



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**



Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Farmacia

TESIS PROFESIONAL

**EFECTO DE LA CAPSAICINA
ADMINISTRADA EN LA BOLSA OVÁRICA
SOBRE EL DESARROLLO FOLICULAR Y
LA PUBERTAD DE LA COBAYA**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Presenta

Irene Mora López

Directores de tesis

MC. Félix Luna Morales, Laboratorio de Neuroendocrinología, FCQ-BUAP
Dr. Victorino Alatríste Bueno, Laboratorio de Neuroendocrinología, FCQ-BUAP

Puebla, Pue, 14 de Diciembre de 2015

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado con los fondos otorgados al cuerpo académico de Farmacia Experimental por la dirección de planeación institucional y el proyecto VIEP NAT-2015. Los experimentos fueron realizados en el laboratorio de Neuroendocrinología, FCQ-BUAP y las fotografías fueron capturadas en el laboratorio de Neurofarmacología de la FCQ-BUAP del Dr. I. Daniel Limón Pérez de León.



A mis directores de tesis MC. Felix Luna Morales y Dr. Victorino Alatriste Bueno por su incondicional apoyo en la realización de este proyecto y por brindarme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Neuroendocrinología, así como a la comisión revisora conformada por el Dr.I.Daniel Limón Pérez De León, Dra. María Isabel Martínez García y Dr. Carlos Escamilla Weinmann por sus comentarios enriquecedores.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Características fisiológicas del sistema reproductor de la cobaya	1
1.2 Pubertad en los mamíferos	1
1.3 Microambiente del ovario en los mamíferos	4
1.4 Desarrollo folicular en los ovarios	6
1.5 Características moleculares de los receptores TRPV1	8
1.6 Vías de señalización activadas por los receptores TRPV1	11
1.7 El desarrollo folicular y la pubertad mediados por los receptores TRPV1	12
2. JUSTIFICACIÓN	15
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVO GENERAL	16
4.1 Objetivos particulares	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1 Animales de experimentación	17
5.2 Grupos experimentales	17
5.3 Administración de la capsaicina en la bolsa ovárica	17
5.4 Registro de la primera apertura vaginal	18
5.5 Obtención de las muestras	18
5.6 Inclusión de las muestras en parafina	19
5.7 Número de folículos ováricos	19
5.8 Inmunohistoquímica para los receptores TRPV1	20
5.9 Número de células TRPV1-positivas	20
5.10 Pruebas estadísticas	20

6. DIAGRAMA DE TRABAJO	22
7. RESULTADOS	24
7.1 Folículos en los ovarios de las cobaya Hartley	24
7.2 Primera apertura vaginal, peso corporal y peso de los ovarios de las cobayas administradas con capsaicina a los 10 días de edad	25
7.3 Folículos ováricos de las cobayas administradas con capsaicina en la bolsa ovárica a los 10 días de edad	25
7.4 Localización por inmunohistoquímica de las células TRPV1-positivas en los folículos ováricos	28
7.5 Células TRPV1-positivas en los folículos ováricos de las cobayas administradas con capsaicina la bolsa ovárica a los 10 días de edad	33
8. DISCUSIÓN	35
9. CONCLUSIÓN	39
10. REFERENCIAS	40
11. APÉNDICE	46

ABREVIATURAS

Bcl-2: Familia de proteínas que regulan procesos de apoptosis celular.

BDGF: Factor de crecimiento derivado del cerebro

CaMKII: Calmodulina quinasa dos dependiente de calcio

CGRP: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

DRG: Ganglios de la raíz dorsal

FAS: Folículos antrales sanos

FAA: Folículos antrales atrésicos

FPS: Folículos preantrales sanos

FPA: Folículos preantrales atrésicos

FSH: Hormona estimulante del folículo

GABA: Ácido amino- γ -butírico

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

GDNF: factor neurotrófico derivado de la glía

IGF-1: Factor de crecimiento derivado de la insulina tipo 1

LH: Hormona luteinizante

L2-5: Segmentos lumbares 2-5

NGF: Factor de crecimiento nervioso

NOS: Nervio ovárico superior

PAV: Primera apertura vaginal

PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa

PKA: Proteína quinasa A

PKC: Proteína quinasa B

PLC: Proteína lipasa C

PIP2: Fosfatidilinositol difosfato

P53: Proteína supresora tumoral

SNC: Sistema nervioso central

SP: Sustancia P

TrKA: Receptor del factor de crecimiento nervioso de alta afinidad

TrkB: Receptor del factor de crecimiento derivado del cerebro

TNF: factor de necrosis tumoral

TRPV1: Receptor a vanilloides de potencial transitorio tipo 1

VIP: Péptido intestinal vasoactivo

Src: proteína quinasa Src

Resumen

La capsaicina modula al receptor a vanilloides de potencial transitorio tipo 1 (TRPV1), este receptor se encuentra en varios tipos de células y se ha visto involucrado en la proliferación celular de diversos órganos. En los ovarios de las cobayas Hartley la capsaicina administrada por vía subcutánea a dosis altas 0.03 M retrasa la edad de la primera apertura vaginal (PAV) y disminuye el desarrollo folicular. La administración de capsaicina en la bolsa ovárica a concentraciones (1nM, 10 nM y 1 µM) no afecta al sistema de regulación hipotálamo-hipófisis-ovario, es decir no modifica la edad de la PAV, las concentraciones 1nM y 10 nM estimulan el desarrollo folicular ovárico disminuyendo la atresia folicular, mientras que la concentración 1 µM produce atresia folicular provocando disminución de la proliferación celular ovárica. Los efectos evaluados provocados por la administración local de capsaicina, muestran que la modulación de TRPV1 y su respuesta hacia la maduración sexual y el desarrollo folicular, depende de la vía de administración y la concentración administrada.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características fisiológicas del sistema reproductor de la cobaya

Los cobayos, conejillos de indias o “guinea pig” son considerados como buenos modelos de experimentación en comparación con las ratas y ratones debido a que sus sistemas funcionan de manera similar a los sistemas humanos. Específicamente, el sistema reproductor de las cobayas se caracteriza por ser un ciclo estral largo, dura 16-17 días en promedio, el cuerpo lúteo funciona por 12 días, hay ovulación espontánea. Además, los animales al momento de nacer ya tiene alto desarrollo del sistema nervioso y muscular. Estas características son similares a los mamíferos de mayor talla como los cerdos, las cabras, los primates no humanos y los humanos (Sadeu et al., 2007; Alatraste et al., 2009; Sun et al., 2014). Añadiendo a esto, la PAV ocurre a los 35-38 días de edad, alcanzado su madurez sexual plena a los 90 días de edad, después de 3 ciclos estrales. Durante el periodo infantil, juvenil y prepuberal, el canal vaginal de las cobayas permanece cerrado por la membrana vaginal y el rompimiento de ella marca el inicio del primer estro, posteriormente solo se abre en el periodo del estro (3 días) y durante el parto. Cabe señalar que durante el ciclo estral, el periodo de diestro dura 12 días (Alatraste et al., 2009). En las cobayas, la preñez dura 70 días, y el número de crías es 3 en promedio (Wang et al, 2010). Al nacer, las crías tienen excelente control motor, incluso ingieren alimento sólido de los adultos. Estas características anatómicas y de conducta sugieren alto nivel de desarrollo en sus sistemas fisiológicos.

1.2 Pubertad en los mamíferos

La pubertad es el periodo de la vida de los mamíferos que ocurre entre la infancia y la edad adulta para alcanzar la madurez sexual. Esta etapa del desarrollo se caracteriza por aumento de las hormonas sexuales, por cambios corporales y cambios conductuales. En el periodo prepuberal inicia la maduración del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, este suceso es marcado por el cambio en el patrón de secreción de la hormona GnRH como consecuencia de la activación de diversos neurotransmisores como glutamato, noradrenalina, ácido gamma amino butírico (GABA) dopamina y péptidos como neuropéptido Y (NPY), entre otros. Además, participan células gliales que favorecen la secreción de GnRH por medio de diversos factores de crecimiento y prostaglandinas que disminuyen el tono inhibitorio del GABA (Ojeda, 2000). La secreción de GnRH es en forma de pulsos y su duración e

intensidad dependen la secreción del estradiol y de la interacción de los diversos neurotransmisores. Cuando las células de la hipófisis son estimuladas por la GnRH producen la secreción pulsátil de la FSH y de la LH, hormonas que actúan sobre las células de los ovarios a través de receptores específicos y estimulan la secreción de estradiol y progesterona. El incremento del estradiol circulante en el plasma es responsable de la apertura vaginal que ocurre en la pubertad de los roedores. Además, el estradiol contribuye al desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, específicamente, al crecimiento de los órganos como los ovarios, útero y glándulas mamarias. Otros reguladores de la función de los ovarios son los nervios simpáticos, nervios parasimpáticos y fibras peptidérgicas. Los primeros llegan a través del NOS, mientras que los segundos lo hacen a través del plexo ovárico (Morales-Ledesma et al., 2015). Los nervios sensoriales del ovario contienen varios transmisores como la SP, VIP y CGRP (Morales-Ledesma et al., 2015). El VIP y la noradrenalina, a través de receptores β_2 en las células de los folículos estimulan la producción de andrógenos, de estradiol y de progesterona y éstas en el desarrollo de los folículos (Figura 1). En el cerebro, influyen en la secreción de GnRH por el asa de regulación positiva y facilitan la conducta sexual (Sisk y Foster, 2004). También se ha reportado que la producción de GnRH depende de las condiciones fisiológicas en las que se encuentre el individuo, es decir, en animales ovariectomizados al nacimiento se mantiene concentración baja de esteroides, sin embargo al llegar la pubertad, los niveles de esteroides incrementan de la misma manera que en los animales intactos (Sisk y Foster, 2004), lo que ha sugerido que el inicio de la pubertad no depende únicamente de los picos de esteroides producidos por el ovario, sino de la regulación de del sistema nervioso central.

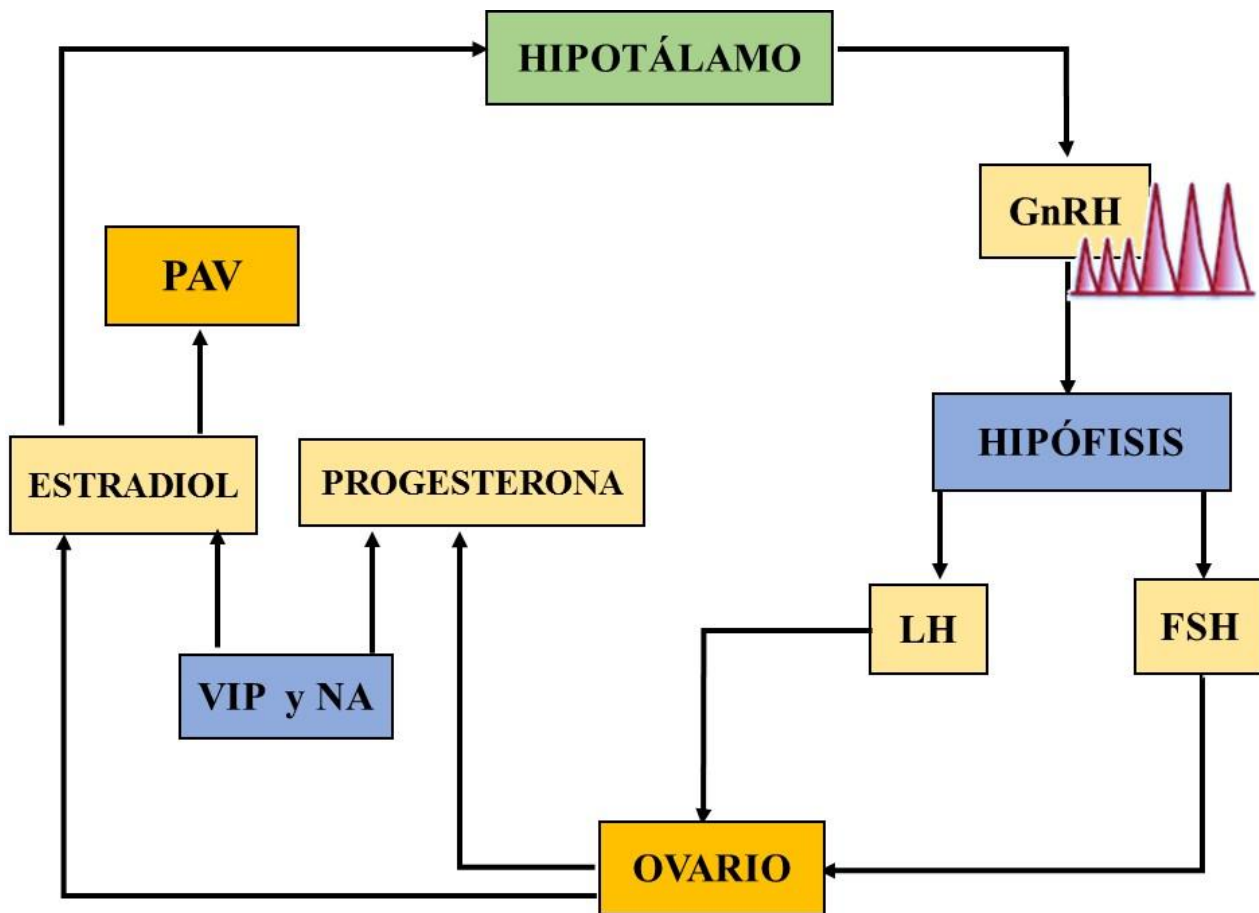


Figura 1. Esquema de la regulación de la pubertad por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. La secreción de GnRH por el hipotálamo depende de estradiol, lo que da lugar a la señalización a la hipófisis para secretar FSH y LH, las cuales ejercen su acción en las células del ovario. El incremento del estradiol circulante es el responsable de la primera apertura vaginal (PAV) en los roedores. Además, la secreción de esteroides se regula por los nervios a través de VIP y noradrenalina que a su vez producen la liberación de andrógenos, de estradiol y de progesterona (Modificado de Ojeda, 2000).

1.3 Microambiente del ovario en los mamíferos

En los mamíferos, los ovarios están cubiertos por una membrana delgada que se fusiona con el oviducto llamada bolsa ovárica. La bolsa ovárica protege al ovario del entorno peritoneal y proporciona una cámara llena de fluido que forma un microambiente específico de los ovarios. La bolsa ovárica contiene líquido extracelular que aumenta sustancialmente al acercarse la ovulación, además desempeña un papel activo en la homeostasis de los fluidos locales alrededor del ovario. Esta estructura es dinámica habiendo absorción y drenaje de fluidos que ingresan a ella para el desarrollo de los ovocitos y la producción de hormonas, también drena líquido del sistema linfático (Figura 2), (Luna et al., 2003; Zhang et al., 2013).

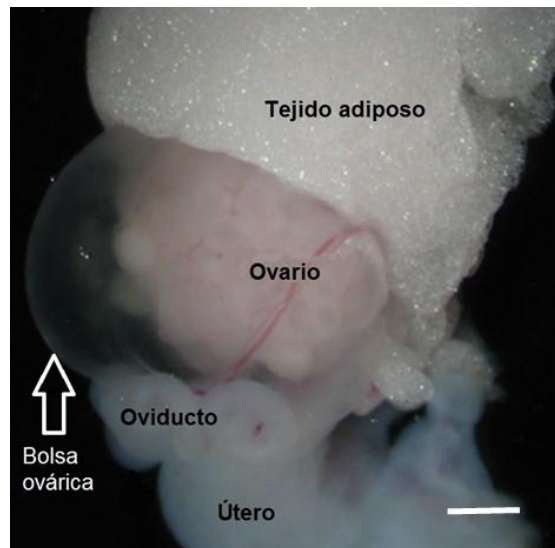


Figura 2. Fotografía del ovario de ratón con su bolsa ovárica. La bolsa ovárica protege al ovario del entorno peritoneal y proporciona una cámara que contiene fluido constituyendo un microambiente de los ovarios. La bolsa ovárica regula la absorción y drenaje de fluidos que ingresan a ella para el desarrollo de los ovocitos y la producción de hormonas. Escala 1 mm. (Tomada de Zhang et al., 2013).

El ovario tiene dos zonas; la médula y la corteza, en la corteza se encuentran los folículos primordiales y folículos en desarrollo. El número y tamaño de ellos varía dependiendo de la edad y del estado reproductivo de la hembra. La presencia de folículos de diferente tamaño refleja cambios internos, asociados a su crecimiento y desarrollo. Es importante señalar que los nervios simpáticos, colinérgicos y sensoriales están en contacto con los ovarios y están involucrados en la foliculogénesis, en el desarrollo folicular y en la

atresia. Las fibras sensoriales son fibras C y $A\delta$ y regulan el crecimiento de los folículos, incluso algunas de ellas están en la teca de los folículos (Luna y Martínez, 2005), También se encuentran entre las células del tejido intersticial y cercanas a los vasos sanguíneos (Zik et al, 2010).

