



# Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Posgrado en Ciencias Químicas

Maestría en Ciencias Químicas

Área de Bioquímica y Biología Molecular

## “Participación de los receptores TRPV1 en desarrollo celular del útero en ratonas CD1 inducidas con Síndrome de Ovario Poliquístico”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

En el área de Bioquímica y Biología Molecular

PRESENTA

**QFB. CINTIA ABIGAIL ZERÓN ALVARADO**

Directores de Tesis

**D.C. Victorino G. S. Alatraste Bueno**

Laboratorio de Neuroendocrinología FCQ-BUAP

**D.C. Liliana Martínez Mendieta**

Laboratorio de Neuroquímica FCQ-BUAP

Puebla, Pue. Noviembre 2023

*“Para las personas creyentes, Dios está al principio. Para los científicos está el final de todas sus reflexiones.”*

*Max Planck*



**BUAP**

Oficio PCQ/393/2023

**Mtro. Alfredo Avendaño Arenaza**  
**Director General de Bibliotecas**  
**Presente**

A través de este medio me dirijo a usted para informarle que la tesis con título **Participación de los receptores TRPV1 en desarrollo celular del útero en ratonas CD1 inducidas con Síndrome de Ovario Poliquístico**, ha sido avalada bajo los preceptos de integridad académica; por tanto, se autoriza la impresión de tesis de la alumna:

Nombre de la alumna: **Cintia Abigail Zeron Alvarado**

Matrícula: **221470330**

Facultad: **Facultad de Ciencias Químicas – Instituto de Ciencias**

Programa Educativo: **Maestría en Ciencias Químicas**

Licenciatura o Posgrado: **Posgrado**

Sin más por el momento, agradezco la atención al presente.

**ATENTAMENTE**  
**“Pensar bien, para vivir mejor”**  
**H. Puebla de Z., a 27 de noviembre de 2023**

  
**Dra. Jaqueline Jiménez Hernández**  
**Secretaría Académica**



  
**Dr. Gilberto Serafín Victorino Alatraste Bueno**  
**Director de Tesis**

  
**Dra. Lilitiana Martínez Mendieta**  
**Codirectora de Tesis**

## AGRADECIMIENTOS

Gracias al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías por la beca económica otorgada para lograr este grado académico.

Gracias a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado.



# CONAHCYT

CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES  
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS

CVU: 1147969



Vicerrectoría de Investigación  
y Estudios de Posgrado

ID Proyecto: 00231

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis directores de tesis el Dr. Victorino Alatraste y la Dra. Liliana Martínez por la dirección y guía para llevar a cabo este trabajo. Gracias por cada una de sus enseñanzas, consejos y apoyo. Son un ejemplo para mí.

Gracias al Dr. Daniel Limón, la Dra. Victoria Palafox, al Dr. Alan Carrasco y al MC. Félix Luna por sus observaciones y correcciones que fueron de gran utilidad para enriquecer mi trabajo. Les agradezco por su tiempo, disposición e interés.

Gracias a mi papá Fausto Zerón. Gracias por cada uno de tus sacrificios para darme la mejor educación, por apoyar cada uno de mis pasos y siempre creer que podría entrar a la maestría e igualarnos en grado. A pesar de que no viste realizado este sueño yo se que estas en mi corazón. Un beso al cielo.

Gracias a mi mamá Cira Alvarado. Gracias por siempre apoyarme y animarme cuando más lo necesito. Gracias por hacerme la mujer que soy. Gracias por tu fortaleza y cuidados que nunca acaban.

Gracias a mis padrinos Ignacio López y Leticia Martínez por ser unos segundos padres para mí, gracias porque sus ánimos y confianza en mis sueños me ayudaron cada vez que creí que no podía más.

Gracias a mis amigos por amar, escuchar, motivar y creer en mí.

Gracias a mis compañeros del laboratorio de Neuroendocrinología de la Facultad de Ciencias Químicas. Agradezco a los chicos de Servicio Social, Práctica Profesional, tesis y estudiantes de posgrado. Gracias por su apoyo, compañía, motivación y amistad. Espero podamos seguir creciendo y convertirnos en esos científicos que anhelamos ser y que nuestro futuro esté lleno de colaboraciones.



Por último, pero más importante para hoy estar escribiendo este texto: Gracias infinitas a Dios. Gracias por la vida y sus experiencias de aprendizaje. Gracias por permitirme soñar y realizar. Gracias porque tuya es la sabiduría y la ciencia que en tu amor me permites apreciar.

# Índice

<i>Resumen</i>	1
1. <i>Introducción</i>	2
1.1 <i>Síndrome de Ovario Poliquístico</i>	2
1.2 <i>El valerato de estradiol como modelo de SOP en animales</i>	11
1.3 <i>Receptor de potencial transitorio a vaniloide miembro 1 (TRPV1)</i>	12
1.4 <i>Implicaciones del receptor TRPV1 en el Síndrome de Ovario Poliquístico</i>	18
2. <i>Justificación:</i>	20
3. <i>Hipótesis:</i>	21
4. <i>Objetivos:</i>	21
4.1 <i>Objetivo general:</i>	21
4.2 <i>Objetivos específicos:</i>	21
5. <i>Metodología:</i>	22
5.1 <i>Diagrama de Trabajo.</i>	22
5.2 <i>Materiales y métodos.</i>	23
6. <i>Resultados</i>	29
6.1 <i>Docking molecular</i>	29
6.1.1 <i>Docking molecular sin membrana epitelial</i>	29
6.1.2 <i>Docking molecular con membrana epitelial</i>	36
6.2 <i>Evaluación del modelo experimental</i>	44
6.2.1 <i>Determinación de la primera apertura vaginal (PAV)</i>	44
6.2.2 <i>Registro de variación de peso</i>	45
6.2.3 <i>Seguimiento del ciclo estral</i>	46
6.3 <i>Evaluación de los úteros</i>	50
6.3.1 <i>Peso relativo de los úteros</i>	50
6.3.2 <i>Evaluación morfométrica de las capas uterinas</i>	51
6.3.2.1 <i>Evaluación morfométrica del epitelio luminal</i>	51
6.3.2.2 <i>Evaluación morfométrica del endometrio</i>	52
6.3.2.3 <i>Evaluación morfométrica del miometrio</i>	53
6.3.2.4 <i>Evaluación morfométrica del perimetrio</i>	55

6.3.2.5 <i>Conteo y evaluación morfológica de glándulas endometriales</i>	57
6.3 <i>Semicuantificación del receptor TRPV1 en el útero</i>	60
6.3.1 <i>Semicuantificación del receptor TRPV1 en el perimetrio</i>	60
6.3.2 <i>Semicuantificación del receptor TRPV1 en el miometrio</i>	61
6.3.3 <i>Semicuantificación del receptor TRPV1 en el endometrio</i>	62
6.3.4 <i>Semicuantificación del receptor TRPV1 en el epitelio luminal</i>	63
7. <i>Discusión de resultados</i>	65
7.1 <i>Comparación entre el docking molecular TRPV1-Capsaicina y TRPV1-Capsaicina con membrana epitelial</i>	65
7.2 <i>Evaluación del valerato de estradiol como modelo de SOP en animales</i>	67
7.3 <i>Evaluación del epitelio ciliar, endometrio y glándulas endometriales</i>	68
7.4 <i>Evaluación del miometrio</i>	70
7.5 <i>Evaluación del perimetrio</i>	71
7.6 <i>La capsaicina como modulador del desarrollo celular</i>	71
8. <i>Conclusiones</i>	74
9. <i>Perspectivas</i>	75
10. <i>Referencias</i>	76
11. <i>Anexos</i>	88



## **Resumen**

*El Síndrome de ovario poliquístico (SOP) es un trastorno neuroendocrino que afecta a las mujeres en edad reproductiva. El SOP causa infertilidad por anovulación. Aunque la anovulación sea tratada farmacológicamente se siguen reportando fallas en la implantación, abortos espontáneos y otras complicaciones durante el embarazo. Estos problemas se han asociado a cambios morfológicos que ocurren en las pacientes a nivel uterino, como lo es la hiperplasia endometrial. Por este motivo, es importante estudiar nuevos moduladores del desarrollo celular en el útero. El receptor de potencial transitorio a vaniloide miembro 1 (TRPV1) es un receptor transmembranal que se ha encontrado en fibras sensoriales y en varios órganos periféricos donde se han propuesto diferentes funciones, entre ellas la proliferación y diferenciación celular. Uno de los agonistas más estudiados del receptor TRPV1 es la capsaicina, componente principal de los chiles. De acuerdo con la concentración de capsaicina empleada, se pueden observar distintas respuestas biológicas de la activación del receptor TRPV1. A bajas concentraciones de capsaicina se promueve la proliferación celular y a altas concentraciones se produce muerte celular. Por estos antecedentes, la hipótesis de este trabajo fue que la estimulación de los receptores TRPV1 con capsaicina modula el desarrollo celular del útero en ratonas CD1 con SOP inducido con valerato de estradiol. El presente trabajo consistió en un estudio in silico de docking molecular entre el receptor TRPV1 y la capsaicina para conocer sus sitios de unión y sus interacciones. Para probar el efecto in vivo en el desarrollo celular uterino se trabajó con ratonas CD1 inducidas a SOP con valerato de estradiol y una posterior administración de capsaicina 1 o 10 nM.*

*Como primera parte del trabajo se determinaron los sitios de unión para capsaicina en el receptor TRPV1 por medio de un docking molecular. Se encontraron 4 sitios de unión a capsaicina en la zona transmembranal y 1 sitio en el poro catiónico con una constante de disociación ( $K_D$ ) de 2 a 10  $\mu$ M. Como segunda parte del trabajo se administró capsaicina 1 y 10 nM en ratonas CD1 inducidas a SOP con valerato de estradiol para estudiar los cambios morfológicos y semicuantificar al receptor TRPV1 en las capas uterinas. En el modelo de VE en ratonas CD1 se encontraron alteraciones morfológicas en el desarrollo celular uterino como la hiperplasia endometrial, aumento del grosor epitelial con aumento de celularidad aberrante y una disminución en el grosor del perimetrio. En este modelo también se observaron alteraciones en la semicuantificación del receptor TRPV1, mostrando una disminución en el epitelio luminal, endometrio y miometrio. La capsaicina en concentraciones 1 y 10 nM demostró ser un buen modulador del desarrollo celular uterino, mejorando la morfología celular aberrante del epitelio luminal y de las glándulas endometriales, así como aumentando el número de glándulas endometriales y el grosor del endometrio, miometrio y perimetrio. Además, mostró un aumento en la semicuantificación del receptor TRPV1 en el epitelio luminal, en el endometrio y en el perimetrio.*

*Como conclusión de este trabajo, nosotros proponemos que la capsaicina en concentraciones de 1 y 10 nM causa una mejora en las anormalidades del desarrollo celular uterino en ratonas CD1 inducidas a SOP con valerato de estradiol a través del agonismo del receptor TRPV1.*

## **1. Introducción**

### **1.1 Síndrome de Ovario Poliquístico**

El Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) es un trastorno neuroendocrino frecuente y la causa principal de infertilidad anovulatoria que afecta a muchas mujeres en edad reproductiva en todo el mundo (Azziz et al., 2004) (Deans et al., 2019). Originalmente fue descrito como un cuadro clínico caracterizado por la presencia de ovarios con pequeños quistes, amenorrea, hirsutismo y obesidad (Stein, Leventhal, 1935). Además, el SOP se ha asociado normalmente a disfunción ovárica, exceso en los niveles de andrógenos, resistencia a insulina y otras comorbilidades (Witchel et al., 2019), por lo cual el SOP puede verse como un sistema complejo y heterogéneo con características reproductivas, metabólicas y psicológicas (Azziz et al., 2016) con una prevalencia del 6 al 20% de la población dependiendo de los criterios usados para su diagnóstico (Chang et al., 2019).

#### **1.1.2 Criterios diagnósticos**

La manifestación clínica del SOP es heterogénea; incluye al hiperandrogenismo, amenorrea, hirsutismo, anovulación, ovarios poliquísticos, resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y obesidad (Norman et al., 2007). Debido a la heterogeneidad de los síntomas que presenta cada paciente con SOP, el diagnóstico correcto es un reto.

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). Posteriormente, las sociedades europeas y norteamericana de reproducción crearon en 2003 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 (después de la exclusión de otras etiologías como hiperplasia suprarrenal congénita, tumores secretores de andrógenos o síndrome de Cushing) (Rotterdam, 2004). Las características ecográficas del SOP incluyen la presencia de 12 o más folículos en cada ovario que miden de 2 a 9 mm de diámetro y/o aumento del volumen ovárico (>10 ml). Esto es independiente de la distribución del folículo o la ecogenicidad del estroma ovárico. Un ovario que cumpla con esta definición es suficiente para definir el SOP (Azziz et al., 2006). Las mujeres con SOP que ovulan parecen ser menos resistentes a la insulina que las mujeres con SOP que anovulan (Adams et al., 2004); además, un estudio publicado en 2007 sugirió que las mujeres con SOP, anovulación crónica y niveles normales de andrógenos no son resistentes a la insulina (Barber et al., 2007). Estas observaciones limitan la utilidad de los criterios de Rotterdam y, en consecuencia, un panel de expertos de la Sociedad de Exceso de Andrógenos (AES) en el 2006 recomendó que el SOP se considere un trastorno de exceso de andrógenos y que se utilicen los criterios de diagnóstico de los NIH. La AES también recomendó que se debe considerar que las mujeres con hiperandrogenismo, síndrome de ovario poliquístico y ciclos ovulatorios tienen un fenotipo de síndrome de ovario poliquístico; por lo tanto, el hiperandrogenismo y la ovulación

infrecuente o irregular, así como el hiperandrogenismo, la ovulación regular y el SOP, cumplen los criterios de la AES para el SOP. Otras condiciones para tener en cuenta para el diagnóstico del SOP que pueden ser de utilidad son el historial médico, los cambios de peso, síntomas de resistencia a insulina, un examen pélvico, una ecografía transvaginal y medición de niveles hormonales (Sadeghi et al., 2002).

### **1.1.3 Patogénesis del SOP y su origen neuroendocrino**

A pesar de la alta prevalencia del SOP y su impacto significativo en la salud, no existe una cura y su manejo actual es subóptimo porque se basa en el tratamiento empírico *ad hoc* de los síntomas. La etiología del SOP sigue sin estar clara al igual que su mecanismo principal, por lo que los tratamientos basados en mecanismos siguen siendo inalcanzables. (Walters et al., 2018).

Varios trastornos se encuentran relacionados y generan un círculo vicioso que resulta en elevación de andrógenos, lo que produce disfunción de los ovarios y del útero (Concha et al., 2017). Los andrógenos elevados representan una característica importante del SOP porque la mayoría (~60 %) de las pacientes son hiperandrogénicas (definición de Rotterdam). Las mujeres con SOP hiperandrogénico muestran una elevación en los niveles séricos de varios andrógenos, incluida la testosterona (T) y los proandrógenos androstenediona (A4) y sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), así como la enzima necesaria para convertir los proandrógenos en andrógenos bioactivos: 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD) (Keefe et al., 2014; Palomba et al., 2014). Se ha informado que modelos animales de roedores, ovejas y primates expuestos prenatalmente a niveles excesivos de andrógenos exhiben la mayoría de los rasgos reproductivos, endocrinos y metabólicos claves de las mujeres con SOP (Walters et al., 2018). Estos hallazgos respaldan un origen fetal para la patología del SOP, donde se planteó la hipótesis de que la programación normal durante la gestación se ve interrumpida por niveles excesivos de andrógenos, lo que conduce a la manifestación de anomalías reproductivas, endocrinas y metabólicas en la vida adulta (Xita et al., 2006). Múltiples líneas de evidencia han sugerido que los andrógenos que actúan a través del receptor de andrógenos (AR) juegan un papel no solo importante, sino esencial, en la patogénesis del SOP, ya que estos receptores se encuentran expresados a lo largo del eje Hipotálamo-hipófisis-ovario (H-H-O) y otros sitios clave en el SOP como hígado y adipocitos. Una pregunta clave para comprender el SOP es si los mecanismos intraováricos o extraováricos inician la patología del síndrome. Los últimos conocimientos de modelos animales del SOP sugirieron que un mecanismo extraovárico crucial sustenta el desarrollo del síndrome (Abbott et al., 2017). Las ratonas que carecen de la acción de receptores androgénicos en el cerebro fueron significativamente protegidas contra muchas características del SOP inducido por dihidrotestosterona (DHT) con rasgos de desregulación metabólica, que incluyen obesidad, aumento de grasa visceral, dislipidemia e hipertrofia pronunciada de adipocitos y esteatosis hepática, esto parece indicar que el cerebro es el sitio clave para el desarrollo de la patogénesis del SOP (Caldwell et al., 2018).

La alteración de la regulación neuroendocrina de la función ovárica también está implicada en los orígenes del SOP. Recientes estudios de la Asociación del Genoma Completo (GWAS por sus siglas en inglés) identificaron polimorfismos en genes asociados con las gonadotropinas y sus receptores: gen del receptor luteinizante/coriogonadotropina (LHCGR), genes relacionados al receptor de la hormona folículo estimulante (FSHR) y variaciones de genes en la subunidad beta de

la hormona folículo estimulante (FSHB). Los polimorfismos identificados hasta la fecha representan sólo una pequeña fracción de la heredabilidad del SOP, lo que sugiere que los mecanismos ambientales y epigenéticos pueden desempeñar un papel mucho más importante en los orígenes de la patología (Shi et al., 2012). Un historial familiar con SOP, por lo tanto, es también un factor de riesgo para desarrollar el síndrome, ya que basado en la agrupación de casos en familias, este es un desorden hereditable (Sirmans et al., 2014). Entre los factores epigenéticos que pueden afectar el SOP se encuentran una hipometilación del receptor LHCGR, que conlleva a una mayor expresión génica y mayor sensibilidad a LH (Abbott et al., 2019).

En las mujeres con SOP es común el reporte de un aumento de la frecuencia del pulso de la hormona luteinizante (LH) y un aumento en la proporción de LH sobre la hormona folículo estimulante (FSH), lo cual sugiere una mayor estimulación de la frecuencia del pulso de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y una mayor actividad de las neuronas GnRHérgicas río arriba en el hipotálamo. Las neuronas GnRHérgicas sirven como la salida final común de la compleja red neuronal que regula la función reproductiva por lo que la actividad de la liberación pulsátil de GnRH depende en gran medida de la retroalimentación homeostática por medio de la señalización de las hormonas esteroideas gonadales en el cerebro. Estas neuronas expresan el receptor de estrógeno (ER)  $\beta$ ; sin embargo, los receptores androgénicos, como ER $\alpha$  y el receptor de progesterona, no se encuentran expresados (Walters et al., 2018). La regulación de retroalimentación negativa mediada por esteroides es en gran medida indirecta y se facilita a través de la red neuronal que se encuentra río arriba de las neuronas GnRH. Hay evidencia de que las pacientes con SOP requieren concentraciones más altas de liberación exógena estradiol y progesterona para ralentizar la liberación pulsátil de alta frecuencia de LH (Pastor et al., 2018) (Chhabra et al., 2005).

La mayoría de las alteraciones en los circuitos cerebrales asociados con los déficits reproductivos del SOP se identificaron en neuronas del núcleo arcuato, en específico las neuronas Kisspetina-Neuroquinina B- Dinorfina (KNDy) y las GABAérgicas. Las neuronas KNDy son importantes en la liberación pulsátil de GnRH, así como la retroalimentación de los esteroides gonadales sobre las neuronas GnRHérgicas, además, se han informado cambios sutiles en la expresión y el circuito de KNDy en varios modelos animales del SOP (Navarro et al., 2012). Otro tipo de neuronas importantes en la activación de las neuronas GnRHérgicas son las GABAérgicas. Normalmente GABA actúa como un neurotransmisor inhibitorio en la mayoría del cerebro adulto, sin embargo, las neuronas GnRHérgicas con frecuencia responden a GABA con excitación debido a una mayor concentración de cloruro intracelular. Experimentos en ratones expuestos a andrógenos de forma prenatal mostraron una mayor invasión de neuronas GABAérgicas con un aumento en la frecuencia de activación de las neuronas GABAérgicas. Esto sugiere que el aumento de la señalización de GABA en el SOP puede ser responsable de impulsar el sistema hiperactivo de GnRH/LH y sus consecuencias posteriores asociadas (Herbison et al., 2011).

La señalización de la hormona antimülleriana (AMH) en el cerebro ha sido implicada como un actor potencial en el desarrollo y fisiopatología del SOP. La AMH está frecuentemente elevada en mujeres con SOP debido a un mayor desarrollo de folículos antrales pequeños y se ha informado que permanece elevada durante el embarazo en mujeres delgadas con SOP. Se ha demostrado que una población significativa de neuronas GnRHérgicas tanto humanas como de ratón expresan el receptor de AMH, y que la AMH puede estimular directa y potentemente la actividad de activación de estas neuronas y aumentar la secreción de LH dependiente de GnRH. Estos hallazgos sugieren

que la AMH elevada puede ser más que simplemente el resultado de un mayor desarrollo de folículos en el SOP y puede contribuir potencialmente a la fisiopatología central (Tata et al., 2018) (Cimino et al., 2016). En la figura 1 se resume la patogénesis del SOP, su origen neuroendocrino y la disregulación en la retroalimentación hormonal.

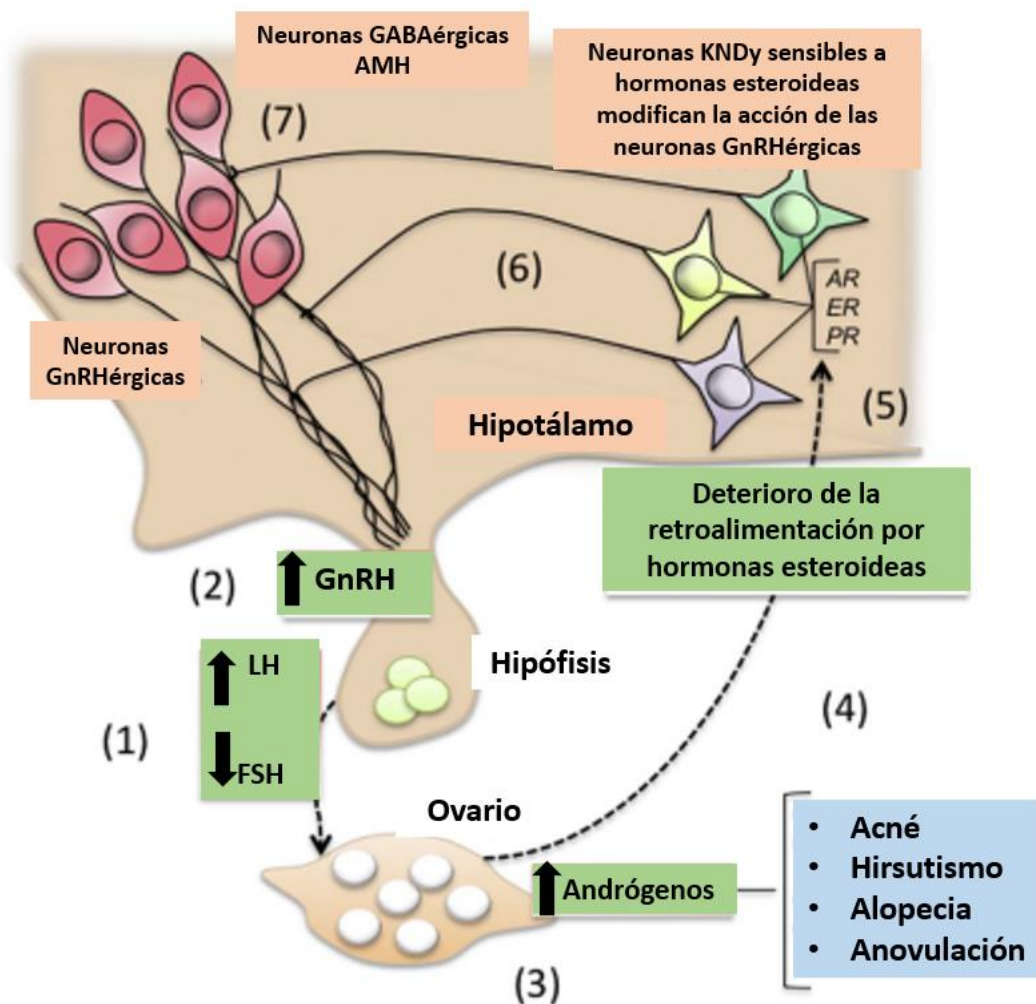


Figura 1. El eje hipotálamo-hipófisis-ovario en el SOP. La elevación de LH y la disminución de FSH en el SOP (1) se han asociado a una elevación de la liberación pulsátil de GnRH por las neuronas GnRHérgicas (2). Un aumento de la proporción de LH a FSH aumenta la hiperplasia de las células de la teca y una producción elevada de andrógenos (3) que contribuye a la apariencia poliquística del ovario y afecta múltiples tejidos sensibles a los andrógenos causando la clínica clásica (4). La retroalimentación negativa por hormonas esteroideas a neuronas KNDy se ve alterada por los niveles elevados de andrógenos (5) que contribuyen a una población de neuronas GnRHérgicas hiperactiva (6). Otros factores que contribuyen a la hipersecreción de GnRH son el aumento de la señalización de las neuronas GABAérgicas en exceso de andrógenos y el aumento de la estimulación directa de AMH en las neuronas GnRHérgicas (7). Moore y Campbell, 2017.

#### **1.1.4 Características clínicas**

Las características clínicas del SOP incluyen hiperandrogenismo clínico en forma de hirsutismo (el cual se presenta en el 70% de las pacientes con SOP), acné (el cual es menos común en el SOP y menos específico que el hirsutismo) o alopecia. La irregularidad menstrual abarca amenorrea primaria o secundaria, oligomenorrea, períodos irregulares y sangrado menstrual abundante. Las pruebas clínicas muestran una morfología ovárica poliquística en ultrasonido, y/o trastorno metabólico en análisis de sangre, incluyendo resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, obesidad y dislipidemia. Sin embargo, puede haber una marcada heterogeneidad en su presentación clínica (Morris et al., 2016). La resistencia a la insulina es un síntoma muy importante en el SOP que puede desencadenar en hiperinsulinemia y conducir a diabetes mellitus tipo 2 (Sirmans et al., 2014). 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 y problemas cardiovasculares (Teede et al., 2010).

#### **1.1.5 Asociación del SOP con otras comorbilidades**

Como fue descrito anteriormente, el Síndrome de Ovario Poliquístico tiene como características clínicas principales el hiperandrogenismo (clínico o bioquímico), disfunción ovulatoria y la presencia de ovarios poliquísticos. Sin embargo, existe una considerable variación interindividual en la presentación. Aunque no se requiere para el diagnóstico, la presencia de resistencia a la insulina e hiperinsulinemia es común y coloca a los afectados en un mayor riesgo de diabetes y enfermedad cardiovascular. Por lo tanto, el SOP afecta negativamente la salud endocrina, metabólica y cardiovascular (Sirmans et al., 2014).

La diabetes tipo 1, tipo 2 y diabetes gestacional han sido asociadas a un incremento en la prevalencia del SOP. En un estudio de prevalencia del SOP en la diabetes tipo 1 se encontró en un 18.8% (Escobar-Morreale et al., 2000), la prevalencia de diabetes tipo 2 en el SOP ha sido estimada del 26.7% (Peppard et al., 2001) y en un estudio de diabetes gestacional el SOP fue identificado en 16% de las pacientes estudiadas (Kashanian et al., 2008). La prevalencia de la resistencia a insulina en el SOP varía desde 50-70%. La hiperinsulinemia produce un estado hiperandrogénico actuando como una gonadotropina con la hormona luteinizante (LH), aumentando la producción de andrógenos por las células de la teca y reduciendo la producción hepática de globulina transportadora de hormonas sexuales, lo que da como resultado en concentraciones más altas de andrógenos libres (Tsilchorozidou et al., 2004). Se ha demostrado un mayor riesgo de dislipidemia en SOP. Las anomalías de los lípidos incluyen la reducción de la alta densidad lipoproteína-colesterol (HDL-C), aumento de los triglicéridos, y aumento del colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) (Sirmans et al., 2014).

Varios estudios concluyen que las mujeres con SOP tienen una prevalencia de hipertensión, y esto se ha asociado a disfunción endotelial posiblemente asociado a un incremento en los niveles de endotelina y aldosterona relacionado a la resistencia a insulina, así como a la obesidad (Diamanti-Kandarakis et al., 2011) (Casella et al., 2006).

Por último, las mujeres con SOP tienen una prevalencia de distintos desórdenes de salud mental. Un estudio reveló que el 35% de las mujeres con SOP estudiadas tenían depresión con respecto al 10.7% del control. También se han informado resultados de mujeres con SOP para los trastornos de ansiedad, donde los resultados oscilan entre 13 y 63%. Los desórdenes alimenticios también parecen ser más común en el SOP con el 12,16 % de las mujeres con SOP en comparación con el 2,83 % de los controles (Hollinrake et al., 2007) (Dokras et al., 2017) (Lee et al., 2017).

### **1.1.6 Síndrome de Ovario Poliquístico y su afectación al ovario**

El SOP recibe su nombre por los múltiples quistes que presentan los ovarios, lo cual conlleva a anovulación y/o trastornos menstruales que aparecen después de la menarca (Walters et al., 2018). Las mujeres con SOP presentan ovarios agrandados de dos a cuatro veces, además hay engrosamiento de la túnica albugínea e hiperplasia de las células de la teca con hipersecreción de andrógenos (Ozyurek et al., 2017). También, hay producción crónica de estrona que ocurre por la conversión periférica de la androstenediona. La estrona aumenta la sensibilidad de la hipófisis al factor liberador endógeno, resultando en secreción exagerada y pulsátil de LH. Por otro lado, la secreción baja de FSH ocurre por la acción inhibitoria de los estrógenos (Deng et al., 2017). La infertilidad afecta al 40% de las mujeres con SOP. El SOP es la causa más común de infertilidad anovulatoria en mujeres de edad reproductiva. Aproximadamente el 90%-95% de las mujeres anovulatorias que acuden a las clínicas de infertilidad tienen SOP (Sirmans y Pate, 2014). Se ha reportado que el incremento de ROS por medio de la NADPH oxidasa (NOX 2) en el SOP conlleva a apoptosis de células de la granulosa, que afecta la calidad de los ovocitos y reduce el éxito de fertilizaciones *in vitro* de las pacientes (Lai et al., 2018). Las mujeres con SOP tienen un número normal de folículos primordiales y los folículos primarios y secundarios aumentan significativamente. Sin embargo, debido a alteraciones en los factores involucrados en el desarrollo folicular normal, el crecimiento folicular se detiene cuando los folículos alcanzan un diámetro de 4 a 8 mm. Debido a que no se desarrolla un folículo dominante, no se produce la ovulación y se reporta mala calidad de los ovocitos (Teede et al., 2010) (Brassard et al., 2008).

### **1.1.7 Síndrome de Ovario Poliquístico y su afeción al útero**

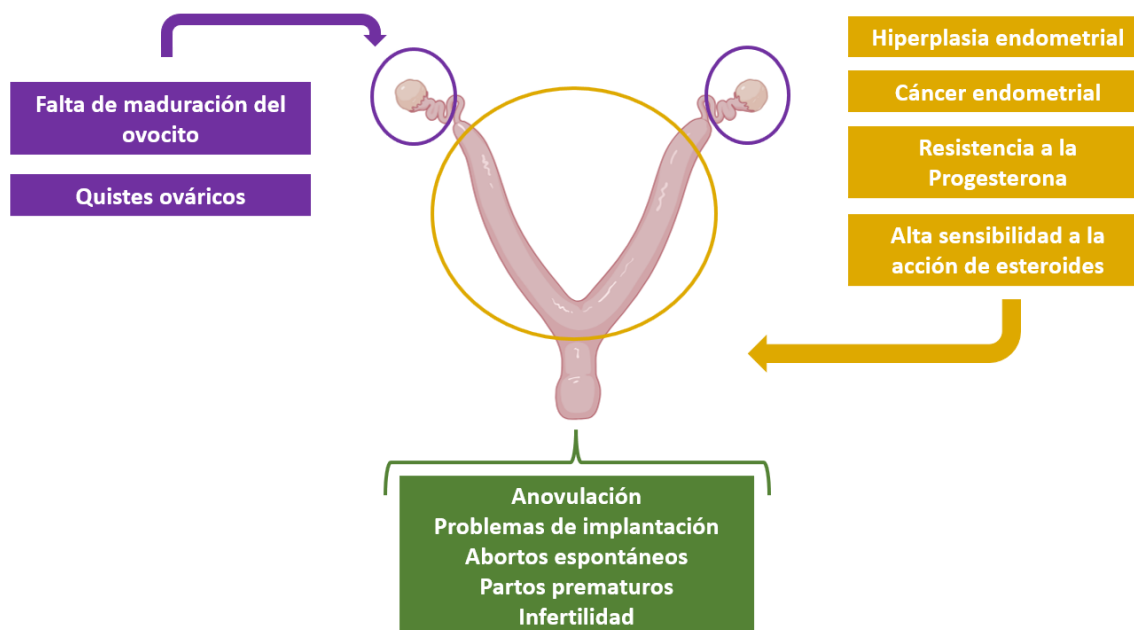
En pacientes con SOP se ha reportado una reducción en los niveles de fertilidad, además el aborto espontáneo ocurre con mayor frecuencia en las pacientes con SOP con incidencias que oscilan entre el 42% y el 73% (Jakubowicz et al., 2002) lo cual se ha reportado asociado con obesidad, problemas cardiovasculares y metabólicos en el SOP (Chakraborty et al., 2013). Lou et al. indicó que las mujeres con SOP tienen un mayor riesgo de aborto espontáneo después de la transferencia de embriones euploides independientemente de la edad y el índice de masa corporal. Estos autores plantearon la hipótesis de que el trastorno endocrino que afecta la función endometrial en el SOP podría ser un factor importante que contribuya a comprometer el resultado del embarazo (Lou et al., 2017). Incluso se ha observado que, aunque se logre el embarazo, las mujeres con SOP tienen significativamente una mayor cantidad de complicaciones durante el embarazo como diabetes gestacional, trastornos hipertensivos y parto prematuro (Joham et al., 2016). Un informe sugirió que la hiperinsulinemia afecta negativamente la función endometrial y el entorno preimplantacional al

disminuir la expresión de glicodelina y proteína de unión al factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGFBP-1). La glicodelina puede desempeñar un papel en la inhibición de la respuesta inmunitaria endometrial al embrión, y la IGFBP-1 parece facilitar los procesos de adhesión en la interfaz fetomaterna. (Jakubowicz et al., 2001).

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 y cáncer endometrial (Barry et al., 2014; Gottschau et al., 2015). La hiperplasia ocurre por la proliferación de las glándulas endometriales con tamaño y forma irregular, que aumentan la razón glándula/estroma (Usandizaga-Pombo, 1966). La hiperplasia endometrial es una condición precancerosa que surge en presencia de una exposición crónica a los estrógenos en oposición a la progesterona. 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). A nivel celular, existen numerosos mecanismos potenciales para promover la enfermedad neoplásica en mujeres con SOP como lo es el estado anovulatorio prolongado, el hiperandrogenismo asociado con la acción de los estrógenos sin oposición, (Key et al., 1988) así como la obesidad e hiperinsulinemia y/o la resistencia a la insulina. La obesidad se relaciona con niveles altos de estradiol a partir de la aromatización de los andrógenos en el tejido adiposo a estrona y la conversión a estradiol, mientras que la insulina promueve la proliferación celular a través del sistema IGF, ya que se ha reportado que en pacientes con SOP hay niveles elevados de IGF-1 e IGF-2 los cuales al unirse a su receptor activan la proliferación celular y suprimen la apoptosis (Chen et al., 2013). Se ha demostrado una sobreexpresión de genes inflamatorios y protooncogénicos, independiente del índice de masa corporal, en células estromales y epiteliales de células endometriales aisladas en mujeres con SOP (Piltonen et al., 2013). La presencia de atipia celular es el factor que favorece la progresión a cáncer endometrial. Se ha encontrado que el 23 % de las mujeres con hiperplasias atípicas desarrollan cáncer endometrial en 4 años posterior al diagnóstico (Zeferino-Toquero et al., 2013). Se han informado las anormalidades del fenotipo, la función y receptividad endometrial y se sugiere que el aborto puede ocurrir debido a estos cambios endometriales (Wang et al., 2001; Giudice et al., 2006). El uso de progestina cíclica o el uso de anticonceptivos orales en combinación con estrógeno y progestina puede ayudar a inhibir la proliferación endometrial (Badawy, Elnashar, 2011). Sin embargo, aproximadamente el 30% de las mujeres con esta afección no responde al tratamiento con progesterona y sufre progresión a hiperplasia atípica y transformación adicional al cáncer de endometrio (Aghajanova et al., 2010).

