



BENEMÉRITA UNIVESIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA



MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

Efecto de la diosgenina y la 26OH-diosgenina sobre el
desarrollo celular en los ovarios y útero de la rata Wistar

TESIS

Que para obtener el Grado de Maestro en
Ciencias Químicas en el Área de Bioquímica
y Biología Molecular

Presenta:

Javier García Castañeda

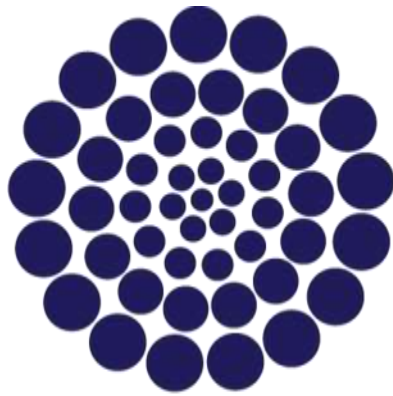
Director MC. Félix Luna Morales
Profesor-Investigador FCQ-BUAP

Codirector Dr. Jesús Sandoval Ramírez
Profesor-Investigador FCQ-BUAP

Puebla, Puebla, a 26 de octubre de 2018

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el CONACYT con el número de becario 786181 del periodo 2016-2018, a la VIEP por el apoyo otorgado para la conclusión de tesis.



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



VIEP

Vicerrectoría de Investigación

y Estudios de Posgrado

Índice

<i>Índice de figuras</i>	i
<i>Índice de tablas</i>	iii
<i>Lista de abreviaturas</i>	iv
<i>Resumen</i>	v
1. INTRODUCCIÓN	1
<i>1.1 Los ovarios y el útero en las diferentes fases del ciclo estral de la rata</i>	3
2. JUSTIFICACIÓN	6
3. HIPÓTESIS	7
4. OBJETIVO GENERAL	7
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
6. DIAGRAMA DE TRABAJO	8
7. MATERIALES Y MÉTODOS	9
<i>7.1 Animales</i>	9
<i>7.2 Administración de DG o 26OH-DG</i>	9
<i>7.3 Obtención y tratamiento de los ovarios y útero de las ratas</i>	9
<i>7.4 Inmunohistoquímica</i>	10
<i>7.5 Análisis estadístico</i>	10
8. RESULTADOS	11
<i>8.1 Peso corporal, peso húmedo de los ovarios y del útero</i>	11
<i>8.2 Espesor del epitelio endometrial, endometrio y miometrio uterino</i>	11
<i>8.3 Glándulas endometriales</i>	15
<i>8.4 Folículos ováricos sanos y atresicos</i>	15
<i>8.5 Identificación por inmunohistoquímica de células caspasa3-positivas en los ovarios</i>	20
<i>8.6 Identificación por inmunohistoquímica de células VEGF-positivas en los ovarios</i>	23
<i>8.7 Identificación por inmunohistoquímica de células NGF-positivas en los ovarios</i>	26
9. DISCUSIÓN	31
10. CONCLUSIÓN	34
11. PERSPECTIVAS	34
12. REFERENCIAS	35