Durante el desarrollo de los folículos hay proliferación de las células de la teca, de las células de la granulosa y ocurre la formación del antro, es espacio lleno de líquido que se forma entre las células de la granulosa. El líquido del antro contiene hormonas esteroides, diversas proteínas con diferentes funciones, proteoglicanos y electrolitos, las proteínas del plasma y las gonadotropinas llegan al líquido del antro por difusión de líquidos vasculares (Luna y Martínez, 2005). En el folículo ovárico, no hay drenaje del fluido folicular, por tanto, el líquido se acumula conforme aumenta el volumen del antro. La formación de líquido folicular comienza al aumentar la vascularización de la teca, con aumentos en la presión de la sangre y con aumento del flujo en los capilares cercanos a la teca. El líquido folicular pasa al antro cruzando el endotelio capilar, la lámina basal y el intersticio de la granulosa folicular (Figura 3) (Rodgers e Irving, 2010).

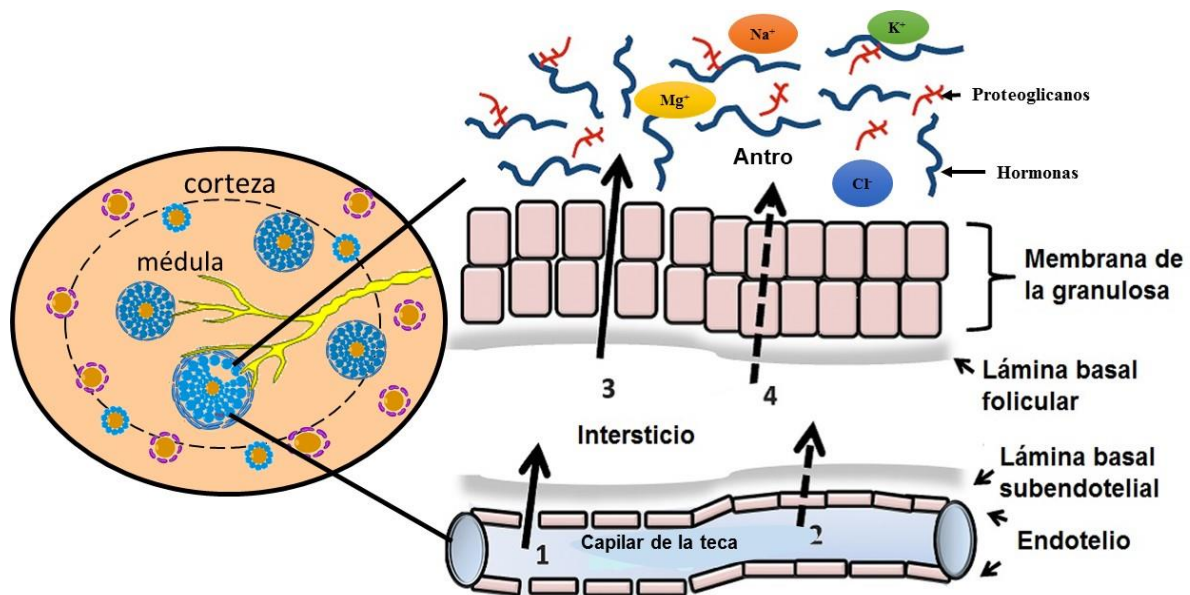


Figura 3. Esquema del ovario. En los folículos desarrollados, el líquido antral puede viajar a él cruzando el endotelio, la lámina basal subendotelial, intersticio, lámina basal folicular y la granulosa. Las rutas 1 y 3 muestran el movimiento de líquido entre las células (flechas continuas), mientras que las rutas 2 y 4 muestran rutas transcelulares (flechas discontinuas) (Modificado de Rodgers e Irving, 2010).

1.4 Desarrollo folicular en los ovarios

El desarrollo folicular inicia con la transformación del folículo primordial a folículo primario, a folículo secundario, a folículo terciario y finalmente a folículo preovulatorio (Erickson, 1995; Loffler y Koopman, 2002). La primera fase, se denomina preantral, es independiente de las gonadotropinas y se caracteriza por el crecimiento y la diferenciación del ovocito. La segunda etapa del desarrollo es denominada antral, es dependiente de gonadotropinas y hay enorme aumento del tamaño del folículo (Erickson, 1995). Los folículos primordiales tienen una capa de células planas que rodean al ovocito. Después, las células planas se transforman a cúbicas y el ovocito adquiere su tamaño final dando estructura al folículo primario. De este estadio se diferencian a folículos secundarios, formados por varias capas de células de la granulosa, algunas de ellas empiezan a diferenciarse en células de la teca interna y teca externa. El folículo terciario incrementa drásticamente de volumen por la formación del antro, espacio que contiene al líquido folicular que está entre las células de la granulosa (Figura 4). Durante el desarrollo folicular es crucial la división de las células de la granulosa y la expansión del antro, fenómenos que contribuyen a la formación de los folículos preovulatorios (Erickson, 1995; Van den Hurk y Zhao, 2005).

Durante la maduración de los folículos también ocurre la selección folicular. En ella aumenta la síntesis de estradiol y la transcripción del receptor de LH en las células de la granulosa. La dominancia de los folículos se adquiere por el tamaño, por la mayor producción de estradiol y por el crecimiento continuo del folículo a pesar de bajas concentraciones sistémicas de FSH. El folículo dominante también adquiere la capacidad para suprimir el crecimiento de otros folículos, se trata de una dominancia funcional. Por el contrario, los folículos que sufrirán atresia no producen estradiol (Austin et al., 2001). La apoptosis de las células de la granulosa puede ser un evento tardío y fallido del desarrollo folicular, ocurre al cesar el crecimiento del folículo y de la producción de estradiol. La producción de estradiol y progesterona en el ovario ocurre en las células de la granulosa y en las células tecales de los folículos en desarrollo. El estradiol se sintetiza de forma creciente hasta el momento de la ovulación, después disminuye su concentración plasmática. Cabe señalar que los niveles bajos de estradiol se acompañan del incremento de progesterona. Las células de la teca de los folículos producen alta cantidad de andrógenos y la aromatización de ellos se da en las células de la granulosa convirtiéndose a estradiol (Baker y Spears, 1999). Otros promotores del

desarrollo folicular son la FSH y la LH. La primera estimula la producción de estrógenos en las células de la granulosa a través de sus receptores específicos, mientras que la segunda (LH) actúa sobre las células de la teca induciendo la ovulación y la luteinización de los folículos. Cuando se altera el equilibrio entre estas dos hormonas (LH y FSH) aumenta la producción de andrógenos, aumenta la atresia folicular y la infertilidad de los animales. Existen dos tipos de atresia; atresia tipo A y atresia tipo B. En la atresia tipo A, el ovocito degenera por apoptosis, mientras que en la atresia tipo B degeneran las células de la granulosa. La atresia A es común en los folículos preantrales mientras que la atresia B afecta a los folículos antrales (Luna y Martínez, 2005). La apoptosis de las células foliculares del ovario se activa por las caspasas 3 y 9, p53, ciclinas y Bcl-2, entre otros. Es importante mencionar que el destino de la mayoría de los folículos es la atresia (Flores et al, 2005), sin embargo existen factores de crecimiento involucrados en la supervivencia folicular como el factor de crecimiento nervioso (NGF), un factor que también modula a los receptores TRPV1 (Luna et al, 2015).

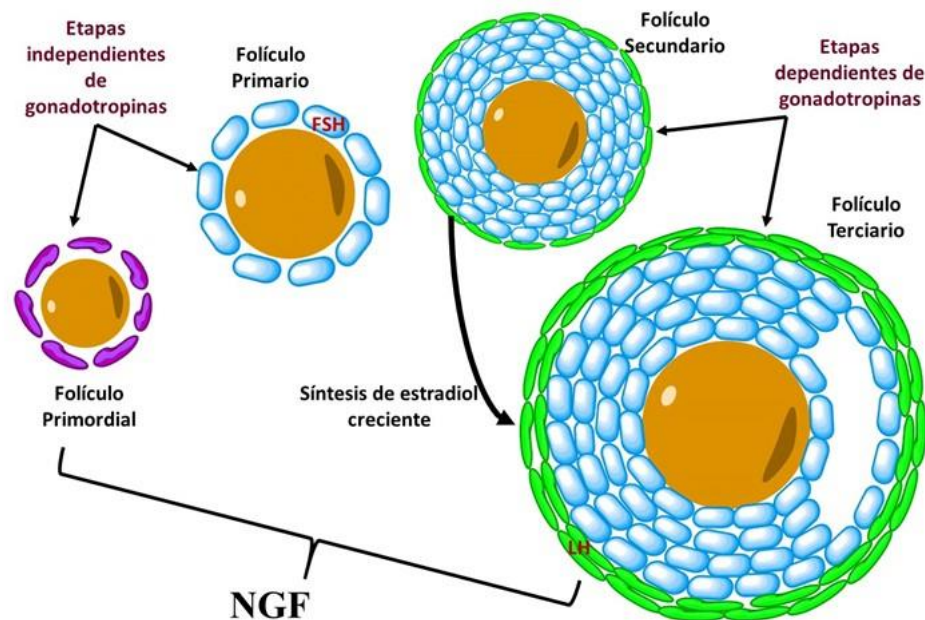


Figura 4. Esquema de folículos en diferentes estados del desarrollo. Los folículos primordiales tienen una capa de células planas que rodean al ovocito. Posteriormente, las células planas se transforman a esféricas formando al folículo primario. La diferenciación continúa a folículos secundarios con varias capas de células de la granulosa y células tecales alargadas. El folículo terciario incrementa de volumen por la presencia del antro, espacio que contiene al líquido folicular que está entre las células de la granulosa. Los folículos secundario y terciario dependen de las gonadotropinas y sintetizan estradiol en cantidades cada vez mayores, el estradiol es esencial para la supervivencia del folículo.

1.5 Características moleculares de los receptores TRPV1

Los receptores TRPV1 están conformados por 6 subunidades transmembranales, una proteína con grupos amino y carboxilo terminal en el espacio intracelular. La proteína existe como monómero o tetrámero y responde tanto a estímulos físicos de temperatura mayor a 43 grados Celsius y a estímulos químicos como la acidez con pH de 5.5 (Holzer, 2008). Las subunidades del receptor forman un canal catiónico no selectivo con alta permeabilidad al calcio (Figura 5). Los receptores TRPV1 se expresan tanto en las terminales nerviosas periféricas como en las terminales centrales de la las fibras C y A δ (Venkatachalam y Montell, 2007; Gunthorpe y Chizh, 2009; Xia et al., 2011).

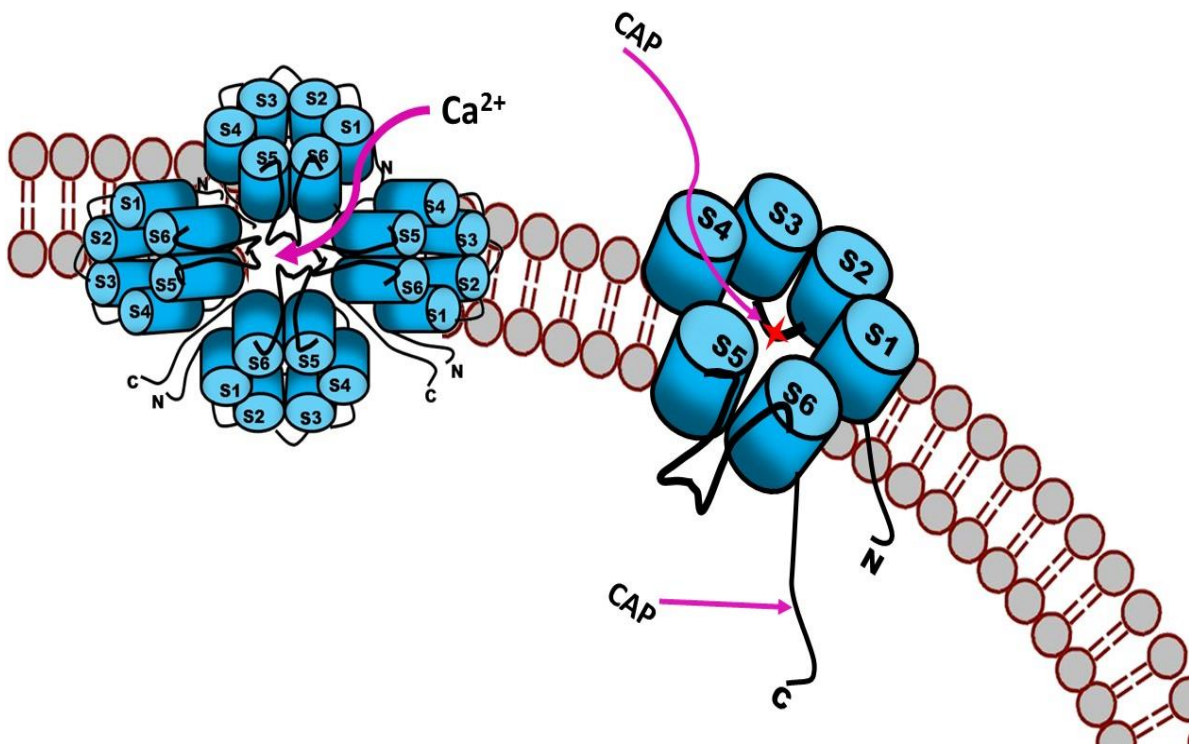


Figura 5. Esquema de los monómeros o tetrámeros del receptor TRPV1. El receptor TRPV1 posee 6 subunidades transmembranales con grupos amino y carboxilo terminales en el citoplasma. Entre la subunidad 5 y 6 se forma el canal de calcio, mientras que los sitios de unión a vanilloides se encuentran entre la segunda y tercera subunidad del receptor en el segmento carboxilo terminal.

La capsaicina (8-metil-N-vainillil-6-nonenamida) es el vanilloide más abundante y potente de la especie de *Capsicum* (Figura 6) (Cases et al., 2011) que activa la corriente de calcio de los receptores TRPV1 (Surowy et al., 2010). Se ha reportado que el receptor TRPV1 tiene dos sitios de unión a vanilloides (Pingle et al., 2007; Xia et al., 2011), uno se encuentra entre la subunidad 2 y 3, específicamente, en los residuos tirosina 511 y serina 512 y el otro en el dominio C-terminal de la proteína (Pingle et al., 2007).

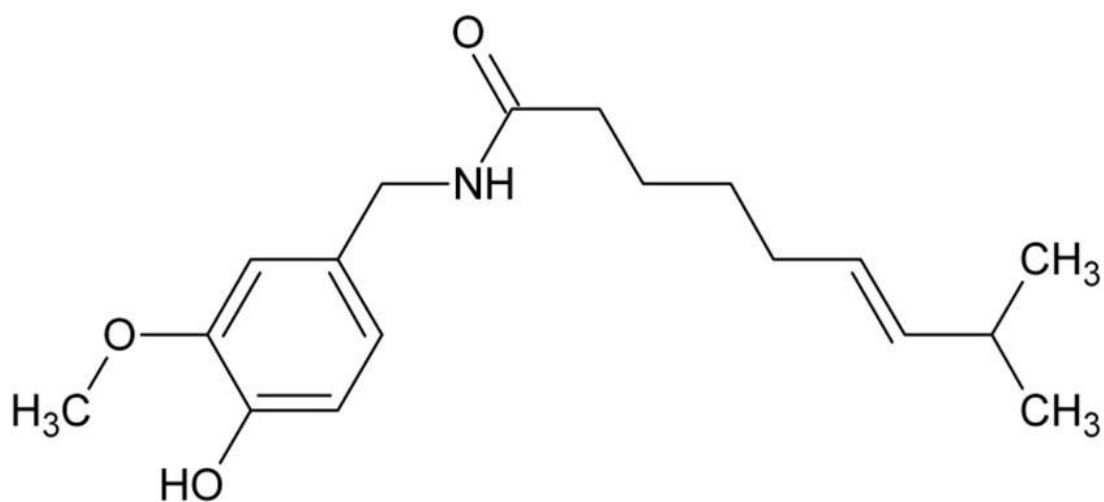


Figura 6. Molécula de capsaicina (IUPAC, 8-Metil-N-vainillil-6-nonenamida). Es una molécula con propiedades lipofílicas.