Se ha mostrado que las mujeres con SOP hipernadrogénicas presentan resistencia a la progesterona (P4) en el endometrio (Savaris et al., 2011). La expresión de receptores de andrógenos (AR) y estrógenos (ER) aumenta significativamente en el endometrio de mujeres con SOP, lo que indica que el endometrio exhibe una alta sensibilidad a la acción de los esteroides (Villavicencio et al., 2006). La expresión de los receptores a progesterona (PR) es en general más alta en endometrio del SOP ovulatorio, particularmente en el compartimiento del epitelio. Por lo tanto, la abundancia de ER y PR en el epitelio, y no en el estroma del endometrio en fase secretora media puede indicar una acción alterada de la progesterona en mujeres con SOP (Leon et al., 2008). La disminución de la capacidad de respuesta a la progesterona biodisponible en el endometrio de mujeres con SOP implica resistencia a la progesterona. En mujeres con SOP, las funciones reguladoras de la progesterona y la extracción de progesterona en el endometrio es deficiente secundario a ciclos oligoovulatorios o anovulatorios. Esto da como resultado un nivel circulante bajo de estrógenos y

cambios endometriales comparables a la fase folicular a lo largo del ciclo (Azziz et al., 2016). Por otro lado, la conversión periférica de androstenediona a estrona en el tejido adiposo, así como el aumento de los niveles de estradiol libre y testosterona en el contexto de la hiperinsulinemia, amplifica los efectos estimulantes y mitógenos de la exposición al estradiol sin oposición. Esto puede conducir a patrones de sangrado impredecibles y sangrado menstrual abundante (Deligeoroglou et al., 2015).



*Figura 2. El SOP y sus afectaciones en el aparato reproductor femenino. En el ovario hay falta de maduración del ovocito que conlleva al desarrollo de quistes ováricos. En el útero se presenta hiperplasia endometrial que puede progresar a cáncer endometrial en las pacientes debido a las alteraciones hormonales. Las afectaciones en la morfología ovárica y uterina causan problemas funcionales en la reproducción como es la anovulación, problemas de implantación, abortos espontáneos y partos prematuros causando infertilidad.*

Está bien establecido que el estrógeno aumenta la expresión endometrial de sus propios receptores (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) y el de AR (Slayden et al., 2001). La alta expresión de ER y AR observada en estudios de pacientes con SOP puede explicarse en parte por la afección hiperestrogénica sin oposición de progesterona. También se ha planteado que los estrógenos son más "potentes" en SOP a través de la acción de coactivadores. Gregory et al. indicaron una sobreexpresión de la familia de coactivadores de receptores de esteroides p160 tanto en el endometrio proliferativo como en el secretor. La expresión mejorada de p160 representa un endometrio más sensible a las acciones de los estrógenos, que en paralelo con el aumento de la expresión de ER explica la mayor incidencia de anomalías endometriales en las mujeres con SOP. El aumento de la expresión de ER $\alpha$  en pacientes ovulatorias con SOP puede contribuir a una mayor falla de implantación y menores tasas de embarazo en mujeres con SOP (Gregory et al., 2002).

Se ha observado un flujo sanguíneo uterino anormal en mujeres con SOP (Palomba et al., 2010). El endometrio es un tejido dependiente de hormonas esteroides. La alteración en los niveles de hormonas esteroides pueden ser responsables de la elevada resistencia al flujo sanguíneo en el útero de mujeres con SOP (Loverro et al., 2001). Se informó que el SOP se diagnostica con mayor frecuencia en adolescentes con anomalías de sangrado uterino que requirió ingreso hospitalario y se describieron las características ecográficas del grosor endometrial y mediciones uterinas en un grupo de adolescentes diagnosticadas con SOP. En este estudio, se reportó un aumento en el grosor del endometrio y una disminución en la longitud uterina correlacionado a la exposición a estrógenos sin oposición de la progesterona. Los autores plantearon la hipótesis de que la longitud uterina más corta puede deberse al desequilibrio crónico entre los niveles de estrógenos y andrógenos (Maslyanskaya et al., 2017).

Los factores de transcripción *FOX* y *HOX* juegan un papel vital en la diferenciación del endometrio y los receptores endometriales. Cermik et al. han reportado una disminución de la expresión de *HOXA10* en el endometrio de pacientes oligoovulatorias con SOP en comparación con controles regulado negativamente por altos niveles de testosterona. Este efecto fue reversible por un bloqueo de testosterona con flutamida. Por tanto, es posible que la receptividad también esté alterada en estos pacientes (Cermik et al., 2003).

Giordano et al. mostraron un mayor nivel de sulfato de heparán en el endometrio de pacientes con SOP y llegaron a la conclusión de que el aumento de estos niveles en estas mujeres puede conducir a una interferencia con la maternidad en cuanto al reconocimiento fetal (Giordano et al., 2015). Un estudio de Piltonen et al. sugirió un perfil alterado de citocinas inflamatorias y metaloproteinasas (MMP) en un subconjunto de endometrio con SOP que tuvo falla de decidualización. Estos investigadores informaron un aumento en los niveles basales de IL-6 y MMP en un cultivo de endometrio con SOP sin decidualización. Después del tratamiento con estradiol y progesterona en el mismo subconjunto de muestras se observó un aumento en los niveles de IL-8 y de MMP, en comparación con los controles. El estudio indicó que la respuesta de decidualización aberrante con una liberación proinflamatoria concomitante de citocinas y MMP podría conducir a un entorno endometrial subóptimo para la implantación (Piltonen et al., 2013).

En un estudio por Leonhardt et al no se encontraron cambios morfológicos en el miometrio de pacientes con SOP con respecto a controles, sin embargo, el peristaltismo uterino en un útero sin embarazo fue menos común en mujeres con SOP. En condiciones normales, el peristaltismo uterino es principalmente activo en el período periovulatorio, siendo la dirección dominante cervicofundal, lo que sugiere su papel en el transporte de esperma, sin embargo, si estos cambios en la peristalsis contribuyen en la infertilidad en el SOP no está determinado (Leonhardt et al., 2012). Por último, en un estudio de modelos de ratas con SOP se demostraron contracciones uterinas más irregulares con mayor frecuencia y tono de reposo, pero no la amplitud de las contracciones regulares, en comparación con el grupo de control después de la exposición a dos agonistas contráctiles: carbacol y oxitocina (Sajadi et al., 2018). Aunque existe información sobre marcadores endometriales alterados en el SOP, hay poca información sobre los efectos del SOP en la morfología y función uterina, embarazo, así como la iniciación e inducción del parto. Esto subraya la necesidad de abordar estos temas en estudios futuros. Claramente, el útero en el SOP merece más atención (Hosseinzadeh et al., 2021).

## 1.2 El valerato de estradiol como modelo de SOP en animales

El valerato de estradiol (VE) (figura 3) es un éster sintético que ha sido utilizado como modelo de inducción de SOP en roedores como la rata y ratona. En ambos roedores se utiliza una sola administración de VE para la inducción del síndrome (Maliqueo et al., 2014). En ratonas se ha utilizado la dosis de 40mg/kg de peso utilizando la vía subcutánea o intramuscular (Peyghambari et al., 2014). En el estudio de Cruz et al., 2012 se demostró que la administración de VE en el período prepuberal hace un modelo de SOP irreversible. (Cruz et al., 2012). El VE es metabolizado en hígado a 17- $\beta$ -Estradiol y ácido valérico, aumentando la cantidad de Estradiol a nivel periférico, efecto que inhibe la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y estimula la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) resultando a su vez en un aumento de la liberación de la hormona luteinizante (LH). De esta forma se desregula el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (H-H-O) similar a la fisiopatología del SOP en humanos (Rodríguez-Flores, 2011). De acuerdo con Brawer et al., 1986 se necesita un tiempo de evolución del síndrome de 30 a 60 días. Entre las características del modelo de VE esta la presencia de aciclicidad mostrando un estro permanente, anovulación, ovarios pequeños con presencia de quistes ováricos, atresia folicular y ausencia de cuerpos lúteos (Osuka et al., 2019; Maliqueo et al., 2016). En el útero se reporta un aumento en el grosor uterino y mitosis del epitelio luminal y glandular además de un cambio en el patrón de expresión de integrinas en el endometrio (Mirabolghasemi et al., 2017; Peyghambari et al., 2014). Algunas de las diferencias del modelo de VE con respecto a otros es que los animales no muestran resistencia a insulina ni aumento de peso (muestran patrones de disminución o ningún cambio significativo); sin embargo, presentan un aumento en la presión sanguínea por un aumento en el tono simpático (Stener-Victorin et al., 2005). Por lo anterior, el modelo de VE permite evaluar los aspectos nerviosos, inflamatorios, hormonales, genéticos y moleculares del SOP, eliminando los aspectos metabólicos como el aumento de peso y resistencia a insulina (Monterrosas-Santamaría, 2020).

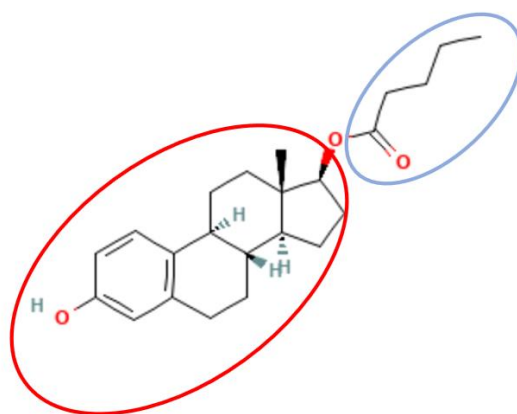


Figura 3. Estructura química del valerato de estradiol. El VE está compuesto por un ácido valérico (también conocido como ácido pentanoico) unido por un enlace éster a una molécula de 17- $\beta$ -estradiol ((17 $\beta$ )-estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol). Pubchem CID: 13791.

### **1.3 Receptor de potencial transitorio a vaniloide miembro 1 (TRPV1)**

La superfamilia de genes de receptores de potencial transitorio (TRP) de mamíferos consta de 28 productos génicos diferentes que codifican canales de cationes no selectivos que juegan una amplia diversidad de funciones fisiológicas (Messeguer et al., 2006). Los miembros de esta superfamilia son principalmente permeables a los cationes, especialmente a  $\text{Ca}^{+2}$ , que es necesario para muchos procesos celulares, incluida la proliferación celular, la transcripción génica y la muerte celular (Zsombok, 2013). La diversidad molecular de las proteínas TRP se correlaciona con su amplio número de funciones biológicas, que van desde la fertilidad hasta la visión, el gusto, el olfato, la osmo/mecanosensación y la nocicepción. Por lo tanto, los canales TRP constituyen una familia de receptores sensoriales (Montell et al., 2002).

Basado en su homología de secuencia, los canales TRP de mamíferos se subdividen en seis familias: 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 es uno de los canales TRP más estudiados. La familia TRPV tiene seis miembros: TRPV1–TRPV6. Los canales TRPV1–TRPV4 son canales activados por la temperatura y también podrían activarse mediante estímulos físicos y químicos, incluidos numerosos ligandos endógenos y exógenos (Nilius et al., 2007). El receptor de potencial transitorio a vaniloide miembro 1 (TRPV1) fue identificado y clonado en 1997 y es el primer miembro identificado de la subfamilia TRPV (Caterina et al., 1997).

El gen *trpv1* de *Mus musculus* codifica para el receptor TRPV1 el cual este compuesto por 839 aminoácidos y tiene un peso molecular de 95kDa (GenBank AY445519.1). Estructuralmente el receptor TRPV1 está conformado por una región N y C terminal intracelular y una región transmembranal. La región N-terminal intracelular está compuesta por 400 aminoácidos que contiene 3 dominios de anquirina, los cuales son sitios de interacción proteína-proteína con proteínas citosólicas además de contar con secuencias consenso para proteínas cinasas. La región C-terminal intracelular contiene un dominio TRP cerca del dominio transmembranal S6 además de sitios de unión a fosfoinositido y calmodulina, así como diversos sitios de fosforilación, los cuales pueden sensibilizar o desensibilizar al receptor. La región transmembranal consta de 6 dominios transmembranales (S1-S6), donde entre el quinto y sexto dominio, se encuentra una región anfipática que es un poro para cationes divalentes y monovalentes ( $\text{Ca}^{+2} > \text{Mg}^{+2} > \text{Na}^{+} \approx \text{K}^{+} \approx \text{Cs}^{+}$ ). Esta región contiene ácidos glutámicos que están involucrados en la activación del receptor dependiente del pH (Caterina et al., 2001). En el cuarto dominio transmembranal se encuentra el sitio de unión a vaniloides (Abdel-Salam, 2014). Los receptores TRPV1 son selectivos para el  $\text{Ca}^{+2}$ , en donde la permeabilidad a este ión es favorecida por el Glu-648 y el Asp-646 (Myers, et al, 2008). En la Figura 4 se observa la representación de la topología del receptor TRPV1 con sus principales dominios funcionales. Los receptores TRPV1 se encuentran de forma biológica como tetramero ensamblado alrededor de un poro acuoso central. La forma tetramérica se puede encontrar como homotetramero y/o heterotetramero, en cuyo caso pueden asociarse con subunidades de los receptores TRPV3 o TRPV4 (Smith et al., 2009).

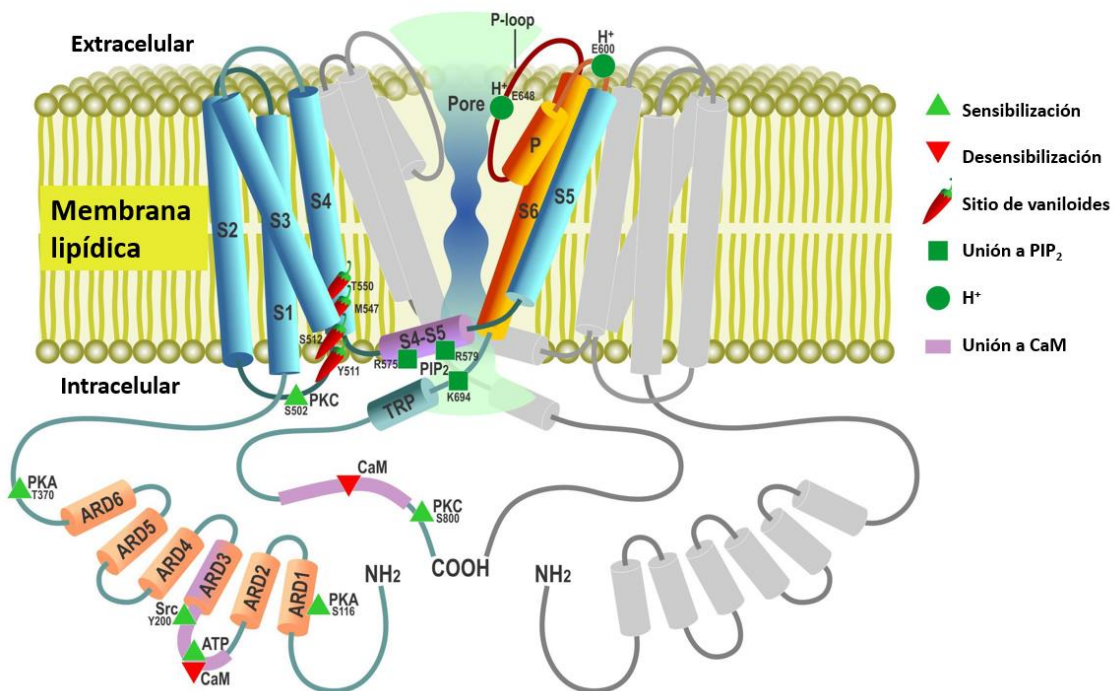


Figura 4. Representación de la topología del receptor TRPV1 con sus principales dominios funcionales. El receptor TRPV1 se encuentra de forma funcional como un tetrámero con sus subunidades dispuestas alrededor de un poro catiónico. En la figura se resalta solo una subunidad en color. Los cilindros representan los 6 dominios transmembranales. En la región N-terminal intracelular se representan las repeticiones de ankirina (ARD). En la región C-terminal intracelular se representa el dominio TRP. De acuerdo con la simbología se marcan los aminoácidos importantes para modificar la funcionalidad del receptor TRPV1. Shuba, 2021.

El receptor TRPV1 es un canal catiónico no selectivo dependiente de ligando con alta permeabilidad a  $\text{Ca}^{+2}$ . Su activación puede ser mediada por ligandos endógenos como anandamida, N-araquidoniol-dopamina, bradisinina, histamina y oleiletanolamina (OEA); ligando exógenos como capsaicina (Capsaicina  $\text{EC}_{50} \approx 0.7 \mu\text{M}$ ), toxina resinífera, olvanil, alicina, alcanfor y piperina; además de otros procesos como temperaturas cerca de  $42^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} < 6.0$ , estiramiento, presión y estímulos eléctricos (Caterina et al., 1997; Nilius et al., 2008).

El receptor 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. La activación de los receptores TRPV1 permite la entrada de los cationes, despolarizando la membrana celular de las fibras aferentes C y  $\text{A}\delta$  y con ello se liberan péptidos como la sustancia P (SP), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (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).

### 1.3.1 Capsaicina como agonista 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). En la figura 5 se muestra la estructura química de la capsaicina y sus 3 grupos principales. La capsaicina se ha utilizado como herramienta farmacológica para estudiar las funciones del receptor TRPV1, esto debido a que se une de manera específica al receptor.

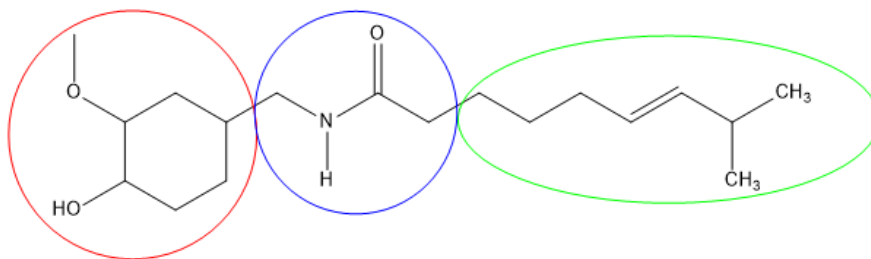


Figura 5. Estructura química de la capsaicina (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida). En un círculo rojo se observa la cabeza o grupo vanillil, en azul el cuello conformado por un enlace amida y por último en verde la cola hidrófoba. Pubchem CID 1548943.

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 TRPV1 dentro de los nociceptores C y A $\delta$  e induce la liberación de péptidos y otros transmisores desde sus terminales periféricas y centrales (Abdel-Salam, 2014). La capsaicina se une al receptor TRPV1 en la región transmembranal S2-S4 con alta afinidad mediada por interacciones entre el grupo vanilloide de la 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 (PIP<sub>2</sub>) se une al extremo C-terminal del receptor e inhibe la activación de canales (Prescott y Julius 2003). El ATP o PIP<sub>2</sub> evitan la desensibilización a las aplicaciones repetidas de capsaicina, mientras que, la calmodulina tiene el efecto contrario (Lishko et al., 2007). A concentraciones altas de capsaicina ( $> EC_{50} \approx 0.7 \mu M$ ) se activa la corriente de Ca<sup>+2</sup> que conduce a la necrosis de las células, sin embargo, a concentraciones bajas ( $< EC_{50} \approx 0.7 \mu M$ ), 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 (30mM y 1  $\mu M$ ) atrasa la pubertad y disminuye la cantidad de receptores TRPV1 en los ovarios, en el DRG y en la médula espinal (Alatríste et al., 2013).

### 1.3.2 El receptor TRPV1 en la biología de la reproducción

El receptor TRPV1 se ha encontrado ampliamente en el tejido neuronal, como por ejemplo en neuronas del ganglio de la raíz dorsal, del ganglio trigémino y ganglio nodoso, además de zonas como el hipotálamo, cerebelo, corteza cerebral, mesencéfalo, bulbo olfatorio, puente de Varolio, médula, hipocampo, tálamo, amígdala y sustancia *nigra* (Nilius et al., 2008).

El receptor TRPV1 también se ha encontrado en varios órganos periféricos participando en funciones diversas. En la siguiente tabla se mencionan algunas de ellas.

Tipo celular o tejido	Función	Referencias
Células ciliadas de bronquios y bronquiolos	Reflejo de tos mediante la motilidad de células ciliadas	Lee et al., 2002
Vejiga urinaria	Relajación del esfínter para el vaciamiento de la orina a través de mecanocepción	De Schepper et al., 2008
Queratinocitos	Nocicepción a través de la liberación de neurotransmisores	Birder et al., 2001
Mastocitos	Inflamación a través de la liberación de mediadores proalgésicos de mastocitos	Stander et al., 2004
Tracto gastrointestinal	Engrosamiento de la barrera protectora del estómago y el duodeno	Yamamoto et al., 2001
Vasos sanguíneos	Constricción miogénica de Bayliss a través de la liberación de sustancia P y neuropéptidos vasoactivos	Scotland et al., 2004
Corazón	Protección al miocardio a través de la liberación de CGRP	Streckcer et al., 2005
Folículos pilosos	Proliferación y diferenciación celular por medio de la activación de PKC, PKA y NF-κB	Nilius et al., 2006; Vennekens et al., 2008; Lee et al., 2009; Bodó et al., 2005

Tabla 1. Funciones del receptor TRPV1 en diversos tipos celulares.

Además de la demostración de expresión y funcionalidad del receptor TRPV1 en diversos órganos periféricos, también se ha demostrado su presencia y se ha empezado una búsqueda de función biológica en los órganos reproductores. En el tracto genital masculino de ratas se ha detectado el mRNA del receptor TRPV1 en los testículos, la próstata y el pene. De manera similar, se ha aislado mRNA de TRPV1 humano de los testículos, túbulos seminíferos, corpus cavernoso, glándula y su piel suprayacente, piel del escroto y próstata (Stein et al., 2004). Además, el receptor TRPV1 se ha encontrado en las células de Sertoli, donde regulaba la acidez del microambiente extracelular, que es crucial para mantener la fertilidad masculina (Auzanneau et al., 2008). Los ratones KO del receptor TRPV1 presentan hipertermia testicular, lo que resulta en el agotamiento

masivo de células germinales de los túbulos seminíferos (Mirzak et al., 2008). En la próstata humana, TRPV1 también se ha descrito en aferentes primarios que recorren la mucosa uretral, utrículo prostático, conductos eyaculatorios y el acino prostático periuretral, tanto por inmunocitoquímica como por Western Blot. La rica inervación sensorial del receptor TRPV1 en la próstata humana juega un papel importante en el desarrollo de prostatitis crónica, donde la sensación de quemazón es la descripción principal del dolor en estos pacientes, ya sea al orinar o eyacular y está directamente relacionado con la activación de las fibras positivas a TRPV1 (Dinis et al., 2005).

En los ovarios y útero también se cuenta con la presencia del receptor TRPV1 tanto en tejido como por las fibras sensoriales que lo inervan. Las fibras sensoriales están representadas por las fibras C y A $\delta$ , las cuales provienen de los DRGs localizados en los segmentos espinales L2-L5 (Aguado, 2002). Dichas fibras llegan a los ovarios y oviductos a través del plexo ovárico, y al útero por el plexo uterino (Gargett et al, 2001; Malin et al, 2009; Forrest y Keast, 2008). Se ha encontrado que estas fibras contienen además a otros receptores de la familia TRP como TRPV4, TRPV6 Y TRPC1 (Ernsberger, 2009). 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 los órganos del sistema reproductor femenino no ha sido completamente estudiado. Debido a estudios de denervación sensorial realizados con capsaicina, se ha propuesto un papel del receptor TRPV1 en la modulación del desarrollo folicular de los ovarios, en el inicio de la pubertad (Alatríste et al., 2013) y en la secreción de estradiol y progesterona por los ovarios, donde también se observó que la inervación sensorial varía a lo largo del ciclo estral en ratas (Morán et al., 2003; Trujillo et al., 2004).

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 TRPV1, 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) (Persoons et al., 2018). Desafortunadamente, la regulación de los canales TRP por las hormonas sexuales esteroides 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). En 2016 se estudió la regulación estrogénica sobre el receptor TRPV1 donde se observó que la administración de Dietilestilbestrol (DES), un agonista no selectivo del receptor estrogénico promovió la regulación al alza del mRNA del receptor TRPV1 en ratas sexualmente inmaduras y maduras, así como su expresión y la administración de 17- $\beta$ -estradiol, un potenciador selectivo del receptor estrogénico alfa, aumentó la expresión del receptor TRPV1. Además, se observó que la activación del receptor TRPV1 regula al alza el mRNA mensajero del mismo (Pohóczyk et al., 2016).

Un estudio sobre la denervación sensorial con capsaicina demostró que además de mostrarse alteraciones en la morfología y función ovárica (disminución de folículos ováricos y disminución de la secreción de estradiol y progesterona) también hay una disminución en la concepción, ya que de las ratas denervadas que procedían a la copulación solo 6 de 23 tuvieron crías. Sin embargo, en este estudio no se observaron cambios en el grosor uterino (Morán et al., 2003). En un estudio que investigó la inervación del receptor TRPV1 del útero humano durante el embarazo y el parto, se observaron fibras TRPV1-IR dispersas por todo el estroma, alrededor de los vasos sanguíneos y con mayor frecuencia en el subepitelio del cuello uterino. Durante el embarazo

se observó una desaparición casi total de fibras TRPV1-IR, sin embargo, la inervación cervical se mantuvo alta durante el embarazo y el trabajo de parto probablemente siendo responsable del dolor durante la maduración cervical. Además, las fibras que expresan el receptor TRPV1 aumentaron significativamente en la epidermis vulvar y la dermis superficial (Tingaker et al., 2008).

Los aferentes cervicales uterinos de rata en el nervio hipogástrico expresan el receptor TRPV1 y se ha demostrado que los estrógenos amplifican la respuesta a los estímulos dolorosos del cuello uterino debido a un aumento de la expresión de TRPV1 en las neuronas sensoriales primarias que inervan el útero (Yan et al., 2007). 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 implicados en el dolor, estas neuronas también inervan al colon 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 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. 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). Estudios realizados en células estromales endometriales ectópicas de pacientes con endometriomas se observó un aumento de fibras positivas al receptor TRPV1 con respecto a pacientes control y correlacionando con la severidad de la dismenorrea. También se observó que la actividad del receptor TRPV1 podía inducir la liberación de IL-1 $\beta$  y óxido nítrico (Liu et al., 2012).

#### **1.4 Implicaciones del receptor TRPV1 en el Síndrome de Ovario Poliquístico**

El posible rol del receptor TRPV1 en la etiología del SOP solo ha sido investigado en neutrófilos, donde se observó que los niveles de peroxidación lipídica y de calcio intracelular fueron mayores en neutrófilos de pacientes con SOP que los controles y que estos se reducían con la incubación de los neutrófilos con Selenio y Capsazepina (un antagonista del receptor TRPV1). Por lo que los autores concluyeron que el Selenio parecía proporcionar un efecto protector contra el estrés oxidativo y la entrada de  $Ca^{+2}$  a través de la modulación de los canales de calcio TRPV1 de los neutrófilos (Köse et al., 2014). El mismo grupo estudió el efecto de la N-acetilcisteína (NAC) y Capsazepina sobre los receptores TRPV1 de neutrófilos de pacientes con SOP, en este estudio se demostró que los valores de calcio intracelular, peroxidación lipídica de neutrófilos, apoptosis, caspasa-3, caspasa-9, producción de especies reactivas de oxígeno citosólico y despolarización de la membrana mitocondrial disminuyeron con el tratamiento con NAC. Además, los niveles séricos de peroxidación lipídica, hormona luteinizante, testosterona, insulina, IL-1 $\beta$  y homocisteína disminuyeron, aunque aumentó la vitamina A sérica, el betacaroteno, la vitamina E y el estado antioxidante total. En conclusión, la NAC redujo el estrés oxidativo, la apoptosis, los niveles de citocinas y la entrada de  $Ca^{+2}$  a través del canal TRPV1, lo que brinda evidencia de apoyo de que el estrés oxidativo y el canal TRPV1 juegan un papel clave en la etiología del SOP (Köse et al., 2015).

El rol del receptor TRPV1 en la etiología del SOP no ha sido estudiado a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, donde se conoce que hay una disfunción clave para la patogénesis del SOP. Como se ha mencionado anteriormente, en pacientes con SOP se ha observado hiperplasia endometrial debido a un aumento de la razón glándula-estroma, así como un aumento en la incidencia de hiperplasia endometrial. El útero es un tejido dependiente de hormonas esteroideas, por lo que la alteración de los niveles hormonales en el SOP podría estar implicado en los cambios morfológicos uterinos. Se ha sugerido que el receptor TRPV1 es modulado por la activación de los receptores estrogénicos además de fluctuar a lo largo del ciclo estral, por lo que su función y expresión podría verse alterada durante el SOP.

En pacientes con SOP varios estudios muestran una desregulación de los niveles de calcio, que contribuye al arresto folicular, resultando en disfunciones reproductivas y menstruales. Además de que un estudio piloto en el que se administró calcio, vitamina D y metformina a pacientes con SOP observó un aumento en la cantidad de folículos dominantes después de 2-3 meses en comparación con administración de solamente metformina (Rashidi et al., 2009).

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). En cáncer, se han observado cambios en la expresión y funcionalidad de los receptores TRP de las células cancerosas (figura 7). Se ha demostrado el papel del receptor TRPV1 en la proliferación celular, donde se observa que el efecto de la capsaicina sobre la proliferación es dependiente de su concentración: a bajas dosis (rangos de orden nM y  $\mu$ M), promueve la proliferación de células cancerosas y a altas dosis (en orden mM), la detiene. También se ha estudiado el rol del receptor TRPV1 en la muerte celular,

donde su agonismo promueve principalmente la apoptosis a través del incremento de calcio intracelular, la vía p53, p38, aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), entre otras (Li et al., 2021). Ejemplos de esto pueden ser el agonismo del receptor TRPV1 con Araquidonil-etanolamida (AEA) y AEA/Cannabidiol que aumentan la apoptosis en células cancerígenas de cervix uterino humano y células cancerígenas endometriales humanas respectivamente (Contassot et al., 2004) (Fonseca et al., 2018). El receptor TRPV1 tiene un rol en la migración e invasión celular, donde se ha observado que, de manera general, a dosis altas y bajos tiempos de exposición de agonistas puede promover la migración celular a través del aumento de calcio intracelular. En cuanto a la invasión celular, se ha observado que el receptor TRPV1 funciona como un represor de la invasión promoviendo la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y E-cadherina, y disminuyendo la expresión de colagenasas como la MMP2 y MMP9 (Li et al., 2021) Por último, se observó que el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) transactiva al receptor TRPV1 incrementando el calcio intracelular, importante para mecanismos de angiogénesis como la activación de la calcio calmodulina cinasa II (CaMKII) y la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Walcher et al., 2018).

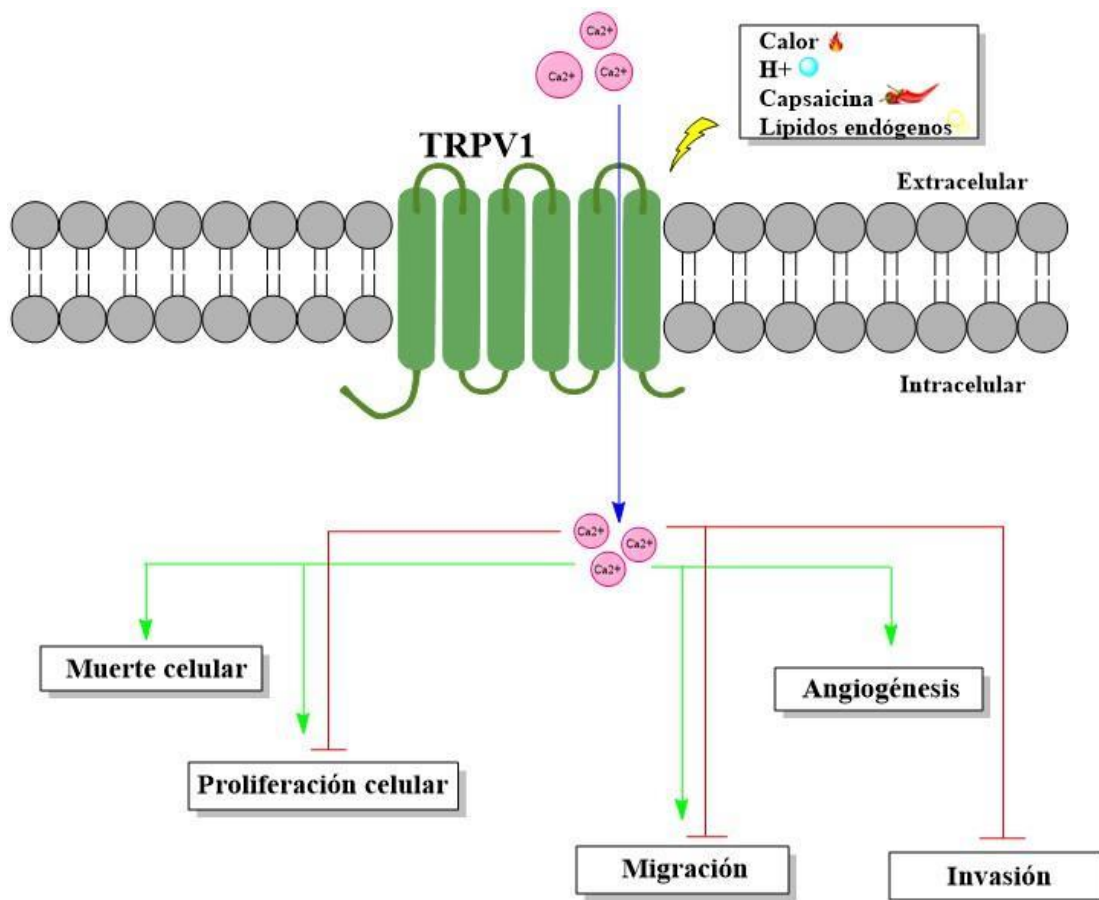


Figura 6. Efectos de la activación del receptor TRPV1 en cáncer. Varios estudios han demostrado que, dependiendo de la concentración de agonistas utilizados, el receptor TRPV1 puede tener funciones contrarias como lo es la muerte y proliferación celular, así como migración e invasión en células cancerosas. Además de una función importante en la angiogénesis.

## **2. Justificación:**

El SOP es un trastorno neuroendocrino conocido como la principal causa de infertilidad en mujeres de edad reproductiva (Deans et al., 2019). La infertilidad causada por el SOP es principalmente por la baja calidad de ovocitos y la falta de maduración de los óvulos lo cual causa oligoovulación y/o anovulación (Teede et al., 2010). Aunque estos problemas son tratados farmacológicamente, se siguen reportando problemas de implantación y varias complicaciones durante el embarazo como abortos espontáneos, diabetes gestacional, trastornos hipertensivos y partos prematuros (Jakubowicz et al., 2002). Además, se ha reportado que en el útero durante el SOP hay un aumento en la hiperplasia endometrial debido a un aumento en la razón glándula/estroma y atipia acelular, lo cual puede progresar a cáncer endometrial (Charalampakis et al., 2016). El útero es un órgano dependiente de hormonas esteroideas por lo que los cambios en los niveles hormonales durante el SOP podrían estar implicados en el origen de estas anomalías fenotípicas y funcionales del útero.

Por otra parte, el receptor TRPV1 ha sido identificado en ovarios y útero, así como las fibras sensoriales que los inervan (Alatraste et al., 2013; Pohóczky et al., 2016). En el laboratorio de Neuroendocrinología de la BUAP se ha estudiado la participación de los receptores TRPV1 en el desarrollo folicular en ovarios y en el inicio de la pubertad. En el útero, se ha observado que el receptor TRPV1 está implicado en el proceso de parto por vía sensorial, además, se ha observado que la expresión del receptor TRPV1 fluctúa a lo largo del ciclo estral y tiene una regulación estrogénica, por lo que las alteraciones hormonales durante el SOP podrían estar afectando su expresión (Tingaker et al., 2008; Persoons et al., 2018). Varios estudios sobre la activación de los receptores TRPV1 con capsaicina han demostrado que, a bajas concentraciones, el receptor TRPV1 promueve la proliferación y diferenciación celular por medio de la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula (Tominaga y Tominaga, 2005). Por lo antes expuesto, se propone que la estimulación de los receptores TRPV1 con capsaicina 1 y 10 nM en ratonas CD1 inducidas con SOP sería útil para conocer el papel que pueda tener este receptor en el desarrollo celular del útero.

### **3. Hipótesis:**

La estimulación del receptor TRPV1 con capsaicina 1 y 10 nM modula el desarrollo celular del útero en ratonas CD1 con Síndrome de Ovario Poliquístico inducido con valerato de estradiol.