Índice de figuras

Figura 1. Respuestas farmacológicas de la diosgenina.....	2
Figura 2. Micrografías representativas de citología vaginal de la rata Wistar	4
Figura 3. Concentración plasmática de LH, FSH, estradiol y progesterona durante el ciclo ovárico de las ratas con ciclos luz/oscuridad de 12: 12 horas	5
Figura 4. Micrografías panorámicas representativas de cortes histológicos transversales del cuerno uterino derecho de ratas Wistar administradas con el vehículo, DG o 26OH-DG	12
Figura 5. Cortes transversales representativos del cuerno uterino derecho de las ratas Wistar administradas con el vehículo, DG o 26OH-DG.....	13
Figura 6. A. Espesor de la mucosa; B. Espesor del endometrio; C. espesor del miometrio; D. Espesor del total del útero de las ratas Wistar administradas con el vehículo, DG o 26OH-DG	14
Figura 7. A. Micrografía de sección transversal del cuerno uterino con las glándulas del endometrio de las ratas Wistar indicadas con fechas. a, vehículo, b, DG y c, 26OH-DG. B. Gráfica con el número de glándulas endometriales.....	15
Figura 8. Cortes histológicos representativos de los ovarios en diestro, proestro y estro teñidos con la tinción de Tricrónica de Masson. Vehículo, DG o 26OH-DG.....	16
Figura 9. Folículos ováricos en la rata Wistar en diestro. Vehículo, DG o 26OH-DG	17
Figura 10. Folículos ováricos en la rata Wistar en proestro. Vehículo, DG o 26OH-DG	18
Figura 11. Folículos ováricos en la rata Wistar en estro. Vehículo, DG o 26OH-DG	19
Figura 12. Cuerpos lúteos en la rata Wistar.	20
Figura 13. Células teco-intersticiales (CTI) caspasa 3-positivas en los ovarios de ratas en diestro.....	21
Figura 14. Células teco-intersticiales (CTI) caspasa 3-positivas en los ovarios de ratas en proestro	22
Figura 15. Células teco-intersticiales (CTI) caspasa 3-positivas en los ovarios de ratas en estro.....	23
Figura 16. Células teco-intersticiales (CTI) VEGF-positivas en los ovarios de ratas en diestro.....	24
Figura 17. Células teco-intersticiales (CTI) VEGF-positivas en los ovarios de ratas en proestro	25
Figura 18. Células teco-intersticiales (CTI) VEGF-positivas en los ovarios de ratas en estro	26

Figura 19. Células teco-intersticiales (CTI) NGF-positivas en los ovarios de ratas en diestro.....	27
Figura 20. Células teco-intersticiales (CTI) NGF-positivas en los ovarios de ratas en proestro.....	28
Figura 21. Células teco-intersticiales (CTI) NGF-positivas en los ovarios de ratas en estro.....	29
Figura 22. Esquema del posible mecanismo de acción basado en ESR1, ESR2 y el receptor 1,25D3-MARRS	34

Índice de tablas

Tabla 1. Características morfológicas en los ovarios, útero y vagina durante el ciclo estral de la rata.....	4
Tabla 2. Peso corporal, ovarios y útero de las ratas Wistar administradas con el vehículo (SSI), DG o 26OH-DG a dosis de 50 µg/kg.....	11
Tabla 3. Resumen de los marcadores celulares en los ovarios de la rata; caspasa-3, VEGF y NGF en los ovarios de las ratas administradas con el vehículo, DG o 26OH-DG	29

Lista de abreviaturas

26OH-DG	26-hidroxidiosgenina
CE	Ciclo estral
CTI	Células teco-instersticiales
D	Diestro
DG	Diosgenina
E	Estro
e	Endometrio
EEM	Error estándar de la media
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ep	Epitelio endometrial
ESR1	Receptor a estradiol 1/ α
ESR2	Receptor a estradiol 2 β
FA	Folículos antrales
FAA	Folículos antrales atresicos
FAS	Folículos antrales sanos
FPA	Folículos preantrales atresicos
FPS	Folículos preantrales sanos
FSH	Hormona estimulante de los folículos
ge	Glándula endometrial
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
H&E	Hematoxilina-Eosina.
HEL	Células humanas leucémicas
HEp-2	Células humanas de cáncer de laringe
ICAM-1	Moléculas de adhesión intercelular
IGF-1	Factor 1 de crecimiento semejante a la insulina
KBM-5	Células mieloides leucémicas
LH	Hormona luteinizante
LIF	Factor inhibidor de la leucemia
M	Metaestro
M4Beu	Células de melanoma malignas
MARRS	Receptores 1,25D ₃ -MARRS
mi	Miometrio
NGF	Factor de crecimiento nervioso
P	Proestro
SSI	Solución Salina Isotónica
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante beta-1
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
VCAM-1	Moléculas de adhesión de las células vasculares
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