Se ha reportado que las células CHO en cultivo expresan los receptores TRPV1 y que la actividad del canal depende de la concentración de capsaicina probada. Con 1 nanomolar de capsaicina ya hay activación de la corriente de calcio, la cual aumenta con 10 nanomolar llegando a un máximo de respuesta con 1 micromolar, por tanto la activación de la corriente del receptor TRPV1 es dependiente de la concentración de capsaicina (Figura 7) (Cases et al., 2011).

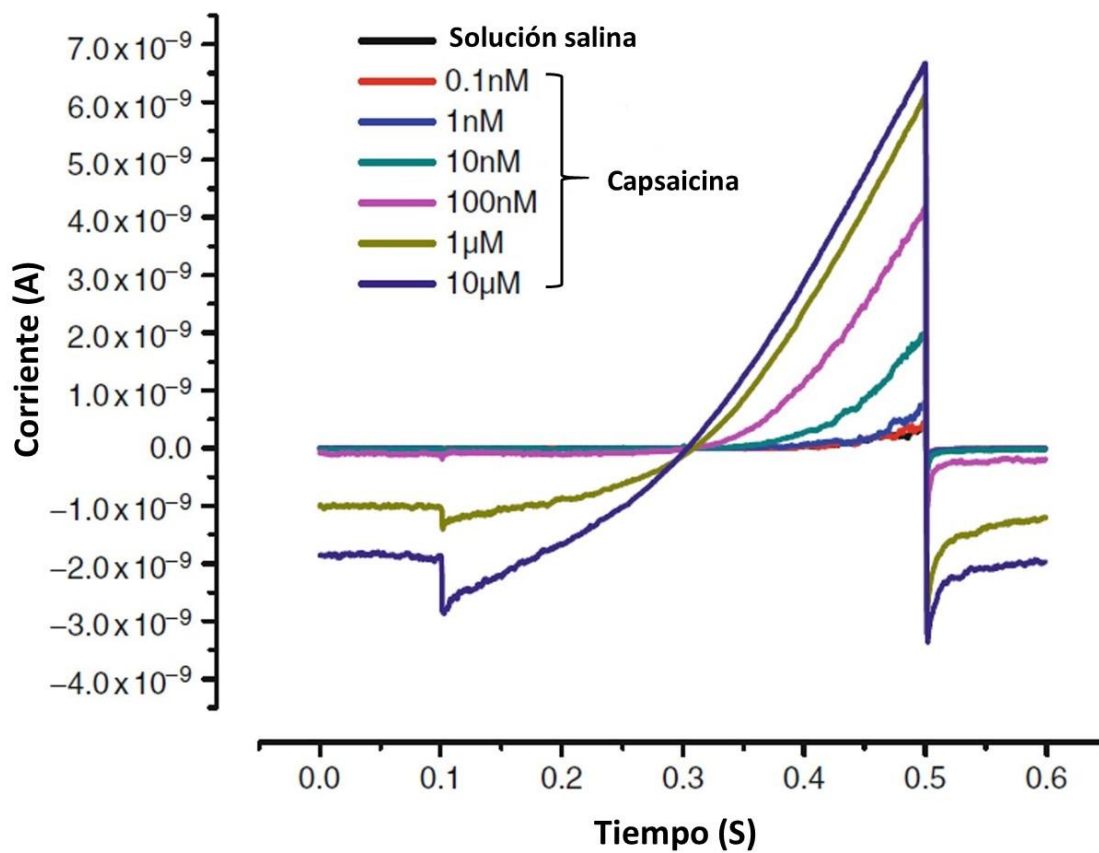


Figura 7. Activación de corrientes del canal TRPV1 moduladas por la capsaicina. Las corrientes eléctricas (A) aumentan según la concentración de capsaicina (Cases et al., 2011).

1.6 Vías de señalización activadas por los receptores TRPV1

En el espacio intracelular, la función de los receptores TRPV1 se modula por PKA, PKC, CaMKII y Src (Pingle et al., 2007; Surowy et al., 2010; Xia et al., 2011). Las respuestas provocadas por la activación de los receptores TRPV1 pueden ser la sensibilización, la desensibilización y la taquifilaxia, todas estas respuestas celulares son dependientes de calcio. La sensibilización ocurre cuando el receptor TRPV1 está en reposo en donde la proteína está fosforilada. Mientras que, la desensibilización ocurre con la activación del canal por la estimulación de un agonista a alta concentración y la taquifilaxia se presenta cuando la respuesta disminuye y los receptores TRPV1 se someten a aplicaciones repetidas y breves de un estímulo. La capsaicina interactúa con los receptores TRPV1 en los sitios de unión a vanilloides intracelulares. La calcineurina, una fosfatasa activada por Ca^{2+} , media la desfosforilación y produce desensibilización de los receptores TRPV1. También, la fosforilación de la PKA reduce la desensibilización de los receptores TRPV1, mientras que la respuesta de los receptores TRPV1 que se obtiene por la aplicación de capsaicina también activa a la PKA (Pingle et al., 2007; Xia et al., 2011).

Otra vía de regulación es mediada por el PIP2 en la membrana que activa a los receptores TRPV1. A baja concentración de capsaicina, el PIP2 inhibe parcialmente a los receptores TRPV1, mientras que la hidrólisis de ellas por la PLC los activa. A concentración más alta de agonista, el PIP2 activa a los receptores TRPV1, mecanismo importante para mantener la actividad del canal. El equilibrio entre los efectos inhibidores y excitadores del PIP2 depende de la estimulación al receptor (Surowy et al., 2010; Cases et al., 2011; Xia et al., 2011). La activación de los receptores TRPV1 se debe a la fosforilación de las quinasas, un fenómeno mediado por la PKC. Además, la PKC modifica directamente el canal y sensibiliza la respuesta ante los agonistas. La PKC a su vez activa a la proteína Src quinasa, quien regula positivamente la actividad del canal iónico del receptor TRPV1 por vía de la fosforilación de tirosina (Pingle et al., 2007; Xia et al., 2011).

También se ha reportado que el NGF aumenta la expresión de los receptores TRPV1 aumentando su transporte desde las membranas intracelulares del retículo endoplásmico y las vesículas hasta la membrana celular (Surowy et al., 2010). Se sugiere que el NGF se une a los receptores TrkA/p75 lo que conduce a la activación de la PLC y a la hidrólisis de PIP2 activando a la PKC y el consiguiente translocación de los receptores TRPV1 a la membrana

celular (Pingle et al., 2007; Cases et al., 2011). El NGF también activa a la PI3K, a la PKC y a la CaMKII provocando cascadas de señalización intracelular que incrementan la apertura del canal de los receptores TRPV1. La señalización mediada por PI3K activa a la quinasa Src que a su vez fosforila a los receptores TRPV1 e induce su translocación a la membrana celular. Al igual que el NGF, el IGF-1 aumenta la translocación de los receptores TRPV1 a la membrana celular a través de la vía de señalización PI3K y PKC aumentando la actividad del canal y la translocación del receptor a la membrana celular (Cases et al., 2011). Además, el NGF y el IGF-1 tienen diferentes actividades biológicas como la diferenciación de células y actividad anti-apoptótica (Flores et al, 2005; Harada et al., 2007). En las neuronas del DRG, la activación de los receptores TRPV1 por la capsaicina aumenta la liberación de CGRP que tiene actividad vasodilatadora produciendo hiperemia. Se ha reportado que el CGRP y la SP aumentan el flujo sanguíneo vascular de los ovarios teniendo efectos tróficos en la glándula (Luna et al, 2015), además, el CGRP inhibe la producción del TNF, un regulador del desarrollo folicular (Harada y Okajima, 2007; Harada et al., 2007).

1.7 El desarrollo folicular y la pubertad mediados por los receptores TRPV1

En el desarrollo folicular intervienen factores intraováricos como el NGF, el GDNF y BDGF, lo hacen a través de sus receptores TrkA y TrkB respectivamente. Otros receptores que participan en el mismo proceso son los receptores TRPV1 (Alatriste et al., 2013). Los receptores TRPV1 se expresan en muchos tipos de células en proliferación, en neuronas relacionadas con el aprendizaje o en el adulto cuando hay actividad relacionada con el aprendizaje (Stock et al., 2014). Cabe mencionar que con la activación de los receptores TRPV1 por capsaicina aumenta la liberación de glutamato, un aminoácido que actúa como regulador positivo para iniciar la pubertad (Stock et al., 2014). En la cobaya infantil, los folículos ováricos tienen bajo nivel de transcripción de los receptores TRPV1, nivel que aumenta al llegar la pubertad (Figura 8) (Alatriste et al., 2013). Se ha mostrado que la PAV se retrasa en cobayas tratadas con capsaicina, lo que sugiere que las fibras sensoriales participan en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario y contribuyen a la aparición de la pubertad de las cobayas (Alatriste et al., 2013). En las terminales de los nervios periféricos, los receptores TRPV1 modulan la transmisión sináptica sensorial, lo hacen a través de los DRG y del ganglio trigémino (Jeffrey et al., 2009; Premkumar et al., 2013). Las terminales aferentes

centrales liberan péptidos como el CGRP con potente actividad vasodilatadora. Además, los receptores TRPV1 y NGF se co-expresan en las fibras sensoriales y están interrelacionados funcionalmente al modular el desarrollo de las neuronas, la liberación de péptidos (CGRP y SP) y la actividad de las fibras aferentes primarias (Obreja et al., 2011; Szallasi et al., 2007). Previamente, se ha postulado que las fibras sensoriales a través de los receptores TRPV1 modulan el desarrollo folicular y la pubertad siendo sensores que integran la transmisión sensorial del ovario al SNC (Alatriste et al., 2013). La degeneración producida por capsaicina a alta dosis produce desensibilización dado que depende de la integridad física de las neuronas expuestas al neurotóxico (Malagarie-Cazenave et al., 2009).

En los humanos, la capsaicina disminuye el desarrollo del cáncer al inducir apoptosis de las células implicadas (Malagarie-Cazenave et al., 2009). Hasta ahora, se han postulado varios mecanismos de acción de la capsaicina; incluyen al estrés oxidativo, la regulación positiva de proteínas pro-apoptóticas y la activación de caspasas (Zhang et al., 2008). El efecto de la capsaicina es a través de la mitocondria, la cual libera citocromo C y este permite la activación de las caspasas-3 y 9, un efecto que depende de la dosis y del tiempo (Maity et al., 2010). Sin embargo el efecto farmacológico de la capsaicina está en función de las células, de la dosis y de la duración del tratamiento. En estudios anteriores se ha mostrado que, en las cobayas tratadas con capsaicina (0.03 M) por vía subcutánea se atrasó la PAV de $44 \pm 1,8$ días vs 36 ± 3 días en los animales tratados con vehículo (Figura 8). También, el número de folículos FPS, FPA, FAS y FAA disminuyó 50, 66, 27 y 52 % respectivamente con la administración de capsaicina (0.03 M) en comparación con los animales administrados con vehículo (Figura 9) (Alatriste et al., 2013).

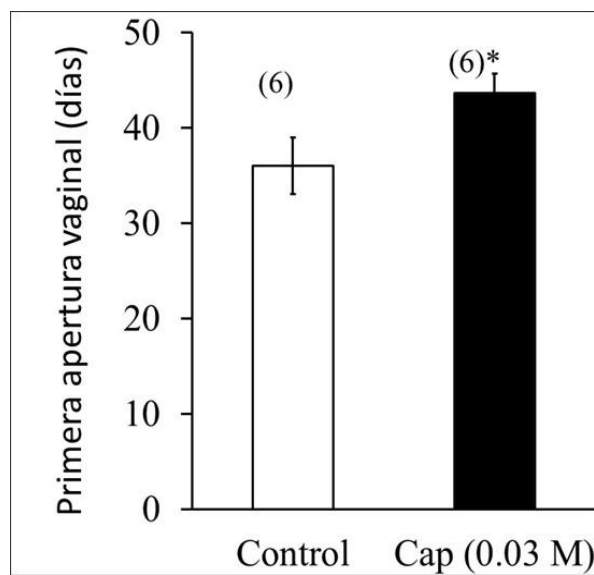


Figura 8. Primera apertura vaginal de cobayas tratadas con capsaicina a los 10 días de edad. En las cobayas tratadas con capsaicina (0.03 M) por vía subcutánea, la PAV fue $44 \pm 1,8$ días vs 36 ± 3 días en los animales control administradas con el vehículo (Alatriste et al., 2013).

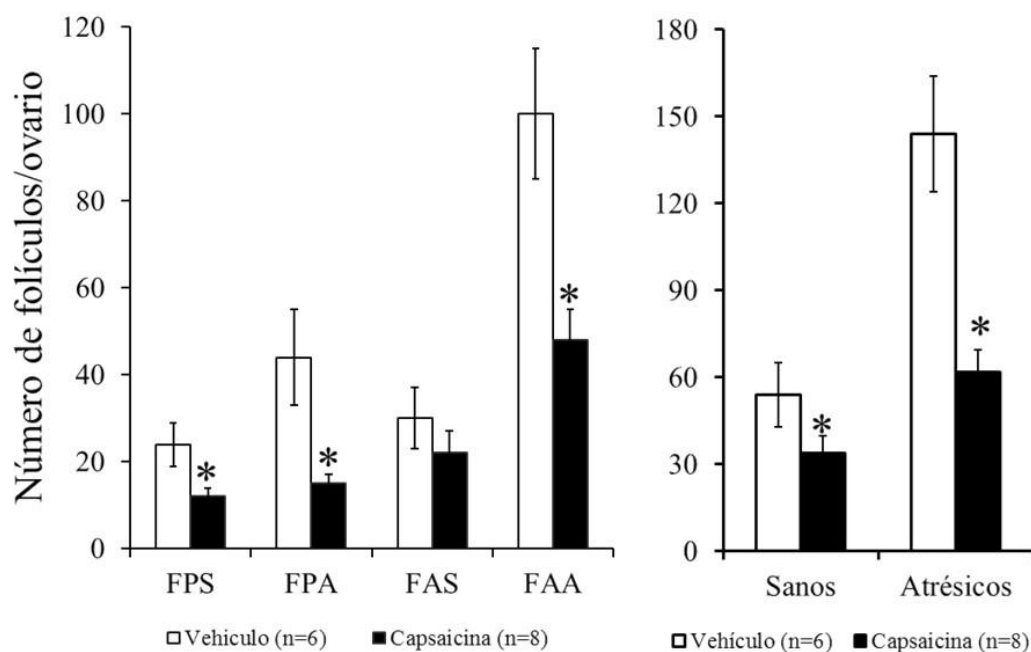


Figura 9. Desarrollo folicular en los ovarios de las cobayas tratadas con capsaicina a los 10 días de edad. En cobayas tratadas con capsaicina (0.03 M) vía subcutánea, el número de FPS, FPA, FAS y FAA disminuyó 50, 66, 27 y 52% respectivamente en comparación con los animales administrados con el vehículo. Los folículos atrésicos disminuyeron 37 y 57 % respectivamente (Alatriste et al., 2013).

2.0 JUSTIFICACIÓN

Los receptores TRPV1 se expresan en diversos tejidos; los DRG, el ganglio trigémino, el ganglio nodoso, fibras nerviosas aferentes C y A δ , en neuronas del hipotálamo, cerebelo, corteza cerebral, núcleo estriado, mesencéfalo, bulbo olfatorio e hipocampo. También en tejidos no neuronales como los queratinocitos de la epidermis, epitelio de la vejiga, músculo liso vascular, células del hígado y macrófagos (Pingle et al., 2007). En algunos órganos su expresión ha sido mejor caracterizada, sin embargo en el sistema reproductor, y específicamente en los ovarios, los datos aún son escasos. Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que en la cobaya, la capsaicina administrada por vía subcutánea a alta concentración (0.03 M) atrasa la pubertad y disminuye el número de células TRPV1-positivas en los folículos ováricos, en los DRG y en la médula espinal (L2-5). Como consecuencia de la degeneración de las fibras sensoriales disminuye la liberación de sustancia P y CGRP y atrasa la pubertad de los animales. En esta tesis estudiamos el efecto de la capsaicina por administración local (bolsa ovárica) a concentración baja (nanomolar y micromolar) y su relación con el desarrollo folicular y la pubertad. Los resultados de este proyecto aumentarán nuestro conocimiento sobre la participación de los receptores TRPV1 en el desarrollo folicular y la maduración sexual considerando que la vía de administración y las concentraciones de capsaicina utilizadas son diferentes con respecto a las utilizadas por Alatríste (Alatríste et al, 2013) y por consecuencia los efectos pueden ser diferentes.