### **4. Objetivos:**

#### **4.1 Objetivo general:**

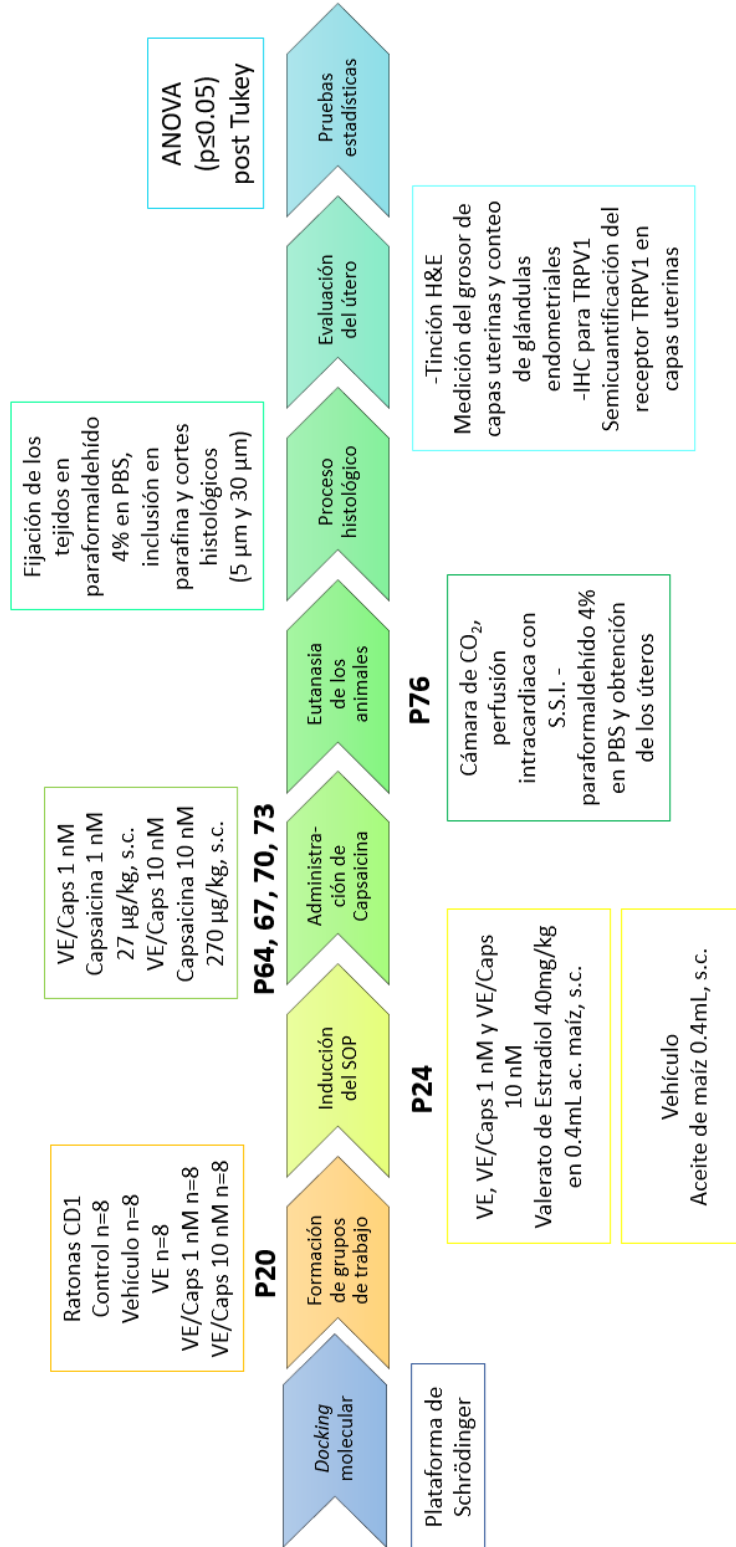
Conocer el efecto de la administración de capsaicina sobre el desarrollo celular del útero de ratonas CD1 con Síndrome de Ovario Poliquístico inducido con valerato de estradiol.

#### **4.2 Objetivos específicos:**

1. Identificar el sitio de unión de la capsaicina en el receptor TRPV1 mediante un acoplamiento molecular *in silico*.
2. Conocer las diferencias en el grosor de las capas uterinas (perimetrio, endometrio y miometrio) durante el SOP inducido con valerato de estradiol y durante la administración con capsaicina 1 y 10 nM.
3. Conocer las diferencias entre el número de glándulas endometriales durante el SOP inducido con valerato de estradiol y durante la administración con capsaicina 1 y 10 nM.
4. Evaluar la morfología celular de las capas uterinas y glándulas endometriales durante el SOP inducido con valerato de estradiol y durante la administración con capsaicina 1 y 10 nM.
5. Evaluar la semicuantificación del receptor TRPV1 en las capas uterinas durante el SOP inducido con valerato de estradiol y durante la administración con capsaicina 1 y 10 nM.

## 5. Metodología:

### 5.1 Diagrama de Trabajo.



## 5.2 Materiales y métodos.

### Experimento in silico

#### Docking molecular

El procedimiento fue realizado en la plataforma Schrödinger. La preparación de la proteína TRPV1 en su versión funcional tetramérica (PDB ID: 7LR0) se realizó con la herramienta *Protein Preparation Wizard*. La preparación del ligando capsaicina (PubChem CID: 1548943) se realizó con la herramienta *Ligprep*. El acoplamiento molecular se calculó con *Glide* seleccionando las zonas transmembranal y citoplasmática como posibles sitios de interacción.

Después de realizar el *docking molecular* entre la proteína TRPV1 y su ligando capsaicina, se realizó nuevamente el *docking* insertando a la proteína en un modelo de membrana endotelial (1,2 palmitoyl-oleoyl-*sn*-glicero-3-phosphocolina, abreviado como POPC) para asemejar lo más posible a las condiciones *in vivo* de las interacciones receptor TRPV1-capsaicina en el útero. Se volvieron a seleccionar las zonas transmembranal y citoplasmática como posibles sitios de interacción. Los resultados de interacciones espaciales y particulares con residuos de la proteína se observaron con el visualizador integrado *Maestro*. Se obtuvieron las energías de interacción (Kcal/mol) de cada sitio encontrado y se calculó la constante de disociación ( $K_D$ ) en orden micromolar ( $\mu\text{M}$ ) con la siguiente fórmula:

$$K_D = e^{\Delta G/RT}$$

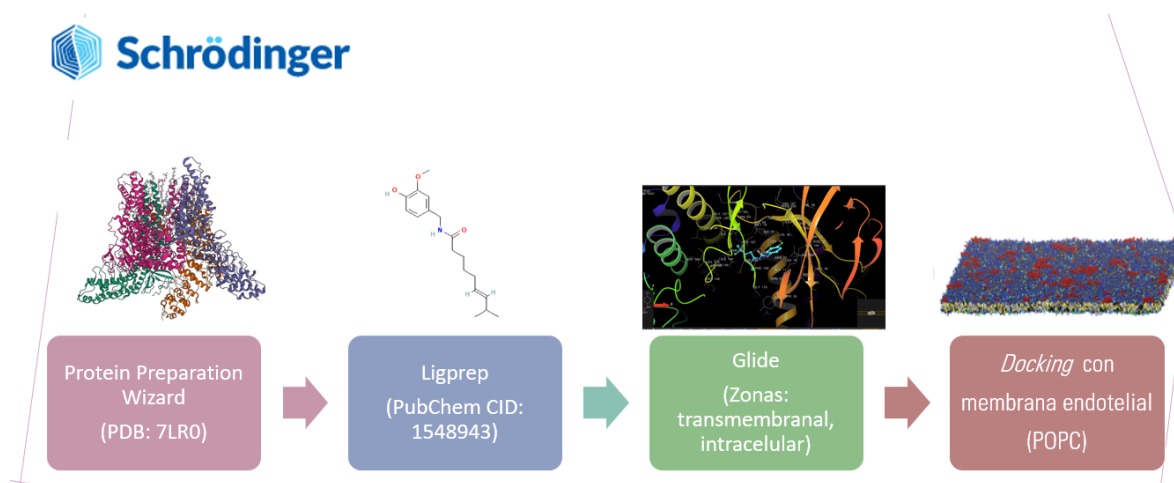


Figura 7. Diagrama de trabajo seguido para realizar el procedimiento de docking molecular en la plataforma de Schrödinger.

### Experimento in vivo

#### Animales

Se trabajó con 40 ratonas CD1 de 20 días de edad (P20) provenientes del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Las ratonas se mantuvieron en cautiverio con ciclos de luz/oscuridad 12-12 horas, agua y alimento *ad libitum* siguiendo los

lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999 para el cuidado de los animales de laboratorio. Las ratonas se asignaron de manera aleatoria a los grupos de trabajo. Se formaron cinco grupos de trabajo cada uno con una n=8 (control, vehículo, VE, VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM). Diariamente se realizó el registro de peso de cada ratona.

### ***Inducción del Síndrome de Ovario Poliquístico***

La inducción del SOP se realizó en los grupos VE, VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM al P24 realizando una administración de valerato de estradiol (40 mg/kg en 0.4mL de aceite de maíz) por vía subcutánea (dosis de acuerdo con el trabajo de Peyghambari et al., 2014). El mismo día se realizó la administración del grupo vehículo (0.4mL de aceite de maíz) vía subcutánea. Se dio un tiempo de evolución del SOP de 40 días posterior a la administración (tiempo promedio de acuerdo con el trabajo de Brawer et al., 1986).

### ***Determinación de la primera apertura vaginal (PAV)***

La PAV se determinó por la observación diaria de la zona ano-genital de cada ratona para verificar la presencia o ausencia de la membrana vaginal. La ausencia de la membrana vaginal se determinó como la primera apertura vaginal (procedimiento de acuerdo con Cruz et al., 2012).

### ***Seguimiento del ciclo estral***

Posterior a la PAV se realizó el seguimiento del ciclo estral por medio de un frotis vaginal diario. Los frotis vaginales fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina y fueron observados al microscopio a 10X para poder identificar la fase del ciclo de acuerdo con los tipos celulares observados (identificación de fases del ciclo estral de acuerdo con lo descrito por Byers et al., 2012).

### ***Administración de capsaicina***

Después del tiempo de evolución del SOP (P64), la administración de capsaicina se realizó a las ratonas de los grupos VE/Caps 1 nM (27 µg/Kg) y VE/Caps 10 nM (270 µg/kg) vía subcutánea en la zona dorsal entre las vértebras L4-L5. Se realizaron cuatro administraciones en total, una en cada uno de los siguientes días: P64, P67, P70 y P73. En los mismos días se administró 250µl de solución salina isotónica (SSI) en las ratonas del grupo vehículo.

### ***Eutanasia y obtención de los úteros***

Posterior al tiempo de administración (P76) se procedió a realizar la eutanasia de todas las ratonas. Las ratonas fueron anestesiadas en cámara de CO<sub>2</sub>, posteriormente se realizó una perfusión intracardiaca con solución salina isotónica (SSI) seguida de paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos (PBS). Después se procedió a la extracción de los úteros y se realizó su pesado húmedo.

### ***Peso relativo de los úteros***

Después de la eutanasia se realizó el pesado húmedo de los úteros de las ratonas y se realizó el siguiente cálculo para obtener el peso relativo de los úteros con respecto al peso del animal:

$$\text{Peso relativo} = \frac{\text{Peso del útero (mg)}}{\text{Peso del animal (mg)}} \times 100$$

### ***Técnicas histológicas***

Los úteros fueron divididos en cuerno uterino derecho y cuerno uterino izquierdo. Los tejidos obtenidos se almacenaron en paraformaldehído al 4% en PBS para completar la fijación. Después pasaron un proceso de deshidratación en Alcohol a diferentes concentraciones (70%, 96% y 100%), se sumergieron en Alcohol-Xilol (1:1), Xilol (100%) e infiltraron en parafina líquida. Se realizaron bloques de parafina para posteriormente hacer cortes histológicos de la zona media de cada cuerno uterino en un micrótopo de deslizamiento Leica SM2010R con un grosor de 5 µm y 30 µm para obtener laminillas que fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina y otras para realizar la técnica de inmunohistoquímica.

### ***Tinción de Hematoxilina-Eosina***

Para realizar la tinción de Hematoxilina-Eosina se tomaron los cortes de un grosor de 5 µm. Los cortes se desparafinaron e hidrataron utilizando Xilol, Alcohol-Xilol (1:1), alcoholes a diferentes concentraciones (100%, 96% y 70%) y agua destilada. Posteriormente se realizó la tinción utilizando hematoxilina durante 3 minutos, 10 baños en alcohol ácido, 10 baños en carbonato de litio y eosina por 2 minutos (se realizó un lavado con agua destilada durante cada paso). Posteriormente, los cortes fueron sometidos al proceso de deshidratación del tejido utilizando alcohol a diferentes concentraciones (70%, 96%, 100%), Alcohol-Xilol (1:1) y Xilol durante 10 minutos cada uno. Por último, se realizó el montaje con resina (el procedimiento de la tinción se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Prophet et al., 1995). Al visualizar al microscopio se pueden distinguir a las estructuras celulares como el citoplasma en color rosa y en coloración azul a los núcleos celulares. Además, esta tinción permite observar detalles de los tejidos y distinguir la organización celular y anomalías en la morfología (Prophet et al., 1995). En la figura 8 se resume la técnica de la tinción Hematoxilina-Eosina.

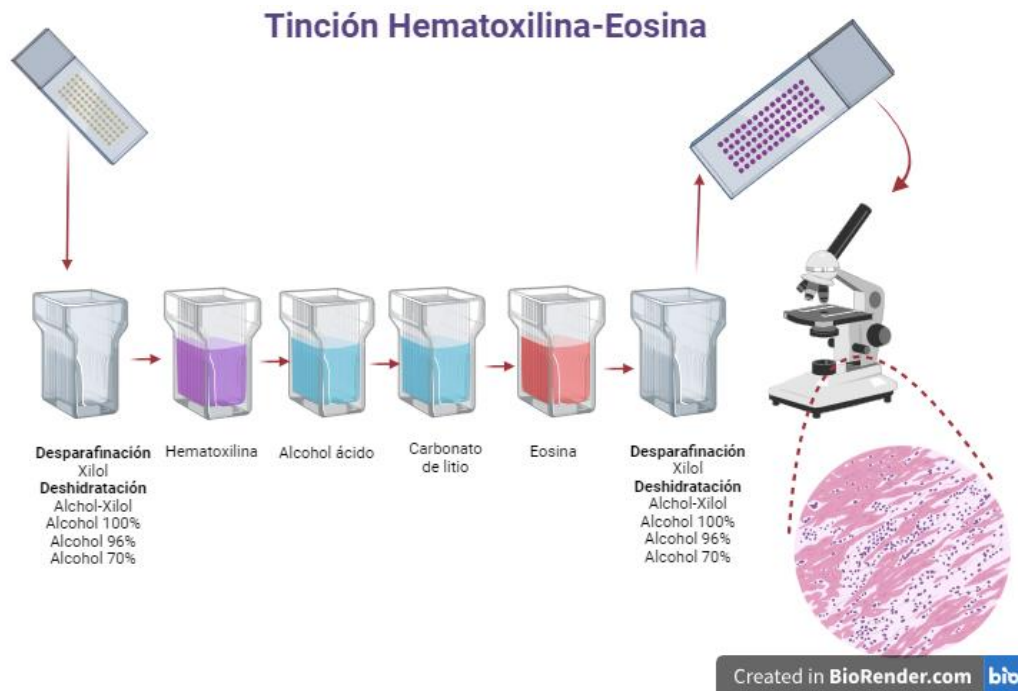


Figura 8. Técnica de la tinción Hematoxilina-Eosina. Imagen creada en BioRender.com

#### ***Análisis morfológico de las capas uterinas y glándulas endometriales***

La tinción de Hematoxilina-Eosina se utilizó para la medición del grosor del perimetrio, miometrio, endometrio, epitelio luminal, así como para el conteo de las glándulas endometriales. Se tomaron aleatoriamente 10 campos del cuerno uterino izquierdo y 10 del cuerno uterino 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. El conteo de glándulas endometriales se realizó utilizando el objetivo de 4X con ayuda del software Motic Images plus 3.0 tomando los mismos campos utilizados para la medición de capas uterinas.

#### ***Técnica de inmunohistoquímica para la detección del receptor TRPV1***

Para realizar la técnica de inmunohistoquímica se tomaron los cortes con un grosor de 30  $\mu\text{m}$  en laminillas silanizadas (silano al 8% en acetona). Se tomaron 3 cortes del cuerno uterino derecho y 3 cortes del cuerno uterino izquierdo de cada animal.

Los cortes histológicos se desparafinaron con Xilol, se hidrataron con Alcohol-Xilol y Alcoholes a diferentes concentraciones (100%, 96% y 70%), y lavaron con PBS pH=7.4. La recuperación antigénica se realizó con buffer de citratos pH=6. La permeabilización se realizó con PBS-Tritón-100X (0.2%). La eliminación de la peroxidasa endógena se realizó con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% en PBS-Tritón-100X (0.2%) durante 10 minutos. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tritón-100X (0.2%). El bloqueo se llevó a cabo con suero de cabra al 5% durante 1 hora. Se realizaron nuevamente 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tritón-100X (0.2%). Se llevó a

cabo la incubación con el anticuerpo primario contra TRPV1 (USBiological; IgG hecho en conejo, dilución 1:1000) durante toda la noche en refrigeración a 4°C. Posterior a la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tritón-100X (0.2%). La incubación con el anticuerpo secundario (Vector Laboratories; INC biotilnado anti-conejo IgG, dilución 1:500, BA-1000 (H+L) purificado por afinidad, hecho en cabra) durante 1 hora. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tritón-100X (0.2%). Se realizó la incubación con Estreptavidina (Life Technologies, Streptavidin Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate, dilución 1:5000) durante 1 hora. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS. El revelado se realizó con DAB (10 mg/mL) del cual se utilizaron 50 µl de DAB por cada mL de PBS. Se inició la reacción agregando 1 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%. El tiempo de revelado fue de 6 minutos. Transcurrido el tiempo, la reacción se detuvo con PBS. se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS.

Los cortes procesados para la determinación del receptor TRPV1 fueron sometidos al proceso de deshidratación del tejido utilizando Alcohol a diferentes concentraciones (70%, 96%, 100%) y Xilol durante 10 minutos cada uno. Por último, se realizó el montaje con resina. Al observar la técnica de inmunohistoquímica al microscopio óptico se observaron las células teñidas (positivas al receptor TRPV1) con una coloración café. En la figura 9 se observa un resumen del procedimiento seguido para la técnica de inmunohistoquímica.

### Técnica de inmunohistoquímica H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/DAB

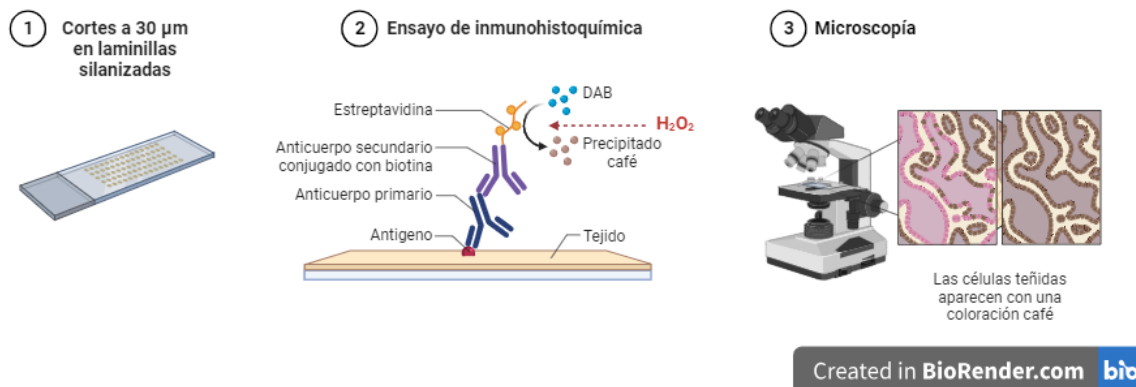


Figura 9. Técnica de inmunohistoquímica H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/DAB. Imagen creada en BioRender.com

### ***Semicuantificación del receptor TRPV1 en el útero***

La técnica de inmunohistoquímica se realizó para la semicuantificación del receptor TRPV1 en el perimetrio, miometrio, endometrio y epitelio luminal. Se tomaron 5 campos del cuerno uterino derecho y 5 campos del cuerno uterino izquierdo a 20X. Con ayuda del software Image J y la herramienta de MACRO se realizó la cuantificación del porcentaje de área teñida (coloración café) en cada capa uterina.

### ***Pruebas estadísticas***

Los datos se expresaron como medias  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Los datos fueron sometidos a una prueba ANOVA de una vía seguida de Tukey, donde dos grupos se consideraron diferentes cuando el valor p fue  $p \leq 0.05$ .

## **6. Resultados**

### **6.1 Docking molecular**

#### **6.1.1 Docking molecular sin membrana endotelial**

Como resultado del *docking* entre el receptor TRPV1 y la capsaicina sin utilizar una membrana, se encontraron 9 sitios de unión para capsaicina en el receptor TRPV1. En la zona transmembranal se encontraron 4 sitios (1T-4T), uno en cada unidad monomérica; en la zona del poro catiónico se encontró 1 sitio y en la zona intracelular se encontraron 4 sitios (1I-4I), uno en cada región N-terminal monomérica (Figura 10 A-C).

Las energías de interacción representan la afinidad del ligando en el sitio de unión del receptor. Entre más negativa es la energía de interacción, mayor es la afinidad del ligando por el sitio. De acuerdo con nuestros resultados mostrados en la tabla 2, la zona transmembranal es la más afín a capsaicina seguido del sitio del poro catiónico y por último la zona intracelular.

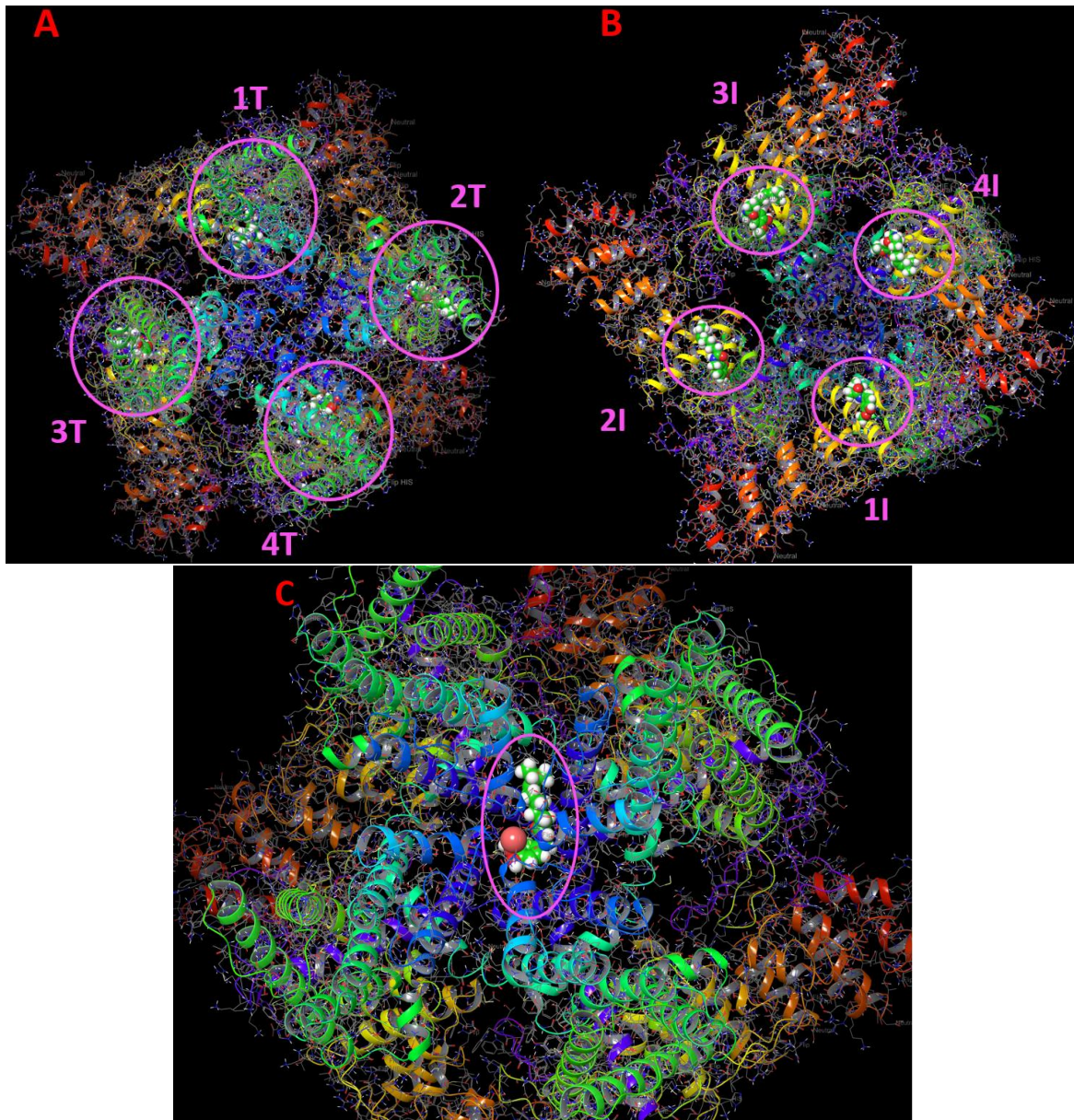


Figura 10. Docking molecular entre la capsaicina y el receptor TRPV1. En círculos rosas se observan los sitios de unión para la capsaicina en el receptor. A) Vista superior mostrando la zona transmembranal del receptor B) Vista inferior mostrando la zona intracelular del receptor C) Vista superior con ampliación en la región del poro catiónico (partícula roja representa un ión Na<sup>+</sup>).

Zona	Número de sitio por zona	Energía de interacción (Kcal/mol)
Transmembranal	1	-7.806
	2	-5.241
	3	-5.474
	4	-5.566
Poro catiónico	1	-5.559
Intracelular	1	-2.617
	2	-3.773
	3	-2.588
	4	-3.766

Tabla 2. Energías de interacción (Kcal/mol) de cada sitio para la capsaicina en el receptor TRPV1.

A continuación, se detallan cada uno de los sitios de unión en cada una de las zonas del receptor TRPV1. En la figura 11 podemos observar los sitios de unión de la zona transmembranal. Como se indica, aminoácidos de los seis dominios transmembranales participan en los 4 sitios de interacción, siendo cada sitio diferente entre sí en su composición. Los aminoácidos representados son en su mayoría de naturaleza hidrófoba. Cada sitio muestra una conformación diferente en la orientación de la capsaicina.

En el sitio 1 de la zona transmembranal (1T) se observa que los aminoácidos que interaccionan con la capsaicina pertenecen a los dominios S3, S4 y parte del asa S4-S5 de la subunidad C y algunos del dominio S6 de la subunidad D. El sitio 1T, el cual tiene la mejor afinidad de unión, muestra una conformación cabeza abajo-cola arriba; por lo que podríamos suponer es la conformación más estable. Hay dos interacciones directas entre los aminoácidos y la capsaicina: una interacción Pi-Pi entre el anillo aromático de la capsaicina y el anillo de la Tirosina 513; y un puente de Hidrógeno entre el hidroxilo de la capsaicina y el Glutámico 572.

El sitio 2T interacciona con los dominios S1, S2 y S4 de la subunidad D, así como parte del dominio TRP. El sitio 2T muestra una conformación cabeza arriba-cola abajo con dos interacciones: una Pi-catión entre el anillo aromático de la capsaicina y el anillo de la Arginina 493; y un puente de Hidrógeno entre el carbonilo de la capsaicina y la Tirosina 557.

El sitio 3T interacciona con los dominios S1, S2, S3 y S4 de la subunidad B y parte del dominio TRP. El sitio 3T muestra una conformación cabeza abajo-cola arriba que presenta 3 interacciones: un puente de hidrógeno entre el carbonilo de la capsaicina y la Tirosina 557, un puente de hidrógeno

entre el hidroxilo de la capsaicina y la Tirosina 556, y una interacción Pi-cación entre el anillo aromático de la capsaicina y la Arginina 493.

El sitio 4T interacciona con los dominios S3, S4 y parte del asa S4-S5 de la subunidad A y los dominios S5 y S6 de la subunidad B. El sitio 4T muestra una conformación horizontal y dos subunidades colaboran con aminoácidos para el sitio de interacción, siendo este sitio el segundo con mejor afinidad para la capsaicina a pesar de no presentar interacciones directas.

En la figura 12 se muestra el sitio de interacción del poro catiónico. En este sitio, la capsaicina interacciona con tres subunidades (A, B y C) siendo los dominios involucrados S5 y S6, particularmente los que se encuentran formando el poro catiónico del receptor (asa S5-S6). Los aminoácidos representados en el sitio son mitad hidrófobos e hidrófilos ya que esta es una zona anfipática. Las interacciones son puentes de hidrógeno con el grupo amina e hidroxilo de la capsaicina con la Treonina 643 de las subunidades B y C respectivamente. La conformación de la capsaicina es cabeza abajo-cola arriba.

En la figura 13 se muestran los sitios de unión en la zona intracelular. En esta zona, la capsaicina interacciona con el dominio N-terminal de una subunidad en particular, uniéndose en las repeticiones de ankirina, principalmente la quinta. La conformación de la capsaicina en los 4 sitios se muestra de forma cabeza abajo-cola arriba. Los sitios de la zona intracelular son los que muestran menor afinidad por la capsaicina. La naturaleza de los aminoácidos es hidrófila debido a que tiene contacto con el interior celular rico en agua. El sitio 1I se une en la subunidad B y muestra una interacción de puente de hidrógeno entre el hidroxilo de la Capsaicina y el Glutámico 358. El sitio 2I se une en la subunidad D mostrando dos puentes de hidrógeno: uno con el hidroxilo de la capsaicina y la Treonina 308; y otro con el éter de la capsaicina y la Lisina 305. El sitio 3I se une en la subunidad C mostrando dos puentes de hidrógeno con el éter de la capsaicina y la Lisina 320; y la amina de la capsaicina con el Glutámico 313. Por último, el sitio 4I se une en la subunidad A con tres puentes de hidrógeno: uno entre el éter de la capsaicina y la Lisina 305, uno con el hidroxilo de la capsaicina y la Treonina 308; y uno con la amina de la capsaicina y la Asparagina 312.

## Región transmembranal

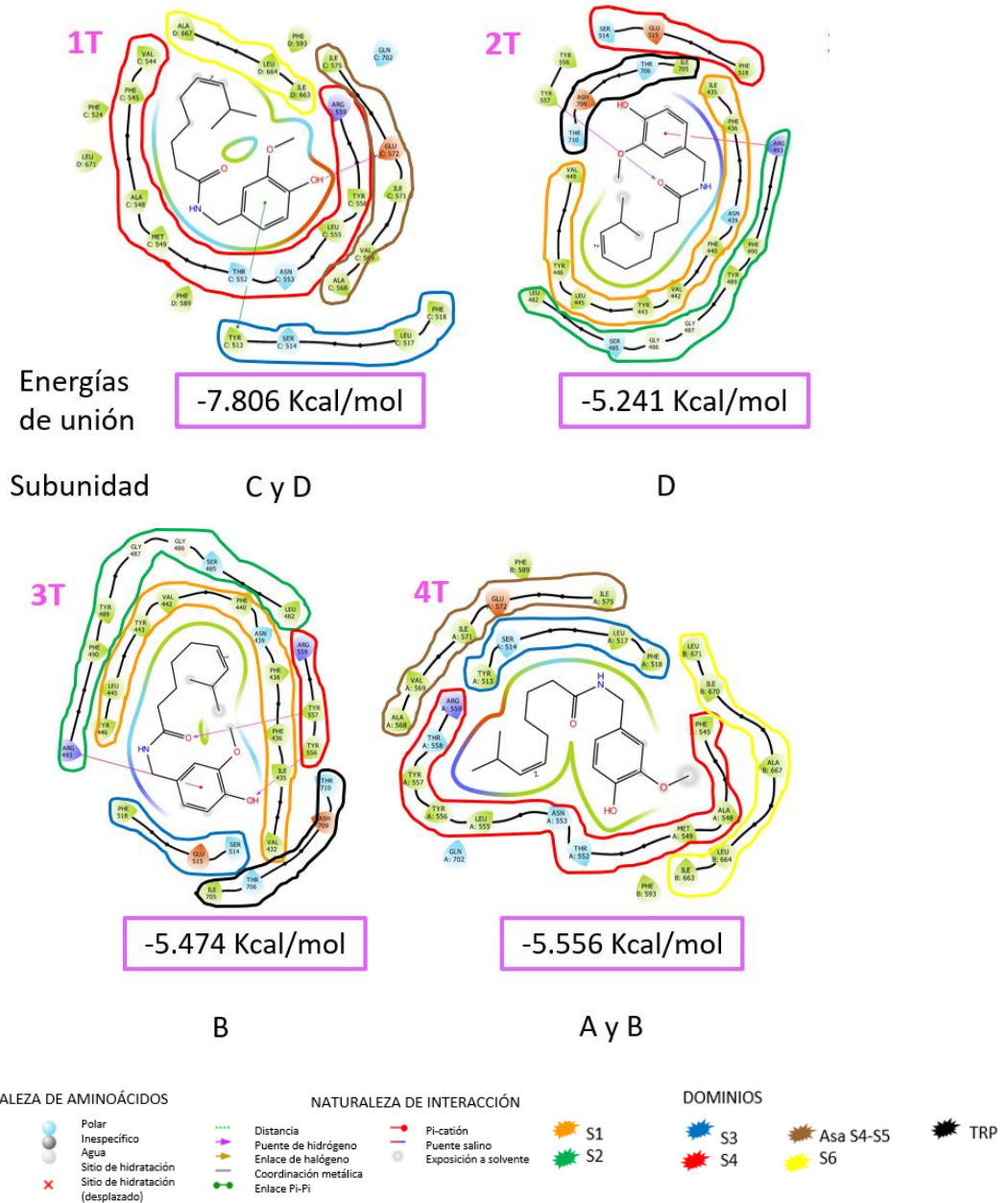


Figura 11. Sitios de interacción de la capsaicina en la zona transmembranal del receptor TRPV1. En círculos de colores se muestran encerrados los dominios a los que pertenecen los aminoácidos. Cada aminoácido se encuentra coloreado de acuerdo con su naturaleza química. Las líneas representan la interacción entre un aminoácido y la capsaicina.

## Sitio del poro catiónico

Energía de unión: -5.559 Kcal/mol

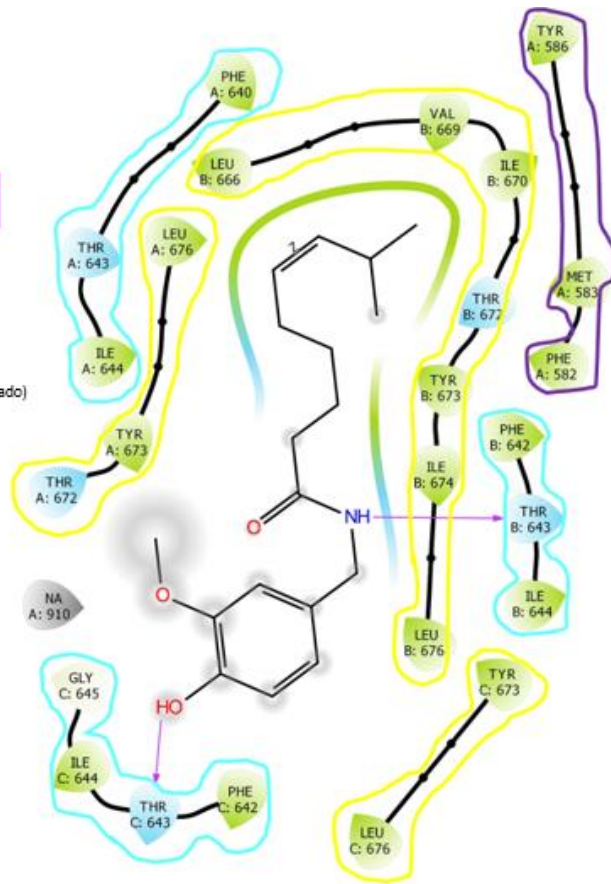


Figura 12. Sitio de interacción en la zona del poro catiónico del receptor TRPV1. En círculos de colores se muestran encerrados los dominios a los que pertenecen los aminoácidos. Cada aminoácido se encuentra coloreado de acuerdo con su naturaleza química. Las líneas representan la interacción entre un aminoácido y la capsaicina.

