL. Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microscopy Research and Technique*, 2002. 59:462-463
- Alatríste V, Herrera-Camacho I, Martínez MI, Limón ID, González-Flores O, Luna F. Sensory denervation with capsaicin reduces ovarian follicular development and delays the onset of puberty in guinea pigs. *Advances in Reproductive Sciences*, 2013. 1(3); 29-37.
- Alatríste V., Paiz-Candia Bertin, M. Jiménez, E. Barrientos, O. Martínez, M. Torres-Soto MI. Martínez, ID. Limón, Luna Félix. Parámetros reproductivos en las cobayas *Cavia porcellus* del Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2009. *Divulgación y Ciencia de los Animales de Laboratorio*. 4. 8-13.
- Asunción, M., Calvo, R.M., San Millán, J.L., Sancho, J., Avila, S., Escobar-Morreale, H.F. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected caucasian women from Spain I. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000 85 (7), 2434–2438.
- Azziz, R. PCOS: a diagnostic challenge. *Reprod. Biomed. Online* 2004 8 (6), 644–648.
- Azziz R, Dewailly D, Owerbach D. Clinical review 56: Nonclassic adrenal hyperplasia: current concepts. *Clin Endocrinol Metab* 1994;78: 810–815.
- Badawy A, Elnashar A. Treatment options for polycystic ovary syndrome. *Int J Womens Health*. 2011;3(1):25-35.
- Barry JA, Azizia MM, Hardiman PJ. Risk of endometrial, ovarian and breast cancer in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2014;20:748–58.
- Becchetti, A.; Arcangeli, A. Integrins and ion channels in cell migration: Implications for neuronal development, wound healing and metastatic spread. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010, 674, 107–123.
- Birder, L.A. et al. Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001 98, 13396–13401
- Bitzinger, N. *Abdominale Sonographie beim Meerschweinchen (Cavia aparea. Porcellus 1758)*. Munich: Ludwig-Maximilians-Universität München, 2008
- Bodó, E. et al. A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control. *Am. J. Pathol.* 2005 166, 985–998

- Bonnington KF y McNaughton AP. Signaling pathways involved in the sensitization of mouse nociceptive neurons by nerve growth factor. *Journal of Physiology*, 2003. 551(2); 433-446.
- Bozdag, G., Mumusoglu, S., Zengin, D., Karabulut, E., Yildiz, B.O. The prevalence and phenotypic features of polycystic ovary syndrome: a systematic review and metaanalysis. *Hum. Reprod*, 2016
- Brauer, M. M. & Smith, P. G. Estrogen and female reproductive tract innervation: cellular and molecular mechanisms of autonomic neuroplasticity. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, 2015 187, 1–17.
- Brock, O., De Mees, C. and Bakker, J. (2015), Hypothalamic Expression of Oestrogen Receptor α and Androgen Receptor is Sex, Age and Region Dependent in Mice. *J Neuroendocrinol*, 27: 264-276.
- Burgoyne, L. A. The mechanisms of pyknosis: hypercondensation and death. 1999. *Experimental cell research*, 248(1), 214-222.
- Capiod, T. Cell proliferation, calcium influx and calcium channels. *Biochimie* 2011, 93, 2075–2079.
- Carazo-Hernández B, Lafalla-Bernad O, García-Simón R, Gascón-Mas E, Moreno-Romea E, Pérez-Ezquerro B. Calidad de vida relacionada con la salud en mujeres con ovario poliúístico. *Medisur [revista en Internet]*. 2014
- Caterina M, Schumacher M, Tominaga M, Rosen T, Levine J, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997; 389:816–824.
- Cernea María, Vasantha Padmanabhan, Robert L. Goodman, Lique M. Coolen, Michael N. Lehman, Prenatal Testosterone Treatment Leads to Changes in the Morphology of KNDy Neurons, Their Inputs, and Projections to GnRH Cells in Female Sheep, *Endocrinology*, Volume 156, Issue 9, 1 September 2015, Pages 3277–3291
- Cervero F. Laird J. Visceral pain. *Lancet* 1999; 353:2145-2148.
- Chaban VV. Visceral sensory neurons that innervate both uterus and colon express nociceptive TRPV1 and P2X3 receptors in rats. *Ethn Dis* 2008, 18 (2Suppl 2): S2-20-4. PMID: 18646315.
- Chapa Oliver AM, Mejía Teniente L. Capsaicin: from plants to a cancer-suppressing agent. *Molecules*. 2016;21(8):931.