Resumen

La diosgenina (DG) y la 26-hidroxi-diosgenina (26OH-DG) son sapogeninas esteroidales inductoras de apoptosis en los folículos ováricos y en el útero de la rata a dosis de 0.1, 1.0 y 4.0 mg/Kg (ip). En este trabajo probamos su efecto a dosis de 50 µg/Kg. Usamos 63 ratas adultas jóvenes de la cepa Wistar con ciclos estrales regulares y 200g de peso que fueron divididas aleatoriamente en 9 grupos (n=7); ratas administradas con el vehículo, con DG y con 26OH-DG (ip) por 3 días en el metaestro, diestro y proestro del ciclo estral. Se obtuvo los ovarios y el útero en el diestro, proestro y estro del ciclo siguiente a la administración de las sustancias de prueba. Los órganos se pesaron, fijaron e incluyeron en parafina, se hicieron cortes histológicos (5 µm) que fueron teñidos con H&E. Posteriormente medimos el espesor del endometrio y miometrio y se contaron los folículos ováricos. El peso de las ratas, el peso del útero y la duración del ciclo estral no se modificaron con la DG o con la 26OH-DG. Sin embargo, el espesor del endometrio, miometrio, número de glándulas endometriales, número de folículos y cuerpos luteos aumentaron significativamente con DG en el diestro y proestro pero no en el estro. Con la administración de 26OH-DG, los parámetros anteriores no se modificaron en relación al grupo control. Estos resultados sugieren efecto estimulante de la DG sobre el útero y los ovarios que mejorarían la fertilidad.

INTRODUCCIÓN

La DG es una saponina obtenida de los tubérculos de *Discorea mexicana* o barbasco, una de las plantas mexicanas importantes para la industria farmacéutica desde el siglo pasado. Esta planta ha sido utilizada para la producción industrial de las hormonas esteroides como la progesterona y sus derivados que se utilizan como anticonceptivos y en terapias de reemplazo hormonal (Benghuzzi et al., 2003), otro producto es la cortisona, un potente antiinflamatorio (Cortés, 2010; Segura et al., 1982). Además, la DG se ha usado como antidiabético (Ravikumar & Anuradha, 1999), contra la hipercolesterolemia (Sauvaire et al., 1991), como antiinflamatorio y antioxidante (Manivannan et al., 2013). También para tratar infartos vasculares cerebrales, alergias y contra la obesidad (Roghani-Dehkordi, et al., 2015; Ravikumar & Anuradha, 1999).

Los efectos de la DG son múltiples y dependientes de la dosis, a 40 μM induce apoptosis y a 10 μM diferenciación de los megacariocitos (Cailleteau et al., 2009). También, en células de cáncer de ovario induce apoptosis (Gu et al., 2013; Chun et al., 2014; Selim & Al Jaouni, 2015) al detener el ciclo celular en las fases G1/G0, activa la expresión de la proteína p53, un factor proapoptótico, al factor NF- κ B, a P21 y a la caspasa-3, mediados por Bcl-2 y PARP e induciendo la muerte de las células (Raju & Mehta, 2009; Cai et al., 2014). La DG disminuye la viabilidad y la proliferación de las células humanas de cáncer de laringe (HEp-2) y de células de melanoma malignas (M4Beu) al aumentar la fosforilación de la proteína p53, activa a la caspasa-3, caspasa-9 y PARP (Corbiere et al., 2004). También reduce la inflamación al inhibir a la ciclooxigenasa e induce la muerte celular al activar la proteína p53 (Figura 1) y la síntesis de colesterol y de ácidos grasos (Raju & Mehta, 2009).