## Región intracelular

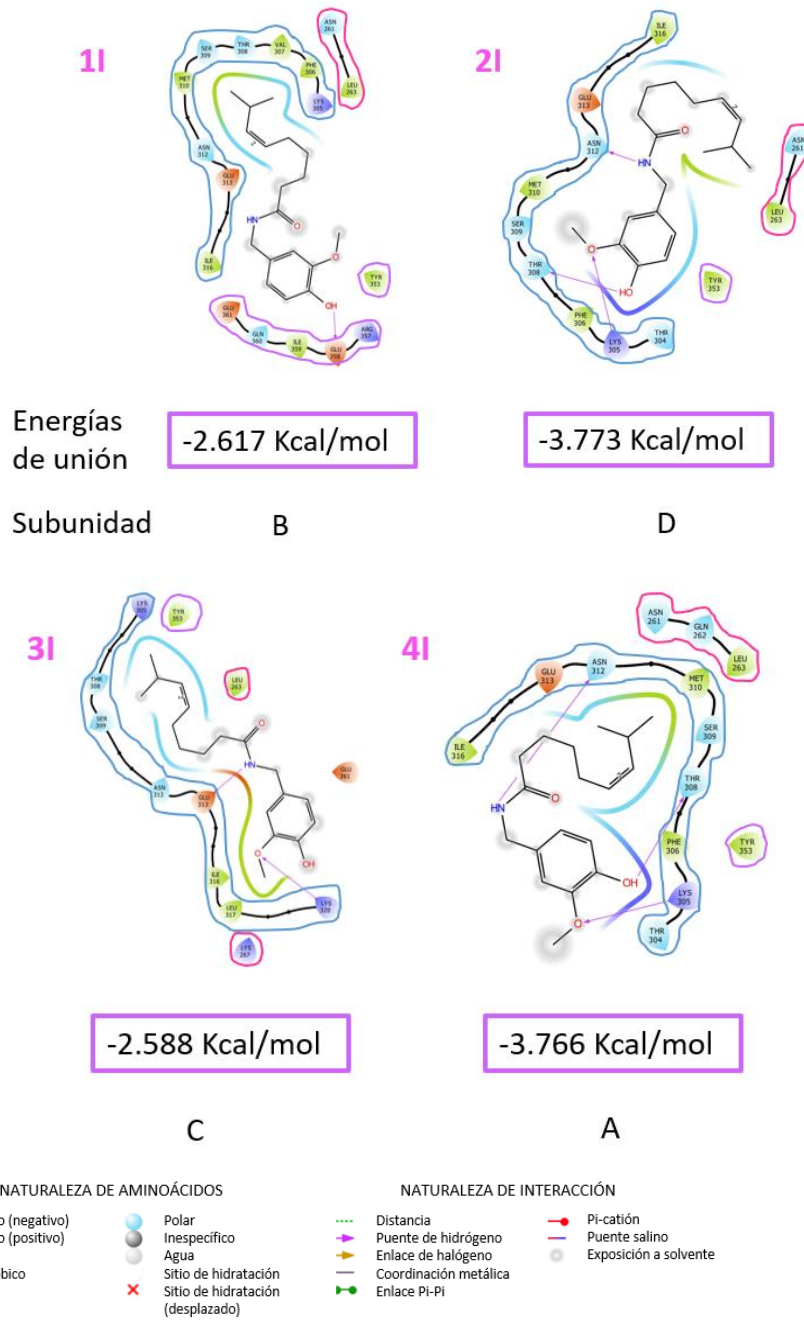


Figura 13. Sitios de interacción de la capsaicina en la zona intracelular del receptor TRPV1. En círculos de colores se muestran encerrados los dominios a los que pertenecen los aminoácidos. Cada aminoácido se encuentra coloreado de acuerdo con su naturaleza química. Las líneas representan la interacción entre un aminoácido y la capsaicina.

### 6.1.2 Docking molecular con membrana endotelial

Para asemejar las condiciones *in vivo* de la interacción entre la capsaicina y el receptor TRPV1, se realizó el *docking* molecular insertando al receptor en una membrana epitelial. La membrana endotelial es el tipo de membrana que se encuentra en las células del útero, por lo que esto asemeja las condiciones de interacción que esperamos en el modelo animal. En la figura 14 podemos observar el modelo del receptor TRPV1 incrustado en la membrana endotelial. Como podemos observar, el grosor de la zona transmembranal del receptor se acopla al grosor de la membrana. En la parte inferior se observan las porciones intracelulares, las cuales interactúan con moléculas de agua libre en el interior celular.

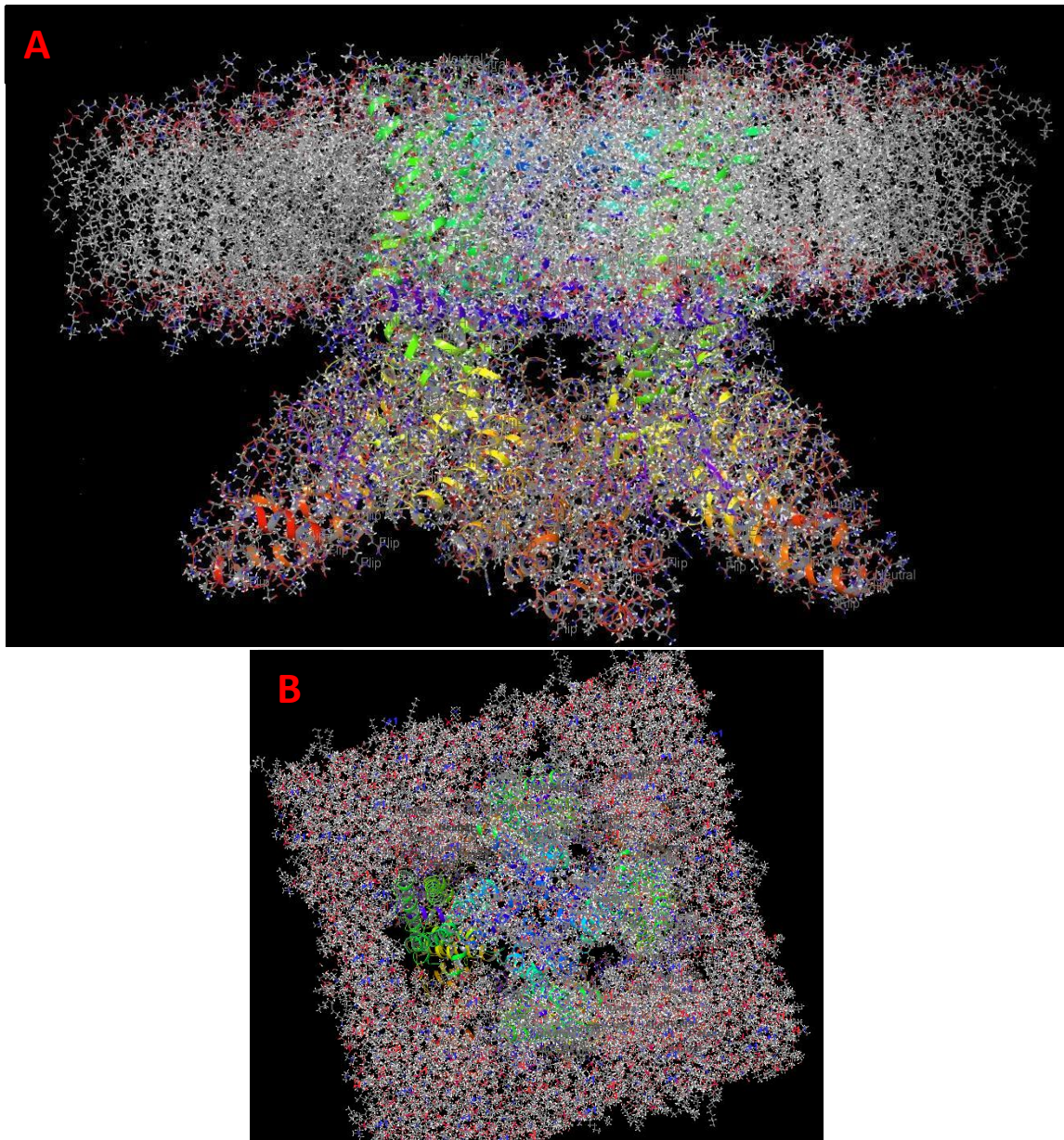


Figura 14. Modelo del receptor TRPV1 en una membrana endotelial. A) Vista frontal B) Vista superior.

Como resultado del *docking*, se encontraron 5 sitios de unión para la capsaicina en el receptor TRPV1. Se encontraron 4 sitios en la región transmembranal y 1 sitio en la zona del poro catiónico (Figura 15 A-B). Como podemos observar en la tabla 3, todos los sitios presentan una energía de interacción muy similar no mostrando una predilección por alguna zona en particular. La constante de disociación para la capsaicina en los sitios encontrados fue de 2 a 10  $\mu\text{M}$ .

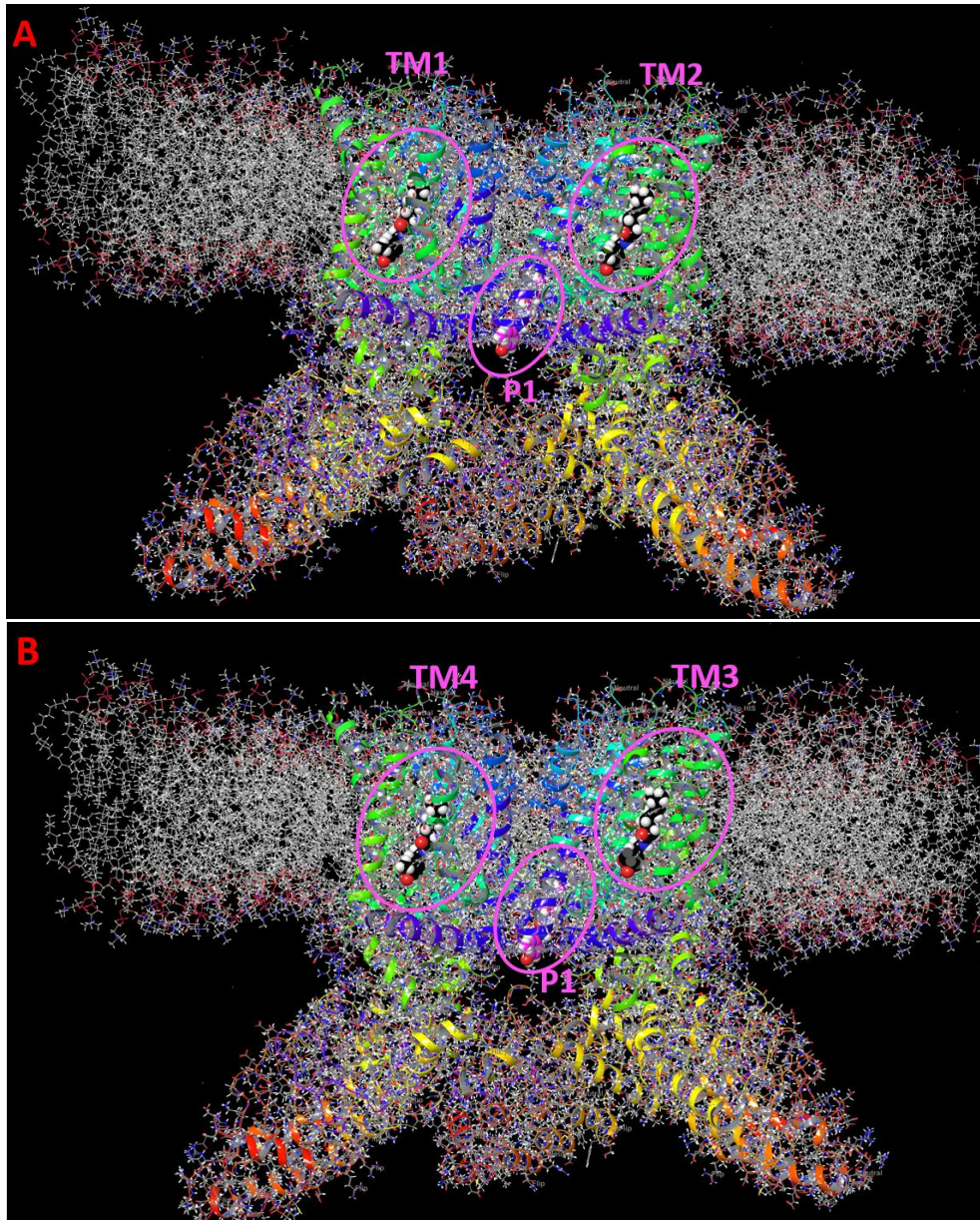


Figura 15. Docking molecular entre la capsaicina y el receptor TRPV1 incrustado en un modelo de membrana endotelial. En círculos rosas se observan los sitios de unión para la capsaicina en el receptor. A) Vista anterior mostrando dos sitios transmembranales y el sitio del poro catiónico B) Vista posterior mostrando dos sitios transmembranales y el sitio del poro catiónico.

Zona	Número de sitio por zona	Energía de interacción (Kcal/mol)	Constante de disociación $K_D$ ( $\mu$ M)
Transmembranal	1	-8.092	2.0
	2	-8.097	2.0
	3	-7.078	10.4
	4	-7.598	4.5
Poró catiónico	1	-8.083	2.0

Tabla 3. Energías de interacción y constante de disociación ( $K_D$ ) de cada uno de los sitios de unión para la capsaicina en el receptor TRPV1 en el docking molecular con membrana endotelial.

En la figura 16 podemos observar a detalle los sitios de unión en la región transmembranal. Cada sitio se encuentra conformado por una subunidad del tetrámero. Todos los sitios tienen la misma conformación de la molécula de capsaicina: cabeza arriba-cola abajo. La naturaleza predominante de los aminoácidos que conforman los sitios de unión es hidrófoba. Los aminoácidos que conforman los sitios son diferentes para cada uno, mostrando diferentes conformaciones de aminoácidos desde el dominio S1 hasta el S4. En la figura 17 podemos observar la representación de las interacciones moleculares entre la capsaicina y residuos aminoacídicos de la región transmembranal en cada sitio encontrado.

El sitio TM1 está conformado por aminoácidos de la subunidad D. La mayoría de los aminoácidos que conforman el sitio de unión pertenecen al dominio S4. Se muestra una interacción Pi-Pi entre el anillo de la capsaicina y la Fenilalanina 518. En la figura 17 superior se observa que la mayoría de las interacciones se presentan en la zona del anillo aromático de la capsaicina. Estas interacciones son de naturaleza hidrófoba y tipo puentes de hidrógeno.

El sitio TM2 está conformado por aminoácidos de la subunidad C. La mayoría de los aminoácidos que conforman el sitio pertenecen a los dominios S1 y S4. Se muestra una interacción de puente de hidrógeno entre el carbonilo de la capsaicina y la Glutamina 521. En la figura 17 inferior podemos observar interacciones con el anillo aromático de la capsaicina y con la cadena carbonada. Estas interacciones son de naturaleza hidrófoba y tipo puentes de hidrógeno.

El sitio TM3 está conformado por aminoácidos de la subunidad B. La mayoría de los aminoácidos pertenecen a los dominios S1, S2 y S4. Se muestra una interacción Pi-Pi entre el anillo de la capsaicina y la Fenilalanina 490. En la figura 18 superior se observa que la mayoría de las interacciones con la capsaicina se presentan en la cadena carbonada y son de naturaleza hidrófoba.

El sitio TM4 está conformado por aminoácidos de la subunidad A. La mayoría de los aminoácidos pertenecen a los dominios S3 y S2. No se muestra ningún tipo de interacción directa con los aminoácidos. En la figura 18 inferior se observa que las interacciones con la capsaicina se encuentran en la cadena carbonada y son de naturaleza hidrófoba y tipo puentes de hidrógeno.

## Región transmembranal

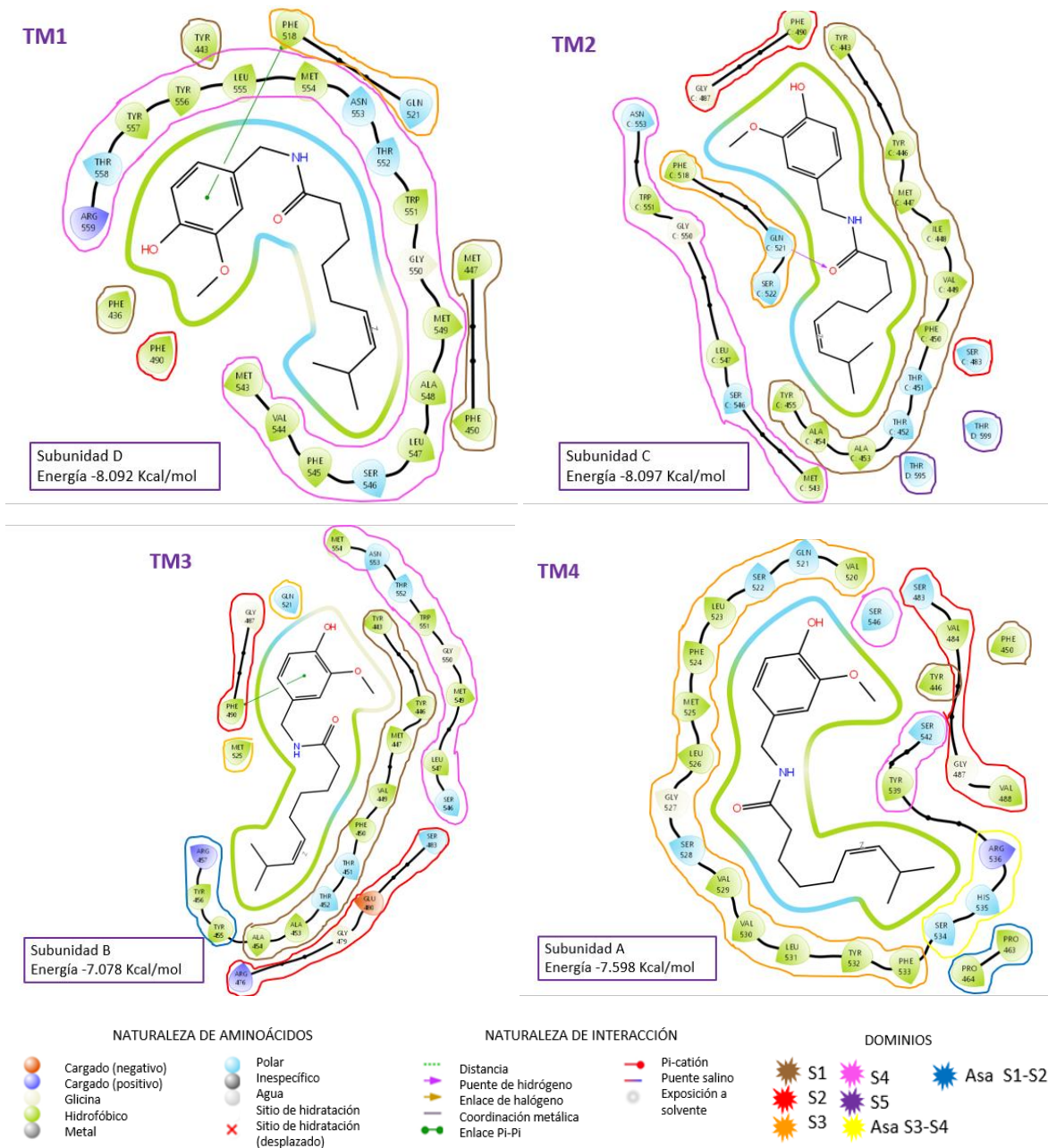


Figura 16. Sitios de interacción de la capsaicina en la zona transmembranal del receptor TRPV1 incrustado en una membrana epitelial. En círculos de colores se muestran encerrados los dominios a los que pertenecen los aminoácidos. Cada aminoácido se encuentra coloreado de acuerdo con su naturaleza química. Las líneas representan la interacción entre un aminoácido y la capsaicina.

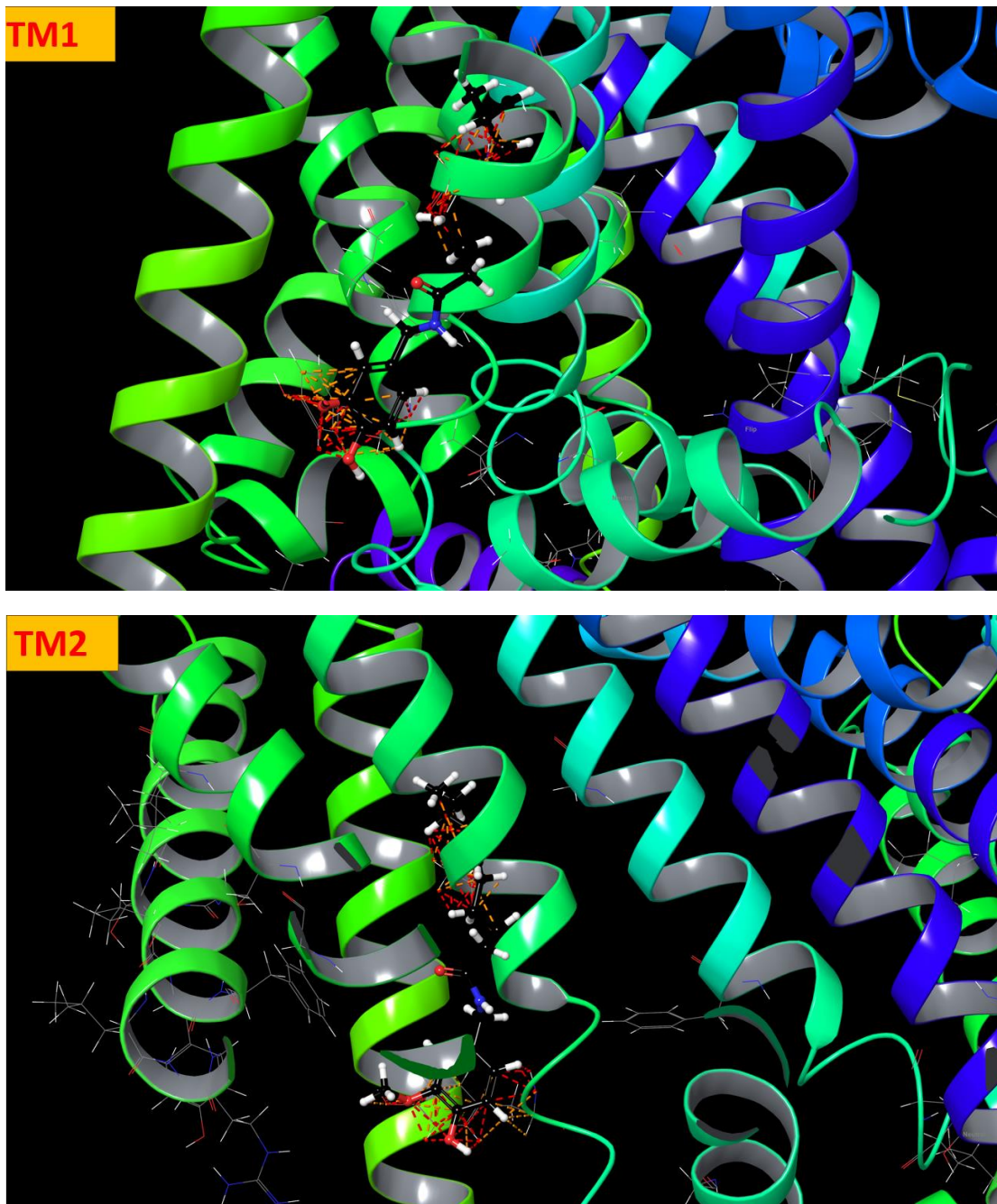


Figura 17. Interacciones moleculares entre la capsicina (molécula negra) y los dominios transmembranales del receptor TRPV1 en los sitios TM1 (superior) y TM2 (inferior). Las interacciones están marcadas como líneas punteadas color naranja (hidrófobas) y rojo (puentes de hidrógeno).

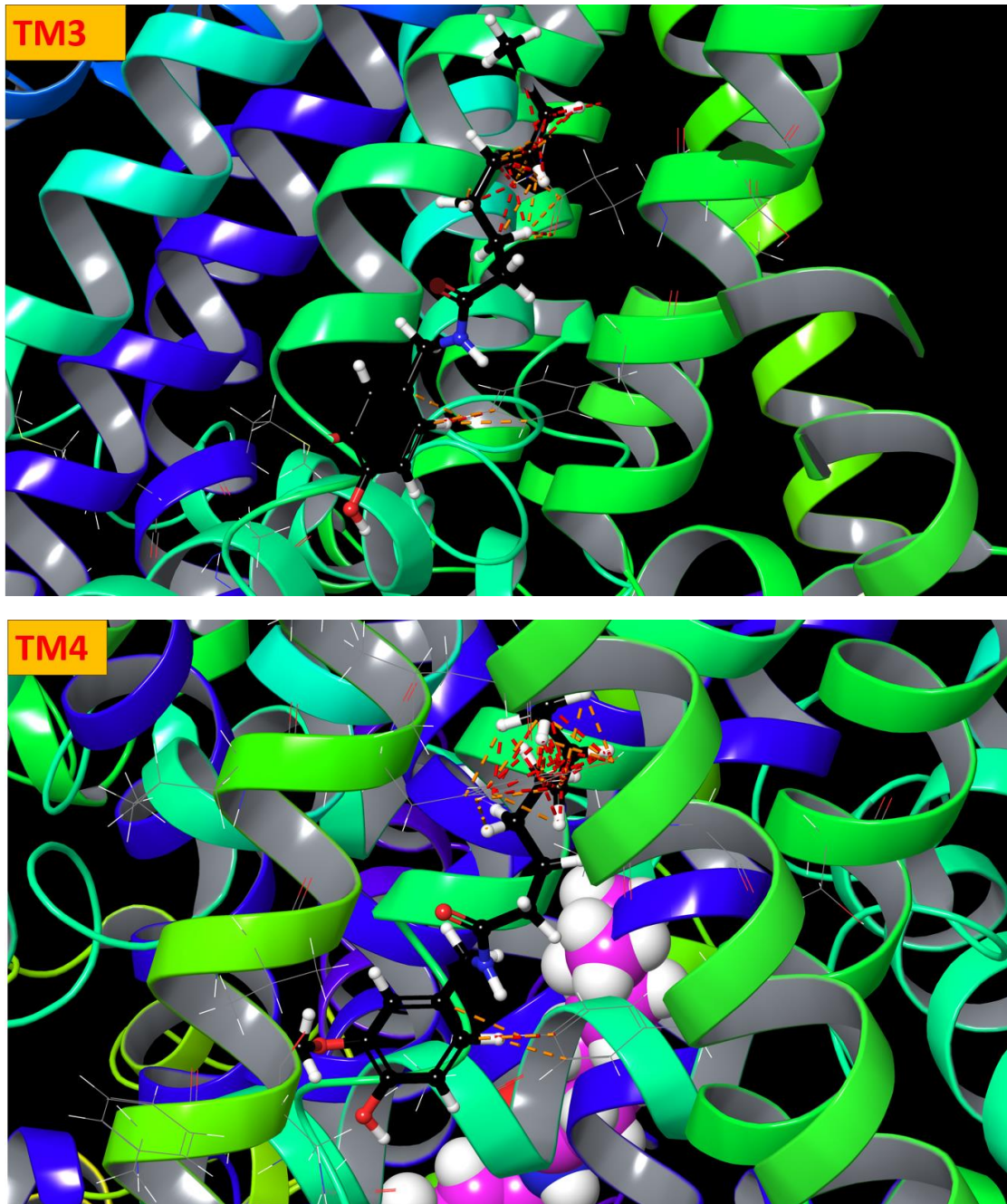


Figura 18. Interacciones moleculares entre la capsicina (molécula negra) y los dominios transmembranales del receptor TRPV1 en los sitios TM3 (superior) y TM4 (inferior). Las interacciones están marcadas como líneas punteadas color naranja (hidrófobas) y rojo (puentes de hidrógeno).

## Sitio del poro catiónico

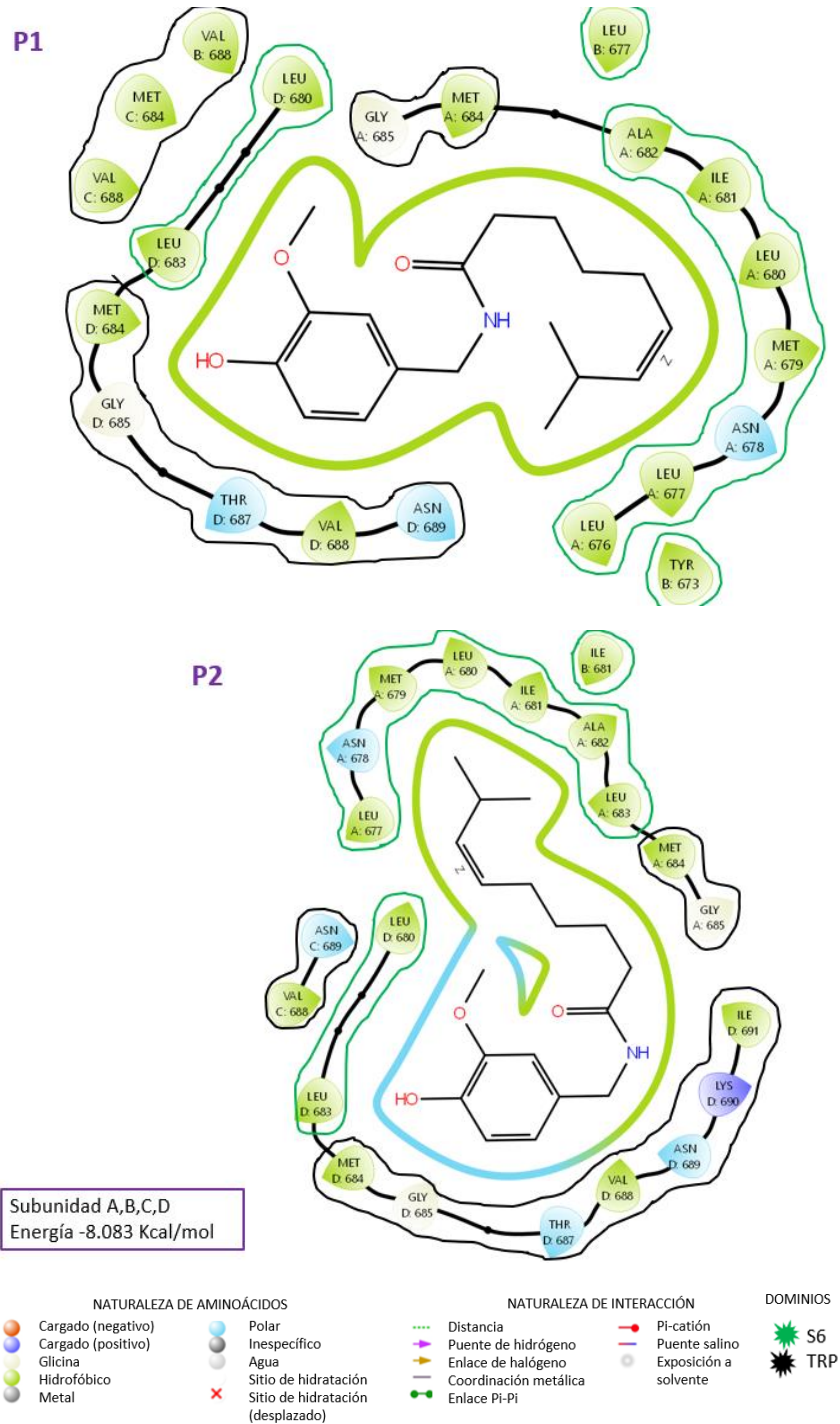
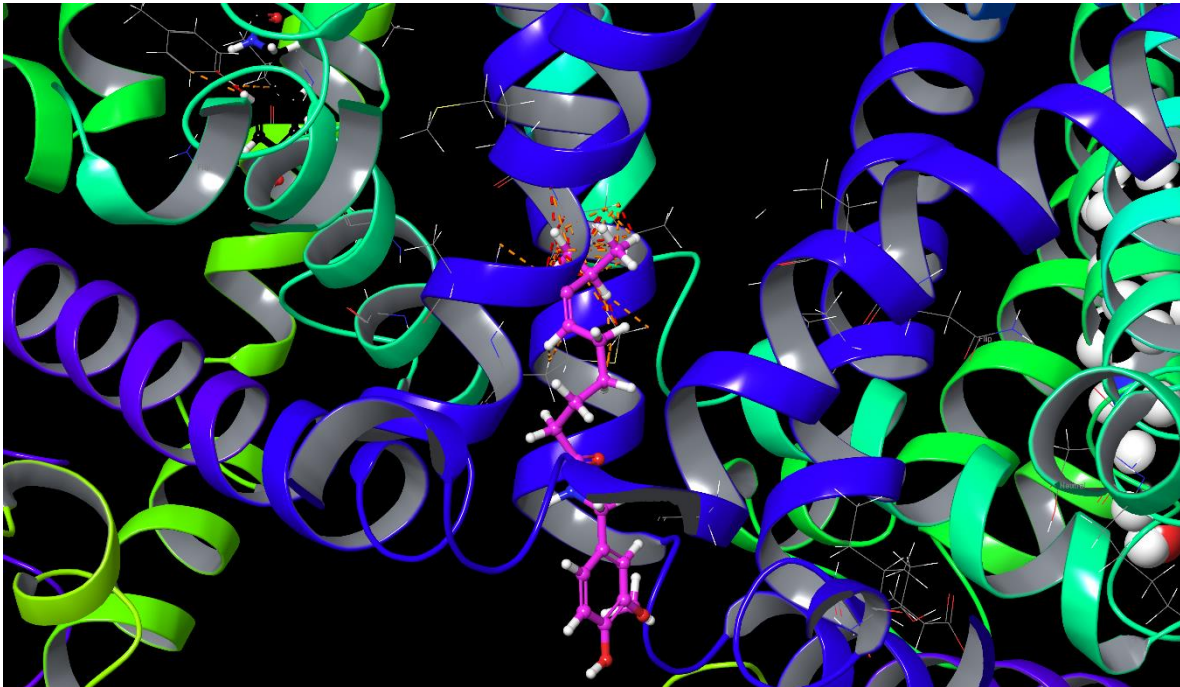


Figura 19. Sitio de interacción de la capsaicina en la zona del poro catiónico del receptor TRPV1 incrustado en una membrana epitelial. Se muestran dos conformaciones que puede presentar la capsaicina en el mismo sitio. En círculos de colores se muestran encerrados los dominios a los que pertenecen los aminoácidos. Cada aminoácido se encuentra coloreado de acuerdo con su naturaleza química. Las líneas representan la interacción entre un aminoácido y la capsaicina.



*Figura 20. Interacciones moleculares entre la capsaicina (molécula rosa) y los dominios S6 y TRP del receptor TRPV1 en el sitio del poro catiónico. Las interacciones están marcadas como líneas punteadas color naranja (hidrófobas) y rojo (puentes de hidrógeno).*

En la figura 19 podemos observar dos conformaciones que pueden presentarse en el sitio del poro catiónico. Ambas tienen la misma energía de unión y sólo puede presentarse una a la vez. El sitio está conformado por aminoácidos del final del dominio S6 y aminoácidos del dominio TRP pertenecientes a las 4 subunidades del tetrámero. La conformación P1 muestra a la Capsaicina de manera horizontal y la conformación P2 la muestra cabeza abajo-cola arriba. En la figura 20 podemos observar las interacciones moleculares entre la cadena carbonada de la capsaicina y residuos aminoácidos hidrófobos del dominio S6 y TRP de las cuatro subunidades del tetrámero. Las interacciones son en su mayoría de naturaleza hidrófoba.

## 6.2 Evaluación del modelo experimental

### 6.2.1 Determinación de la primera apertura vaginal (PAV)

En la figura 21 se grafica el promedio de los días de la PAV de cada uno de los grupos de estudio. El grupo control tuvo en promedio la PAV a los 27.8 días; el grupo vehículo a los 26.8 días y los grupos administrados con VE (VE, VE/Caps 1 nM, VE/Caps 10 nM) a los 26.9, 27.1 y 26.6 días respectivamente. Estadísticamente, no se encontraron diferencias significativas en el promedio de la PAV de cada uno de los grupos experimentales.

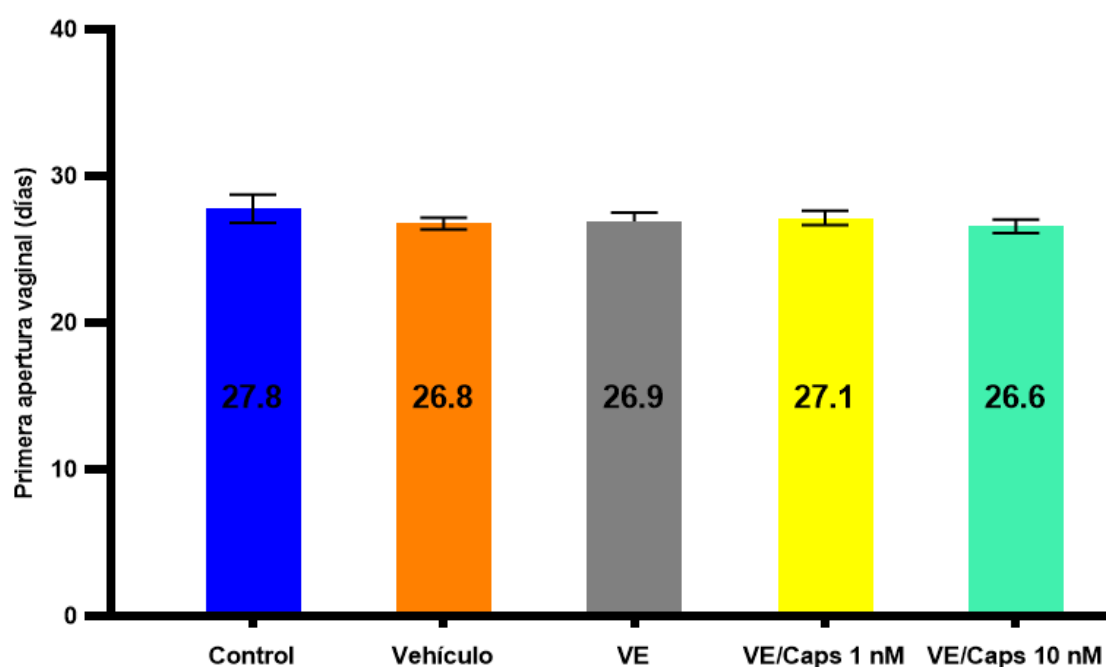


Figura 21. Primera apertura vaginal. En la gráfica se muestra el promedio de la PAV de las ratonas de cada grupo experimental  $\pm$  EEM (Control, Vehículo, VE, VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM  $n=8$  por grupo). Se realizó el análisis ANOVA post Tukey  $p \leq 0.05$ . No se encontraron diferencias significativas.