3.0 HIPÓTESIS

La capsaicina a dosis baja administrada en la bolsa ovárica aumenta el desarrollo folicular y adelanta la pubertad de la cobaya.

4.0 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la administración de capsaicina (1 nM, 10 nM y 1 μ M) en la bolsa ovárica sobre el desarrollo folicular y la pubertad de la cobaya.

4.1 Objetivos particulares

- 4.1.1** Evaluar la pubertad después de administrar la capsaicina en la bolsa ovárica a los 10 días de edad.
- 4.1.2** Evaluar el desarrollo folicular después de administrar la capsaicina en la bolsa ovárica a los 10 días de edad.
- 4.1.3** Evaluar las células TRPV1-positivas en los folículos ováricos después de administrar la capsaicina en la bolsa ovárica a los 10 días de edad.

5.0 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales de experimentación

Las cobayas Hartley usadas en este trabajo fueron reproducidas y mantenidas en el bioterio “Claude Bernard” de la BUAP y se usaron siguiendo los criterios que estipula la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Esta norma está en concordancia con los criterios internacionales del NIH, USA.

Utilizamos 24 cobayas Hartley de 10 días de edad que se asignaron de forma aleatoria a cuatro grupos experimentales (n=6). Los animales se mantuvieron con ciclos de luz-obscuridad de 12-12 horas, temperatura de 22 ± 2 °C, alimento y agua a libre acceso. La dieta fue suplementada con alfalfa que tiene proteínas, minerales y vitamina C, esto considerando que las cobayas no pueden sintetizar vitamina C y la deficiencia de ella puede provocar escorbuto (Frikke-Schmidt et al, 2015).

5.2 Grupos experimentales

Grupo 1: Cobayas administradas en la bolsa ovárica con el vehículo.

Grupo 2: Cobayas administradas en la bolsa ovárica con capsaicina a concentración 1 nM.

Grupo 3: Cobayas administradas en la bolsa ovárica con capsaicina a concentración 10 nM.

Grupo 4: Cobayas administradas en la bolsa ovárica con capsaicina a concentración de 1 μ M.

5.3 Administración de la capsaicina en la bolsa ovárica

La administración de capsaicina o del vehículo (solución salina isotónica, pH 7.4.) se hizo a los 10 días de edad por cirugía en la región dorsal lumbar L2-5. Las cobayas fueron anestesiadas con ketamina (im, 35 mg/kg), 2.5 min después la xilacina (im, 5mg/kg), 2.5 min la cloropiramide (ip, 10mg/kg) y 2.5 min después el salbutamol (ip, 1mg/Kg). Posteriormente, por medio de una incisión de la piel y separación de los músculos por disección roma (músculo de los lomos y músculo psoas) llegamos cuidadosamente a la bolsa ovárica y colocamos un cubo de gelatina hidrolizada estéril (5 mm²) (Hemospon) que previamente fue impregnada con la solución de capsaicina o con el vehículo (100 μ l) (figura 10). Una vez hecho esto procedimiento se prosiguió a suturar por capas, primero los músculos y luego la piel. Finalmente se aplicó azul de metileno de uso veterinario. Después de la cirugía, los animales se tuvieron en observación hasta recuperarse completamente de la

anestesia y posteriormente se regresaron al cubículo del bioterio. En los días siguientes, revisamos todos los días el progreso de la incisión y la alimentación de los animales hasta el final del experimento a los 35 días en promedio.

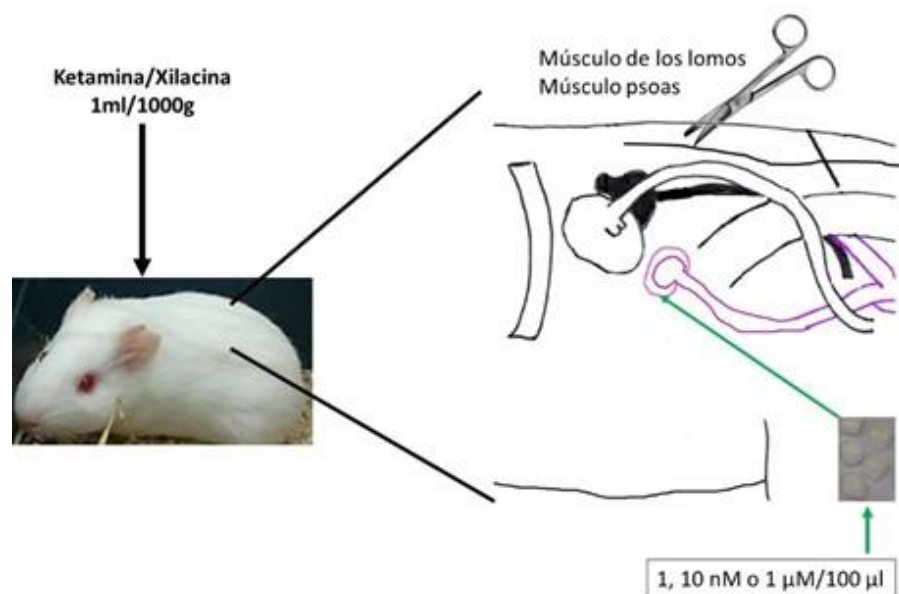


Figura 10. Administración de capsaicina o del vehículo en la bolsa ovárica. Administración por cirugía en la región dorso-lumbar L2-5. Por medio de una incisión de la piel y de los músculos (músculo de los lomos y músculo psoas), en la bolsa ovárica se colocó un cubo de gelatina impregnada con la solución de capsaicina o con el vehículo (100 µl). Se prosiguió a suturar, finalmente se aplicó azul de metileno.

5.4 Registro de la primera apertura vaginal

Después de la cirugía, las cobayas estuvieron en cajas colectivas de plástico. A partir del día 25 de edad, se observó a simple vista la región ano-genital de los animales para verificar la presencia o ausencia de su membrana vaginal. Cuando la membrana vaginal desapareció se tomó como indicador del inicio de la pubertad.

5.5 Obtención de las muestras

Cuando las cobayas presentaron la primera apertura vaginal se colocaron en una cámara de CO₂ a baja presión para inducir inconciencia y hacer la perfusión de solución salina por vía intracardiaca. Se eligió este método por su rápida inducción en la pérdida de la sensibilidad periférica y pérdida de la conciencia de los animales (5 segundos). Lo anterior

considerando que no existe diferencia para disminuir el dolor y el estrés si se administra otro anestésico antes de la eutanasia con CO₂ (Valentine et al., 2012). Posteriormente se perfundió por vía intracardiaca con 150 mililitros de solución salina isotónica seguida de 150 mililitros paraformaldehído-PBS al 4%. Enseguida se hizo la disección de los ovarios, se pesaron en fresco en una balanza analítica de precisión (Ohaus) y se post-fijaron con paraformaldehído-PBS. A partir de los pesos de los ovarios en fresco (miligramos) y del peso de la cobaya (gramos) que son los pesos absolutos calculamos el peso relativo de los ovarios sin diferenciar el ovario derecho u el ovario izquierdo (mg/100g de animal). Calcular el peso relativo es una manera de estandarización considerando que los órganos pélvicos pueden variar su peso independientemente del peso total. La disección de los ovarios se llevó a cabo a la edad de la PAV porque dependiendo del vanilloide, la dosis y la vía de administración, la refractariedad de los nociceptores puede durar desde minutos hasta varios días debido a la desensibilización de los receptores o la citotoxicidad producida en las células (Sanz-Salvador et al., 2012).

5.6 Inclusión de las muestras en parafina

Los ovarios se incluyeron en parafina usando los métodos de deshidratación con alcohol a concentraciones crecientes, blanqueamiento con xilol y parafina líquida usando un histoquinete de banda (Leica). Finalmente los ovarios quedaron inmersos en parafina sólida para hacer los cortes histológicos (Apéndice). Se realizaron cortes histológicos seriados de 5 µm de espesor de todo el ovario obteniendo cortes a intervalos de 100 micras, mismos que fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Estos cortes histológicos se usaron para contar los folículos.

5.7 Número de folículos ováricos

Se usaron cortes histológicos seriados de 5 µm de espesor obtenidos a intervalos de 100 micras de todo el ovario, mismos que fueron desparafinados, hidratados y teñidos con hematoxilina-eosina (Apéndice) (Wang et al, 2010). Los cortes se analizaron con un microscopio óptico de campo claro y los folículos fueron clasificados con base en las características morfológicas de las células de la teca, células de la granulosa y el ovocito. Con base en estos criterios identificamos 4 grupos de folículos; folículos preantrales sanos

(FPS), folículos preantrales atrésicos (FPA), folículos antrales sanos (FAS) y folículos antrales atrésicos (FAA).

5.8 Inmunohistoquímica para los receptores TRPV1

Los cortes histológicos se desparafinaron, hidrataron y lavaron con solución PBS. La recuperación antigénica se realizó con buffer de citratos (0.1 mM, pH=6), se permeabilizaron con PBS-Triton-100X al 2%, y las proteínas inespecíficas se bloquearon con albúmina bovina libre de IgG al 0.5% en PBS-T. Posteriormente, los cortes histológicos se incubaron por 18 horas con el anticuerpo monoclonal ratón anti-receptor a capsaicina (Millipore) (1:50) a 4 grados Celsius, y por 2 horas con el anticuerpo secundario IgG de cabra (H&L) conjugado con fenil-isotiocianato (FITC) (Santa Cruz Biotechnology) (1:250) a temperatura ambiente. Los núcleos de las células se marcaron con yoduro de propidio por 2 minutos (1:1000, Millipore). Finalmente, las laminillas se protegieron con fluido de montaje (Millipore) (Apéndice). La fluorescencia se detectó con un microscopio Leica DM100 que tiene una cámara con la que se tomaron fotografías que se procesaron con el programa IM50 para PC. En la figura 17-20 mostramos las células TRPV1-positivas en los ovarios de la cobaya.

5.9 Número de células TRPV1-positivas

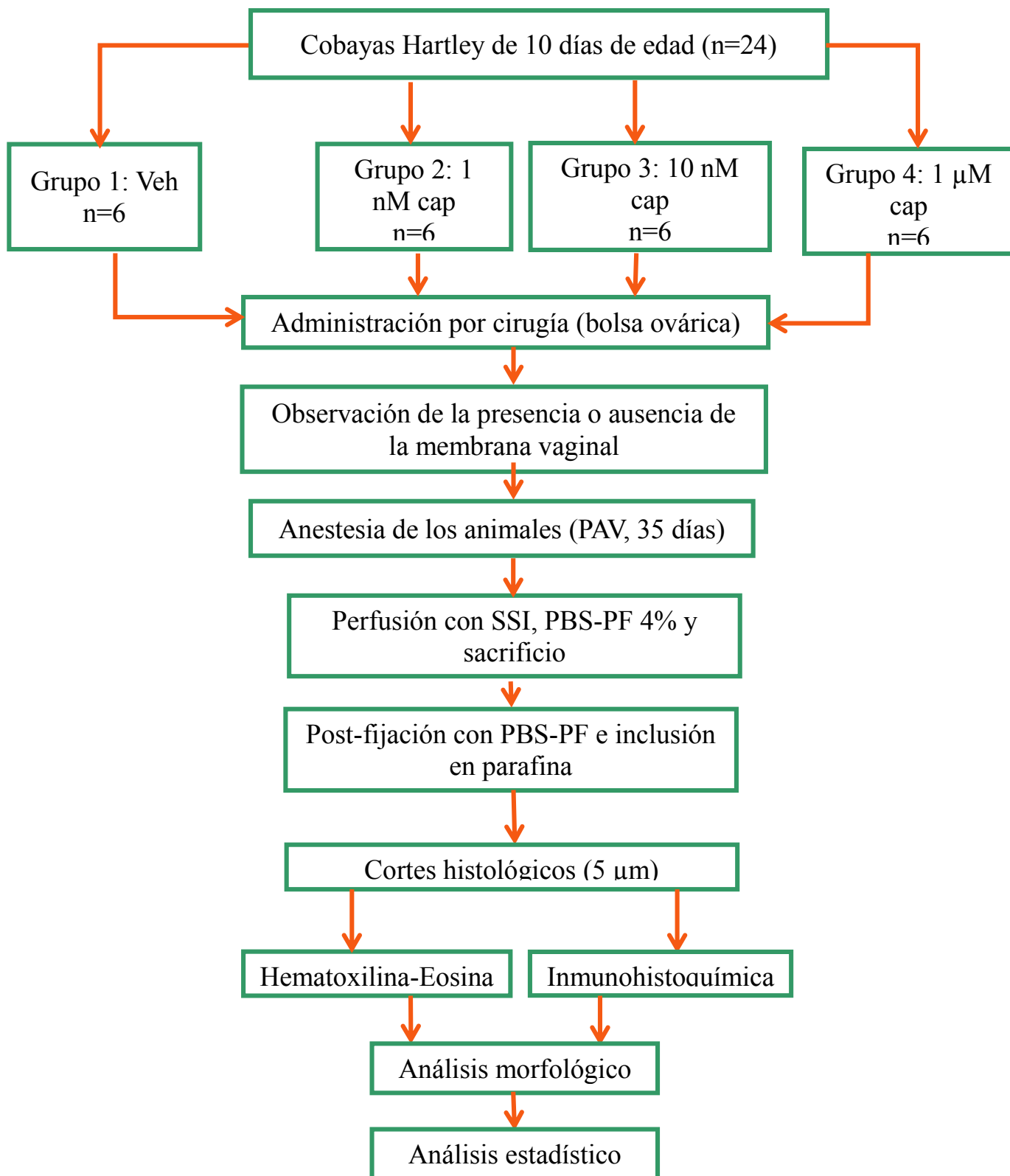
Por cada ovario, se realizaron 5 ensayos independientes de inmunohistoquímica y contamos las células TRPV1-positivas en 5 campos usando la herramienta “cell counter” del software NIH, ImageJ (NCBI, USA). El resultado cualitativo final fue medido usando la herramienta “measure” del mismo programa (NIH, ImageJ) y las células fueron positivas cuando la medición de color fue \geq a 50 unidades arbitrarias (AU) y negativas cuando tuvieron \leq a 49 AU.

5.10 Pruebas estadísticas

El número folículos y de células TRPV1-positivas se compararon con los valores del grupo control con la prueba de ANOVA de dos vías por haber múltiples variables de afectación del experimento seguida de la prueba de U de Mann-Whitney. Para la edad de la primera apertura vaginal usamos la prueba de U de Mann-Whitney por ser una variable con distribución no paramétrica. En esta prueba, los valores obtenidos se clasifican en función de su valor y no en función de grupo experimental al que pertenecen. El análisis estadístico

se realizó en el programa GraphPad Prism 5 y las gráficas fueron realizadas en Microsoft Office Excel 2013. Los resultados se tomaron como diferentes cuando la probabilidad fue menor al 5%.

6.0 DIAGRAMA DE TRABAJO



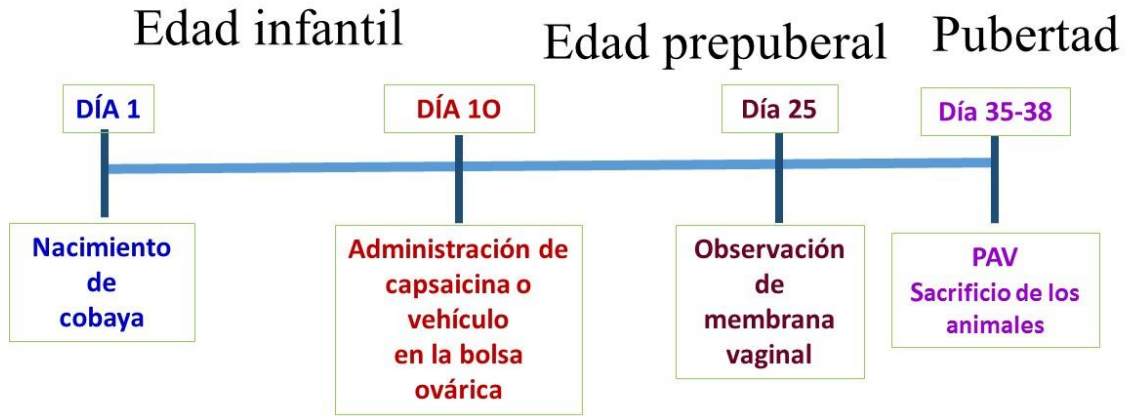


Figura 11. Resumen de la administración de capsaicina o el vehículo en las cobayas, observación de ausencia o presencia de membrana vaginal y sacrificio de los animales para obtención de muestras.