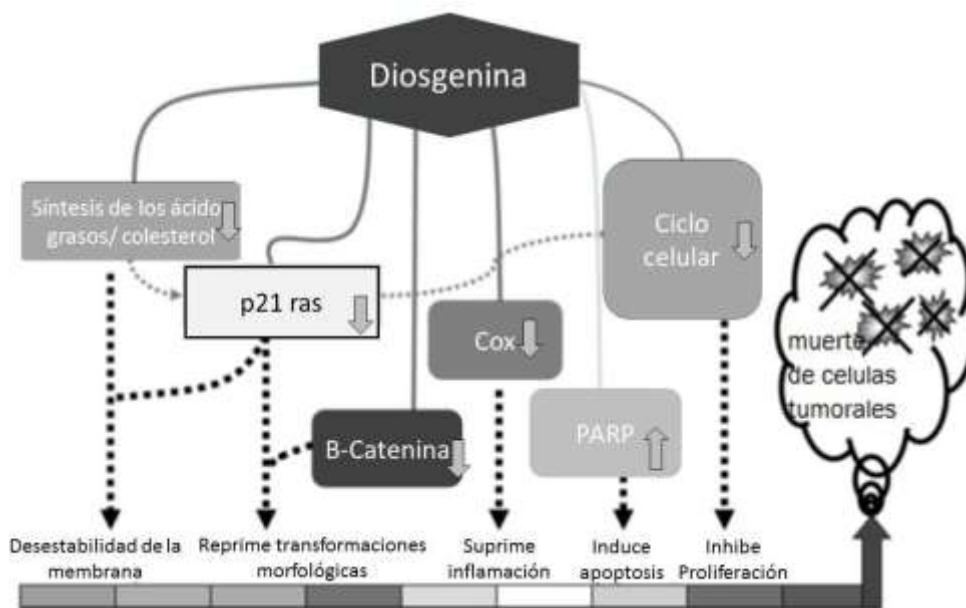


Figura 1. Respuestas farmacológicas de la diosgenina tomado y modificado (Raju & Mehta, 2009).

En glándula tiroides, la DG inhibe la hiperplasia, la hipertrofia y la secreción de hormonas tiroideas, también disminuye la proliferación de sus células al inhibir la producción de proteínas asociadas a la división y el ciclo celular (Cai et al., 2014). Además, interviene en la diferenciación y activación de apoptosis de las células humanas leucémicas (HEL) en forma dosis dependiente, se ha propuesto que la DG activa la vía de señalización Sonic Hedgehog (Ghezali et al., 2014). En células cancerosas de seno, la DG actúa a través del receptor ESR1 a estradiol, suprime a la ciclina D1 e inhibe la proliferación de las células al interrumpir el ciclo celular (Chun et al., 2014). Contrariamente, en cultivo de macrófagos la DG (250µg/ml) aumentó hasta 3.2 veces la proliferación (Selim & Al Jaouni, 2015), mientras que en cultivos primarios humanos de los tirocitos inhibió el ciclo celular dependiente de la dosis (15-30µmol/L) (Bian, et al., 2011). En células mieloides leucémicas (KBM-5), la DG tuvo un efecto citotóxico dependiente de la dosis (Shishodia & Aggarwal, 2006) y en cultivo primario de células de Sertoli, la DG aumentó la viabilidad, un efecto que dependió de la concentración (0.01-2.5 µM), los autores reportaron interacción compleja que afectó el progreso del ciclo celular y la apoptosis haciendo mayor translocación de los receptores ESR1 y ESR2 a estradiol (Wu et al., 2015).

En ratonas ovariectomizadas, la DG aumentó el espesor de la epidermis, sin alterar la acumulación de grasa (Tada et al., 2009) y en ratones 5XFAD, reestableció la memoria, el crecimiento de los axones y aumentó la actividad sináptica de las neuronas de la corteza

y del hipocampo. Se ha propuesto que estas sus acciones de la DG son a través del receptor 1,25D₃-MARRS de respuesta rápida (Tohda et al., 2012).