### 6.2.2 Registro de variación de peso

En el registro de peso de la figura 22 observamos que después de la administración de VE (P24) se presentó una tendencia de disminución en los grupos administrados (VE, VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM) comparados con el control y vehículo, sin embargo, conforme avanzó el tiempo de evolución, alrededor del P48 se fue perdiendo esta tendencia y los pesos se asemejaron. Después de la administración de capsaicina (P64) el peso de todos los grupos se mantuvo constante. Por lo cual, no se observaron cambios significativos en el peso de los animales durante todo el experimento.

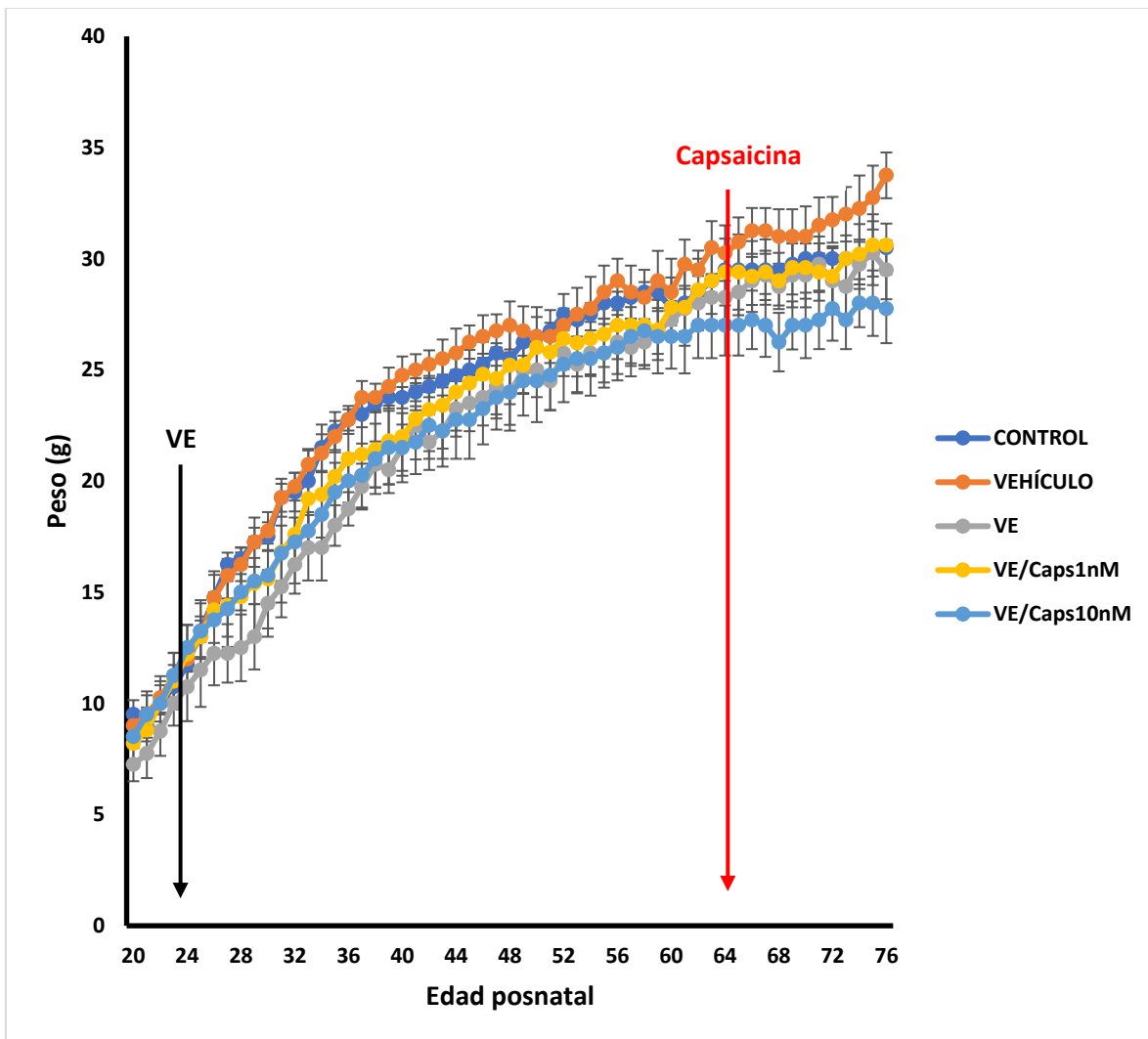


Figura 22. Registro de variación de peso. En la gráfica se muestra el promedio del peso de las ratonas de los grupos de trabajo a lo largo del estudio  $\pm$ EEM (control, vehículo, VE, VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM  $n=8$  por grupo). Se realizó el análisis ANOVA post Tukey  $p \leq 0.05$ . No se encontraron diferencias significativas.

### 6.2.3 Seguimiento del ciclo estral

El ciclo estral es el ciclo reproductivo de los roedores y consta de cuatro etapas: estro, metaestro, diestro y proestro. Un ciclo estral tiene una duración aproximada de 4-5 días. Para la identificación del ciclo estral por medio de su citología se observa la presencia de células escamosas, células epiteliales nucleadas y leucocitos. La proporción de estas células determina la fase en la que se encuentra (Byers et al., 2012):

Proestro: Predominan las células epiteliales nucleadas pueden estar en grupos o individuales.

Estro: Predominan las células epiteliales escamosas y aparecen en grupo.

Metaestro: Es una mezcla de células donde predominan los leucocitos, pero existe presencia de células epiteliales nucleadas o escamosas.

Diestro: Predominan los leucocitos.

En la parte superior de la figura 23 se observan imágenes representativas de cada fase del ciclo. En la parte inferior se observa la aciclicidad en las ratonas, mostrando un Estro permanente.

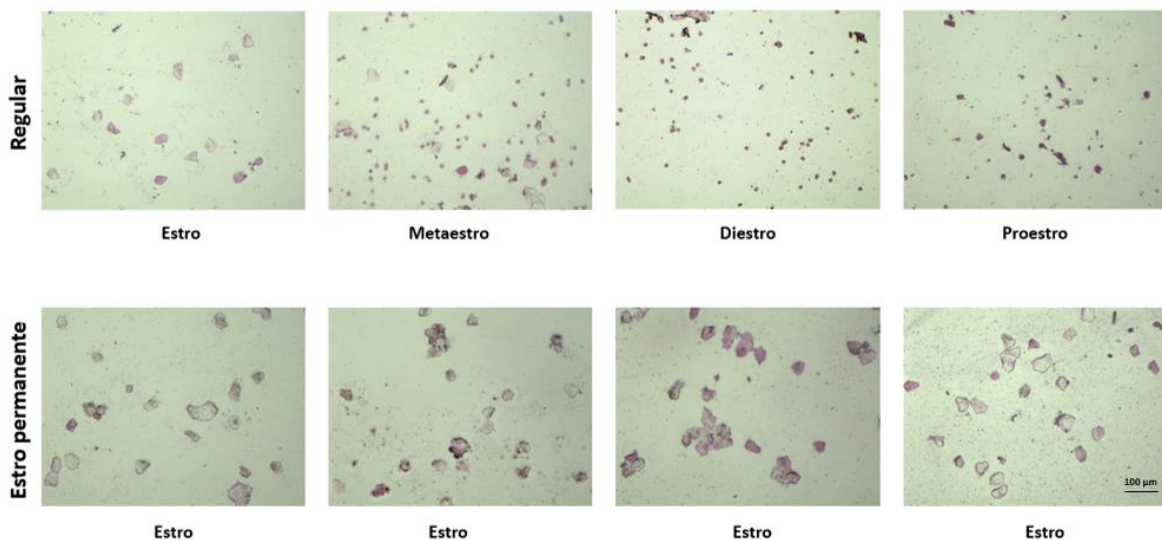


Figura 23. Microfotografías de frotis vaginales de ratonas CD1 teñidas con H&E a 10X. Barra de escala: 100 µm. En la parte superior se muestran las fases del ciclo estral de acuerdo con la celularidad observada en el frotis vaginal. En la parte inferior se muestra un ejemplo de frotis vaginales de una ratona acíclica (fase de estro permanente).

En las figuras 24 y 25 se muestran gráficas representativas del seguimiento del ciclo estral de las ratonas de los grupos de estudio. En la izquierda se encuentran las gráficas del seguimiento antes del tiempo de administración de capsaicina y en la derecha el seguimiento posterior a tiempo de la administración.

En los grupos control y vehículo se puede observar un comportamiento similar en la ciclicidad, pasando estas por todas las fases cada 4 o 5 días. En el grupo vehículo después de la administración de SSI no se reportan cambios en el ciclo estral. En los grupos administrados con VE (VE, VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM) antes del tiempo de administración de capsaicina se observa a la mayoría de las ratonas en una fase de estro permanente (aciclicidad). En el grupo VE/Caps 1 nM se observa que las ratonas presentaron aciclicidad en estro. En el grupo VE/Caps 10 nM se mostró también una aciclicidad en estro, presentando algunos días de metaestro.

Posterior al tiempo de administración de capsaicina, se siguió presentando este patrón de aciclicidad en las ratonas administradas con capsaicina (VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM) y en las no administradas (VE), mostrando el mismo patrón.

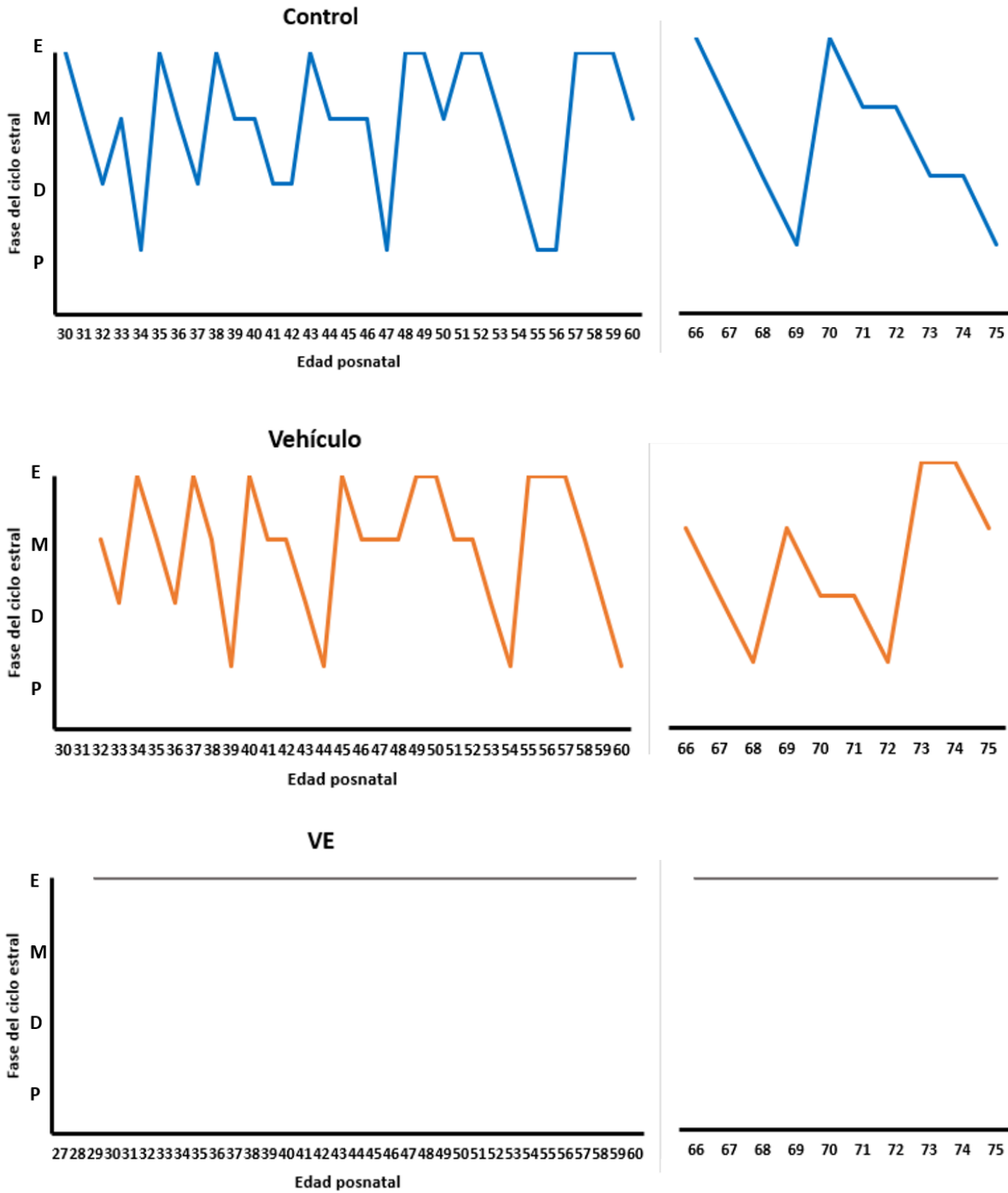


Figura 24. Gráficas representativas del seguimiento del ciclo estral de las ratonas en los grupos de trabajo control, vehículo y VE. Cada letra representa una fase del ciclo estral: E estro, M metaestro, D diestro, P proestro. A la izquierda se muestran las gráficas antes del tiempo de administración de capsaicina y a la derecha posterior al tiempo de administración.

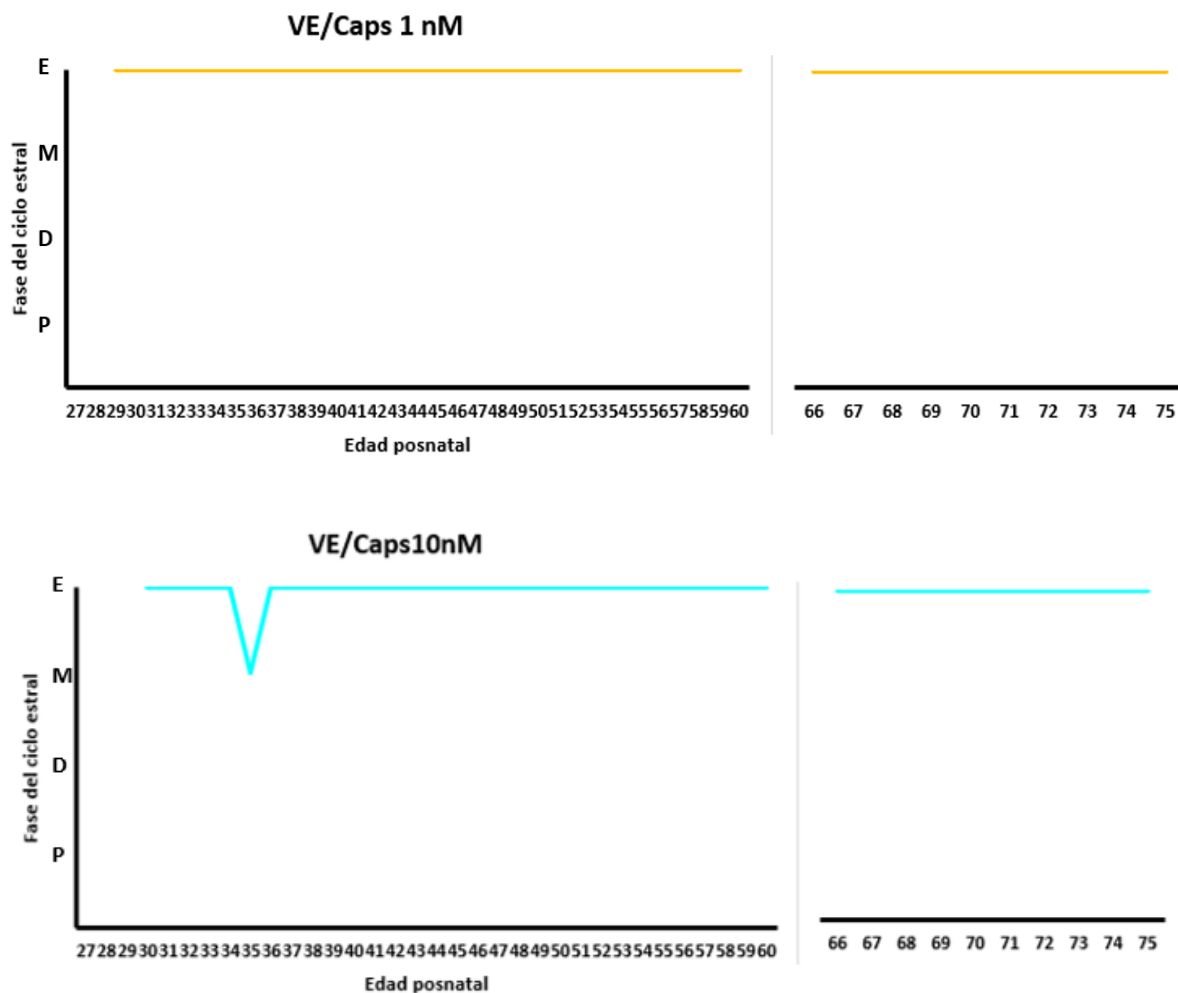


Figura 25. Gráficas representativas del seguimiento del ciclo estral de las ratonas en los grupos de trabajo VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM. Cada letra representa una fase del ciclo estral: E estro, M metaestro, D diestro, P proestro. A la izquierda se muestran las gráficas antes del tiempo de administración de capsaicina y a la derecha posterior al tiempo de administración.

## 6.3 Evaluación de los úteros

### 6.3.1 Peso relativo de los úteros

Como podemos observar en la figura 26 F, el promedio del peso relativo de los úteros fue de 0.5% en el grupo control, 0.5% en el grupo vehículo, 0.6% en el grupo VE, 0.6% en el grupo VE/Caps 1 nM y 0.5% en el grupo VE/Caps 10 nM. No se encontraron diferencias significativas entre el promedio del peso relativo de cada uno de los grupos de trabajo. Sin embargo, los grupos VE y VE/Caps 1 nM muestran un mayor promedio del peso relativo de los úteros y el grupo VE/Caps 10 nM es el que muestra un menor promedio. En las figuras 26 A-E se observan imágenes representativas de los úteros de los grupos experimentales.

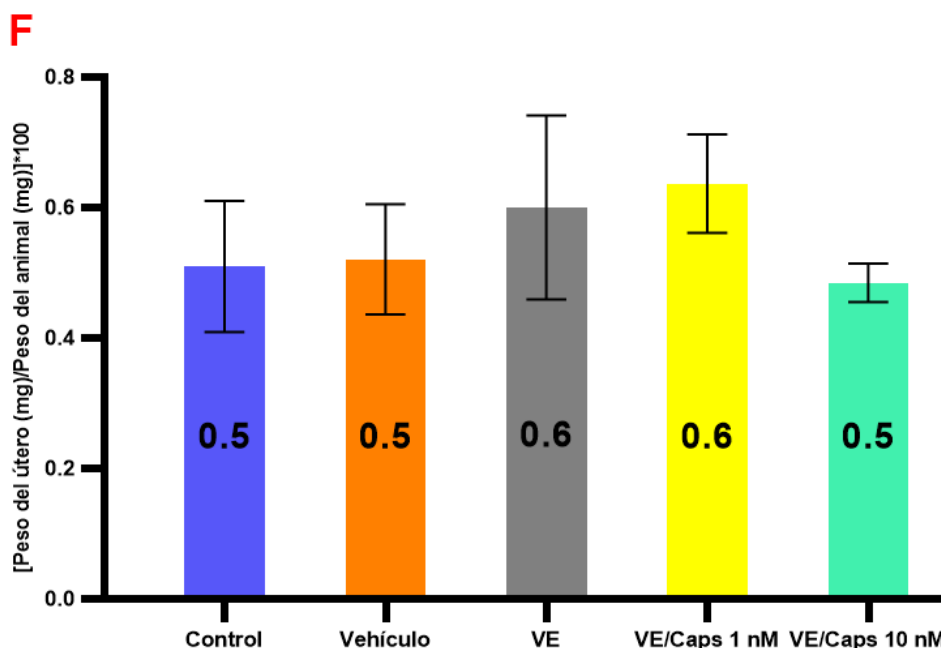


Figura 26. Peso relativo de los úteros. A-E Fotografías representativas de los úteros. A- control, B- vehículo, C- VE, D- VE/Caps 1 nM, E- VE/Caps 10 nM. En la gráfica se muestra el promedio del peso relativo de los úteros de las ratonas de los grupos de trabajo al momento de la eutanasia  $\pm$ EEM (control, vehículo, VE, VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM  $n=8$  por grupo). Se realizó el análisis ANOVA post Tukey  $p \leq 0.05$ . No se encontraron diferencias significativas.

### **6.3.2 Evaluación morfométrica de las capas uterinas**

El útero es un órgano reproductivo femenino que está compuesto por 3 capas celulares y un epitelio luminal. La capa más externa es el perimetrio. El perimetrio está compuesto por tejido conectivo que se encarga de proteger y darle sostén al órgano. La segunda capa es el miometrio, el cual está compuesto por tejido muscular liso. Las células musculares dan flexibilidad al tejido para poder realizar contracciones y estiramiento durante el proceso de embarazo y parto. La capa más interna es el endometrio. El endometrio está compuesto por células epiteliales cilíndricas, glándulas y estroma. Su principal función es el desarrollo de la placenta. Las glándulas endometriales son glándulas tubulares simples formadas por epitelio simple columnar o cuboidal, estas secretan sustancias nutricionales para el implante y crecimiento del embrión. Por último, se encuentra el epitelio luminal. El epitelio luminal está compuesto de una monocapa de células columnares simples ciliadas, lugar que sirve para la implantación del óvulo fertilizado (Ross, 2008).

A continuación, en cada apartado siguiente se hace la descripción de los resultados tanto de la medición como de la evaluación morfológica de cada capa uterina.

#### **6.3.2.1 Evaluación morfométrica del epitelio luminal**

En la figura 27 F se observan los promedios del grosor del epitelio luminal de cada uno de los grupos de trabajo. En el grupo control se muestra un promedio de 20.6  $\mu\text{m}$  y en el grupo vehículo un promedio de 24.4  $\mu\text{m}$ . En los grupos VE y VE/Caps 1 nM se observó un aumento en el grosor del epitelio en comparación al grupo vehículo de 28.2 y 29.5  $\mu\text{m}$  respectivamente. En el grupo VE/Caps 10 nM el grosor promedio fue de 26.8  $\mu\text{m}$ . En este grupo se observa una disminución en el grosor epitelial a comparación con los grupos VE y VE/Caps 1 nM.

En la figura 27 A-E se presentan las microfotografías representativas del epitelio luminal de cada uno de los grupos de trabajo. Los grupos VE y VE/Caps 1 nM muestran un epitelio más grueso, esto debido a un aumento en la celularidad, ya que en vez de mostrarse una monocapa de células ciliadas se observa una pseudo bicapa de células mal organizadas. Al observar el grupo VE/Caps 10 nM podemos ver una monocapa de células ciliadas muy similar en morfología con el grupo control y vehículo.

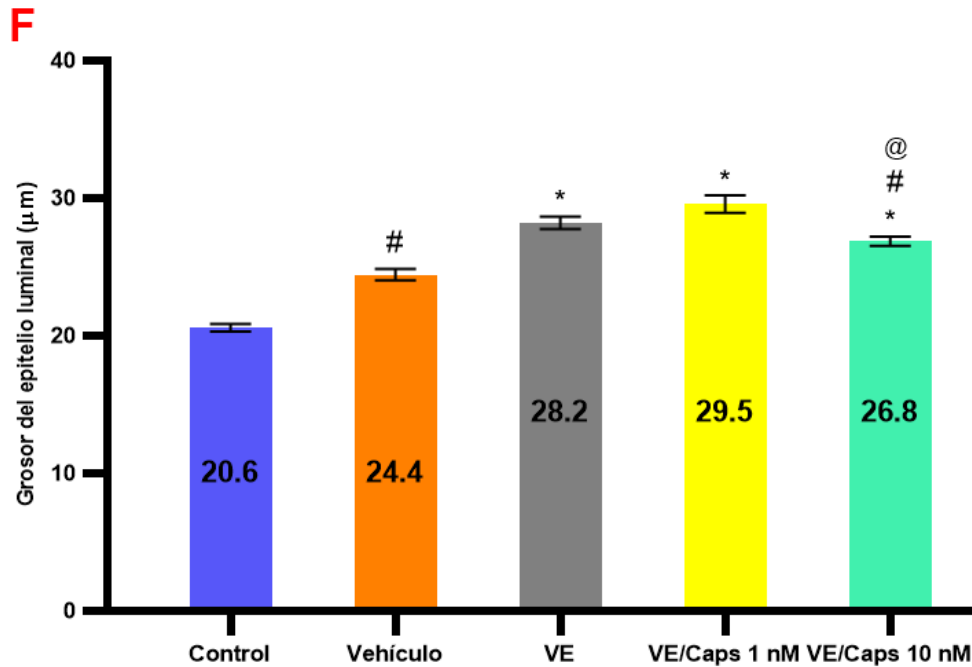
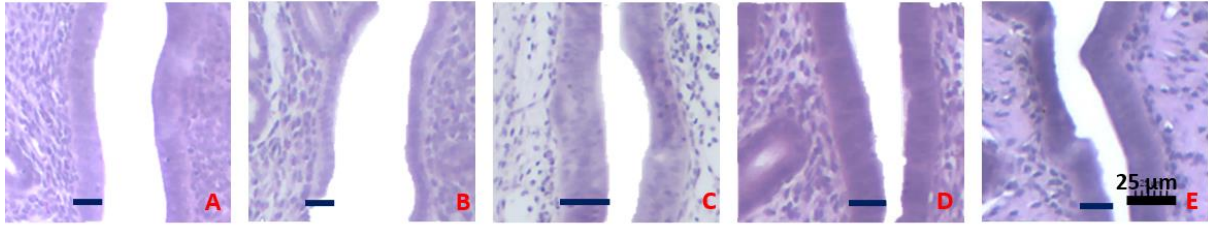


Figura 27. Grosor del epitelio luminal. A-E Microfotografías representativas de la morfología del epitelio luminal a 10X. A- control, B- vehículo, C- VE, D- VE/Caps 1 nM, E- VE/Caps 10 nM. En líneas azules se marca el epitelio luminal. Barra de escala 25 µm. F Gráfica del promedio del grosor del epitelio luminal de los grupos de trabajo  $\pm$  EEM. Se indica un aumento en el grosor del epitelio en los grupos VE, VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM comparado con el vehículo. Se indica una disminución en el grosor del epitelio en los grupos vehículo y VE/Caps 10 nM en comparación con el grupo VE. Se indica una disminución en el grosor del epitelio en el grupo VE/Caps 10 nM en comparación con el grupo VE/Caps 1 nM. ANOVA post Tukey  $p \leq 0.05$  \* vs grupo vehículo # vs grupo VE. @ vs grupo VE/Caps 1 nM.

### 6.3.2.2 Evaluación morfométrica del endometrio

En la figura 28 F se observan los promedios del grosor del endometrio de cada grupo de trabajo. El promedio del grupo control fue de 251.8 µm, del grupo vehículo fue de 291.4 µm y del grupo VE fue de 285.7 µm. El promedio del grosor del endometrio de estos 3 grupos mencionados fue similar. Los grupos que si presentaron un aumento significativo en el grosor del endometrio fueron los administrados con capsaicina (VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM). El promedio del grosor del endometrio del grupo VE/Caps 1 nM fue de 368.8 µm y del grupo VE/Caps 10 nM fue de 381.6 µm.

En la figura 28 A-E se observan microfotografías representativas de parte del endometrio de cada uno de los grupos de trabajo. Podemos observar que el grupo VE muestra un aumento en la celularidad a comparación del grupo control y vehículo. Los grupos administrados con capsaicina muestran una disminución en la celularidad, dejando mayor espacio al estroma endometrial.

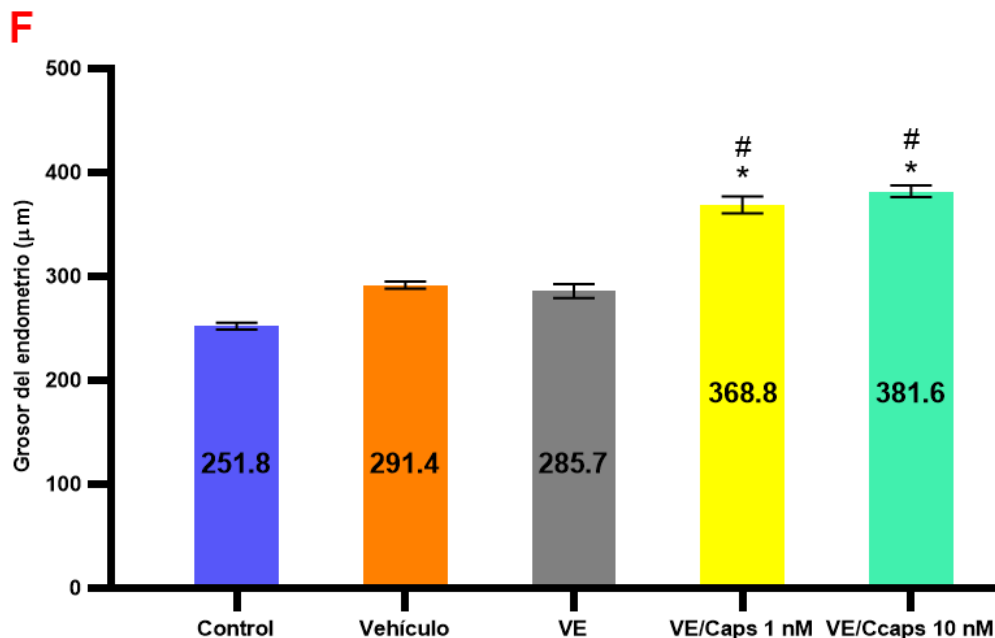
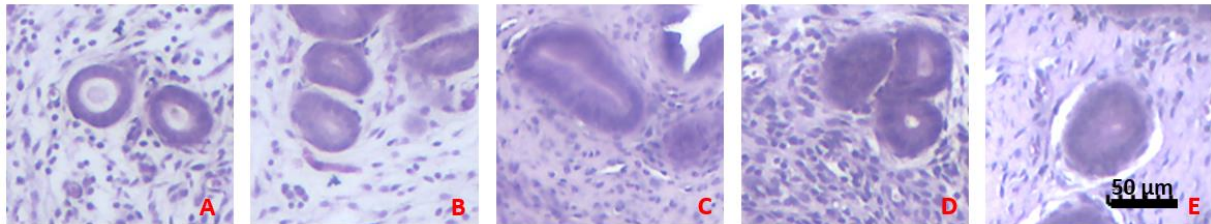


Figura 28. Grosor del endometrio. A-E Microfotografías representativas de la morfología del endometrio a 10X. A- control, B- vehículo, C- VE, D- VE/Caps 1 nM, E- VE/Caps 10 nM. Barra de escala 50 µm. F Gráfica del promedio del grosor del endometrio de los grupos de trabajo  $\pm$ EEM. Se indica un aumento en el grosor del endometrio en los grupos VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM en comparación con el grupo vehículo. Se indica un aumento en el grosor del endometrio en los grupos VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM en comparación con el grupo VE. ANOVA post Tukey  $p \leq 0.05$  \* vs grupo vehículo. # vs grupo VE.

### 6.3.2.3 Evaluación morfométrica del miometrio

En la figura 29 F podemos observar el grosor promedio del miometrio de cada uno de los grupos de trabajo. Los grupos control, vehículo y VE muestran un promedio similar en el grosor del miometrio. El grupo control tiene un promedio de 71.8 µm, el grupo vehículo de 71.9 µm y el grupo VE tiene un promedio de 72.2 µm. Los grupos administrados con capsaicina (VE/Caps 1 nM y

VE/Caps 10 nM) muestran un aumento en el grosor del miometrio a comparación con los otros. El grupo VE/Caps 1 nM tiene un grosor promedio de 91.5  $\mu\text{m}$  y el grupo VE/Caps 10 nM de 86.4  $\mu\text{m}$ . Estadísticamente, el grupo VE/Caps 1 nM fue el que mostró un mayor aumento en el grosor del miometrio.

En la figura 29 A-E se observan microfotografías representativas de la capa del miometrio de cada uno de los grupos de trabajo. Podemos observar que todos los grupos presentan una morfología celular similar, mostrando células musculares.

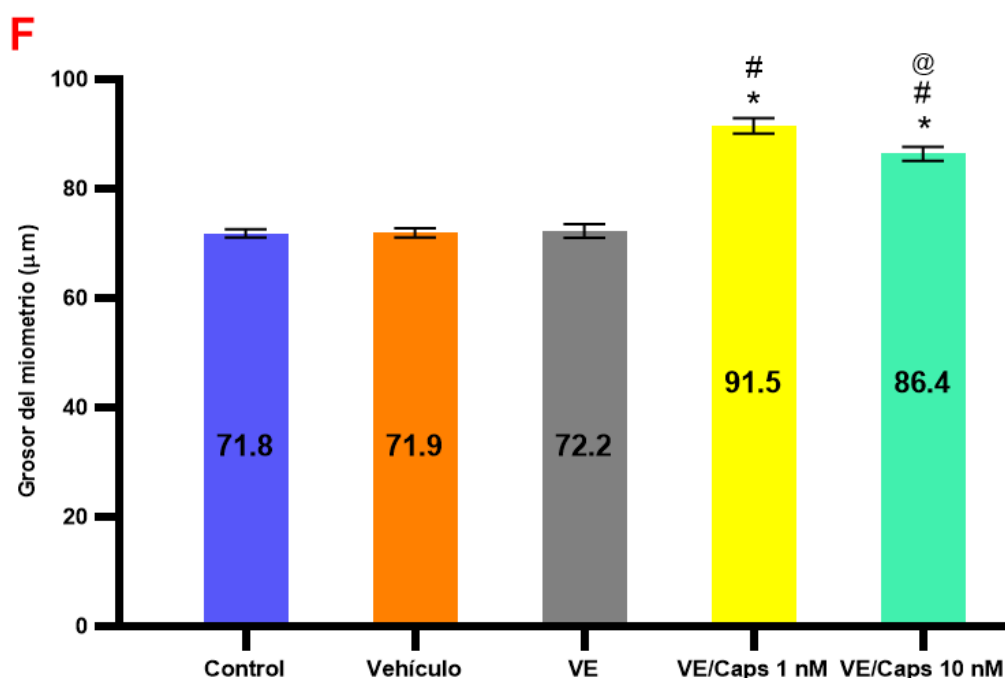
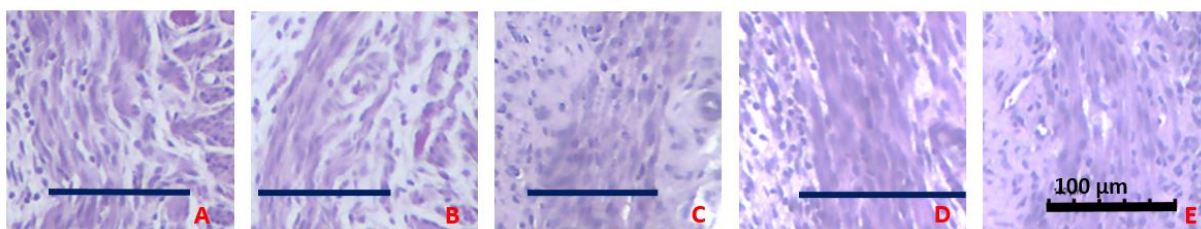


Figura 29. Grosor del miometrio. A-E Microfotografías representativas de la morfología del miometrio a 10X. A- control, B- vehículo, C- VE, D- VE/Caps 1 nM, E- VE/Caps 10 nM. En líneas azules se marca el miometrio. Barra de escala 100  $\mu\text{m}$ . F Gráfica del promedio del grosor del miometrio de los grupos de trabajo  $\pm\text{EEM}$ . Se indica un aumento en el grosor del miometrio en los grupos VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM en comparación con el grupo vehículo. Se indica un aumento en el grosor del miometrio en los grupos VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM en comparación con el grupo VE. Se indica una disminución en el grosor del miometrio en el grupo VE/Caps 10 nM en comparación con el grupo VE/Caps 1 nM. ANOVA post Tukey  $p \leq 0.05$  \* vs grupo vehículo. # vs grupo VE. @ vs grupo VE/Caps 1 nM.