- Charalampakis, V., A. A. Tahrani, A. Helmy, J. K. Gupta & R. Singhal. Polycystic ovary syndrome and endometrial hyperplasia: an overview of the role of bariatric surgery in female fertility: *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2016 v. 207, p. 220226.
- Chiliquinga Villacis, Sixto, Aguirre Fernández, Roberto, Agudo Gonzabay, Maritza, Chú Lee, Ángel, & Cuenca Buele, Sylvana. Criterios diagnósticos y tratamiento integral terapéutico del síndrome de ovarios poliúísticos. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 2017 43(3), 173-181.

- Corbin CJ, Trant JM, Walters KW, Conley AJ. Changes in testosterone metabolism associated with the evolution of placental and gonadal isozymes of porcine aromatase cytochrome P450. *Endocrinology* 1999;140:5202–5210.
- De Clercq, K.; Held, K.; Van Bree, R.; Meuleman, C.; Peeraer, K.; Tomassetti, C.; Voets, T.; D’Hooghe, T.; Vriens, J. Functional expression of transient receptor potential channels in human endometrial stromal cells during the luteal phase of the menstrual cycle. *Hum. Reprod.* 2015, 30, 1421–1436.
- Deliot, N.; Constantin, B. Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration. *Biochim. Biophys. Acta* 2015, 1848, 2512–2522.
- Diogenes A, Patwardhan MA, Jeske AN, Ruparel BN, Goffin V, Akopian NA y Hargreaves MK. Prolactin modulates TRPV1 in female rat trigeminal sensory neurons. *The Journal of Neuroscience*, 2006. 26(31): 8126-8136
- Dray A, Urban L, Dickenson AH. Pharmacology of chronic pain. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15:190-197.
- Erdost H, Özgüden-Akkoc GC, Özfiliz N, İlhan T y Tütüncü S. The histological investigation of the testes of mice after an application of capsaicin. *Veterinarski Arhiv*, 2009. 79(5): 509-516.
- Ernsberger U. Role of neurotrophin signaling in the differentiation of neurons from dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. *Cell Tissue Research*, 2009. 336: 349-384
- García Bermejo, Técnico especialista en Anatomía patológica del Servicio Gallego de Salud. 2006. España: Editorial Mad, S.L.
- Golech, S.A. et al. Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2004 132, 87–92
- Gottschau M, Kjaer SK, Jensen A, Munk C, Mellemkjaer L. Risk of cancer among women with polycystic ovary syndrome: a Danish cohort study. *Gynecol Oncol* 2015;136:99–103.
- Giudice LC. Endometrium in PCOS: implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006;20:235–44.
- Hasan Kafali, Mehmet Iriadam, İlyas Ozardali, Nurettin Demir. Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease. *Archives of Medical Research*, 2004 35: 103-108.
- H. Teede, A. Deeks, L. Moran, E. Diamanti-Kandarakis, C. Kouli, A. Bergiele, et al., Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan, *BMC Med.* 8 (2010) 41
- Hossain, M., & O'shea, J. The vascular anatomy of the ovary and the relative contribution of the ovarian and uterine arteries to the blood supply of the ovary in the guinea-pig. *Journal of Anatomy*, 1983 137(3),457-466.
- Jordt SE, Julius D. Molecular basis for species-specific sensitivity to “hot” chili peppers. *Cell*, 2002 108:421–430

- Kechagias, S. et al. Expression of vanilloid receptor-1 in epithelial cells of human antral gastric mucosa. *Scand. J. Gastroenterol.* 2005 40, 775–782
- Knight, P., & Glistler, C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development, *Reproduction*, 2006 132(2), 191-206.
- Kunert-Keil C, Bisping F, Krüger J y Brinkmeier H. Tissue-specific expression of TRP channel *Genomics*, 2006. 20; 7:159-173
- Lee MB, Lee SG, Jung ME, Choi CK y Jeung BE. Uterine and placental expression of TRPV6 gene is regulated via progesterone receptor- or estrogen receptor-mediated pathways during pregnancy in rodents. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2009.7:49-60.
- Leffler A, Fischer JM, Rehner D, Kienel S, Kistner K, Saur KS, Gavva RN, Reeh WP y Nau C. The vanilloid receptor TRPV1 is activated and sensitized by local anesthetics in rodent sensory neurons. *The journal of Clinical Investigation*, 2008. 118: 763-776
- Leonhardt, H., Gull, B., Kishimoto, K., Kataoka, M., Nilsson, L., Janson, P. O., ... Hellström, M. Uterine Morphology and Peristalsis in Women with Polycystic Ovary Syndrome. 2012. *Acta Radiologica*, 53(10), 1195–1201.