7. RESULTADOS

7.1 Folículos en los ovarios de las cobayas Hartley

Con base en sus características morfológicas identificamos 4 grupos de folículos; FPS, FPA, FAS y FAA. Las micrografías corresponden a ovarios de cobayas administradas con el vehículo (Figura 12), la clasificación de los folículos como sanos o atrésicos se realizó en base a los criterios establecidos por Wang (Wang et al, 2010).

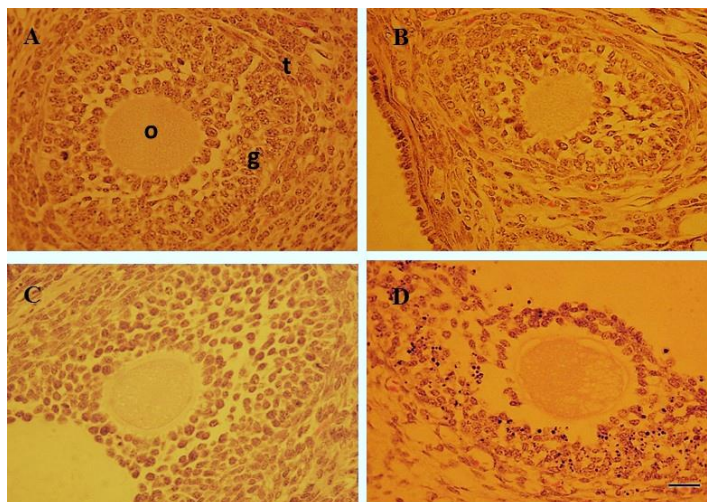


Figura 12. Folículos ováricos de cobayas administradas con el vehículo. A. Folículo preantral sano (FPS), B. Folículo preantral atrésico (FPA), C. Folículo antral sano (FAS) y D. Folículo antral atrésico (FAA). o =ovocito, g =granulosa y t = teca. Fotografías tomadas con microscopio óptico de campo claro, tinción de hematoxilina-eosina. Escala, 25 μ m.

7.2 Primera apertura vaginal, peso corporal y peso de los ovarios de las cobayas administradas con capsaicina a los 10 días de edad

Con la administración de capsaicina (1 nM, 10 nM o 1 μ M) en la bolsa ovárica a los 10 días de edad de las cobayas, la edad de la PAV, el peso corporal y el peso de los ovarios no se modificaron en comparación con las cobayas administradas con el vehículo (Tabla 1).

Tabla 1. Edad de la primera apertura vaginal (PAV), peso corporal y peso de los ovarios de cobayas administradas con capsaicina o con el vehículo a los 10 días de edad.

	PAV (días)	Peso corporal (g)	Ovarios (mg/100 g)
Veh (n=7)	36 \pm 3	345 \pm 19	17 \pm 3
Cap 1 nM (n=7)	39 \pm 2	321 \pm 08	16 \pm 2
Cap 10 nM (n=6)	34 \pm 2	314 \pm 23	16 \pm 1
Cap 1 μ M (n=6)	40 \pm 1	373 \pm 20	13 \pm 1
p<0.05, U de Mann-Whitney			

7.3 Folículos ováricos de las cobayas administradas con capsaicina en la bolsa ovárica a los 10 días de edad

Con 1 y 10 nM de capsaicina, el número de FPS y FAS no se modificó en comparación con las cobayas administradas con el vehículo (Figura 13). Sin embargo, con 1 μ M de capsaicina, el número de FPA y los FAA aumentó 243 y 114.2 % respectivamente. En contraste con 1nM y 10 nM, el número de FPA disminuyó 67 y 53 % y con 1 μ M de capsaicina aumentó 110 % (Figura 13). Finalmente, con 1nM y 10 nM, los FAA disminuyeron 44 y 39 %, mientras que con 1 μ M aumentaron 84 % (Figura 13).

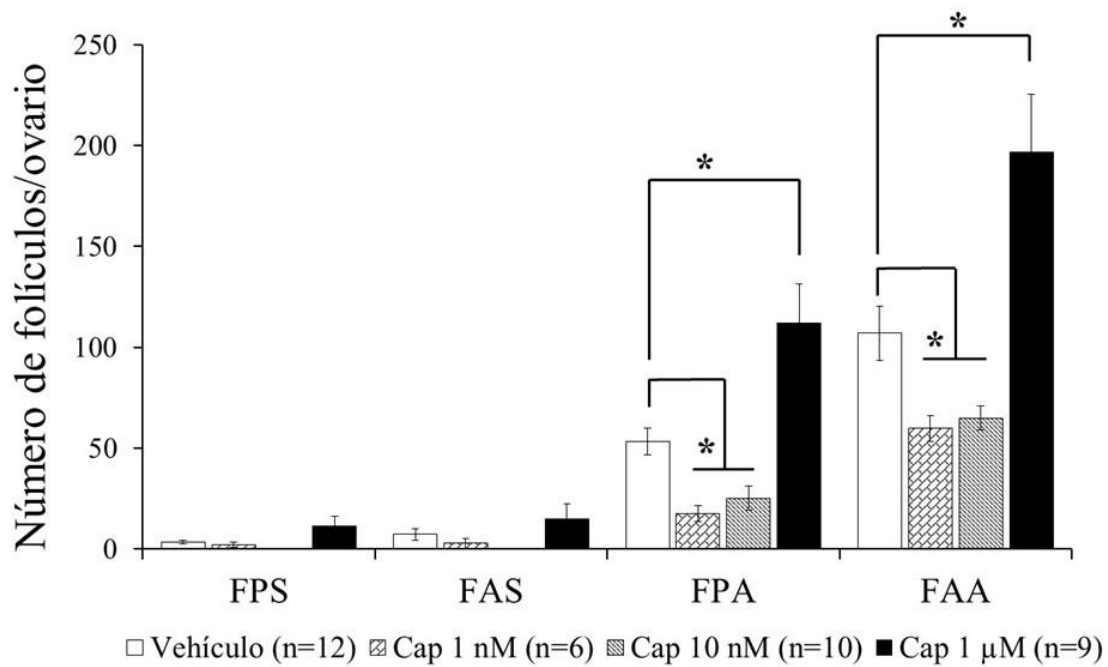


Figura 13. Folículos ováricos en las cobayas administradas con capsaicina o con el vehículo en la bolsa ovárica a los 10 días de edad. Folículos preantrales sanos (FPS), folículos antrales sanos (FAS), folículos preantrales atrésicos (FPA) y folículos antrales atrésicos (FAA). Las barras representan el promedio y el EEM. $* \leq 0.05$ ANOVA seguida de U de Mann-Whitney.

Si únicamente consideramos las categorías de folículos sanos y folículos atrésicos, encontramos que con 1 y 10 nM de capsaicina, los folículos atrésicos disminuyen 56 y 50 % en comparación con las cobayas que recibieron el vehículo (Figura 14). En contraste, con 1 μ M de capsaicina, el número de folículos atrésicos aumentó 136 % (Figura 14). Sin embargo, el número de folículos ováricos sanos fue similar en todos los grupos experimentales (Figura 14). En todos los grupos experimentales, la baja cantidad de folículos sanos en relación a los folículos atrésicos se debe a que son diferentes estados fisiológicos de los folículos donde la atresia es altamente probable (Flores et al, 2005; Wang et al., 2010).

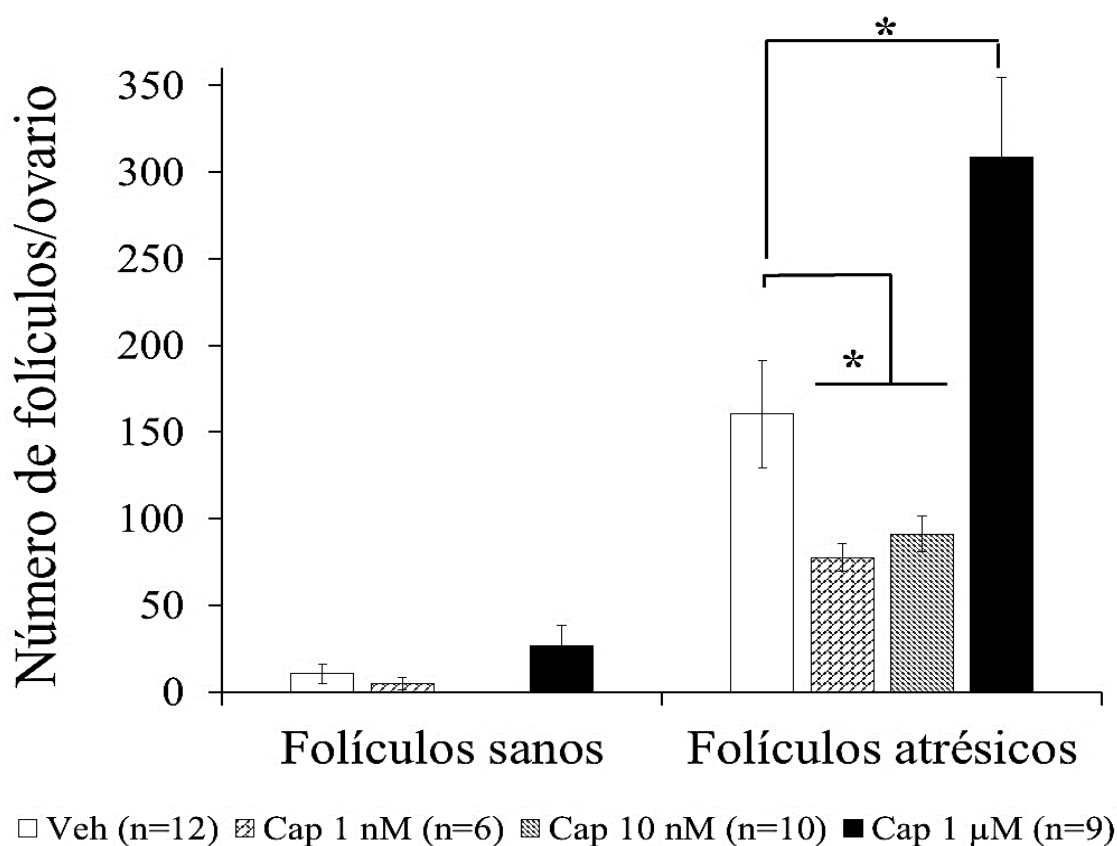


Figura 14. Folículos ováricos sanos y atrésicos en las cobayas administradas con capsaicina o con el vehículo en la bolsa ovárica a los 10 días de edad. Las barras representan el promedio y el EEM. $* \leq 0.5$ ANOVA seguida de U de Mann-Withney.

7.4 Localización por inmunohistoquímica de las células TRPV1-positivas en los folículos ováricos

En todas las categorías de folículos (FPS, FPA, FAS y FAA) encontramos células TRPV1-positivas, sin embargo, el número de ellas cambia dependiendo de la concentración de capsaicina administrada. En los folículos preantrales sanos con 1 y 10 nM, el número de células TRPV1-positivas aumentó en comparación con el vehículo, sin embargo, con 1 μ M de capsaicina disminuyó su número (Figura 15). Cabe mencionar que los FPA tuvieron pocas células TRPV1-positivas en comparación con los folículos sanos, sin embargo, con 1 y 10 nM de capsaicina, las células TRPV1-positivas aumentan en comparación con el vehículo (Figura 16). En los FAS, las células TRPV1-positivas fueron tanto de la granulosa como de la teca y hay mayor reactividad al anticuerpo con 1 y 10 nM en comparación con el vehículo (Figura 17). Finalmente, en los FAA, hay menos células TRPV1-positivas en comparación con los folículos ováricos de los animales administrados con el vehículo, sin embargo, con 1 μ M de capsaicina la inmuno-reactividad es menor en comparación con los animales administrados con 1 y 10 nM de capsaicina o con los animales administrados con el vehículo (Figura 18).

FOLÍCULO PREANTRALES SANOS

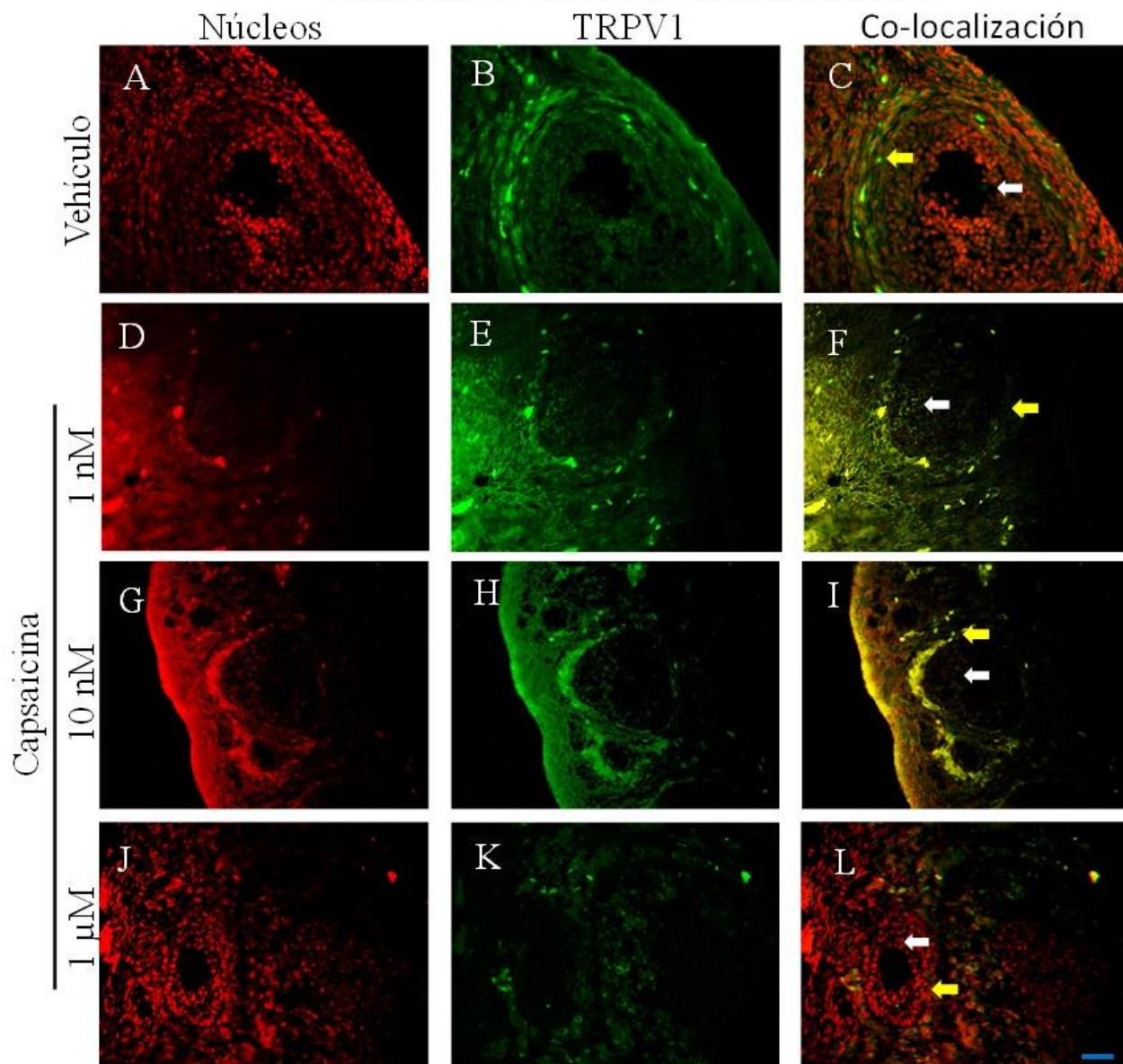


Figura 15. Células TRPV1-positivas en los folículos preantrales sanos localizadas por inmunohistoquímica a la edad de la PAV. En rojo se muestran los núcleos teñidos con yoduro de propidio (A, D, G y J), en verde las células-TRPV1 marcados con FITC (B, E, H y K) y en amarillo la co-localización (C, F, I y L). Las células de la granulosa están señalizadas con flecha blanca y las de la teca con flecha amarilla. Escala, 100 μm .