#### **6.3.2.4 Evaluación morfológica del perimetrio**

En la figura 30 F podemos observar el grosor promedio del perimetrio de cada uno de los grupos de trabajo. El promedio del grupo control fue de 76.3  $\mu\text{m}$ . El promedio del grupo vehículo fue de 71.9  $\mu\text{m}$ . El grupo VE mostró una disminución en el grosor del perimetrio en comparación con el grupo vehículo con un grosor de 48.4  $\mu\text{m}$ . Los grupos administrados con capsaicina (VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM) mostraron un aumento en el grosor del perimetrio en comparación con el grupo VE aunque no llegó a ser estadísticamente igual al grupo vehículo. El grupo VE/Caps 1 nM tuvo un grosor promedio de 62.6  $\mu\text{m}$  y el grupo VE/Caps 10 nM de 54.0  $\mu\text{m}$ . Estadísticamente, el grupo VE/Caps 1 nM mostró un mayor aumento en el grosor del perimetrio a comparación al grupo VE/Caps 10 nM.

En la figura 30 A-E se observan microfotografías representativas del perimetrio de cada uno de los grupos de trabajo. Podemos observar que hay una disminución en la celularidad en el perimetrio del grupo VE, dato que corresponde con la disminución del grosor de la capa. Los grupos administrados con capsaicina muestran un aumento en la celularidad del perimetrio, correlacionando con el aumento en el grosor.

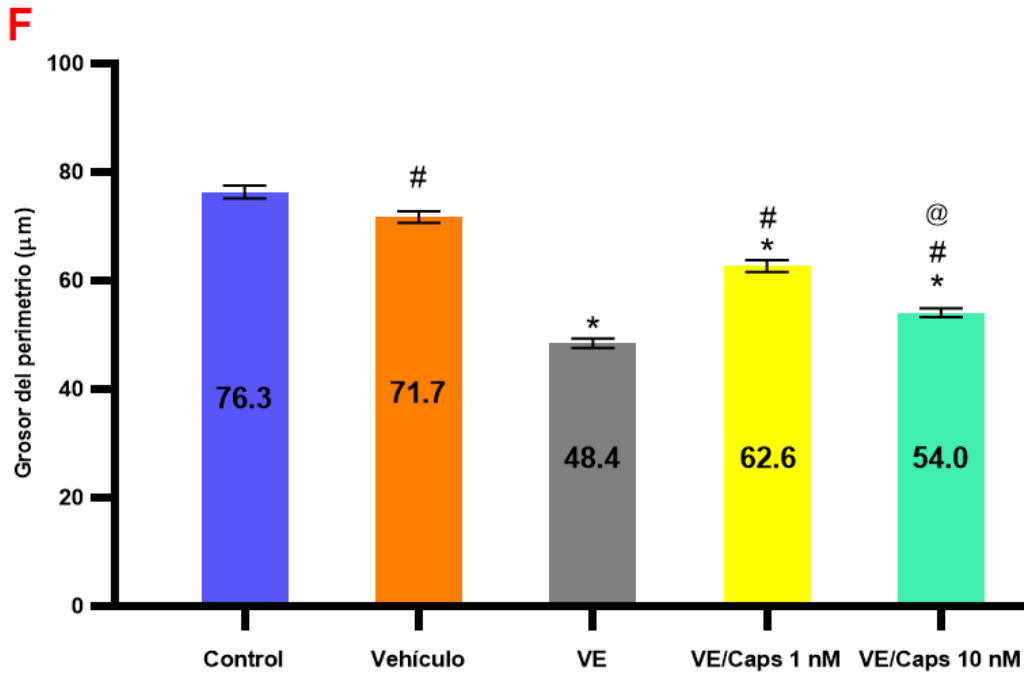
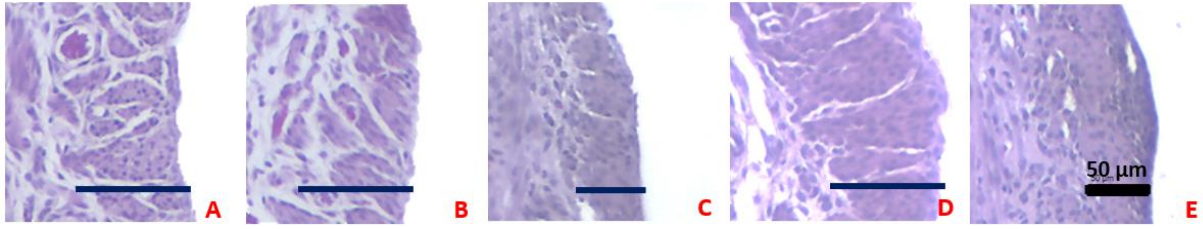


Figura 30. Grosor del perimetrio. A-E Microfotografías representativas de la morfología del perimetrio a 10X. A- control, B- vehículo, C- VE, D- VE/Caps 1 nM, E- VE/Caps 10 nM. En líneas azules se marca el perimetrio. Barra de escala 50 µm. F Gráfica del promedio del grosor del perimetrio de los grupos de trabajo  $\pm$ EEM. Se indica una disminución en el grosor del perimetrio del grupo VE en comparación con el grupo vehículo. Se indica un aumento en el grosor del perimetrio en los grupos vehículo, VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM en comparación con el grupo VE. Se indica una disminución en el grosor del perimetrio en el grupo VE/Caps 10 nM en comparación con el grupo VE/Caps 1 nM. ANOVA post Tukey  $p \leq 0.05$  \* vs grupo vehículo. # vs grupo VE. @ vs grupo VE/Caps 1 nM.

### **6.3.2.5 *Conteo y evaluación morfológica de glándulas endometriales***

En la figura 31 F se observa el promedio del número de glándulas endometriales de cada grupo de trabajo. El grupo control y el grupo vehículo tuvieron en promedio 23.2 y 27.0 glándulas respectivamente. El grupo VE tuvo una menor cantidad de glándulas endometriales a comparación con los demás grupos, teniendo en promedio 7.2 glándulas. Los grupos administrados con capsaicina (VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM) muestran un aumento en el número de glándulas endometriales en comparación con el grupo VE, teniendo en promedio 13.6 y 13.2 respectivamente. En las microfotografías (figura 31 A-E) se observa la morfología de las glándulas endometriales de los grupos de trabajo. Se puede observar que en el grupo VE las glándulas presentaron un mayor tamaño y forma diferente a las del grupo control y vehículo. Las glándulas de los grupos administrados con capsaicina muestran una reducción en el tamaño y forma irregular presentada en el grupo VE, mostrando un patrón más similar a los grupos control y vehículo.

En la figura 32 se observa un panel de microfotografías representativas del útero en cada grupo de trabajo. Se puede observar que a pesar de que el grupo VE tuvo un menor número de glándulas, estas eran muy grandes a comparación con las del grupo control y vehículo. Las glándulas del grupo VE cubren mayor superficie del endometrio y su morfología es aberrante. En cambio, los grupos administrados con capsaicina muestran un aumento en el número de glándulas, siendo estas de un tamaño mediano y una morfología más parecida a los grupos control y vehículo.

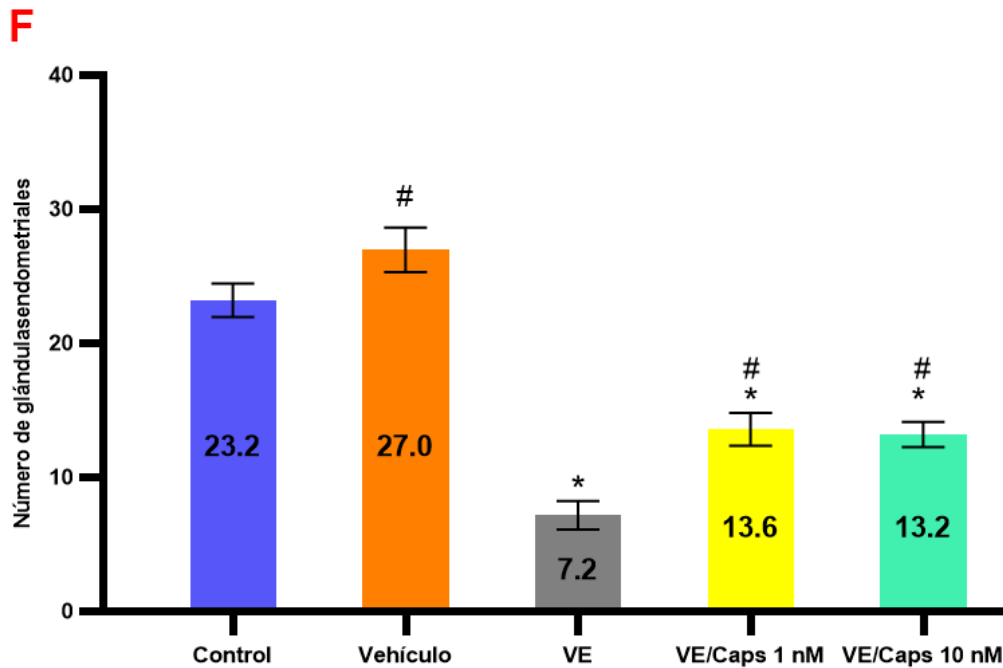
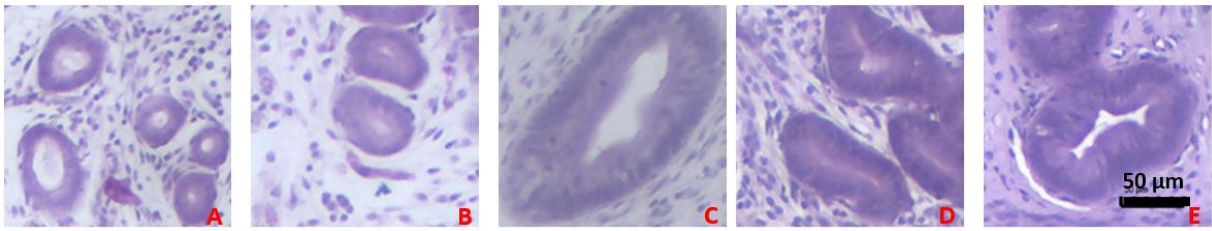


Figura 31. Conteo de glándulas endometriales. A-E Microfotografías representativas de la morfología de las glándulas endometriales a 10X. A- control, B- vehículo, C- VE, D- VE/Caps 1 nM, E- VE/Caps 10 nM. Barra de escala 50 µm. F Gráfica del promedio del número de glándulas endometriales en los grupos de trabajo  $\pm$ EEM. Se indica una disminución en el número de glándulas endometriales en el grupo VE en comparación con el grupo vehículo. Se indica un aumento en el número de glándulas endometriales de los grupos VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM en comparación con el grupo VE. ANOVA post Tukey  $p \leq 0.05$  \* vs grupo vehículo # vs grupo VE.

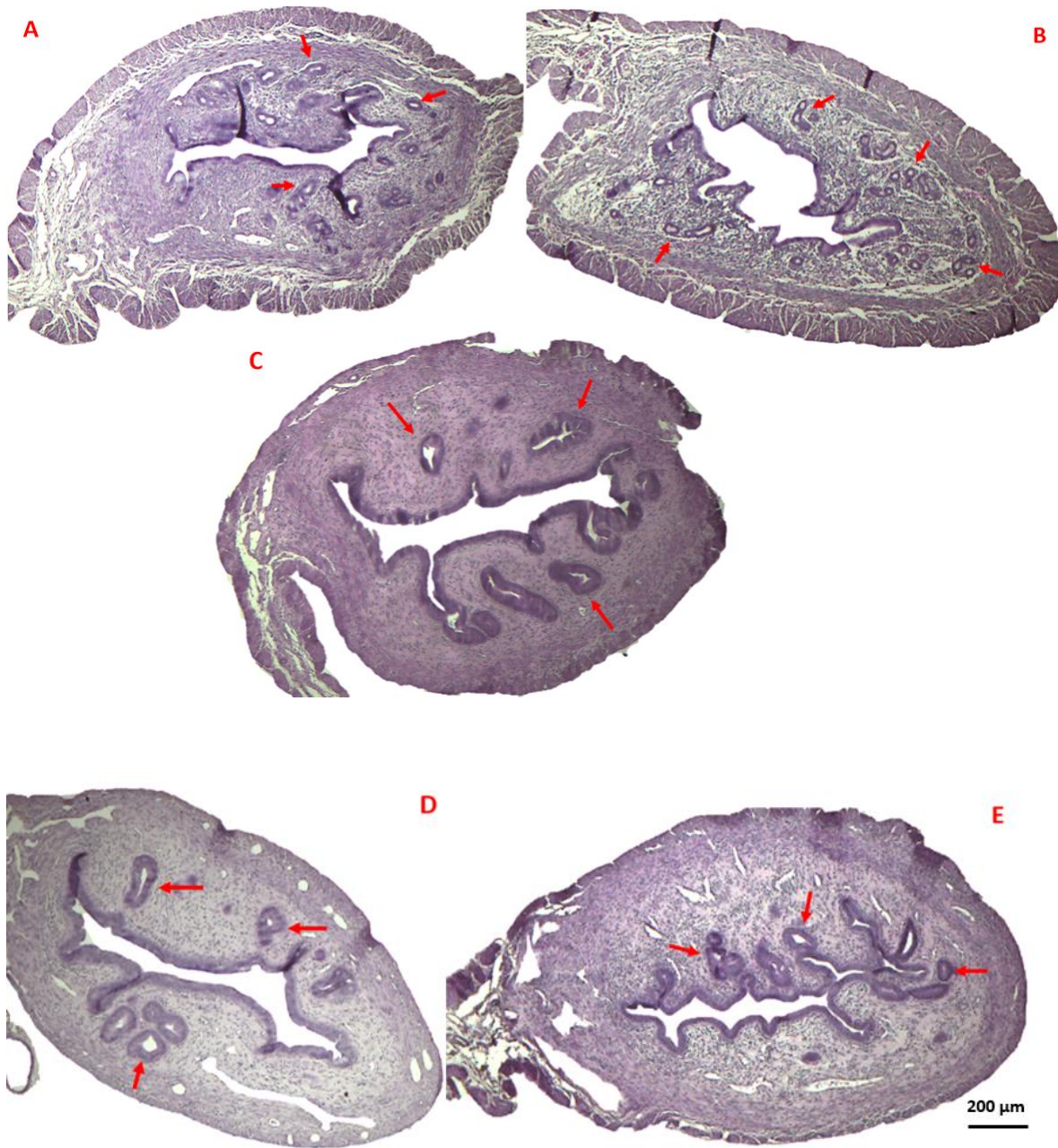


Figura 32. Microfotografías representativas de los úteros de cada grupo de trabajo. Cortes teñidos con H&E a 4X. Barra de escala: 200 µm. En flechas rojas se señalan las glándulas endometriales. A- control B- vehículo C- VE D- VE/Caps 1 nM E- VE/Caps 10 nM.

### 6.3 Determinación del receptor TRPV1 en el útero

A continuación, se describen los resultados de la semicuantificación del receptor TRPV1 en las capas uterinas por medio de la técnica de inmunohistoquímica de peroxidasa. El porcentaje de área teñida (coloración café) representa la presencia del receptor TRPV1 en el útero.

#### 6.3.1 Determinación del receptor TRPV1 en el perimetrio

En la figura 33 F se observa el promedio del porcentaje de área teñida del receptor TRPV1 en el perimetrio de cada uno de los grupos de trabajo. Los grupos control, vehículo y VE tuvieron en promedio 23.6%, 25.9% y 25.6% respectivamente. Los grupos administrados con capsaicina (VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM) muestran un aumento en el porcentaje de área teñida en comparación con el grupo VE y vehículo, teniendo en promedio 32.1% y 33.4% respectivamente. En las microfotografías (figura 33 A-E) podemos observar la presencia del receptor TRPV1 en el perimetrio (línea roja), teniendo una mayor intensidad en los grupos administrados con capsaicina.

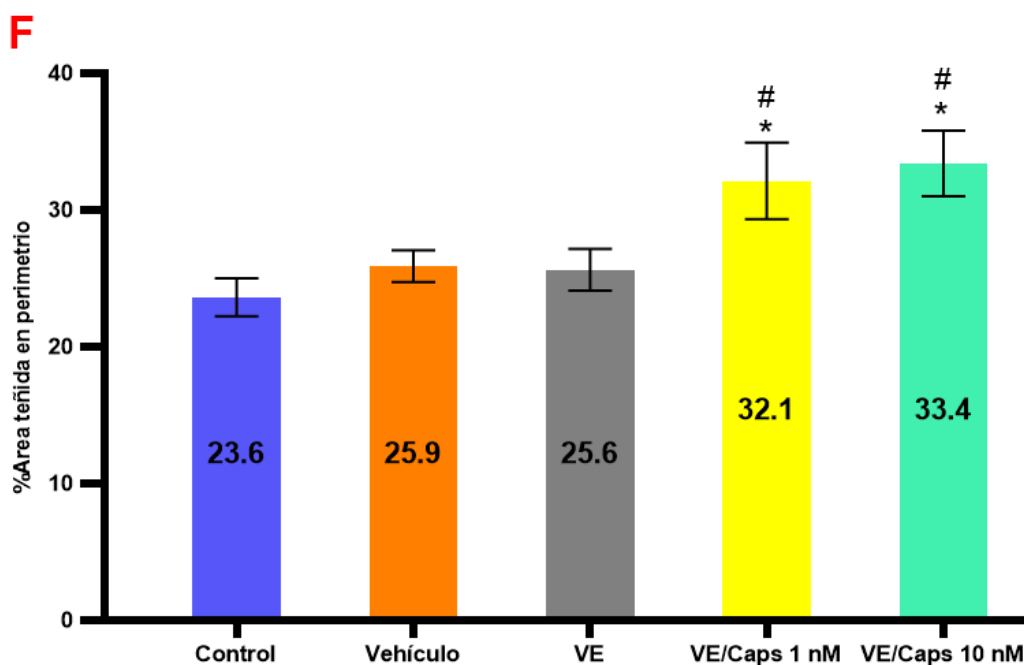
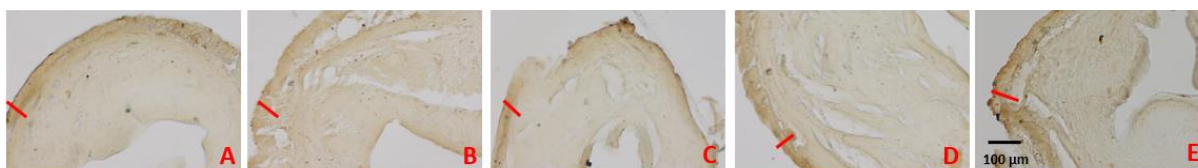


Figura 33. Determinación del receptor TRPV1 en el perimetrio. A-E Microfotografías representativas de la técnica de inmunohistoquímica para el receptor TRPV1 en el perimetrio a 20X. A- control, B- vehículo, C- VE, D- VE/Caps 1 nM, E- VE/Caps 10 nM. Barra de escala 100 µm. F Gráfica del promedio de la semicuantificación por densitometría del receptor TRPV1 en el perimetrio en los grupos de trabajo  $\pm$ EEM. ANOVA post Tukey  $p < 0.05$  \* vs grupo vehículo # vs grupo VE.

### 6.3.2 Determinación del receptor TRPV1 en el miometrio

En la figura 34 F se observa el promedio del porcentaje de área teñida del receptor TRPV1 en el miometrio de cada uno de los grupos de trabajo. Los grupos control y vehículo tuvieron en promedio 8.6% y 11.6% respectivamente. El grupo VE mostró una disminución en el porcentaje de área teniendo en promedio 7.4% en comparación con el grupo vehículo. Los grupos administrados con capsaicina (VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM) muestran una disminución aún mayor en el porcentaje de área teñida en comparación con el grupo VE y vehículo, teniendo en promedio 4.1% y 3.3% respectivamente. En las microfotografías (figura 34 A-E) podemos observar la presencia del receptor TRPV1 en el miometrio (línea roja), teniendo una mayor intensidad en los grupos control y vehículo.

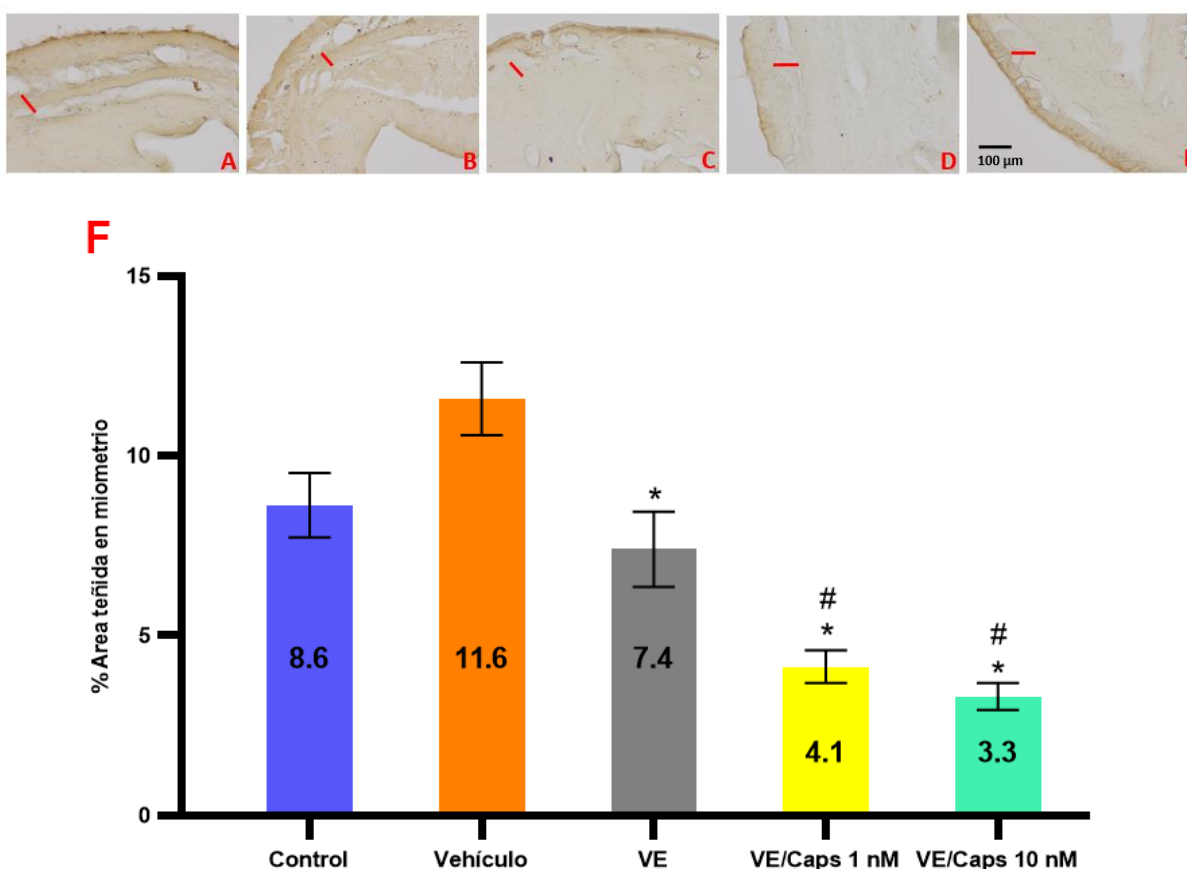


Figura 34. Determinación del receptor TRPV1 en el miometrio. A-E Microfotografías representativas de la técnica de inmunohistoquímica para el receptor TRPV1 en el miometrio a 20X. A- control, B- vehículo, C- VE, D- VE/Caps 1 nM, E- VE/Caps 10 nM. Barra de escala 100  $\mu$ m. F Gráfica del promedio de la semicuantificación por densitometría del receptor TRPV1 en el miometrio en los grupos de trabajo  $\pm$ EEM. ANOVA post Tukey  $p \leq 0.05$  \* vs grupo vehículo # vs grupo VE.

### 6.3.3 Determinación del receptor TRPV1 en el endometrio

En la figura 35 F se observa el promedio del porcentaje de área teñida del receptor TRPV1 en el endometrio de cada uno de los grupos de trabajo. Los grupos control y vehículo tuvieron un promedio de 7.2% y 8.6% respectivamente. El grupo VE mostró una disminución en el porcentaje de área teñida en comparación al grupo vehículo teniendo un promedio de 2.1%. Los grupos administrados con capsaicina (VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM) muestran un aumento en el porcentaje de área teñida en comparación con el grupo VE teniendo en promedio 6.4% y 5.6% respectivamente, aunque sigue siendo menor al del grupo vehículo. En las microfotografías (figura 35 A-E) podemos observar la presencia del receptor TRPV1 en el endometrio (línea roja), teniendo una mayor intensidad en todos los grupos a excepción del grupo VE.

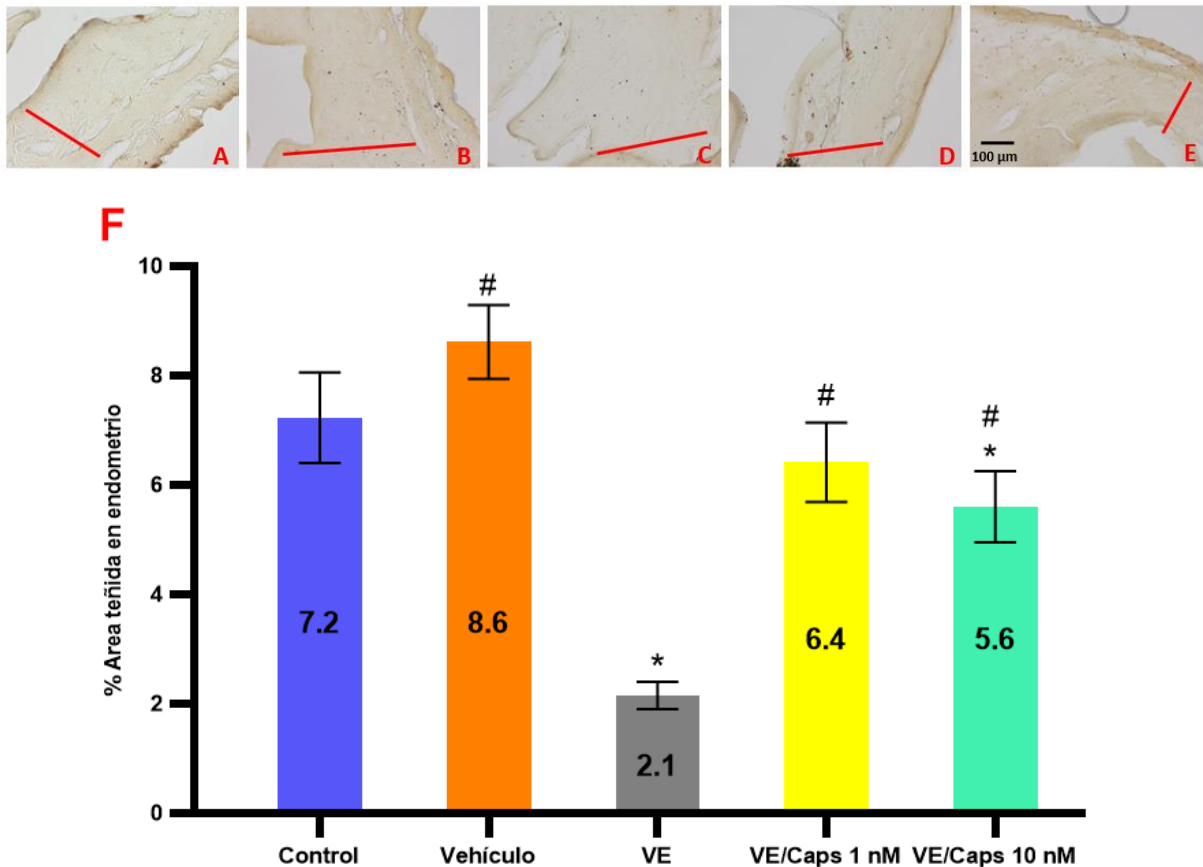


Figura 35. Determinación del receptor TRPV1 en el endometrio. A-E Microfotografías representativas de la técnica de inmunohistoquímica para el receptor TRPV1 en el endometrio a 20X. A- control, B- vehículo, C- VE, D- VE/Caps 1 nM, E- VE/Caps 10 nM. Barra de escala 100  $\mu$ m. F Gráfica del promedio de la semicuantificación por densitometría del receptor TRPV1 en el endometrio en los grupos de trabajo  $\pm$ EEM. ANOVA post Tukey  $p < 0.05$  \* vs grupo vehículo # vs grupo VE.

### 6.3.4 Determinación del receptor TRPV1 en el epitelio luminal

En la figura 36 F se observa el promedio del porcentaje de área teñida del receptor TRPV1 en el epitelio luminal de cada uno de los grupos de trabajo. Los grupos control y vehículo tuvieron en promedio 26.3% y 27.8% respectivamente. El grupo VE mostró una disminución en el porcentaje de área en comparación al grupo vehículo teniendo un promedio de 16.6%. Los grupos administrados con capsaicina (VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM) muestran un aumento en el porcentaje de área en comparación con el grupo VE teniendo en promedio 23.9% y 27.1% respectivamente. En las microfotografías (figura 36 A-E) podemos observar la presencia del receptor TRPV1 en el epitelio luminal (línea roja), teniendo una mayor intensidad en todos los grupos a excepción del grupo VE.

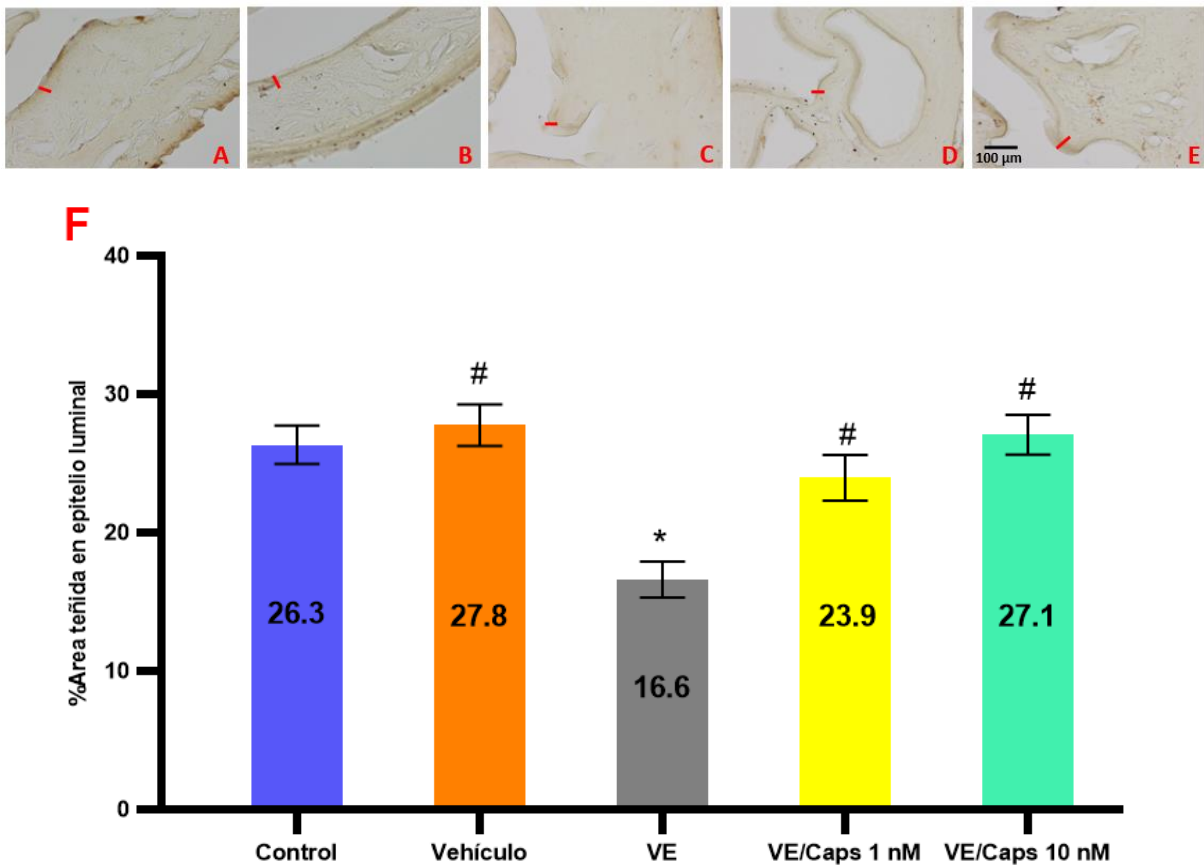


Figura 36. Determinación del receptor TRPV1 en el epitelio luminal. A-E Microfotografías representativas de la técnica de inmunohistoquímica para el receptor TRPV1 en el epitelio luminal a 20X. A- control, B- vehículo, C- VE, D- VE/Caps 1 nM, E- VE/Caps 10 nM. Barra de escala 100  $\mu$ m. F Gráfica del promedio de la semicuantificación por densitometría del receptor TRPV1 en el epitelio ciliar en los grupos de trabajo  $\pm$ EEM. ANOVA post Tukey  $p \leq 0.05$  \* vs grupo vehículo # vs grupo VE.

Por último, en la figura 37 se presenta un panel de microfotografías representativas de la determinación del receptor TRPV1 por la técnica de inmunohistoquímica en cada capa uterina con un mayor aumento para observar mejor la marca (coloración café). De manera general, se observa que el receptor TRPV1 tiene mayor presencia en la capa del perimetrio y epitelio luminal (23-26% de área teñida) de manera natural (grupo control), mientras que, las capas con menor expresión del receptor son las del miometrio y endometrio (7-8% del área teñida). En el modelo de SOP (VE) se observó una disminución en la presencia del receptor TRPV1 en el miometrio, endometrio y epitelio luminal. Las administraciones de capsaicina (VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM) aumentaron la presencia del receptor TRPV1 en el perimetrio, endometrio y epitelio luminal a comparación con el grupo VE.

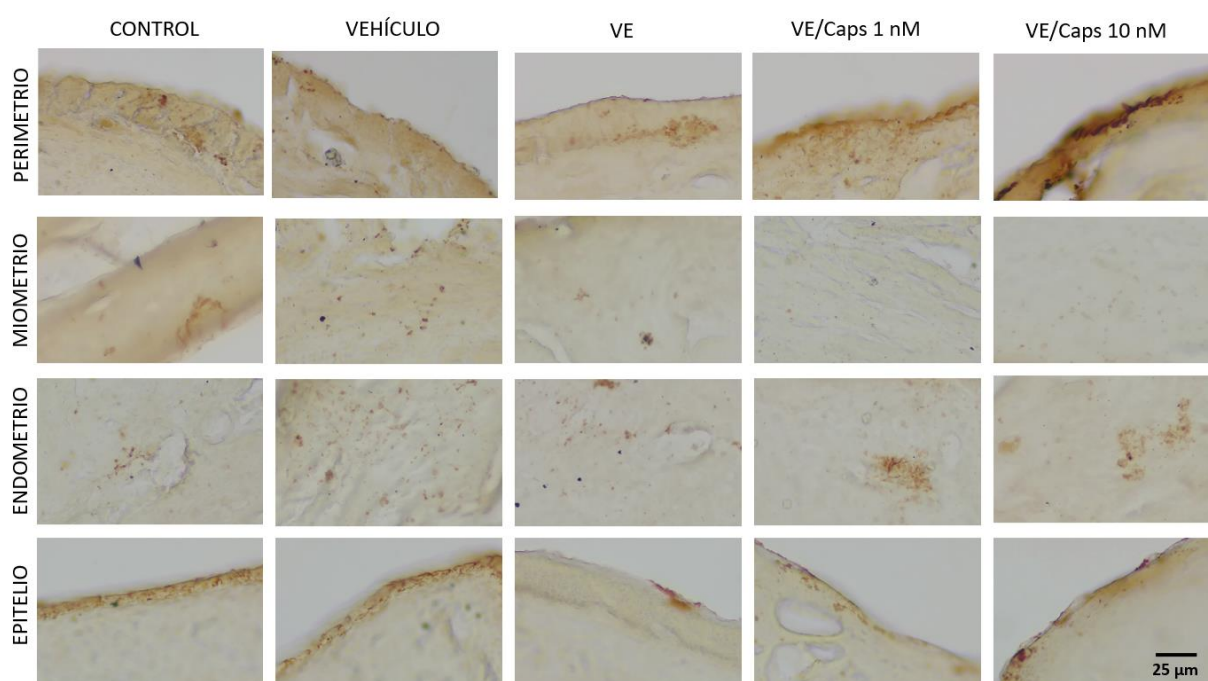


Figura 37. Panel de microfotografías de la determinación por inmunohistoquímica de peroxidasa del receptor TRPV1 en las capas uterinas. Barra de escala: 25 µm.