- Lishko PV, Procko E, Jin X, Phelps CB, Gaudet R. The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron*, 2007 54:905–918
- Luna F, Alatríste V, Barrientos E, Molina A, Escamilla-Weimann C, Limón ID, Martínez MI y González-Flores O. Nuevos moduladores del desarrollo celular en los ovarios de los mamíferos. *Mensaje Bioquímico-UNAM*, 2013. Vol. XXXVII: 225-240.
- Maharjan, R., Nagar, P. S., & Nampoothiri, L. Effect of Aloe barbadensis Mill. formulation on Letrozole induced polycystic ovarian syndrome rat model. 2010. *Journal of Ayurveda and integrative medicine*, 1(4), 273–279.
- March, W.A., Moore, V.M., Willson, K.J., Phillips, D.I., Norman, R.J., Davies, M.J. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum. Reprod.*, 2010 25 (2), 544–551.
- McCormick BA, Wilburn RD, Thomas MA, et al. Endometrial thickness predicts endometrial hyperplasia in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2011;95:2625 – 7
- McGee Elizabeth A., J. Aaron, Hsueh W., Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles, *Endocrine Reviews*, Volume 21, Issue 2, 1 April 2000, Pages 200–214.
- Megías M, Molist P, Pombal MA. Atlas de histología vegetal y animal. Órganos animales. 2019, Recuperado (fecha de consulta) de: http://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/guiada_o_a_inicio.php
- Messeguer A, Planells-Cases R y Ferrer-Montiel A. Physiology and pharmacology of the vanilloid receptor. *Current Neuropharmacology*, 2006. 4:1-15.
- Mossman, H. W. Comparative Anatomy. Biology of the Uterus. Elizabeth M. Ramsey (auth.), Ralph M. Wynn (eds.)-Biology of the Uterus-Springer US (1977) (1)19-34
- N. Egnud, A. M. Uterine and placental circulation in the guinea pig: an angiographic study. *Reprod. Fert.*, 1974 401-410.

- N. Madnani, K.Khan, P. Chauhan, G. Parmar, Polycystic ovarian syndrome, *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 79 (2013) 310–32
- Nanjappa, M. K., T. I. Medrano, A. G. March & P. S. Cooke, 2015, Neonatal uterine and vaginal cell proliferation and adenogenesis are independent of estrogen receptor 1 (ESR1) in the mouse: *Biol Reprod*, v. 92, p. 78
- Newman TA, Bailey JL, Stocker LJ, Woo YL, Macklon NS y Cheong YC. Expression of neuronal markers in the endometrium of women and those without endometriosis. *Hum Reprod*, 2013 28(9): 2502-2510. PMID:23820422.
- Nie J, Liu X y Guo SW. Immunoreactivity of oxytocin receptor and transient receptor potential vanilloid type 1 and its correlation with dysmenorrhea an adenomyosis. *Am J obstet Gynecol*, 2010 202(4): 346.e1-8.PMID:20096818,
- Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiology Reviews*. 2007; 87:165–217
- Nishikori M. Classical and alternative NF- κ B activation pathways and their roles in lymphoid Malignancies. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology*, 2005. 45(1):15-24.
- Pache TD, Chadha S, Gooren LJ, Hop WC, Jaarsma KW, Dommerholt HB, Fauser BC. Ovarian morphology in long-term androgentreated female to male transsexuals. A human model for the study of polycystic ovarian syndrome? *Histopathology* 1991;19:445–452.
- Paradisi Roberto, Raffaella Fabbri, Cesare Battaglia & Stefano Venturoli (2013) Ovulatory effects of flutamide in the polycystic ovary syndrome, *Gynecological Endocrinology*, 29:4, 391-395
- Patel, S. Polycystic ovary syndrome (PCOS), an inflammatory, systemic, lifestyle endocrinopathy. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2018 27-36.
- Pedersen, S. F., Owsianik, G., y Nilius, B. TRP channels: an overview. *Cell Calcium*. 2005; 38(3) 233-252.
- Poretsky L. On the paradox of insulin-induced hyperandrogenism in insulin-resistant states. *Endocr Rev* 1991;12:3–13.
- Pratip Chakraborty, S. K. Recurrent Pregnancy Loss in Polycystic Ovary Syndrome: Role of Hyperhomocysteinemia and Insulin Resistance. *Plos One*, 2013 5-12.