FOLÍCULO PREANTRALES ATRÉSICOS

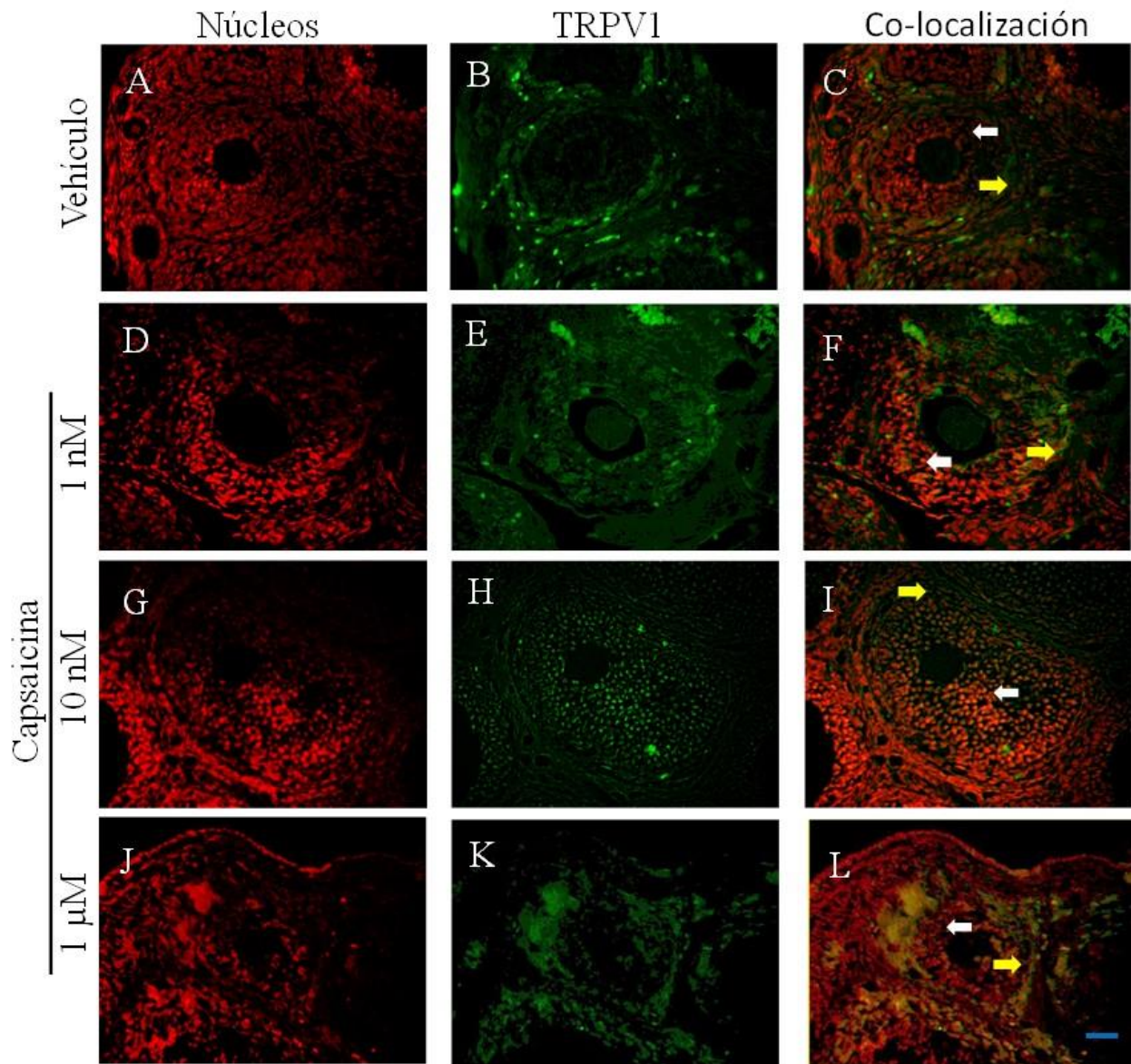


Figura 16. Células TRPV1-positivas en los folículos antrales atrésicos localizadas por inmunohistoquímica a la edad de la PAV. En rojo se muestran los núcleos teñidos con yoduro de propidio (A, D, G y J), en verde las células TRPV1-positivas marcadas con FITC (B, E, H y K) y en amarillo la co-localización (C, F, I y L). Las células de la granulosa están señalizadas con flecha blanca y las de la teca con flecha amarilla. Escala, 100 μ m.

FOLÍCULOS ANTRALES SANOS

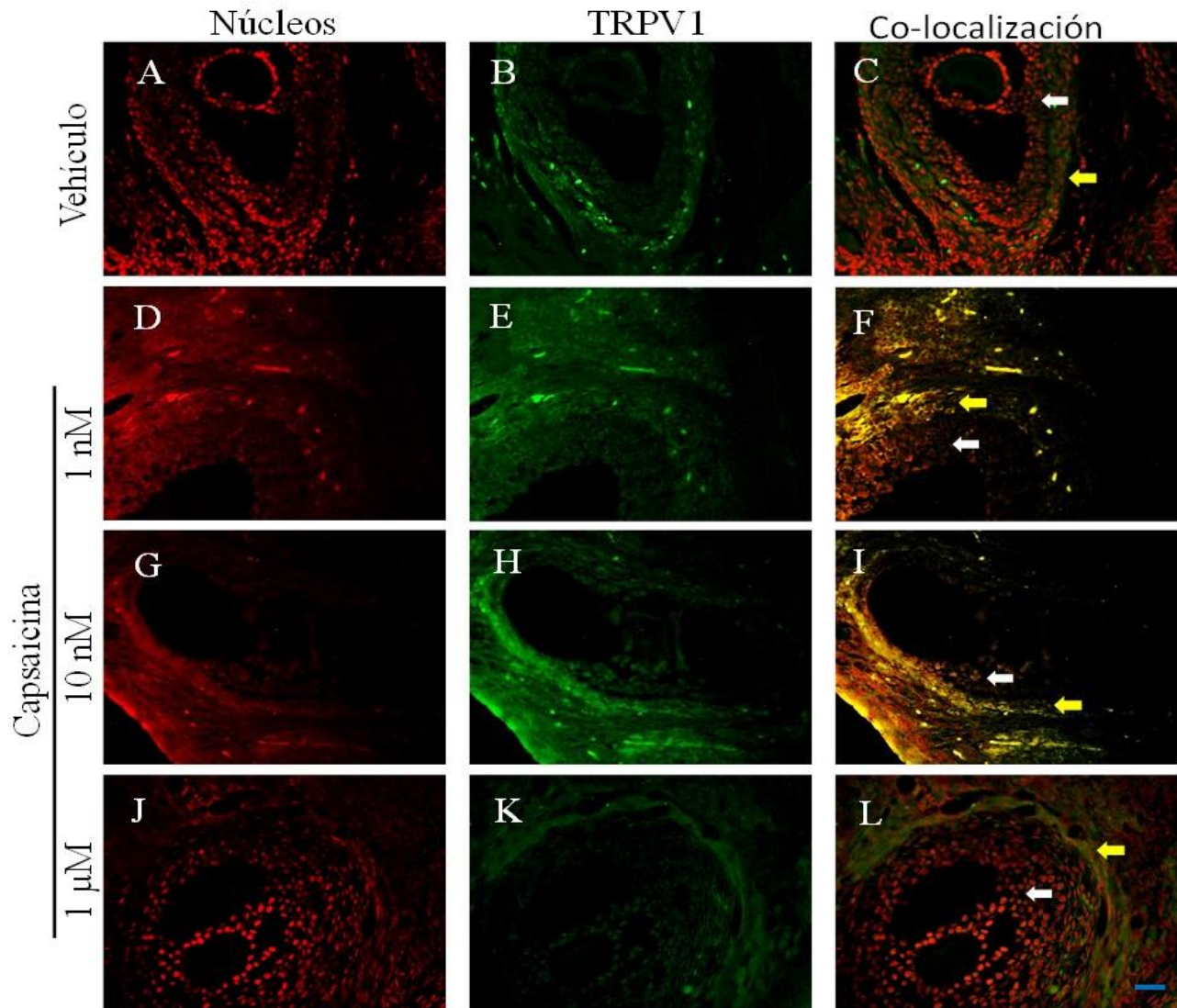


Figura 17. Células TRPV1-positivas en los folículos antrales sanos localizadas por inmunohistoquímica a la edad de la PAV. En rojo se muestran los núcleos teñidos con yoduro de propidio (A, D, G y J), en verde las células TRPV1-positivas marcados con FITC (B, E, H y K) y en amarillo la co-localización (C, F, I y L). Las células de la granulosa están marcadas con flecha blanca y las células de la teca con flecha amarilla. Escala, 100 μ m.

FOLÍCULO ANTRALES ATRÉSICOS

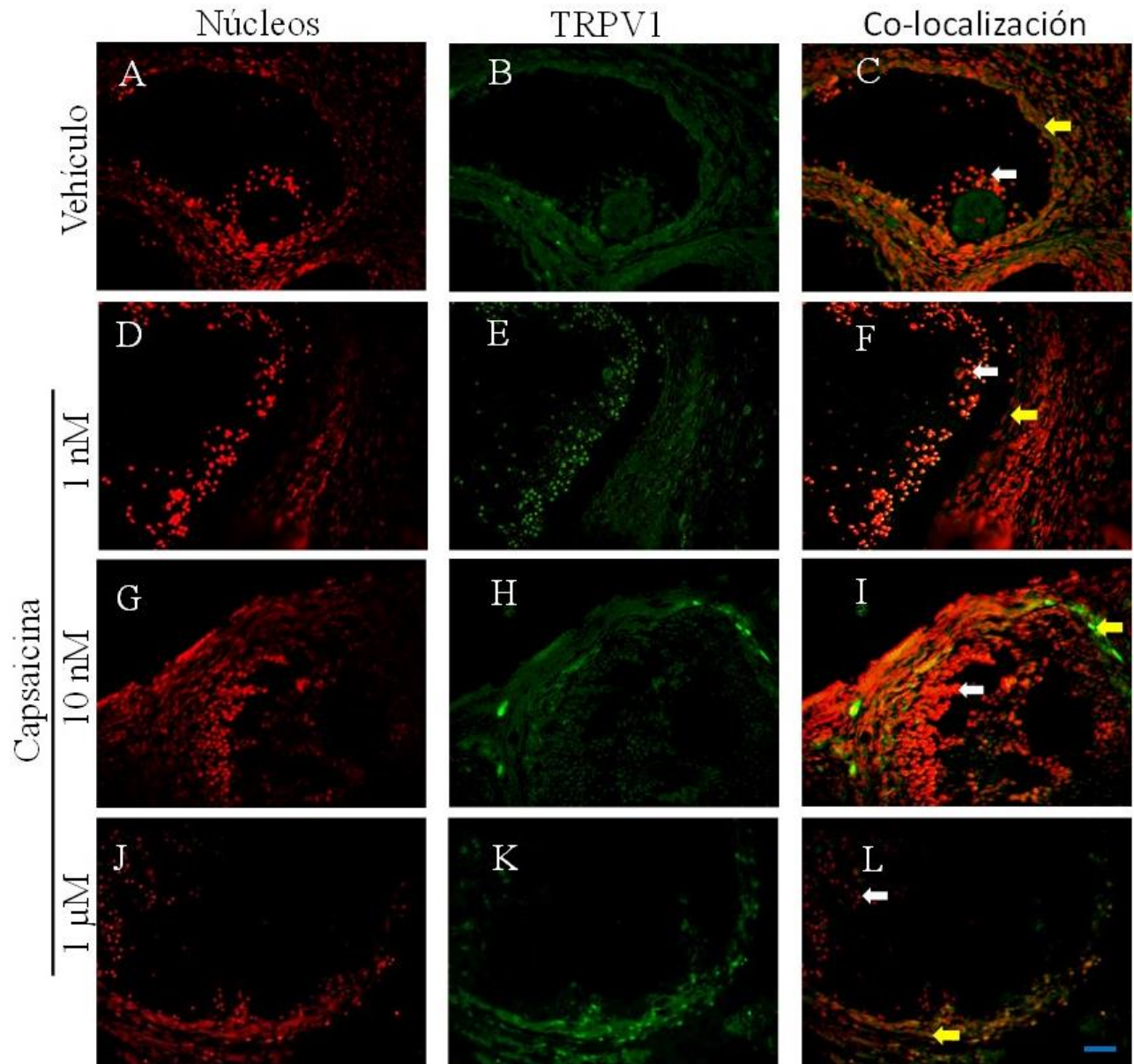


Figura 18. Células TRPV1-positivas en los folículos antrales atrésicos localizadas por inmunohistoquímica a la edad de la PAV. En rojo se muestran los núcleos teñidos con yoduro de propidio (A, D, G y J), en verde las células TRPV1-positivas marcadas con FITC (B, E, H y K) y en amarillo la co-localización (C, F, I y L). Las células de la granulosa están señalizadas con flecha blanca y las células de la teca con flecha amarilla. Escala, 100 μ m.

7.5 Células TRPV1-positivas en los folículos ováricos de las cobayas administradas con capsaicina en la bolsa ovárica a los 10 días de edad

En las cobayas administradas con 1 nM o 1 μ M de capsaicina y en comparación con los animales administrados con el vehículo, en los FPS, el número de células TRPV1-positivas disminuyó 35 y 49 % respectivamente (Figura 19), mientras que con 10 nM, las células TRPV1-positivas aumentaron 54 % (Figura 19), sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa, ANOVA y U de Mann-Withney. Un resultado similar no significativo estadísticamente se obtuvo en los FPA que aumentaron 57 y 45% con 1nM y 10 nM respectivamente, ANOVA y U de Mann-Withney (Figura 19). En contraste, con 1 μ M de capsaicina, el número de células TRPV1-positivas disminuyó 75 % (Figura 19). En los FAS, aumentaron 252, 408 y 102 % con 1nM, 10 nM y 1 μ M respectivamente (Figura 19). En los FAA, las células TRPV1-positivas fueron escasas con cantidades similares en todos los grupos experimentales (Figura 19).

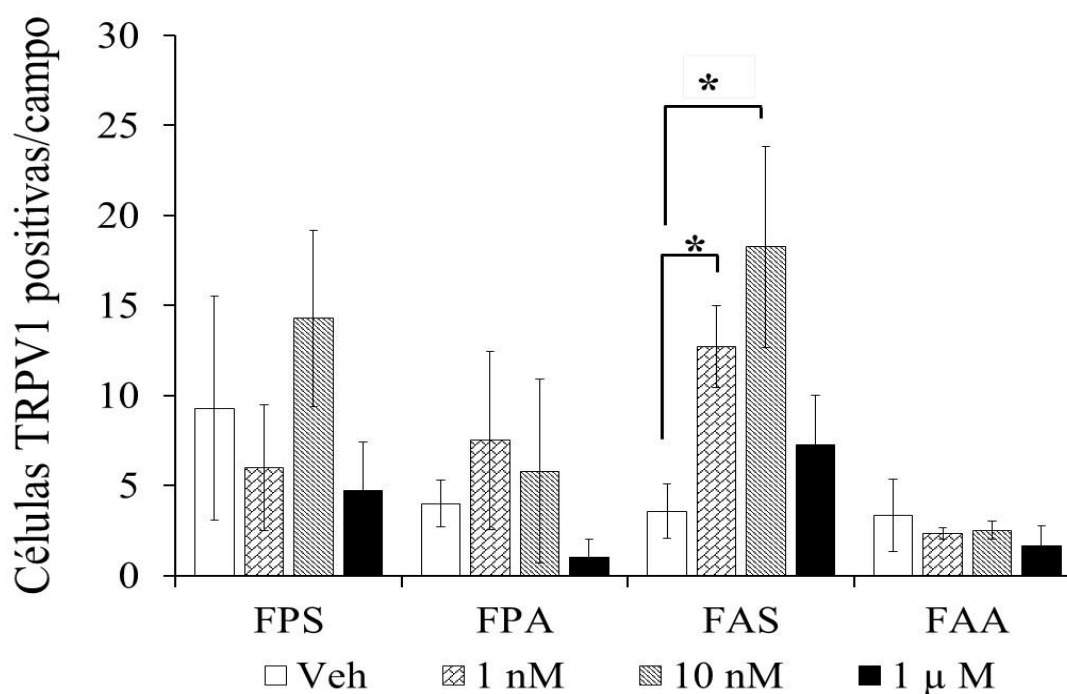


Figura 19. Células TRPV1 positivas en los folículos ováricos de las cobayas administradas con capsaicina o con el vehículo en la bolsa ovárica a los 10 días de edad. Folículos preantrales sanos (FPS), folículos preantrales atrésicos (FPA), folículos antrales sanos (FAS) y folículos antrales atrésicos (FAA). Las barras representan el promedio y el EEM. * ≤ 0.05 ANOVA y U de Mann-Withney.

Considerando las categorías de folículos ováricos sanos y atrésicos obtuvimos que con 1 nM, 10 nM de capsaicina, el número de células TRPV1-positivas aumentó 46 y 153 % respectivamente en comparación con los animales del grupo administrado con el vehículo (Figura 20). En contraste, con 1 μ M de capsaicina, en los folículos atrésicos, el número de células TRPV1-positivas fue bajo y similar a los animales del grupo control administrado con el vehículo (Figura 20).