## 7. Discusión de resultados

### 7.1 Comparación entre el docking molecular TRPV1-Capsaicina y TRPV1-Capsaicina con membrana endotelial

Los resultados del *docking* molecular entre el receptor TRPV1 y la capsaicina mostraron 9 sitios de unión en el receptor para capsaicina (sección 6.1.1). De los 9 sitios encontrados, 4 se encontraron en la zona transmembranal, 1 en la zona del poro catiónico y 4 en la zona N-terminal intracelular. Los sitios con mejor energía de unión fueron los sitios transmembranales. La capsaicina es una molécula lipofílica, por lo que su afinidad es por la zona transmembranal, rica en aminoácidos hidrófobos (por ejemplo Tyr, Phe, Met, Leu, Trp, Ala) incrustados en la membrana celular (Abdel-Salam, 2014). Por esta razón, en la zona transmembranal se observan interacciones con el anillo aromático de la capsaicina. El hecho de encontrar una gran cantidad de sitios de unión y en diferentes zonas explicaría los diferentes efectos de la capsaicina de acuerdo con la concentración utilizada (bajas concentraciones proliferación celular y altas concentraciones muerte celular) (Alatríste et al., 2013; Li et al., 2021). Con estos resultados preliminares, podríamos proponer que, a bajas concentraciones, la molécula de capsaicina se une primero a la zona transmembranal, activando el receptor TRPV1 y promoviendo un efecto estimulante sobre la célula; al aumentar la concentración de capsaicina se empiezan a saturar los demás sitios en orden de afinidad (primero el sitio del poro catiónico y después la zona intracelular), y con ello se activan diferentes vías en el receptor TRPV1 lo que provocaría un efecto diferente a nivel biológico como lo es la muerte celular.

Para poder replicar las condiciones *in vivo* de la interacción entre el receptor TRPV1 y capsaicina, añadimos un modelo de membrana endotelial. Al ser este el tipo de membrana que se encuentra en las células uterinas, esperamos condiciones de interacción muy similares a las de nuestro modelo experimental. Cabe resaltar que este es el primer trabajo donde se realiza un *docking* entre el receptor TRPV1 en forma tetramérica completa y la capsaicina en un modelo de membrana endotelial.

Los resultados del *docking* entre el receptor TRPV1 y capsaicina con membrana endotelial fueron diferentes comparados con el *docking* sin membrana (Tabla 4). Se encontraron 5 sitios de interacción (a diferencia de los 9 sitios en el *docking* sin membrana). De los 5 sitios, 4 se encontraron en la zona transmembranal y 1 en el sitio del poro catiónico. Además, estos sitios tienen mejor energía de interacción que los sitios encontrados en el *docking* sin membrana. Las energías de interacción pasaron de -5 y -7 Kcal/mol en el *docking* sin membrana a -8 Kcal/mol en el *docking* con membrana. Al ser las energías de interacción más negativas, esto demuestra que los sitios con membrana endotelial tienen mayor afinidad por la capsaicina. Como mencionamos anteriormente, la capsaicina es una molécula lipofílica con alta afinidad por moléculas hidrófobas. La presencia de moléculas de fosfolípidos (como fosfocolina) y colesterol en la membrana celular podrían estar interaccionando directamente con la capsaicina al igual que los aminoácidos hidrófobos, mejorando así la afinidad de los sitios. Esto se ha demostrado en estudios de dinámica molecular donde se observa que la interacción de la capsaicina y la anandamida con el ambiente membranal juegan un papel clave en mediar la unión ligando-receptor en la zona transmembranal (Hanson et al., 2015; Muller et al., 2020). El sitio del poro catiónico también mostró una mejor afinidad que en el *docking* sin membrana. Esto se debe a que el sitio encontrado en esta zona es diferente. El sitio del *docking*

sin membrana está conformado por aminoácidos de los dominios S5 al S6 de 3 subunidades (A, B y C); en cambio, el sitio del *docking* con membrana está conformado por aminoácidos de los dominios S6 y TRP de las 4 subunidades. El sitio del poro catiónico del *docking* con membrana está compuesto por mayor cantidad de aminoácidos hidrófobos y más adentro del poro del receptor, por lo que, esta zona es más afín por la capsaicina. En el *docking* con membrana epitelial no se encontraron sitios intracelulares para la capsaicina. No se ha reportado en la literatura sitios de unión en la zona transmembranal, solamente su incrustación en los dominios transmembranales (Zheng y Auerbach, 2011). Por lo tanto, nuestros resultados al igual que la literatura muestran que no es posible que la capsaicina atraviese la membrana celular.

Docking sin membrana			Docking con membrana		
Zona	Número de sitio por zona	Energía de interacción (Kcal/mol)	Zona	Número de sitio por zona	Energía de interacción (Kcal/mol)
Transmembranal	1	-7.806	Transmembranal	1	-8.092
	2	-5.241		2	-8.097
	3	-5.474		3	-7.078
	4	-5.566		4	-7.598
Poro catiónico	1	-5.559	Poro catiónico	1	-8.083
Intracelular	1	-2.617			
	2	-3.773			
	3	-2.588			
	4	-3.766			

Tabla 4. Comparación de las energías de interacción de los sitios de unión a capsaicina en el receptor TRPV1 del docking molecular con y sin membrana epitelial.

Estudios anteriores de *docking* molecular entre el receptor TRPV1 y capsaicina han sido realizados utilizando a la proteína en su forma monomérica o sin las regiones N y C- terminal intracelular (Yang y Zheng, 2017). Por esta razón, solo se había encontrado 1 sitio canónico para la capsaicina en el receptor TRPV1. Utilizar una estructura tetramérica del receptor TRPV1 nos permite acercarnos más a las condiciones *in vivo* de interacción entre la capsaicina y el receptor, ya que esta es su forma biológica funcional (Smith et al., 2009). En este trabajo, al utilizar la forma tetramérica encontramos 4 sitios transmembranales (uno en cada monómero del receptor TRPV1). Como se pudo observar en los resultados obtenidos, los 4 sitios transmembranales muestran diferente conformación de aminoácidos, esto es debido a que la tetramerización del receptor cambia la conformación espacial de las subunidades. Además, al realizar el *docking* con la estructura tetramérica, encontramos otro sitio en la zona del poro catiónico. Este sitio está conformado por aminoácidos de las 4 subunidades principalmente del dominio TRP. El dominio TRP sirve para poder realizar la tetramerización del receptor (García-Sanz et al., 2004). Debido a que este sitio sólo se forma en un tetrámero del receptor TRPV1 es que no había sido reportado con anterioridad.

Debido a la diferencia de los sitios de unión encontrados para capsaicina en el receptor TRPV1 en el *docking* con membrana, es necesario plantear otra explicación sobre los efectos de la capsaicina dependiendo su concentración utilizada. De acuerdo con la literatura, se ha reportado que la capsaicina tiene primero contacto en la zona del poro catiónico del receptor TRPV1, después, pasa a su sitio de unión en la zona transmembranal del receptor, donde al colocarse cambia la conformación espacial del asa S4-S5, permitiendo así, la apertura del poro catiónico para el paso de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula (Vu et al., 2020). En la zona del poro catiónico, se encuentran dos aminoácidos importantes en la apertura del canal: Isoleucina 681 y Metionina 684 (Nadezhdin et al., 2021). Estos aminoácidos forman parte del sitio de unión a capsaicina encontrado. Por estos antecedentes, proponemos que, a bajas concentraciones de capsaicina, esta se une a los sitios transmembranales del receptor abriendo el poro catiónico permitiendo así el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula, promoviendo un efecto estimulante sobre la célula, y que, al aumentar la concentración, se saturan todos los sitios transmembranales y el del poro catiónico, aumentando el tamaño de apertura del poro haciendo que aumente el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular provocando muerte celular.

De acuerdo con nuestros resultados, la constante de disociación ( $K_D$ ) de la capsaicina en el receptor TRPV1 se encuentra en el orden micromolar ( $\mu\text{M}$ ) (2-10  $\mu\text{M}$ ), resultado que concuerda con la  $K_D$  reportada en otros trabajos para capsaicina (Ross et al., 2001). Al ser la  $K_D$  la concentración del ligando a la que se ocupan la mitad de los sitios de unión específicos, nosotros tomamos la decisión de probar concentraciones en el orden nanomolar (nM), para estimular levemente al receptor y no saturar los sitios para capsaicina. De acuerdo con estudios de Alatraste et al., 2013 las concentraciones en orden de nM estimulan la proliferación celular y en orden  $\mu\text{M}$  causan denervación.

Siguiendo esta hipótesis, en nuestro modelo animal utilizamos las concentraciones de 1 y 10 nM de capsaicina aplicadas en las ratonas para observar el efecto de estas concentraciones sobre el desarrollo celular uterino durante el SOP. Al ser ambas bajas concentraciones en relación con la  $K_D$ , nosotros esperamos tres posibilidades: 1) Ningún efecto a 1 nM y efecto modulador sobre el desarrollo celular a 10 nM o 2) Efecto modulador sobre el desarrollo celular a 1 y 10 nM, siendo más efectiva la concentración de 1 nM o 3) Efecto modulador sobre el desarrollo celular a 1 y 10 nM, siendo más efectiva la concentración de 10 nM.

## **7.2 Evaluación del valerato de estradiol como modelo de SOP en animales**

El modelo experimental utilizado en este trabajo fue ratonas CD1 administradas con valerato de estradiol como inductor del SOP. Como medidas de seguimiento de las ratonas se llevó a cabo la determinación de la primera apertura vaginal, un registro de peso diario y el seguimiento del ciclo estral.

La primera apertura vaginal de las ratonas ocurre en promedio a las 4 semanas de vida (P28) (Ahima, 1997; Cruz et al., 2012). En nuestros resultados, todos los grupos de trabajo presentaron en promedio la PAV entre los días 26 y 27 sin mostrar ninguna diferencia significativa. De acuerdo con el trabajo de Cruz et al., 2012 se ha demostrado que una administración neonatal-infantil de VE en roedores adelanta la PAV. La administración de VE aumenta los niveles de estradiol, el cual regula los cambios ocurridos durante la pubertad como la aparición de la PAV. Si la administración se

realiza en días cercanos al inicio de la pubertad, no se adelanta la PAV (Cruz et al., 2012). Este dato lo constatamos al observar que la administración de VE en el P24 no adelantó la PAV de las ratonas administradas.

En el peso de los animales no se observó ningún cambio importante en cuanto a la administración de VE y capsaicina. Después de la administración de VE se observó una ligera tendencia de disminución en el peso de las ratonas, pero poco a poco se fue estabilizando a valores similares al control. En el trabajo de Peyghambari et al., 2014 se usó el modelo de VE en ratonas donde también se observó una tendencia de disminución con una recuperación final sin cambios importantes en el peso de los animales. El modelo de VE no presenta resistencia a insulina, responsable del aumento en el depósito de grasa del área abdominal, por lo cual, este modelo no presenta un aumento en el peso de los animales (Teede et al., 2010). Después de la administración de capsaicina tampoco se observaron modificaciones en el peso corporal de las ratonas. Estudios previos han demostrado que la capsaicina no modifica el peso corporal de los animales tras su administración subcutánea (Alatríste et al., 2013).

En el seguimiento del ciclo estral observamos que la administración de VE hizo que las ratonas fueran acíclicas, ya que, la mayoría mostraron la fase de estro todo el tiempo de estudio. Algunas ratonas mostraron otras fases del ciclo los primeros días y con el tiempo mostraron un patrón estro-metaestro. De acuerdo con Brawer et al., 1986 después de la administración de VE en los primeros 15-20 días, dos terceras partes de las ratas administradas muestran un patrón de diestro y proestro, y después de 20 días muestran un estro permanente. Nuestros resultados fueron similares ya que las ratonas con un comportamiento similar en los primeros días posteriores a la administración evolucionaron a un estro casi constante. A pesar de que algunas ratonas presentaron pocos días de metaestro no llegaron a ser cíclicas. El modelo de VE desregula el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (H-H-O) aumentando la liberación de LH y disminuyendo la liberación de FSH (Rodríguez-Flores, 2011). La LH actúa sobre las células de la teca en los ovarios promoviendo la síntesis de testosterona (T) y la FSH sobre las células de la granulosa promoviendo la conversión de T en estradiol (E2), importante para la maduración del ovocito (Arechavaleta-Velasco et al., 2009). La falta de la acción de la FSH hace que no se complete el estadio de maduración del ovocito por lo cual no es liberado, no ocurre la ovulación y no hay ciclicidad. La administración de capsaicina no mejoró el estado acíclico de las ratonas. Las administraciones de capsaicina fueron solo cuatro en un período de 12 días (del P64 al P76) por lo que no fue una administración crónica. Por esta razón, se piensa que no fue estimulante suficiente para realizar algún cambio importante en el eje H-H-O para inducir la ovulación. De acuerdo con Alatríste et al., 2013 y Morán et al., 2005 el receptor TRPV1 participa en el desarrollo folicular ovárico, por lo que, a pesar de no inducir la ciclicidad en las ratonas no se podría descartar algún cambio en la maduración de los ovocitos. Para poder confirmar que la capsaicina no modificó el desarrollo folicular se necesitaría realizar un estudio histológico de los ovarios y cuantificar los diferentes estadios de los folículos.

### ***7.3 Evaluación del epitelio ciliar, endometrio y glándulas endometriales***

El útero es un órgano cuya regulación depende de las hormonas. Se ha observado en pacientes con SOP que los trastornos endocrinos presentados afectan la morfología y función endometrial, conllevando a una disminución en la fertilidad, implantación y embarazos exitosos (Lou

et al., 2017). Por esta razón, es para nosotros importante realizar un estudio enfocado en la celularidad uterina y sus probables moduladores.

En los resultados de este trabajo se observaron cambios uterinos en la evaluación morfológica con la tinción de Hematoxilina-Eosina. Se observó que el grupo VE (modelo de SOP) mostró un aumento en el grosor del epitelio luminal, un aumento en la celularidad del endometrio y presentó glándulas con morfología aberrante abarcando gran parte del endometrio (hiperplasia endometrial). Los modelos animales de SOP han reportado cambios importantes en el útero como lo es aumento del grosor y mitosis del epitelio luminal, crecimiento descontrolado de la capa del endometrio y presencia de hiperplasia endometrial con aumento de la densidad glandular. La hiperplasia endometrial se da por un aumento en el tamaño de las glándulas endometriales con forma atípica que aumentan la razón glándula/estroma (Mirabolghasemi, et al; 2017; Kuyucu et al., 2018; Virginia et al., 2020). A nivel celular, se han propuesto varios mecanismos que promueven los cambios morfológicos durante el SOP. Entre ellos se encuentran el aumento de la acción de andrógenos y estradiol a través de un aumento en la expresión de sus receptores (AR y ER) en el endometrio (Key et al., 1988; Villavicencio et al., 2006). Además de que los bajos niveles de progesterona debido a la falta de ciclos ovulatorios da como resultado un endometrio que permanece en un estado proliferativo (Savaris et al., 2011; Azziz et al., 2016). El aumento de la expresión de ER $\alpha$  en pacientes ovulatorias con SOP puede contribuir a una mayor falla de implantación y menores tasas de embarazo en mujeres con SOP (Gregory et al., 2002). Por estas razones, deducimos que los úteros de las ratonas del grupo VE no eran funcionales.

Los grupos administrados con capsaicina (VE/Caps 1 nM y VE/Caps 10 nM) mostraron una mejora en la calidad celular comparado con el grupo VE de acuerdo con la evaluación morfológica con la tinción Hematoxilina-Eosina. La capsaicina disminuyó la celularidad del epitelio ciliar mostrando una monocapa de células más ordenadas, disminuyó la celularidad del endometrio debido a que aumentó el grosor de la capa celular dando mayor espacio al estroma endometrial y, por último, disminuyó la hiperplasia endometrial, mostrando glándulas de tamaño más pequeño y con mejor morfología. La disminución de la hiperplasia del útero es un indicador de mejoría y preventivo de cáncer endometrial (Charalampakis et al., 2016). El endometrio, las glándulas endometriales y el epitelio ciliar tienen como propósito la implantación del óvulo fertilizado, la nutrición del embrión y el desarrollo de la placenta (Ross, 2008). Ya que los cambios morfológicos en el endometrio y epitelio luminal se han asociado a la falla en la implantación y embarazo durante el SOP, la mejora de la calidad celular por la administración de capsaicina puede asociarse a cambios positivos para la funcionalidad del útero.

En este trabajo se muestra por primera vez la semicuantificación por densitometría del receptor TRPV1 con la técnica de inmunohistoquímica en el útero de ratonas inducidas a un modelo de SOP. Hasta el momento solo había sido demostrada su expresión en el útero de humanos, ratas y cobayas (De Clercq et al., 2015; Pohóczyk et al., 2016; Alatraste et al., 2013). Los cambios morfológicos durante el SOP y la posterior administración con capsaicina en el endometrio (estroma y glándulas) y epitelio luminal de las ratonas correlacionan con los cambios encontrados en la semicuantificación del receptor TRPV1 con la técnica de inmunohistoquímica en endometrio y epitelio luminal. En el grupo VE, que fue el modelo de SOP, se observó una disminución significativa en la semicuantificación del receptor TRPV1 en el endometrio y epitelio luminal, mientras que, la administración de capsaicina 1 y 10 nM en las ratonas mostraron un aumento significativo en el

endometrio y epitelio luminal en comparación con el modelo de SOP. El agonismo de los receptores TRPV1 ha mostrado regular de manera positiva su expresión tal como encontramos en este trabajo en el endometrio y epitelio luminal (Pohóczy et al., 2016). A pesar de haber sido demostrada la expresión del receptor TRPV1 en células uterinas, no se ha demostrado su papel biológico en el órgano. De acuerdo con estudios del receptor TRPV1 en otros tejidos, se ha demostrado su papel en proliferación y diferenciación celular (Nilius et al, 2006; Vennekens et al, 2008; Lee et al, 2009; Bodó et al., 2005). Por los puntos expuestos, sugerimos que el receptor TRPV1 modula el desarrollo celular del endometrio y epitelio luminal, permitiendo una mejora en las anomalías celulares observadas en las ratonas inducidas a SOP con VE.

#### **7.4 Evaluación del miometrio**

La evaluación morfométrica con la tinción de Hematoxilina-Eosina no mostró modificaciones en cuanto al grosor y calidad celular del miometrio en el grupo VE. La capa del miometrio está compuesta por células musculares que dan flexibilidad al útero para poder realizar contracciones y estiramiento durante el proceso de embarazo y parto (Ross, 2008). No se han reportado cambios en la capa miometrial en modelos murinos de SOP con VE. En el estudio de Virginia et al., 2020 en un modelo murino de SOP con dehidroepiandrosterona (DHEA) mostró una disminución en la densidad nuclear del miometrio; demostrando que la acción de los andrógenos durante el SOP modifica la proliferación de las células lisas musculares del miometrio. De acuerdo con Leondhart et al., 2012 en pacientes con SOP se han demostrado cambios en el peristaltismo uterino sin cambios morfológicos en el miometrio. Además, en el trabajo de Sajadi et al., 2018 en ratas con SOP mostraron patrones de contracciones uterinas irregulares. Por estos antecedentes, sugerimos que hay cambios importantes a nivel miometrial que influyen en la funcionalidad de esta capa durante el SOP, sin embargo, son necesarios más estudios para poder deducir cuales son los cambios moleculares que conllevan a las alteraciones en la funcionalidad. De acuerdo con la evaluación morfométrica del miometrio con la tinción de Hematoxilina-Eosina, la administración de capsaicina 1 y 10 nM mostró un aumento en el grosor miometrial. Un aumento en el grosor del miometrio puede sugerir un aumento en la cantidad de fibras musculares. Un aumento en las fibras musculares podría relacionarse con mayor capacidad de estiramiento del útero, mejorando movimientos como el peristaltismo y tono de contracciones uterinas. Nuevamente, el agonismo del receptor TRPV1 con capsaicina 1 y 10 nM demostró un aumento en la proliferación celular del miometrio.

En cuanto a la semicuantificación del receptor TRPV1 con la técnica de inmunohistoquímica en el miometrio se observó que en el modelo de SOP hay una disminución significativa en la distribución del receptor TRPV1. La administración de capsaicina 1 y 10 nM mostraron una mayor disminución en el miometrio. La capa del miometrio recibe inervación sensorial con fibras positivas al receptor TRPV1. El receptor TRPV1 percibe procesos de estiramiento, presión y el estado de vascularización de órganos (Aguado, 2002). La administración de capsaicina se realizó en la zona dorsal entre las vértebras L4-L5. Esta zona contiene a los DRGs con fibras sensoriales positivas para el receptor TRPV1 que inervan directamente al útero (Chaban, 2008). Por lo que, el aumento en el grosor de la capa del miometrio puede deberse a la estimulación de los receptores TRPV1 presentes en las fibras sensoriales de la región administrada con capsaicina y no a la presencia del receptor TRPV1 en células del miometrio. La estimulación de las fibras sensoriales positivas al receptor TRPV1

pudo mejorar la señalización hacia SNC por medio de la liberación de neurotransmisores como SP, CGRP y glutamato y mejorar así de forma directa la proliferación celular del miometrio (Tominaga y Tominaga, 2005). Se ha demostrado también el aumento en la inervación con fibras positivas al receptor TRPV1 en patologías uterinas con endometriosis, por lo que, también sería útil estudiar la región de la médula espinal para semicuantificar al receptor TRPV1 en esta zona para conocer los cambios en la expresión del receptor durante el SOP (Nie et al., 2010; Newman et al., 2013; liu et al., 2012).

### ***7.5 Evaluación del perimetrio***

De acuerdo con nuestros resultados de la evaluación morfométrica del perimetrio con Hematoxilina-Eosina, el grupo VE mostró una disminución en el grosor y celularidad del perimetrio. El perimetrio es la capa más externa del útero y se encarga de proteger y dar soporte al órgano. Una disminución en el grosor del perimetrio indicaría una menor protección del útero, dejándolo expuesto a infecciones, diseminación de tumores, golpes, roces con otros órganos de la zona abdominal y menor sostén en caso de un embarazo (Pinto et al., 1966).

La administración de capsaicina 1 y 10 nM aumentó el grosor y la celularidad del perimetrio, lo cual sugiere una capa con mayor funcionalidad de protección y soporte al útero. El aumento en el grosor del perimetrio se correlaciona con el aumento en la presencia del receptor TRPV1 en esta capa. Nuevamente, se observa que el agonismo del receptor TRPV1 promueve al alza su misma expresión. A pesar de que el receptor TRPV1 no se encontró disminuido en el modelo de SOP es claro que el agonismo del receptor con capsaicina regula de manera positiva su expresión y activación, promoviendo la proliferación celular del perimetrio.

Como se mencionó anteriormente, los cambios morfológicos uterinos han sido asociados con la falla en la funcionalidad durante el SOP en humanos. No se han reportado alteraciones tanto en morfología como en función del perimetrio durante el SOP. De acuerdo con nuestros resultados, la disminución en el grosor del perimetrio podría asociarse con una falta de protección y sostén en un embarazo y contribuir a los abortos espontáneos que sufren las pacientes con SOP. En cambio, el aumento en el grosor del perimetrio debido a la administración de capsaicina podría ser un factor positivo en la funcionalidad uterina durante el embarazo.

### ***7.6 La capsaicina como modulador del desarrollo celular***

La capsaicina demostró ser un buen modulador del desarrollo celular uterino, mejorando la morfología celular aberrante del epitelio luminal y glándulas endometriales, así como aumentando el número de glándulas endometriales y el grosor de las capas uterinas miometrio y perimetrio. Estas mejoras en las capas celulares son indicadores de un útero más funcional comparado con el estado general del tejido en la patología del SOP en las ratonas. Por lo que, sugerimos que la capsaicina contribuye a devolver la funcionalidad del útero a través de una modulación de la proliferación celular alterada en el modelo de SOP.

El calcio es un regulador importante de procesos celulares como lo es la proliferación y diferenciación, por lo que, la activación de canales iónicos como los de la familia TRP puede modular

las concentraciones de calcio intracelular (Deliot et al., 2015). En pacientes con SOP varios estudios muestran una desregulación de los niveles de calcio, que contribuye al arresto folicular, resultando en disfunciones reproductivas y menstruales (Rashidi et al., 2009). Debido a estos antecedentes, sugerimos que la activación de los receptores TRPV1 con capsaicina modula la proliferación y diferenciación celular alterada durante el SOP inducido.

De acuerdo con Li et al., 2021 se ha demostrado que bajas concentraciones de capsaicina promueven la proliferación y diferenciación celular, mientras que, a altas concentraciones la detiene (Figura 35). La proliferación se ve favorecida a través de la fosforilación de vías como PI3K (fosfoinositol-3-cinasa), ERK1/2 (cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2), PKC (proteína cinasa C) y PLC (fosfolipasa C). También se ha observado que altas concentraciones de agonistas promueven la muerte celular a través de altos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, vías como la p53, p38 y aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por último, se observó que el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) transactiva al receptor TRPV1, incrementando el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, importante para mecanismos de angiogénesis como la activación de la calcio calmodulina cinasa II (CaMKII) y la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Walcher et al., 2018).

Estudios previos realizados en el laboratorio demostraron que la administración de bajas concentraciones de capsaicina (1 y 10 nM) promueven el desarrollo folicular de los ovarios y que altas concentraciones (30 mM) disminuye el desarrollo folicular (Alatraste et al., 2013). De acuerdo con nuestros resultados obtenidos en el análisis del *docking* molecular, sugerimos que bajas concentraciones de capsaicina permiten una apertura controlada del poro catiónico, permitiendo un flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que promueve la proliferación y diferenciación celular. En nuestro trabajo, con la administración de las concentraciones de 1 y 10 nM, encontramos una modulación de la proliferación celular en el útero, mostrando patrones de mejoría en la calidad celular durante el SOP. Nosotros proponemos que, a través de estimulación del receptor TRPV1 con capsaicina se promovieron las vías PI3K, ERK1/2, PKC y PLC, permitiendo una proliferación y diferenciación celular. Además, el agonismo del receptor TRPV1 con capsaicina a 1 y 10 nM promueve un aumento en la expresión de este. Sin embargo, se requiere seguir investigando la regulación del receptor TRPV1 y sus vías de señalización con la administración de capsaicina.

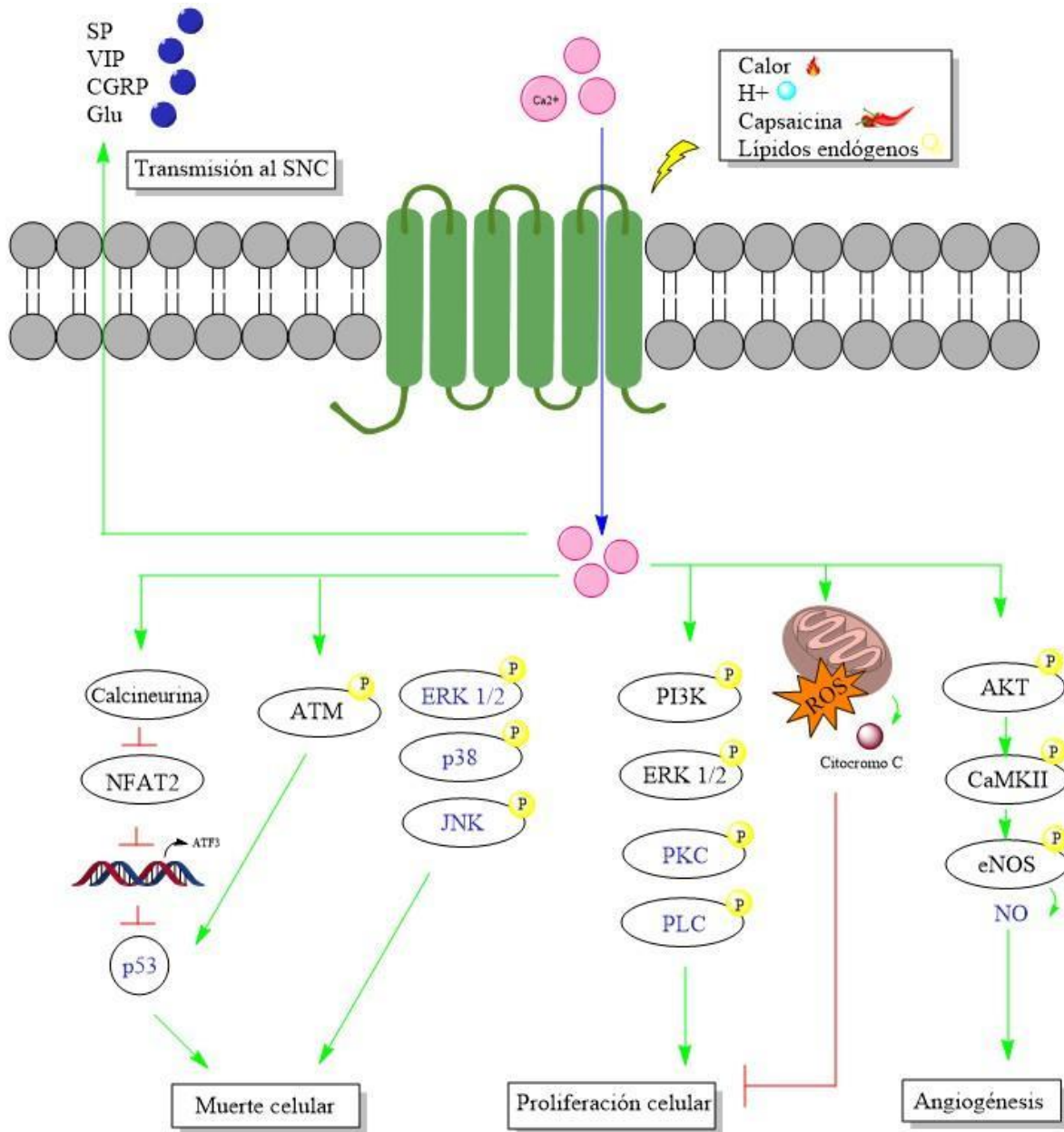


Fig. 35 Principales vías de señalización del receptor TRPV1 en procesos de proliferación, muerte celular y angiogénesis de células cancerosas, así como en la transmisión nociceptiva en las fibras sensoriales. SP: sustancia P. VIP: péptido intestinal vasoactivo. CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina. Glu: glutamato. SNC; sistema nervioso central. NFAT2: factor nuclear de células T activadas 2. ATF3: factor de transcripción dependiente de monofostato de adenosina cílico 3. ATM: ataxia telangiectasia mutado. ERK: cinasa regulada por señales extracelulares. JNK: cinasa c-Jun N-terminal. PI3K: fosfoinositol-3-cinasa. PKC: proteína cinasa C. PLC: fosfolipasa C. ROS: especies reactivas de oxígeno. AKT: proteína cinasa B. CaMKII: calcio calmodulina cinasa II. eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial. NO: óxido nítrico.

## **8. Conclusiones**

- 1.- El receptor TRPV1 cuenta con 5 sitios de unión a capsaicina, 4 sitios transmembranales y 1 sitio en el poro catiónico. Las interacciones de la membrana celular y la zona transmembranal del receptor son importantes para mejorar la afinidad de la capsaicina por el receptor.
- 2.- El hecho de encontrar varios sitios de unión a capsaicina demuestra la sensibilidad por interacciones moleculares del receptor de acuerdo con las concentraciones empleadas. La capsaicina en bajas concentraciones permite una apertura controlada del poro catiónico, permitiendo un flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que promueve la proliferación y diferenciación celular.
- 3.- El modelo de VE en ratonas CD1 mostró alteraciones morfológicas en el desarrollo celular uterino como la hiperplasia endometrial, aumento del grosor epitelial con aumento de celularidad aberrante y una disminución en el grosor del perimetrio. Este modelo también mostró alteraciones en la distribución del receptor TRPV1, ya que se encontró una disminución en el epitelio luminal, endometrio y miometrio.
- 4.- La capsaicina en concentraciones 1 y 10 nM demostró ser un buen modulador del desarrollo celular uterino, mejorando la morfología celular aberrante del epitelio luminal y de las glándulas endometriales, así como aumentando el número de glándulas endometriales y el grosor del endometrio, miometrio y perimetrio. Además, se observó un aumento en la semicuantificación del receptor TRPV1 en el epitelio luminal, en el endometrio y en el perimetrio. Estos factores indican que la capsaicina causa una mejora en las anomalías del desarrollo celular uterino en el modelo de SOP a través del agonismo del receptor TRPV1.

## **9. *Perspectivas***

El SOP causa infertilidad en mujeres de edad reproductiva debido a la anovulación. Se reportan problemas de implantación y complicaciones durante el embarazo como lo son abortos espontáneos, diabetes gestacional, trastornos hipertensivos y partos prematuros. Estos problemas en la funcionalidad han sido asociados a cambios morfológicos en el útero como lo es la hiperplasia endometrial y atipia celular (Lou et al., 2017).

De acuerdo con los resultados observados, la capsaicina en concentraciones 1 y 10 nM mejora la calidad celular alterada durante el SOP. Para demostrar que el útero vuelve a ser funcional sugerimos probar la capacidad de implantación y gestación de las ratonas con tratamiento de capsaicina.

## 10. Referencias

- Abbott, D. H. (2017). Neuronal androgen receptor: Molecular gateway to polycystic ovary syndrome?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(16), 4045-4047.
- Abbott, D. H., Dumesic, D. A., & Levine, J. E. (2019). Hyperandrogenic origins of polycystic ovary syndrome—implications for pathophysiology and therapy. *Expert review of endocrinology & metabolism*, 14(2), 131-143.
- Abdel-Salam, O. M. (Ed.). (2014). *Capsaicin as a therapeutic molecule* (Vol. 68). Springer Science & Business Media.
- Adams, J. M., Taylor, A. E., Crowley Jr, W. F., & Hall, J. E. (2004). Polycystic ovarian morphology with regular ovulatory cycles: insights into the pathophysiology of polycystic ovarian syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(9), 4343-4350.
- Aghajanova, L., Velarde, M. C., & Giudice, L. C. (2010, January). Altered gene expression profiling in endometrium: evidence for progesterone resistance. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 28, No. 01, pp. 051-058). © Thieme Medical Publishers.
- Aguado, L. I. (2002). Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microscopy research and technique*, 59(6), 462-473.
- Ahima, R. S., Dushay, J., Flier, S. N., Prabakaran, D., & Flier, J. S. (1997). Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *The Journal of clinical investigation*, 99(3), 391-395.
- Alatríste, V., Herrera-Camacho, I., Martínez, M. I., Limón, I. D., González-Flores, O., & Luna, F. (2013). Sensory denervation with capsaicin reduces ovarian follicular development and delays the onset of puberty in guinea pigs. *Advances in Reproductive Sciences*, 2013.
- Arechavaleta-Velasco, F., Díaz-Cueto, L., & Domínguez-López, P. (2009). PESTICIDAS ORGANOCOLORADOS Y SUS EFECTOS EN LA ESTEROIDOGÉNESIS OVÁRICA. *MENSAJE BIOQUÍMICO*, 33.
- Auzanneau, C., Norez, C., Antigny, F., Thoreau, V., Jouglu, C., Cantereau, A., ... & Vandebrouck, C. (2008). Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in cultured rat Sertoli cells regulate an acid sensing chloride channel. *Biochemical pharmacology*, 75(2), 476-483.
- Azziz, R. (2004). PCOS: a diagnostic challenge. *Reproductive biomedicine online*, 8(6), 644-648.
- Azziz, R., Carmina, E., Dewailly, D., Diamanti-Kandarakis, E., Escobar-Morreale, H. F., Futterweit, W., ... & Witchel, S. F. (2006). Criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an androgen excess society guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(11), 4237-4245.
- Azziz, R., Carmina, E., Chen, Z., Dunaif, A., Laven, J. S., Legro, R. S., ... & Yildiz, B. O. (2016). Polycystic ovary syndrome. *Nature reviews Disease primers*, 2(1), 1-18.
- Badawy, A., & Elnashar, A. (2011). Treatment options for polycystic ovary syndrome. *International journal of women's health*, 3, 25–35.