- Prescott ED, Julius D. A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science*, 2003 300:1284–1288
- Rai R, Backos M, Rushworth F, Regan L. Polycystic ovaries and recurrent miscarriage—a reappraisal. *Hum Reprod* 2000 15: 612–615.
- Ricu M, Paredes A, Greiner M, Ojeda SR y Lara HE. Functional development of the ovarian noradrenergic innervation. *Endocrinology*, 2008. 149(1): 50-56
- Ross, M. H. *Histología. Texto y Atlas color con biología celular y molecular*. Buenos Aires: Editorial Médica panamericana, S. A. 2008

- Rotterdam, E.A.-S.P.C.W.G. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum. Reprod. (Oxford)* 2004 19 (1), 41–47.
- S.M. Sirmans, K.A. Pate, Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome, *Clin. Epidemiol.* 6 (2013) 1–13.
- Spampinato, S., Trabucco, A., Biasiotta, A., Biagioni, F., Cruccu, G., Copani, A., Colledge, W. H., Sortino, M. A., Nicoletti, F., ... Chiechio, S. (2011). Hyperalgesic activity of kisspeptin in mice. *Molecular pain*, 7, 90.
- Shirasuna, K., & Iwata, H. Effect of aging on the female reproductive function. *Contraception and Reproductive Medicine*, 2017 2, 23.
- Smith St JE y Lewin RG. Nociceptors a phylogenetic view. *Journal Compilation Physiology*, 2009. 195; 1089-1106.
- Srinivasan K. Biological activities of red pepper (*Capsicum annuum*) and its pungent principle capsaicin: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016;56:1488-1500.
- Stander S, Moormann C, Schumacher M, Buddenkotte J, Artuc M, Shpacovite V, Brzoska T, Lippert U, Henz BM, Luger TA, Metze D, Steinhoff M. Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp Dermatol.* 2004;13:129–139.
- Stein, I.F., Leventhal, M.L. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1935 29, 181–191.
- Tachi, S., Tachi, C., and Lindner, H. H. Cilia-bearing stromal cells in the rat uterus. 1969 *J Anat.* 104, 295-308.
- Tominaga M y Tominaga T. Structure and function of TRPV1. *European Journal of Physiology*, 2005. 451: 143-150.
- Usandizaga-Pombo, J. M. Glandular hyperplasia of the endometrium: *Acta Gynaecol Obstet Hisp Lusit*, 1996 v. 15, p. 117-30 contd.
- Vennekins R, Owsianik G y Nilius B. Vanilloid Transient potential cation channels: an overview. *Current Pharmaceutical Design*, 2008. 14: 18-31
- Vellani V, Mapplebeck S, Moriondo A, Davis JB, McNaughton PA. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol.* 2001;534:813–825.
- Vitek, W., S. Alur & K. M. Hoeger. Off-label drug use in the treatment of polycystic ovary syndrome: *Fertil Steril*, 2015 v. 103, p. 605-11.
- Vriens, J. et al. TRP channels and modulation by hepatocyte growth factor/scatter factor in human hepatoblastoma (HepG2) cells. *Cell Calcium*, 2004. 36, 19–28
- Wagner, J. (2014). *The Biology of the Guinea Pig*. New York: Academic Press.
- Walters, K. A., The role of central androgen receptor actions in regulating the hypothalamic-pituitary-ovary axis. *Neuroendocrinology.* 2018: 106, 389-400.

- Wang JX, Davies MJ, Norman RJ. Polycystic ovarian syndrome and the risk of spontaneous abortion following assisted reproductive technology treatment. *Hum Reprod.* 2001;16:2606–9.
- Wei, C.; Wang, X.; Zheng, M.; Cheng, H. Calcium gradients underlying cell migration. *Curr. Opin. CellBiol.* 2012, 24, 254–261.
- Xu S, Cheng Y, Keast JR y Osborne BP. 17 β -Estradiol activates estrogen receptor β signalling and inhibits transient receptor potential vanilloid receptor 1 activation by capsaicin in adult rat nociceptors neurons. *Endocrinology*, 2008. 149(11):5540-5548
- Yildiz, B.O., Bozdag, G., Yapici, Z., Esinler, I., Yarali, H. Prevalence, phenotypeand cardiometabolic risk of polycystic ovary syndrome under di□erent diagnostic criteria. *Hum. Reprod.* 2012. 27 (10), 3067–3073.
- Zsombok A. Vanilloid receptors--do they have a role in whole body metabolism? Evidence from TRPV1. 2013. *Journal of diabetes and its complications*, 27(3), 287–292.