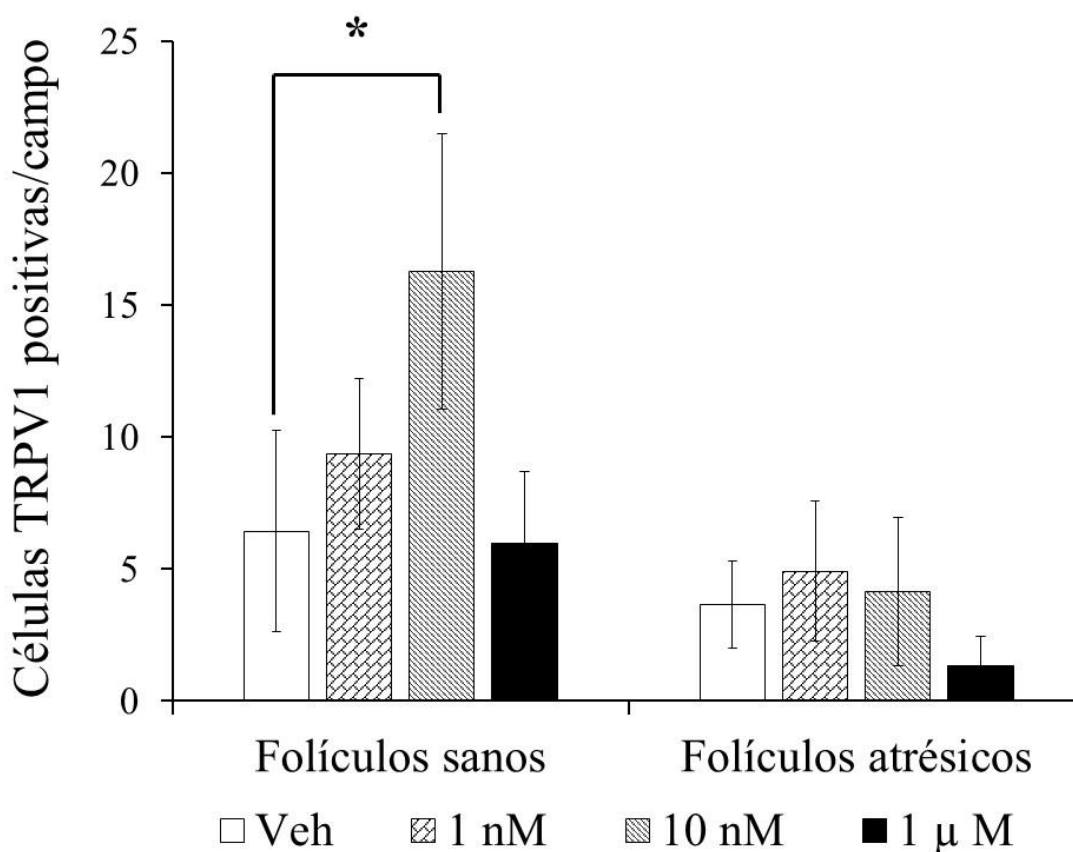


Figura 20. Células TRPV1-positivas en los folículos ováricos sanos y atrésicos de las cobayas administradas con capsaicina o con el vehículo en la bolsa ovárica a los 10 días de edad. Las barras representan el promedio y el EEM, * \leq 0.5 ANOVA y U de Mann-Withney.

8. DISCUSIÓN

La capsaicina a diferentes concentraciones (1 nM, 10 nM y 1 μ M) administradas en la bolsa ovárica de las cobayas no modificó el peso corporal ni el peso de los ovarios en comparación con los animales administrados con el vehículo. Estos resultados sugieren que la administración local de capsaicina no altera la fisiología de los animales, también sugiere que no se afecta el metabolismo general. Estos resultados son similares a los obtenidos en cobayas por administración subcutánea de capsaicina (Alatraste et al., 2013; Morales-Ledesma et al., 2015). La respuesta al tratamiento con capsaicina es depende de la dosis y de la especie dado que en las ratas, dosis de 50 mg/kg de capsaicina administrada al nacimiento y a los 3 días de edad por vía subcutánea, el peso corporal y el peso de los ovarios aumentó, los autores postularon que fue debido a cambios en el sistema linfático localizados en la bolsa ovárica, resultado del aumento de la circulación de la sangre y de los fluidos hacia la cavidad ovárica tomando en cuenta que son estructuras estrechamente relacionadas y reguladas por las hormonas del ovario (Morán et al., 2003; Zhang et al., 2013). Por otro lado, de nuestro experimento, la edad de la primera apertura vaginal de las cobayas no cambió con la administración local de capsaicina (1 nM, 10 nM y 1 μ M), un resultado contrario a lo obtenido por la administración subcutánea de la misma sustancia a concentración mayor (0.03 M) (Alatraste et al., 2013). Se ha reportado que a dosis alta de capsaicina ocurre degeneración de los nervios afectados reflejándose en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovarios y atrasando la maduración sexual de las cobayas (PAV) (Alatraste et al., 2013).

En este estudio y en relación a los folículos de los ovarios, la capsaicina tuvo efecto doble; a baja concentración (1 nM y 10 nM) aumentó el número de células TRPV1-positivas y disminuyó la atresia de los folículos de los ovarios, mientras que a alta dosis (1 μ M) aumentó la atresia. Este resultado es congruente considerando que se ha reportado que la capsaicina a baja dosis estimula la sobrevivencia y proliferación celular (Stock et al., 2014) mientras que a alta concentración inhibe el crecimiento de las células cancerígenas (Caprodossi et al., 2011). También se ha reportado que la aplicación de capsaicina a baja dosis estimula el desarrollo de los folículos pilosos (Harada et al., 2007) y el desarrollo de las células de la piel (Harada y Okajima, 2007), incluso en los ratones hay neurogénesis en los cerebros (Stock et al., 2014), también estimula el desarrollo de las células musculares lisas

de las vías respiratorias (Zhao et al., 2014) y reduce la inflamación y el estrés oxidativo pulmonar inducido por la isquemia (Wang et al., 2012). En contraste a alta dosis (1 μ M) de capsaicina induce atresia y disminuye las células TRPV1-positivas en los folículos del ovario, resultado que están en concordancia con el efecto de la alta concentración de capsaicina en los ovarios (Alatríste et al., 2013). Además se ha reportado que la desfosforilación de los receptores TRPV1 produce desensibilización, nuestros resultados sugieren que la capsaicina a dosis de 1 μ M provoca desensibilización de los receptores TRPV1 y los hace insensible a los estímulos. Sin embargo, el canal desensibilizado sigue siendo funcional (Cases et al., 2011). Otra posibilidad es que haya ocurrido estimulación masiva de los receptores TRPV1 lo que produce muerte celular por apoptosis (Sanz-Salvador et al., 2012; Cho et al., 2013).

En los folículos ováricos sanos, con 1 y 10 nM de capsaicina obtuvimos diferente respuesta, el número de células TRPV1-positivas aumentó, lo que sugiere que el número de canales de calcio también aumentó en relación a la concentración de capsaicina administrada como se ha sugerido en los experimentos en la línea celular CHO (Lopshire y Nicol, 1998). Este resultado es posible considerando que el número de células TRPV1-positivas en los folículos sanos disminuyó con 1 μ M de capsaicina. Es bien establecido que baja dosis de capsaicina estimula la función del receptor TRPV1 en las células, mientras que a dosis altas lo inhibe. Se trata de un agonista específico que al abrir el canal de calcio de los receptores TRPV1 reduce el umbral de activación al calor ($<44^{\circ}\text{C}$) provocando regulación positiva de las quinasas, de la fosforilación de los receptores TRPV1 y la sensibilización del mismo. Sin embargo, la estimulación masiva induce apoptosis de las células (Zik et al., 2010). La administración de capsaicina a concentraciones crecientes estimula al receptor TRPV1, de esta forma cambia el microambiente de los folículos ováricos, obteniendo resultados opuestos, resultando atresia folicular por la activación de la corriente de calcio. No encontramos células de la granulosa TRPV1-positivas, probablemente se deba a que las células de la granulosa no cuentan con fibras A δ y C en las cuales está presente TRPV1.

Aunque la disminución de los folículos preantrales sanos con 1 y 10 nM en comparación con 1 μ M no fue significativa, se puede atribuir a que las células en proceso de mitosis tienen baja expresión de los receptores TRPV1 (Stock et al., 2014). Otra posibilidad es que la capsaicina se una a los receptores CB1 de las células del ovario resultando un efecto alternativo de regulación a través del mismo agonista (Stock et al., 2014). La disminución de

células TRPV1-positivas con 1 μ M de capsaicina sugiere mayor internalización de los receptores en la membrana plasmática para su posterior degradación en los lisosomas (Sanz-Salvador et al., 2012), fenómeno de regulación que lleva a la atresia de los folículos ováricos. En condiciones fisiológicas, este fenómeno podría ser un mecanismo de selección folicular debido a que la mayoría de los folículos se degeneran por atresia, resultando que solo tres folículos llegan a ser preovulatorios (Hutz et al., 1990; Tütüncü y Özfiliz, 2010).

La administración local de capsaicina, activa a los receptores TRPV1 pero no modifica la pubertad. Este resultado sugiere que no afecta al eje hipotálamo-hipófisis-ovario y no modificó la concentración de estradiol responsable de activar la secreción de gonadotropinas en el cerebro (Roth et al., 2000). Un resultado opuesto al que se obtiene con alta concentración de capsaicina administrada por vía subcutánea (0.03 M) (Alatriste et al., 2013). Las concentraciones (1 nM, 10 nM y 1 μ M) administradas por vía local en las cobayas, activan a TRPV1 (figura 21) sin modificar la edad de la pubertad, este resultado sugiere que no se afecta al eje hipotálamo-hipófisis-ovario, probablemente no se modifiquen las concentraciones de estradiol que son responsables de activar la secreción de gonadotropinas en el cerebro (Roth et al., 2000). Un resultado opuesto al que se obtiene con alta dosis de capsaicina por vía subcutánea (Alatriste et al., 2013). En la figura 19 resumimos las vías de regulación de los receptores TRPV1 que proponemos para el desarrollo o a la atresia folicular en el ovario.

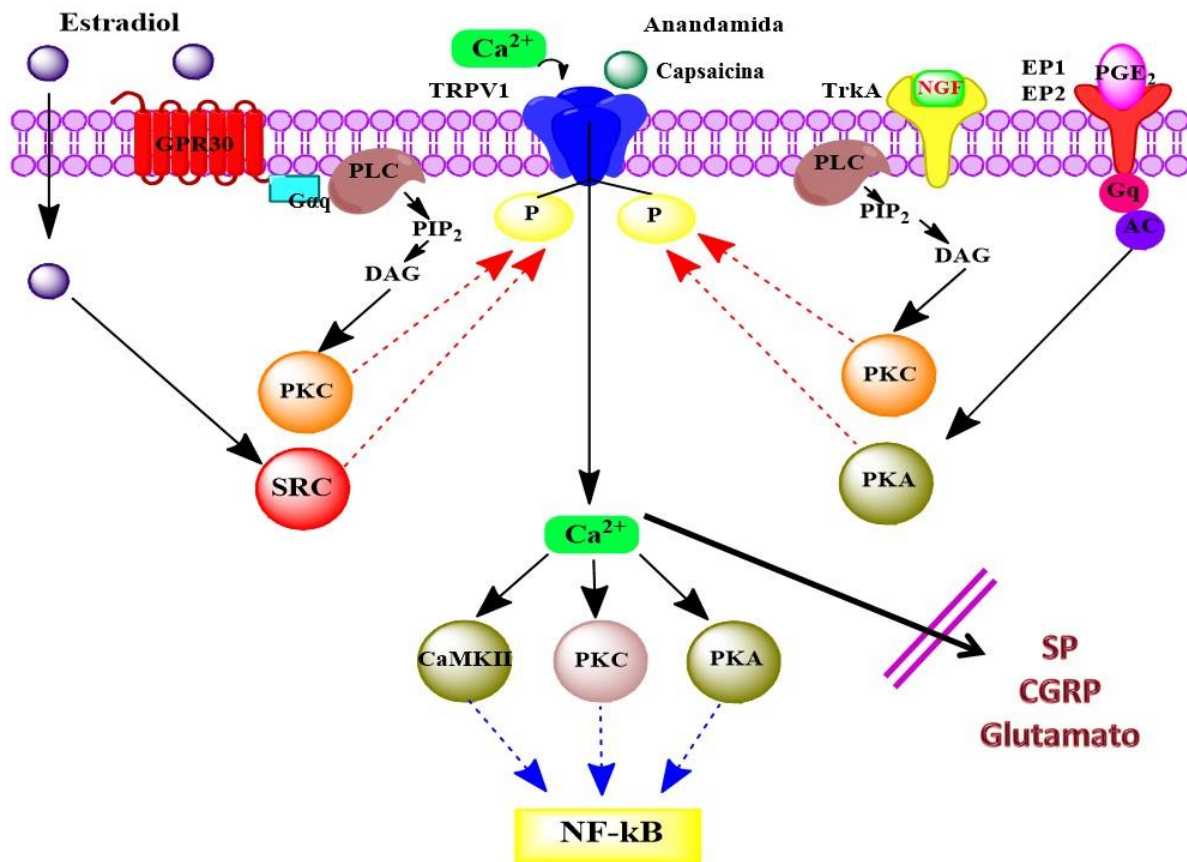


Figura 21. Esquema de la interacción del receptor TRPV1. Unión con los ligandos endógenos y exógenos (anandamida, estradiol, NGF y capsaicina), las moléculas de señalización intracelular (PKC, PKA, SRC, CaMKII, PLC, DAG, Ca²⁺ y NF-kB) y los transmisores periféricos (SP, CGRP y glutamato) (Tomado de Luna et al., 2015).

9. CONCLUSIÓN

1. La capsaicina administrada en la bolsa ovárica no modificó la edad de la primera apertura vaginal de las cobayas.
2. Con 1 y 10 nM aumentó el número de células tecales TRPV1-positivas y el desarrollo folicular de los ovarios.
3. Con 1 μ M de capsaicina disminuyó el número de células tecales TRPV1-positivas y aumentó la atresia de los folículos ováricos.

10. REFERENCIAS

- Alatraste, V., Paiz, B., Jiménez, M., Barrientos, E., Martínez, O., Torres-Soto, M., Martínez, M.I., Limón, I.D., Escamilla-Weinmann, C. y Luna, F. (2009). Parámetros reproductivos en las cobayas *Cavia porcellus* del bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. *Divulgación y Ciencia de los Animales de Laboratorio*, 4(1)8-13.
- Alatraste, V., Herrera Camacho, I., Martínez, M.I., Limón, I.D., González Flores, O. y Luna, F. (2013). Sensory denervation with capsaicin reduces ovarian follicular development and delays the onset of puberty in guinea pigs. *Advances in Reproductive Sciences*, 1(3)29-37.
- Austin, E.J., Mihm, M., Evans, A.C.O, Knight, P.G., Ireland, J.L.H., Ireland, J.J., y Roche J.F. (2001). Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 64(3)839-848.
- Baker, S. J. y Spears, N. (1999). The role of intra-ovarian interactions in the regulation of follicle dominance. *Human Reproduction Update*, 5(2)153-165.
- Caprodossi, S., Amantini, C., Nabissi, M., Morelli, M.B., Farfariello, V., Santoni, M., Gismondi, A. y Santoni G. (2011). Capsaicin promotes a more aggressive gene expression phenotype and invasiveness in null-TRPV1 urothelial cancer cells. *Carcinogenesis*, 32(5) 686–694.
- Cases, R.P., Valente, P., Montiel, A.F., Qin, F., y Szallasi, A. (2011). Complex regulation of TRPV1 and related thermo-TRPs: Implications for therapeutic intervention. En: Islam Shahidul Md (Ed). *Transient Receptor Potential Channels*. Springer, 491-515.
- Cho, W. H., Lee, H. J., Choi, Y.J., Oh, J.H., Kim, H.S. y Cho, H.S. (2013). Capsaicin induces apoptosis in MG63 human osteosarcoma cells via the caspase cascade and the antioxidant enzyme system. *Molecular Medicine Reports*, 8(6)1655-1662.
- Erickson, G.F. (1995). The ovary: Basic principles and concepts, A. Physiology. En: Felig, P., Baxter, J.D., Frohman, L.A. (Eds) *Endocrinology and Metabolism*. Mac Graw-Hill, 973-1015.