- Barry, J. A., Azizia, M. M., & Hardiman, P. J. (2014). Risk of endometrial, ovarian and breast cancer in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update*, 20(5), 748-758.
- Barber, T. M., Wass, J. A., McCarthy, M. I., & Franks, S. (2007). Metabolic characteristics of women with polycystic ovaries and oligo-amenorrhoea but normal androgen levels: implications for the management of polycystic ovary syndrome. *Clinical endocrinology*, 66(4), 513-517.
- Becchetti, A., & Arcangeli, A. (2010). Integrins and ion channels in cell migration: implications for neuronal development, wound healing and metastatic spread. *Integrins and Ion Channels*, 107-123.
- Bonnington, J. K., & McNaughton, P. A. (2003). Signalling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor. *The Journal of physiology*, 551(2), 433-446.
- Brassard, M., AinMelk, Y., & Baillargeon, J. P. (2008). Basic infertility including polycystic ovary syndrome. *Medical Clinics of North America*, 92(5), 1163-1192.
- Brawer, J. R., Munoz, M., & Farookhi, R. (1986). Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biology of reproduction*, 35(3), 647-655.
- Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L., & Taft, R. A. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PloS one*, 7(4), e35538.
- Caldwell, A. S., Edwards, M. C., Desai, R., Jimenez, M., Gilchrist, R. B., Handelsman, D. J., & Walters, K. A. (2017). Neuroendocrine androgen action is a key extraovarian mediator in the development of polycystic ovary syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(16), E3334-E3343.
- Capiod, T. (2011). Cell proliferation, calcium influx and calcium channels. *Biochimie*, 93(12), 2075-2079.
- Cascella, T., Palomba, S., Tauchmanovà, L., Manguso, F., Di Biase, S., Labella, D., ... & Orio, F. (2006). Serum aldosterone concentration and cardiovascular risk in women with polycystic ovarian syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(11), 4395-4400.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653), 816-824.
- Caterina, M. J., & Julius, D. (2001). The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annual review of neuroscience*, 24(1), 487-517.
- Cermik D, Selam B, Taylor HS. Regulation of HOXA-10 expression by testosterone in vitro and in the endometrium of patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:238-43.
- Chaban, V. V. (2008). Visceral sensory neurons that innervate both uterus and colon express nociceptive TRPV1 and P2X3 receptors in rats. *Ethn Dis*, 18(2 Suppl 2), S2-20.
- Chakraborty, P., Goswami, S. K., Rajani, S., Sharma, S., Kabir, S. N., Chakravarty, B., & Jana, K. (2013). Recurrent pregnancy loss in polycystic ovary syndrome: role of hyperhomocysteinemia and insulin resistance. *PLoS One*, 8(5), e64446.

Chang, R. J., & Dumesic, D. A. (2019). Polycystic ovary syndrome and hyperandrogenic states. In Yen and Jaffe's reproductive endocrinology (pp. 520-555). Elsevier.

Charalampakis, V., Tahrani, A. A., Helmy, A., Gupta, J. K., & Singhal, R. (2016). Polycystic ovary syndrome and endometrial hyperplasia: an overview of the role of bariatric surgery in female fertility. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 207, 220-226.

Chapa-Oliver, A. M., & Mejía-Teniente, L. (2016). Capsaicin: from plants to a cancer-suppressing agent. *Molecules*, 21(8), 931.

Chen, Y. L., Wang, K. L., Chen, M. Y., Yu, M. H., Wu, C. H., Ke, Y. M., ... & Yen, M. S. (2013). Risk factor analysis of coexisting endometrial carcinoma in patients with endometrial hyperplasia: a retrospective observational study of Taiwanese Gynecologic Oncology Group. *Journal of gynecologic oncology*, 24(1), 14-20.

Chhabra, S., McCartney, C. R., Yoo, R. Y., Eagleson, C. A., Chang, R. J., & Marshall, J. C. (2005). Progesterone inhibition of the hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator: evidence for varied effects in hyperandrogenemic adolescent girls. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(5), 2810-2815.

Cimino, I., Casoni, F., Liu, X., Messina, A., Parkash, J., Jamin, S. P., ... & Giacobini, P. (2016). Novel role for anti-Müllerian hormone in the regulation of GnRH neuron excitability and hormone secretion. *Nature communications*, 7(1), 1-12.

Concha, C. F., Recabarren, S. E., & Pérez, B. F. (2017). Epigenetics of polycystic ovary syndrome. *Revista medica de Chile*, 145(7), 907-915.

Contassot, E., Tenan, M., Schnüriger, V., Pelte, M. F., & Dietrich, P. Y. (2004). Arachidonyl ethanolamide induces apoptosis of uterine cervix cancer cells via aberrantly expressed vanilloid receptor-1. *Gynecologic oncology*, 93(1), 182-188.

Cruz, G., Barra, R., González, D., Sotomayor-Zárate, R., & Lara, H. E. (2012). Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats. *Fertility and sterility*, 98(5), 1283-1290.

De Clercq, K., Held, K., Van Bree, R., Meuleman, C., Peeraer, K., Tomassetti, C., ... & Vriens, J. (2015). Functional expression of transient receptor potential channels in human endometrial stromal cells during the luteal phase of the menstrual cycle. *Human Reproduction*, 30(6), 1421-1436.

Deans, R. (2019). Polycystic ovary syndrome in adolescence. *Medical Sciences*, 7(10), 101.

Deligeoroglou, E. K., & Creatsas, G. K. (2015). Dysfunctional uterine bleeding as an early sign of polycystic ovary syndrome during adolescence. *Minerva ginecologica*, 67(4), 375-381.

Déliot, N., & Constantin, B. (2015). Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848(10), 2512-2522.

Deng, Y., Zhang, Y., Li, S., Zhou, W., Ye, L., Wang, L., ... & Wang, W. (2017). Steroid hormone profiling in obese and nonobese women with polycystic ovary syndrome. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.

- Diamanti-Kandarakis, E., Spina, G., Kouli, C., & Migdalis, I. (2001). Increased endothelin-1 levels in women with polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin therapy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(10), 4666-4673.
- Dinis, P., Charrua, A., Avelino, A., Nagy, I., Quintas, J., Ribau, U., & Cruz, F. (2005). The distribution of sensory fibers immunoreactive for the TRPV1 (capsaicin) receptor in the human prostate. *European urology*, 48(1), 162-167.
- Dokras, A., Clifton, S., Futterweit, W., & Wild, R. (2012). Increased prevalence of anxiety symptoms in women with polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *Fertility and sterility*, 97(1), 225-230.
- Erdost, H., G Özgüden Akkoç, C., Özfıfıfız, N., İlhan, T., & Tütüncü, Ş. (2009). The histological investigation on the testes of mice after an application of capsaicin. *Veterinarski arhiv*, 79(5), 509-516.
- Ernsberger, U. (2009). Role of neurotrophin signalling in the differentiation of neurons from dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. *Cell and tissue research*, 336(3), 349-384.
- Escobar-Morreale, H. F., Roldán, B., Barrio, R., Alonso, M., Sancho, J., de la Calle, H., & García-Robles, R. (2000). High prevalence of the polycystic ovary syndrome and hirsutism in women with type 1 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(11), 4182-4187.
- Fonseca BM, Correia-da-Silva G, Teixeira NA. Cannabinoid-induced cell death in endometrial cancer cells: involvement of TRPV1 receptors in apoptosis. *J Physiol Biochem*. 2018; 74: 261-72.
- Forrest, S. L., & Keast, J. R. (2008). Expression of receptors for glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands in sacral spinal cord reveals separate targets of pelvic afferent fibers. *Journal of Comparative Neurology*, 506(6), 989-1002.
- García-Sanz, N., Fernández-Carvajal, A., Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Fajardo-Sánchez, E., Fernández-Ballester, G., & Ferrer-Montiel, A. (2004). Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *Journal of Neuroscience*, 24(23), 5307-5314.
- Gargett, C. E., & Rogers, P. A. (2001). Human endometrial angiogenesis. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-*, 121(2), 181-186.
- Giudice, L. C. (2006). Endometrium in PCOS: implantation and predisposition to endocrine CA. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 20(2), 235-244.
- Giordano MV, Giordano LA, Gomes RC, Simoes RS, Nader HB, ~ Giordano MG, et al. The evaluation of endometrial sulfate glycosaminoglycans in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2015; 31:278–81.
- Gottschau, M., Kjaer, S. K., Jensen, A., Munk, C., & Møllekjær, L. (2015). Risk of cancer among women with polycystic ovary syndrome: a Danish cohort study. *Gynecologic oncology*, 136(1), 99-103.

- Gregory, C. W., Wilson, E. M., Apparao, K. B. C., Lininger, R. A., Meyer, W. R., Kowalik, A., ... & Lessey, B. A. (2002). Steroid receptor coactivator expression throughout the menstrual cycle in normal and abnormal endometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *87*(6), 2960-2966.
- Hanson, S. M., Newstead, S., Swartz, K. J., & Sansom, M. S. (2015). Capsaicin interaction with TRPV1 channels in a lipid bilayer: molecular dynamics simulation. *Biophysical journal*, *108*(6), 1425-1434.
- Herbison, A. E., & Moenter, S. M. (2011). Depolarising and hyperpolarising actions of GABAA receptor activation on gonadotrophin-releasing hormone neurones: Towards an emerging consensus. *Journal of neuroendocrinology*, *23*(7), 557-569.
- Hollinrake, E., Abreu, A., Maifeld, M., Van Voorhis, B. J., & Dokras, A. (2007). Increased risk of depressive disorders in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility*, *87*(6), 1369-1376.
- Hosseinzadeh, P., Barsky, M., Gibbons, W. E., & Blesson, C. S. (2021). Polycystic ovary syndrome and the forgotten uterus. *F&S Reviews*, *2*(1), 11-20.
- Jakubowicz, D. J., Luorno, M. J., Jakubowicz, S., Roberts, K. A., & Nestler, J. E. (2002). Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *87*(2), 524-529.
- Jakubowicz, D. J., Seppälä, M., Jakubowicz, S., Rodriguez-Armas, O., Rivas-Santiago, A., Koistinen, H., ... & Nestler, J. E. (2001). Insulin reduction with metformin increases luteal phase serum glycodelin and insulin-like growth factor-binding protein 1 concentrations and enhances uterine vascularity and blood flow in the polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *86*(3), 1126-1133.
- Joham, A. E., Palomba, S., & Hart, R. (2016, March). Polycystic ovary syndrome, obesity, and pregnancy. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 34, No. 02, pp. 093-101). Thieme Medical Publishers.
- Jordt, S. E., & Julius, D. (2002). Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell*, *108*(3), 421-430.
- Kashanian, M., Fazy, Z., & Pirak, A. (2008). Evaluation of the relationship between gestational diabetes and a history of polycystic ovarian syndrome. *Diabetes research and clinical practice*, *80*(2), 289-292.
- Keefe, C. C., Goldman, M. M., Zhang, K., Clarke, N., Reitz, R. E., & Welt, C. K. (2014). Simultaneous measurement of thirteen steroid hormones in women with polycystic ovary syndrome and control women using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *PloS one*, *9*(4), e93805.
- Key, T. J. A., & Pike, M. C. (1988). The dose-effect relationship between 'unopposed' oestrogens and endometrial mitotic rate: its central role in explaining and predicting endometrial cancer risk. *British journal of cancer*, *57*(2), 205-212.
- Köse, S. A., & Nazıroğlu, M. (2014). Selenium reduces oxidative stress and calcium entry through TRPV1 channels in the neutrophils of patients with polycystic ovary syndrome. *Biological trace element research*, *158*(2), 136-142.

Köse, S. A., & Nazıroğlu, M. (2015). N-acetyl cysteine reduces oxidative toxicity, apoptosis, and calcium entry through TRPV1 channels in the neutrophils of patients with polycystic ovary syndrome. *Free radical research*, 49(3), 338-346.

Kuyucu, Y., Çelik, L. S., Kendirinan, Ö., Tap, Ö., & Mete, U. Ö. (2018). Investigation of the uterine structural changes in the experimental model with polycystic ovary syndrome and effects of vitamin D treatment: An ultrastructural and immunohistochemical study. *Reproductive biology*, 18(1), 53-59.

Lai, Q., Xiang, W., Li, Q., Zhang, H., Li, Y., Zhu, G., ... & Jin, L. (2018). Oxidative stress in granulosa cells contributes to poor oocyte quality and IVF-ET outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Frontiers of medicine*, 12(5), 518-524.

Lee, I., Cooney, L. G., Saini, S., Smith, M. E., Sammel, M. D., Allison, K. C., & Dokras, A. (2017). Increased risk of disordered eating in polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 107(3), 796-802.

Lee, L. Y., Kwong, K., Lin, Y. S., & Gu, Q. (2002). Hypersensitivity of bronchopulmonary Cfibres induced by airway mucosal inflammation: cellular mechanisms. *Pulm Pharmacol Therap*, 15, 199–204.

Leon, L., Bacallao, K., Gabler, F., Romero, C., Valladares, L., & Vega, M. (2008). Activities of steroid metabolic enzymes in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome. *Steroids*, 73(1), 88-95.

Leonhardt, H., Gull, B., Kishimoto, K., Kataoka, M., Nilsson, L., Janson, P. O., ... & Hellström, M. (2012). Uterine morphology and peristalsis in women with polycystic ovary syndrome. *Acta Radiologica*, 53(10), 1195-1201.

Li, L., Chen, C., Chiang, C., Xiao, T., Chen, Y., Zhao, Y., & Zheng, D. (2021). The impact of TRPV1 on cancer pathogenesis and therapy: a systematic review. *International Journal of Biological Sciences*, 17(8), 2034.

Lishko, P. V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C. B., & Gaudet, R. (2007). The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron*, 54(6), 905-918.

Liu, J., Liu, X., Duan, K., Zhang, Y., & Guo, S. W. (2012). The expression and functionality of transient receptor potential vanilloid 1 in ovarian endometriomas. *Reproductive sciences*, 19(10), 1110-1124.

Luo, L., Gu, F., Jie, H., Ding, C., Zhao, Q., Wang, Q., & Zhou, C. (2017). Early miscarriage rate in lean polycystic ovary syndrome women after euploid embryo transfer—a matched-pair study. *Reproductive biomedicine online*, 35(5), 576-582.

Malin, S. A., Christianson, J. A., Bielefeldt, K., & Davis, B. M. (2009). TRPV1 expression defines functionally distinct pelvic colon afferents. *Journal of Neuroscience*, 29(3), 743-752.

Maliqueo, M., Benrick, A., & Stener-Victorin, E. (2014, May). Rodent models of polycystic ovary syndrome: phenotypic presentation, pathophysiology, and the effects of different interventions. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 32, No. 03, pp. 183-193). Thieme Medical Publishers.

- Maslyanskaya, S., Talib, H. J., Northridge, J. L., Jacobs, A. M., Coble, C., & Coupey, S. M. (2017). Polycystic ovary syndrome: an under-recognized cause of abnormal uterine bleeding in adolescents admitted to a children's hospital. *Journal of pediatric and adolescent gynecology*, 30(3), 349-355.
- Messeguer, A., Planells-Cases, R., & Ferrer-Montiel, A. (2006). Physiology and pharmacology of the vanilloid receptor. *Current neuropharmacology*, 4(1), 1-15.
- Mirabolghasemi, G., & Kamyab, Z. (2017). Changes of the uterine tissue in rats with polycystic ovary syndrome induced by estradiol valerate. *International Journal of Fertility & Sterility*, 11(1), 47.
- Mizrak, S. C., Gadella, B. M., Erdost, H., Ozer, A., van Pelt, A. M., & van Dissel-Emiliani, F. M. (2008). Spermatogonial stem cell sensitivity to capsaicin: an in vitro study. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 6(1), 1-9.
- Montell, C., Birnbaumer, L., & Flockerzi, V. (2002). The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell*, 108(5), 595-598.
- Monterrosas Santamaría, J. R. (2020). *Caracterización de la expresión genética a nivel transcripcional de ovarios de ratas Long Evans en respuesta al tratamiento de valerato de estradiol* (Master's thesis).
- Moore, A. M., & Campbell, R. E. (2017). Polycystic ovary syndrome: understanding the role of the brain. *Frontiers in neuroendocrinology*, 46, 1-14.
- Morán, C., Morales, L., Razo, R. S., Apolonio, J., Quiróz, U., Chavira, R., & 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.
- Morris, S., Grover, S., & Sabin, M. A. (2016). What does a diagnostic label of 'polycystic ovary syndrome' really mean in adolescence? A review of current practice recommendations. *Clinical obesity*, 6(1), 1-18.
- Muller, C., Lynch, D. L., Hurst, D. P., & Reggio, P. H. (2020). A closer look at anandamide interaction with TRPV1. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 144.
- Myers, B. R., Bohlen, C. J., & Julius, D. (2008). A yeast genetic screen reveals a critical role for the pore helix domain in TRP channel gating. *Neuron*, 58(3), 362-373.
- Nadezhdin, K. D., Neuberger, A., Nikolaev, Y. A., Murphy, L. A., Gracheva, E. O., Bagriantsev, S. N., & Sobolevsky, A. I. (2021). Extracellular cap domain is an essential component of the TRPV1 gating mechanism. *Nature communications*, 12(1), 2154.
- Navarro, V. M. (2012). New insights into the control of pulsatile GnRH release: the role of Kiss1/neurokinin B neurons. *Frontiers in endocrinology*, 3, 48.
- Newman, T. A., Bailey, J. L., Stocker, L. J., Woo, Y. L., Macklon, N. S., & Cheong, Y. C. (2013). Expression of neuronal markers in the endometrium of women with and those without endometriosis. *Human Reproduction*, 28(9), 2502-2510.

- Nie, J., Liu, X., & Guo, S. W. (2010). Immunoreactivity of oxytocin receptor and transient receptor potential vanilloid type 1 and its correlation with dysmenorrhea in adenomyosis. *American journal of obstetrics and gynecology*, 202(4), 346-e1.
- Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., & Peters, J. A. (2007). Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiological reviews*, 87(1), 165-217.
- Nilius, B., Vennekens, R., & Owsianik, G. (2008). Vanilloid transient receptor potential cation channels: an overview. *Current pharmaceutical design*, 14(1), 18-31.
- Norman, R. J., Dewailly, D., Legro, R. S., & Hickey, T. E. (2007). Polycystic ovary syndrome. *The Lancet*, 370(9588), 685-697.
- Osuka, S., Nakanishi, N., Murase, T., Nakamura, T., Goto, M., Iwase, A., & Kikkawa, F. (2019). Animal models of polycystic ovary syndrome: A review of hormone-induced rodent models focused on hypothalamus-pituitary-ovary axis and neuropeptides. *Reproductive medicine and biology*, 18(2), 151-160.
- Ozyurek, E. S., Yoldemir, T., & Artar, G. (2017). Androstenedione response to recombinant human FSH is the most valid predictor of the number of selected follicles in polycystic ovarian syndrome:(a case-control study). *Journal of ovarian research*, 10(1), 1-8.
- Palomba, S., Falbo, A., Chiossi, G., Muscogiuri, G., Fornaciari, E., Orio, F., ... & Zullo, F. (2014). Lipid profile in nonobese pregnant women with polycystic ovary syndrome: a prospective controlled clinical study. *Steroids*, 88, 36-43.
- Palomba, S., Falbo, A., Russo, T., Battista, L., Tolino, A., Orio, F., Zullo, F., 2010. Uterine blood flow in pregnant patients with polycystic ovary syndrome: relationships with clinical outcomes. *BJOG* 117, 711–721.
- Pastor, C. L., Griffin-Korf, M. L., Aloj, J. A., Evans, W. S., & Marshall, J. C. (1998). Polycystic ovary syndrome: evidence for reduced sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(2), 582-590.
- Peppard, H. R., Marfori, J., Iuorno, M. J., & Nestler, J. E. (2001). Prevalence of polycystic ovary syndrome among premenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes care*, 24(6), 1050-1052.
- Persoons, E., Hennes, A., De Clercq, K., Van Bree, R., Vriens, G., Peterse, D., ... & Vriens, J. (2018). Functional expression of TRP ion channels in endometrial stromal cells of endometriosis patients. *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2467.
- Peyghambari, F., Fayazi, M., Amanpour, S., Haddadi, M., Muhammadnejad, S., Muhammadnejad, A., ... & Mazaheri, Z. (2014). Assessment of  $\alpha 4$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$  and  $\beta 3$  integrins expression throughout the implantation window phase in endometrium of a mouse model of polycystic ovarian syndromes. *Iranian journal of reproductive medicine*, 12(10), 687.
- Piltonen, T. T., Chen, J., Erikson, D. W., Spitzer, T. L. B., Barragan, F., Rabban, J. T., ... & Giudice, L. C. (2013). Mesenchymal stem/progenitors and other endometrial cell types from women with

polycystic ovary syndrome (PCOS) display inflammatory and oncogenic potential. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(9), 3765-3775.

Pinto, R. M., Lerner, U., & Pontelli, H. (1966). Effect in vitro of progesterone on the contractile activity of the 3 layers of the human pregnant uterus. *Revista de la Sociedad Argentina de Biología*, 42(5), 214-221.

Pohóczky, K., Kun, J., Szalontai, B., Szőke, É., Sághy, É., Payrits, M., ... & Helyes, Z. (2016). Estrogen-dependent up-regulation of TRPA1 and TRPV1 receptor proteins in the rat endometrium. *Journal of molecular endocrinology*, 56(2), 135-149.

Prescott, E. D., & Julius, D. (2003). A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science*, 300(5623), 1284-1288.

Prophet, E. B., Mills, B., Arrington, J. B., & Sobin, L. H. (1995). Manual de métodos histotecnológicos del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. *Traducción de la 5ª Edición inglesa*. Washington.

Rashidi, B., Haghollahi, F., Shariat, M., & Zayerii, F. (2009). The effects of calcium-vitamin D and metformin on polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 48(2), 142-147.

Rodríguez-Flores, M. (2011). The polycystic ovary syndrome. The point of view of the internist. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 49(6), 611-620.

Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. (2004). Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Human reproduction*, 19(1), 41-47.

Ross, M. H., & Pawlina, W. (2008). Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular. 5 ta ed. *Madrid: Editorial médica panamericana*, 268-302.

Ross, R. A., Gibson, T. M., Brockie, H. C., Leslie, M., Pashmi, G., Craib, S. J., ... & Pertwee, R. G. (2001). Structure-activity relationship for the endogenous cannabinoid, anandamide, and certain of its analogues at vanilloid receptors in transfected cells and vas deferens. *British journal of pharmacology*, 132(3), 631-640.

Sajadi, M., Noroozadeh, M., Bagheripour, F., & Tehrani, F. R. (2018). Contractions in the isolated uterus of a rat model of polycystic ovary syndrome compared to controls in adulthood. *International journal of endocrinology and metabolism*, 16(2).

Sadeghi, H. M., Adeli, I., Calina, D., Docea, A. O., Mousavi, T., Daniali, M., ... & Abdollahi, M. (2022). Polycystic Ovary Syndrome: A Comprehensive Review of Pathogenesis, Management, and Drug Repurposing. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 583.

Savaris, R. F., Groll, J. M., Young, S. L., DeMayo, F. J., Jeong, J. W., Hamilton, A. E., ... & Lessey, B. A. (2011). Progesterone resistance in PCOS endometrium: a microarray analysis in clomiphene citrate-treated and artificial menstrual cycles. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(6), 1737-1746.

Scotland, R. S., Chauhan, S., Davis, C., De Felipe, C., Hunt, S., Kabir, J., ... & Ahluwalia, A. (2004). Vanilloid receptor TRPV1, sensory C-fibers, and vascular autoregulation: a novel mechanism involved in myogenic constriction. *Circulation research*, *95*(10), 1027-1034.

Shi, Y., Zhao, H., Shi, Y., Cao, Y., Yang, D., Li, Z., ... & Chen, Z. J. (2012). Genome-wide association study identifies eight new risk loci for polycystic ovary syndrome. *Nature genetics*, *44*(9), 1020-1025.

Shuba, Y. M. (2021). Beyond neuronal heat sensing: diversity of TRPV1 heat-capsaicin receptor-channel functions. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*, 612480.

Sirmans, S. M., & Pate, K. A. (2014). Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. *Clinical epidemiology*, *6*, 1.

Slayden OD, Nayak NR, Burton KA, Chwalisz K, Cameron ST, Critchley HO, et al. Progesterone antagonists increase androgen receptor expression in the rhesus macaque and human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;*86*:2668–79.

Smith, E. S. J., & Lewin, G. R. (2009). Nociceptors: a phylogenetic view. *Journal of Comparative Physiology A*, *195*(12), 1089-1106.

Srinivasan, K. (2016). Biological activities of red pepper (*Capsicum annuum*) and its pungent principle capsaicin: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, *56*(9), 1488-1500.

Stein, I. F. (1935). Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol*, *29*, 181-191.

Stein, R. J., Santos, S., Nagatomi, J., Hayashi, Y., Minnery, B. S., Xavier, M., ... & De Miguel, F. (2004). Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract. *The Journal of urology*, *172*(3), 1175-1178.

Stener-Victorin, E., Ploj, K., Larsson, B. M., & Holmång, A. (2005). Rats with steroid-induced polycystic ovaries develop hypertension and increased sympathetic nervous system activity. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *3*(1), 1-10.

Strecker, T., Messlinger, K., Weyand, M., & Reeh, P. W. (2005). Role of different proton-sensitive channels in releasing calcitonin gene-related peptide from isolated hearts of mutant mice. *Cardiovascular research*, *65*(2), 405-410.

Tata, B., Mimouni, N. E. H., Barbotin, A. L., Malone, S. A., Loyens, A., Pigny, P., ... & Giacobini, P. (2018). Elevated prenatal anti-Müllerian hormone reprograms the fetus and induces polycystic ovary syndrome in adulthood. *Nature medicine*, *24*(6), 834-846.

Teede, H., Deeks, A., & Moran, L. (2010). Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC medicine*, *8*(1), 1-10.

Tingåker, B. K., Ekman-Ordeberg, G., Facer, P., Irestedt, L., & Anand, P. (2008). Influence of pregnancy and labor on the occurrence of nerve fibers expressing the capsaicin receptor TRPV1 in human corpus and cervix uteri. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *6*(1), 1-8.

- Tominaga, M., & Tominaga, T. (2005). Structure and function of TRPV1. *Pflügers Archiv*, 451(1), 143-150.
- Trujillo, A., Morales, L., Vargas, X., Alba, L., & Domínguez, R. (2004). Effects of capsaicin treatment on the regulation of ovarian compensatory hypertrophy and compensatory ovulation. *Endocrine*, 25(2), 155-162.
- Tsilchorozidou, T., Overton, C., & Conway, G. S. (2004). The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Clinical endocrinology*, 60(1), 1-17.
- Usandizaga-Pombo, J. M. (1966). Glandular hyperplasia of the endometrium. *Acta gynaecologica et obstetrica Hispano-Lusitana*, 15(2), 117.
- Villavicencio, A., Bacallao, K., Avellaira, C., Gabler, F., Fuentes, A., & Vega, M. (2006). Androgen and estrogen receptors and co-regulators levels in endometria from patients with polycystic ovarian syndrome with and without endometrial hyperplasia. *Gynecologic oncology*, 103(1), 307-314.
- Virginia, A. M., Virginia, T. M., & Laura, K. (2020). Androgen receptor and uterine histoarchitecture in a PCOS rat model. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 518, 110973.
- Vu, S., Singh, V., Wulff, H., Yarov-Yarovoy, V., & Zheng, J. (2020). New capsaicin analogs as molecular rulers to define the permissive conformation of the mouse TRPV1 ligand-binding pocket. *Elife*, 9, e62039.
- Walcher, L., Budde, C., Böhm, A., Reinach, P. S., Dhandapani, P., Ljubojevic, N., ... & Mergler, S. (2018). TRPM8 activation via 3-Iodothyronamine blunts VEGF-induced transactivation of TRPV1 in human uveal melanoma cells. *Frontiers in Pharmacology*, 1234.
- Walters, K. A., Gilchrist, R. B., Ledger, W. L., Teede, H. J., Handelsman, D. J., & Campbell, R. E. (2018). New perspectives on the pathogenesis of PCOS: neuroendocrine origins. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 29(12), 841-852.
- Walters, K. A., Bertoldo, M. J., & Handelsman, D. J. (2018). Evidence from animal models on the pathogenesis of PCOS. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 32(3), 271-281.
- Wang, J. X., Davies, M. J., & Norman, R. J. (2001). Polycystic ovarian syndrome and the risk of spontaneous abortion following assisted reproductive technology treatment. *Human Reproduction*, 16(12), 2606-2609.
- Wei, C., Wang, X., Zheng, M., & Cheng, H. (2012). Calcium gradients underlying cell migration. *Current opinion in cell biology*, 24(2), 254-261.
- Witchel, S. F., Oberfield, S. E., & Peña, A. S. (2019). Polycystic ovary syndrome: pathophysiology, presentation, and treatment with emphasis on adolescent girls. *Journal of the Endocrine Society*, 3(8), 1545-1573.
- Xita, N., & Tsatsoulis, A. (2006). Fetal programming of polycystic ovary syndrome by androgen excess: evidence from experimental, clinical, and genetic association studies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(5), 1660-1666.

- Yamamoto, H., Horie, S., Uchida, M., Tsuchiya, S., Murayama, T., & Watanabe, K. (2001). Effects of vanilloid receptor agonists and antagonists on gastric antral ulcers in rats. *European Journal of Pharmacology*, *432*(2–3), 203–210. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(01\)01481-9](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(01)01481-9)
- Yan, T., Liu, B., Du, D., Eisenach, J. C., & Tong, C. (2007). Estrogen amplifies pain responses to uterine cervical distension in rats by altering transient receptor potential-1 function. *Anesthesia & Analgesia*, *104*(5), 1246-1250.
- Yang, F., & Zheng, J. (2017). Understand spiciness: mechanism of TRPV1 channel activation by capsaicin. *Protein & cell*, *8*(3), 169-177.
- Zeferino-Toquero, M., Bañuelos-Flores, J., Maytorena-Córdova, G., Reyna-Amaya, H., & Acevedo-Vega, M. F. (2013). Incidence of endometrial cancer in patients with biopsy specimens of endometrial hyperplasia. *Ginecología y obstetricia de Mexico*, *81*(09), 519-524.
- Zheng, W., & Auerbach, A. (2011). Decrypting the sequence of structural events during the gating transition of pentameric ligand-gated ion channels based on an interpolated elastic network model. *PLoS computational biology*, *7*(1), e1001046.
- Zsombok, A. (2013). Vanilloid receptors—do they have a role in whole body metabolism? Evidence from TRPV1. *Journal of diabetes and its complications*, *27*(3), 287-292.

## 11. Anexos

Parte de este trabajo fue presentado en los siguientes eventos:

- XXVII Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas con los avances de la tesis: “Participación de los receptores TRPV1 en desarrollo celular del útero en ratonas CD1 inducidas con Síndrome de Ovario Poliquístico”.
- Latin XCchem Twitter Conference 2022 con el poster titulado: “Modulación *in silico* de TRPV1: sitios transmembranales, citoplasmáticos y estructurales”.
- Exposición de Carteles en el evento “La mujer y la niña en la Ciencia” con el cartel titulado: “Inducción del Síndrome de Ovario Poliquístico con Valerato de Estradiol en Ratonas CD1”.
- Concurso de Carteles Modalidad Inglés “Semana Internacional del cerebro FCQ-BUAP 2023” con el cartel titulado: “*In silico* modulation of TRPV1: transmembrane, cytoplasmatic and structural sites”.
- V Congreso de investigadoras del SIN y de Iberoamérica con el cartel titulado: “Participación de los receptores TRPV1 en desarrollo celular del útero en ratonas CD1 inducidas con Síndrome de Ovario Poliquístico”. (pendiente el certificado)
- Congreso de la *Society for Neuroscience* 2023 con el cartel titulado: “Molecular docking of capsaicin at epithelial membrane model TRPV1 receptor”.

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

## Otorgan la presente **Constancia a:**

Zerón Alvarado Cintia Abigail

Alatríste Bueno Victorino Gilberto

Martínez Mendieta Liliana

por su contribución:

**Participación de los receptores TRPV1 en desarrollo celular del útero en ratonas CD1 inducidas con Síndrome de Ovario Poliquístico**

en el Simposio interno XXVII del posgrado del en Ciencias Químicas

"Pensar Bien para Vivir Mejor"

H. Puebla de Zaragoza, del 07 al 10 de noviembre de 2022



Dra. Jacqueline Jiménez Hernández  
Secretaría académica



Dr. Guillermo Soriano Moro  
Coordinador

# LatinXChem

This is to certify that

Zerón Alvarado Cintia Abigail, Alatraste Bueno Victorino, Martínez Mendieta Liliana, Alan Carrasco Carballo

participated in the #LatinXChem Twitter Conference 2022 on Nov. 28, 2022 with the poster entitled:

*Modulación in silico de TRPV1: sitios transmembranales, citoplasmáticos y estructurales.*



Gabriel Merino  
On behalf of the #LatinXChem  
Organizing Committee



Luciana Gonzaga de Oliveira  
On behalf of the #LXChemBio  
Category Organizers



**BUAP**



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla  
A través de la Facultad de Ciencias Químicas  
Otorga el presente

# RECONOCIMIENTO

A: **Cintia Abigail Zerón Alvarado**

Por su participación con el cartel titulado:

**“Inducción del Síndrome de Ovario Poliquístico con Valerato de Estradiol en Ratonas CD1”**

Durante la Exposición de Carteles “La Mujer y la Niña en la Ciencia”

**Pensar bien, para vivir mejor.**

H. Puebla de Zaragoza, a 10 de febrero de 2023



**DC Jorge Raúl Cerna Cortez**  
Director de la Facultad



La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas

Laboratorio de Neurofarmacología

Otorgan en presente:



## Reconocimiento

a: **Cintia Abigail Zerón Alvarado**

Facultad de Ciencias Químicas, BUAP.



Por haber ganado el PRIMER LUGAR con su trabajo titulado:

*“In silico modulation of TRPV1: transmembrane, cytoplasmatic and structural sites”*

Durante el concurso de carteles MODALIDAD INGLÉS realizado en el marco de la “Semana Internacional del cerebro FCQ-BUAP 2023”

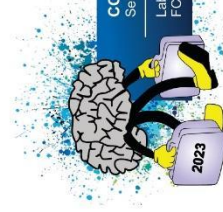
*“Pensar bien, para vivir mejor”*

H. Puebla de Zaragoza,  
a 17 de marzo de 2023

**Dr. I. Daniel Limón Pérez de León**

Profesor-Investigador FCQ-BUAP

Organizador de la SIC-FCQ-BUAP 2023



COMITÉ ORGANIZADOR

Semana Internacional del Cerebro 2023

Laboratorio de Neurofarmacología

FCQ-BUAP



BUAP

**Poster**

**PSTR250. Ion Channels of the Peripheral Nervous System**

**Location:** WCC Halls A-C

**Time:** Monday, November 13, 2023, 1:00 PM - 5:00 PM

**Program #/Poster #:** PSTR250.06/B59

**Topic:** D.01. Somatosensation

**Title:** Molecular docking of capsaicin at epithelial membrane model TRPV1 receptor

**Authors:** \*C. A. ZERÓN ALVARADO<sup>1</sup>, A. CARRASCO CARBALLO<sup>2</sup>, L. MARTÍNEZ MENDIETA<sup>3</sup>, V. G. S. ALATRISTE BUENO<sup>4</sup>;

<sup>1</sup>Lab. de Neuroendocrinología, Benemérita Univ. Autónoma De Puebla, Puebla, Mexico; <sup>2</sup>Lab. de Elucidación y Síntesis orgánica, <sup>3</sup>Lab. de Neuroquímica, <sup>4</sup>Lab. de Neuroendocrinología, Benemérita Univ. Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

**Abstract:** The transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV1) is a transmembrane receptor with ion channel activity that allows the passage of cations, mainly calcium. The TRPV1 can be activated by capsaicin, the main component of chili peppers. The TRPV1 has been found on sensory fibers as well other cells. Different effects with respect to capsaicin concentration have been shown in different biological tissues. The TRPV1 activation by low concentrations of capsaicin promotes cell proliferation and differentiation, however high concentrations promote cell death. In the uterus, the expression of the TRPV1 has been demonstrated, but its function is poor understood. The uterus is an organ that is constantly undergoing regeneration, mainly luminal and glandular epithelial cells, so the TRPV1 may play

an important role in uterine cell development. In this work, an *in silico* molecular docking study was performed to identify the capsaicin binding site on the TRPV1 in an epithelial membrane model. The docking was performed on the Schrödinger platform. With the Protein Preparation Wizard tool, the crystallized structure of the tetrameric squirrel TRPV1 (PDB: 7LR0) was optimized to a physiological pH (pH=7.40). The capsaicin molecule (PubChem CID: 1548943) was loaded in Ligprep and macromodel tool. The probable binding areas such as the transmembrane and intracellular areas were selected in Glide tool by XP Molecular docking. Subsequently, the embedding of the TRPV1 in an epithelial membrane model was performed. The aims of embed the TRPV1 into an epithelial membrane was to assimilate *in vivo* molecular interactions in uterus. As a result, we found five capsaicin binding sites in the TRPV1 receptor. Four sites were found in the transmembrane zone with the following binding energies: Site 1: -8,092 Kcal/mol, Site 2: -8,097 Kcal/mol, Site 3: -7,078 Kcal/mol and Site 4: -7,598 Kcal/mol. One site was found in the cationic pore with a binding energy of -8,083 Kcal/mol. The dissociation constant ( $K_D$ ) of each binding site was obtained with values of 2.0  $\mu$ M, 2.0  $\mu$ M, 10.4  $\mu$ M, 4.5  $\mu$ M and 2.0  $\mu$ M respectively. According to our results, the sites with the best affinity are the transmembrane sites 1 and 2 and the cationic pore site. In our work we have found Different sites of activation for capsaicin in the TRPV1, we demonstrate the sensitivity for molecular interactions of the TRPV1 according to the concentration used. These results indicate possible reference capsaicin concentrations to test for TRPV1 stimulation in uterine cells.

**Disclosures:** C.A. Zerón Alvarado: None. A. Carrasco Carballo: None. L. Martínez Mendieta: None. V.G.S. Alatríste Bueno: None.