- Flores P, F.I., Velasco, C.R., Pardo R, M.C., y Martínez, PM. (2005). Apoptosis y atresia folicular: Un binomio esencial en el desarrollo ovárico. *Veterinaria México UNAM*, 36 (1) 87-103.
- Frikke-Schmidt, H., Tveden-Nyborg, P., Lykkesfeldt, Jens. (2015). L-dehydroascorbic acid can substitute L-ascorbic acid as dietary vitamin C source in guinea pigs. *Redox Biology*. 20(7): 8-13.
- Gunthorpe, M.J. y Chizh, B.A. (2009). Clinical development of TRPV1 antagonists: targeting a pivotal point in the pain pathway. *Drug Discovery Today*, 14(1-2)56-67.
- Harada N. y Okajima K. (2007). Effect of topical application of capsaicin and its related compounds on dermal insulin-like growth factor-I levels in mice and on facial skin elasticity in humans. *Growth Hormone & IGF Research*, 17(2)171-176.
- Harada, N., Okajima, K., Arai, M., Kurihara, H., y Nakagata, N. (2007). Administration of capsaicin and isoflavone promotes hair growth by increasing insulin-like growth factor-I production in mice and in humans with alopecia. *Growth Hormone & IGF Research*, 17(5)408-415.
- Holzer, P. (2008). The pharmacological challenge to tame the transient receptor potential vanilloid-1(TRPV1) nociceptor. *British Journal of Pharmacology*, 155(8)1145-1162.
- Hutz, R.J, BejVan, S. M., Durning, M., Dierschke, D. J., Fischer, C. L. y Zachow, R. J. (1990). Changes in follicular populations, in serum estrogen and progesterone, and in ovarian steroid secretion in vitro during the guinea pig estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 42 (2) 266-272.
- Jeffry, J.A., Yu, S.Q., Sikand, P., Parihar, A., Evans, M.S., y Premkumar, L.S. (2009). Selective targeting of TRPV1 expressing sensory nerve terminals in the spinal cord for long lasting analgesia. *Plos One*, 4(9) e7021.
- Looffler, K.A. y Koopman, P. (2002). Charting the course of ovarian development in vertebrates. *International Journal of Developmental Biology*, 46 (4) 503-510.
- Lopshire, J.C., y Nicol, G.D. (1998). The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E2 enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies. *The Journal of Neuroscience*, 18(16) 6081-6092.

- Luna, F., Cortés, M., Flores, M., Hernández, B., Trujillo, A. y Domínguez R. (2003). The effects of superior ovarian nerve sectioning on ovulation in the guinea pig. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(61) 1-7.
- Luna M., F. y Martínez G., M.I. (2005). Fisiología celular del ovario de los mamíferos y su regulación neuroendocrina. En: Luna Morales F. y Gómora Arrati P. (Eds). *Fisiología y conducta, aspectos moleculares y celulares*. Textos científicos, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 153-180.
- Luna, F., Alatríste, V., Martínez, I., y Limón, I.D. (2015). Los receptores TRPV1 en órganos del sistema reproductor y su modulación funcional por hormonas. En: González, F.O., Melo, S.A.I., Lima, H.F.J., y Hoffman, K.L. (Coordinadores). Efecto de las hormonas esteroides sobre procesos fisiológicos y reproductivos. *Universidad Autónoma de Tlaxcala*, 133-151.
- Maity, R., Sharma, J., Jana, N.R. (2010). Capsaicin induces apoptosis through ubiquitin–proteasome system dysfunction. *Journal of Cellular Biochemistry*, 109(5) 933-942.
- Malagarie-Cazenave, S., Olea-Herrero, N., Vara, D. y Díaz-Laviada, I. (2009). Capsaicin, a component of red peppers, induces expression of androgen receptor via P13K and MAPK pathways in prostate LNCaP cells. *Febs Letters*, 583(1) 141-147.
- Morales -Ledesma, L., Apolonio, J. y Trujillo A. (2015). In the pubertal rat, the regulation of ovarian function involves the synergic participation of the sensory and sympathetic innervations that arrive at the gonad. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(61)1-8.
- Morán, C., Morales, L., Razo, R. S., Apolonio, J., Quiróz, U., Chavira, R. y Domínguez, R. (2003). Effects of sensorial denervation induced by capsaicin injection at birth or on day three of life, on puberty, induced ovulation and pregnancy. *Life Sciences*, 73 (16) 2113-2125.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. Diario Oficial de la Federación, 6 de diciembre de 1999, 1-58.
- Obreja, O., Ringkamp, M., Turnquist, B., Hirth, M., Forsch, E., Rukwied, R., Petersen, M. y Schmelz M. (2011). Nerve growth factor selectively decreases activity dependent conduction slowing in mechanoinensitive C-nociceptors. *Pain*, 152 (9) 2138-2146.

- Ojeda, S.R. (2000). Female reproduction function. En: Griffin, J.E. y Ojeda, S.R. (Eds) *Textbook of Endocrine Physiology*. Fourth Edition. Oxford University Press, 202-242.
- Pingle, S.C., Matta, J.A. y Ahern, G.P. (2007). Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. En: Flockerzi, V. y Nilius, B. (Eds). *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*. Springer. 179: 155-171.
- Premkumar, L.S. y Mruvil, A. (2013). TRP channels and analgesia. *Life Sciences*, 92 (8-9) 415-424.
- Rodgers, R. J. y Irving Rodgers H. F. (2010). Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biology of Reproduction*, 82 (6) 1021-1029
- Roth, C., Leonhardt, S., Seidel, C., Luft, H., Wuttke, W. y Jarry H. (2000). Comparative analysis of different puberty inhibiting mechanisms of two GnRH agonists and the GnRH antagonist cetrorelix using a female rat model. *Pediatric Research*, 48(4) 468-474.
- Sanz-Salvador, L., Andrés-Borderia, A., Ferrer-Montiel, A., y Planells-Cases, R. (2012). Agonist and Ca²⁺-dependent desensitization of TRPV1 channel targets the receptor to lysosomes for degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(23) 19462–19471.
- Sadeu, J.C., Adriaens, I., Cortvrindt, R. y Smitz, J. (2007). Study of folliculogenesis in vivo in guinea pig. *Theriogenology*, 68 (9) 1228-1239.
- Sisk, C.L. y Foster, D.L. (2004). The neural basis of puberty and adolescence. *Nature Neuroscience*, 7(10) 1040-1047.
- Stock, K., Garthe, A., De Almeida Sassi, F. y Glass, R., Wolf, S.A. y Kettenmann, H. (2014). The capsaicin receptor TRPV1 as a novel modulator of neural precursor cell proliferation. *Stem Cells*, 32(12) 3183- 3195.
- Sun, S.Y., Zhang, W., Han, X., Huang, R.H. y Shi, F.X. (2014). Cell proliferation and apoptosis in the fetal and neonatal ovary of guinea pigs. *Genetic and Molecular Research*, 13(1)1570-1578.
- Surowy, C.S., Kym, P.R., y Reilly, R.M. (2010). Biochemical pharmacology of TRPV1: Molecular integrator of pain signals. En: Gomtsyan, A. y Faltynek, C.R. (Eds).

- Vanilloid receptor TRPV1 in drug discovery, Targeting pain and other pathological disorders.* John Wiley & Sons, Inc., Publication, 101-133.
- Szallasi, A., Cortright, D.N., Blum, C.A. y Samer, R.E. (2007). The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(5) 357-372.
- Tütüncü, S. y Özfiliz N. (2010). Distribution of the vanilloid (capsaicin) receptor type 1 in the rat ovaries on different sexual development period. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 161(6) 272-276.
- Valentine, H., Williams, W.O. y Maurer, K.J. (2012). Sedation or inhalation anesthesia before euthanasia with CO2 does not reduce behavioral or physiologic signs of pain and stress in mice, *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 51(1) 50-57.
- Van den Hurk, R. y Zhao, J. (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63:1717-1751.
- Venkatachalam, K. y Montell, C. (2007). TRP Channels. *Annual Review of Biochemistry*, 76:387-417.
- Wang, W., Liu, H.L., Tian, W., Zhang, F.F., Gong, Y., Chen, J.W., Mao, D.G., y Shi FX. (2010). Morphologic observation and classification criteria of atretic follicles in guinea pigs. *Journal of Zhejiang University-Science Biomedicine & Biotechnology*, 11(5):307-314.
- Wang, M., Ji, P., Wang, R., Zhao, L. y Xia, Z. (2012). TRPV1 Agonist capsaicin attenuates lung ischemia-reperfusion injury in rabbits. *Journal of Surgical Research*, 173(1) 153-160.
- Xia, R., Dekermendjian, K., Lullau, E. y Dekker, N. (2011). TRPV1: A therapy target that attracts the pharmaceutical interests. En: Shahidul Md. (Ed). *Transient receptor potential channels*. Springer, 637-665.
- Zhang, H., Zhang, Y., Zhao, H., Zhang, Y., Chen, Q., Peng, H., Lei, L., Qiao, J., Shi, J., Cao, Z., Duan, E. y Jin, Y. (2013). Hormonal regulation of ovarian bursa fluid in mice and involvement of aquaporins. *Plos One*, 8(5)1-7.

- Zhang, R., Humphreys, I., Sahu R.P., Shi, Y. y Srivastava, S.K. (2008). *In vitro* and *in vivo* induction of apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death pathway. *Apoptosis*, 13(12) 1465-1478.
- Zhao, L., Kuang, H., Zhang, L., Wu, J., Chen, X., Zhang, X. y Ma L. (2014). Effect of trpv1 channel on proliferation and apoptosis of airway smooth muscle cells of rats. *Journal of Huazhong University of Science and Technology (Medical Sciences)*, 34(4) 504-509.
- Zik, B., Akkoç Özgüden, C. G., Tütüncü, Ş., İlhan, T., Yilmaztepe, A.O. y Özenci Ç.Ç. (2010). Effects of low dose capsaicin (Cap) on ovarian follicle development in prepubertal rat. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 161(6) 288-294.

11. APÉNDICE

1. Reactivos utilizados en los experimentos

Anticuerpo primario: Mouse anti-capsaicin receptor monoclonal antibody

Proveedor: Millipore

Número de catálogo: MAB5568

Aplicación: Este anticuerpo está validado para su uso en Western blot e inmunohistoquímica.

Reactividad de las especies: rata, ratón y cobayo.

Anticuerpo secundario: anti-goat IgG conjugado con FITC

Proveedor: Santa Cruz Biotechnology

Número de catálogo: sc-2356

Aplicación: Este anticuerpo está validado para su uso en Western blot e inmunohistoquímica.

Yoduro de propidio

Proveedor: Millipore

Número de catálogo: S7109

Aplicación: Es un fluorocromo nuclear utilizado para contratinción.

Líquido de montaje: Mounting fluid (non-permanent)

Proveedor: Millipore

Número de catálogo: Chemicon's 5013

Aplicación: diagnóstico, inmunohistoquímica.

Triton X -100 para biología molecular

Proveedor: Sigma Aldrich

Número de catálogo: T8787

Capsaicina

Proveedor: Sigma Aldrich

Número de catálogo: M2028

2. Técnica de hematoxilina y eosina

1. Desparafinación con xilol; dos lavados de 10 minutos cada uno.
2. Baño de alcohol al 96 % por 10 minutos.
3. Hidratar con agua destilada por 3 minutos.
4. Teñir con hematoxilina por tres minutos.
5. Lavar en agua de la llave, cambiar hasta que el agua quede limpia.
6. Diferenciar en alcohol ácido 2 veces e inmediatamente lavar con agua de la llave.
7. Lavar en baño con solución saturada de carbonato de litio hasta cambio de color a azul brillante. Inmediatamente lavar con agua de la llave.
8. Teñir con Eosina por 2 minutos.
9. Alcohol al 96% por 2 minutos.
10. Deshidratar con alcohol absoluto por 2 minutos.
11. Sumergir las laminillas en alcohol-xilol por 3 minutos.
12. Sumergir en xilol por 15 minutos.
13. Montar con resina sintética para microscopía en xilol al 60%

3. Técnica de inmunohistoquímica

- Desparafinado e hidratación de los tejidos
 1. Sumergir en xilol por 20 minutos.
 2. Sumergir en alcohol-xilol por 10 minutos.
 3. Sumergir en alcohol absoluto por 10 minutos.
 4. Sumergir en alcohol absoluto por 3 minutos.
 5. Sumergir en alcohol al 96 % por 10 minutos.
 6. Sumergir en alcohol 70 % por 10 minutos.
 7. Lavar con agua destilada por 5 minutos.
 8. Enjuagar con buffer de fosfatos (PBS) a pH 7.4 por 5 minutos.

- Recuperación antigénica
 9. Incubar con el buffer de citratos por 30 minutos a 55 grados Celsius
 10. Incubar con PBS-T al 2% por 10 minutos
- Bloqueo de marcaje inespecífico
 11. Incubar con albumina libre de IgG al 0.5% por 30 minutos.
 12. Lavar con PBS-T 2 % por 10 minutos.
- Incubación con el anticuerpo primario
 13. Incubar con el anticuerpo primario (Mouse anti-capsaicin receptor monoclonal antibody) diluido en PBS-T (1:50). La incubación es en cámara húmeda cerrada por 20 horas a 4 grados Celsius
 14. Lavar 15 minutos con PBS-T
- Incubación con el anticuerpo secundario
 15. Incubar con el anticuerpo secundario (anti-goat IgG conjugado con FITC) (1:250) diluido en PBS-T, colocar las laminillas en cámara húmeda a temperatura ambiente protegidas de la luz.
 16. Lavar 15 minutos con PBS-T.
 17. Lavar 3 minutos con PBS.
 18. Teñir núcleos con yoduro de propidio (1:1000) por 3 minutos.
 19. Lavar 10 minutos con PBS agitando suavemente.
 20. Lavar 10 minutos con agua bidestilada.
 21. Lavar 5 minutos con PBS-T.
 22. Montar los cubreobjetos con líquido de montaje
 23. Observar al microscopio de fluorescencia.



Efecto dualístico de capsaicina sobre el desarrollo folicular ovárico de la cobaya

Mora Irene¹ (estudiante de licenciatura), Alatríste Victorino¹, Martínez Ma. Isabel¹, Limón Daniel¹, Oscar González-Flores² y Luna Félix¹

¹Departamento de Farmacia, FCQ-BUAP, Puebla CP 72570, México

²CIRA, CINVESTAV-UAT, Tlaxcala CP90140, México.

Los folículos ováricos de la cobaya infantil tienen baja expresión de los receptores TRPV1 y aumenta al llegar a la pubertad. Por otro lado, la capsaicina es un agonista de alta afinidad a los receptores TRPV1 que a dosis alta provoca denervación sensorial. El objetivo del presente trabajo fue probar el efecto de diferentes concentraciones de capsaicina sobre el desarrollo folicular y la pubertad de la cobaya. Usamos veinticuatro cobayas Hartley de 10 días de edad divididas en 4 grupos; los animales recibieron en la bolsa ovárica 100 μ l de 1 nM, 10 nM o 1 μ M de capsaicina, los controles recibieron el vehículo (SSI). Los animales fueron sacrificados a la edad de la primera apertura vaginal (PAV). Por análisis histológico contamos los folículos ováricos y por inmunohistoquímica (IHC) evaluamos las células TRPV1-positivas de los folículos. La capsaicina no modificó la edad de la PAV (1 nM, 39 \pm 2 días; 10 nM, 34 \pm 2 días y 1 μ M, 40 \pm 1 vs 36 \pm 3 días del grupo control). El peso de los ovarios no cambió con 1 y 10 nM (16 \pm 2, 16 \pm 1 vs 17 \pm 3 mg/100g) pero disminuyó con 1 μ M (13 \pm 1 mg/100g vs 16 \pm 3 días del control). Los folículos atrésicos disminuyeron con 1 y 10 nM de capsaicina, mientras que con 1 μ M lo aumentaron. Además, las células TRPV1-positivas incrementaron en los folículos sanos con 1 y 10 nM y disminuyeron con 1 μ M de capsaicina. Nuestros resultados muestran que la capsaicina, a concentraciones bajas (1 nM y 10 nM) aumenta el desarrollo folicular, mientras que concentraciones mayores (1 μ M) aumenta la atresia. Este efecto dualístico de la capsaicina es similar al que se ha reportado en la médula espinal, el útero o la vejiga urinaria, por lo que podemos concluir que el uso de este compuesto es una excelente herramienta farmacológica, ya que al modular diferencialmente a los receptores TRPV1 dependiendo de la dosis, puede estimular o inhibir el desarrollo folicular ovárico.