En estudios previos de nuestro grupo de trabajo realizados en ratas de la cepa Wistar se probó que tanto DG como la 26OH-DG a 4 mg/Kg administradas por vía intraperitoneal inhiben el desarrollo de los folículos ováricos y disminuyen el espesor del endometrio y del miometrio uterino (Amaro López, 2015; Hilario-Martinez et al., 2015). Sin embargo, la 26OH-DG a dosis de 50 µg/kg (Campos-Sandoval, 2018) y 1.0 mg/kg aumentó el número de folículos en desarrollo (Amaro López, 2015).

En síntesis, la diferenciación, la proliferación o la apoptosis de las células son respuestas debidas tanto a factores genéticos como a factores ambientales. En ellas hay modificación de la transcripción de diversos genes, la circulación de la sangre aumenta o disminuye como resultado de la cantidad de arterias y venas y consecuentemente, el aporte de los nutrientes. La desregulación de estos procesos está ligada a diferentes estados fisiológicos normales de la reproducción o a patologías como el cáncer, la diabetes y la obesidad. Por lo que es atractivo estudiar “*in vivo*” el efecto farmacológico de nuevos compuestos con interferencia el desarrollo celular que son clave para el desarrollo de nuevos fármacos.

Los ovarios y el útero en las diferentes fases del ciclo estral de la rata

El ciclo estral de las ratas tienen 4 fases; proestro, estro, metaestro y diestro. En el proestro, los folículos ováricos crecen rápido, pero a la vez, los cuerpos lúteos del ciclo previo degeneran, y en el útero hay distensión la luz por la acumulación del líquido. En el estro, los folículos alcanzan la maduración y ocurre la ovulación, mientras que, en el útero, la distensión es máxima e inicia la degeneración vacuolar de su epitelio. En el metaestro, se forman los cuerpos lúteos y en el útero la degeneración vacuolar es máxima. Finalmente, en el diestro, los cuerpos lúteos crecen y los folículos en crecimiento tienen tamaño variable, mientras que el endometrio regenera (de la Cruz & Pásaro, 1998). Estos cambios ocurren por acción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), que actúa sobre la hipófisis anterior e induce la liberación de la hormona estimulante de los folículos (FSH) y hormona luteinizante (LH). Por citología vaginal, podemos conocer los cambios cíclicos que ocurren en su epitelio a lo largo del ciclo estral de la rata (Figura 2). En la tabla 1 se resumen los cambios que ocurren en los ovarios, útero y vagina de las ratas durante el ciclo estral.

Durante el ciclo estral, las concentraciones hormonales se modifican en las ratas por la acción reguladora del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Figura 3) (Asarian & Geary, 2013).

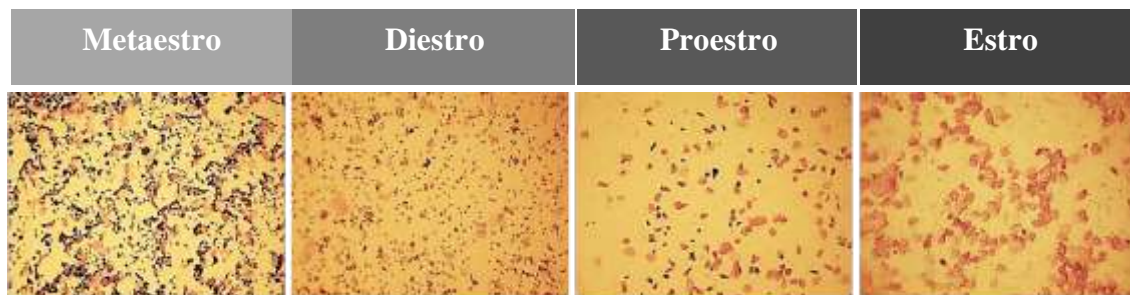


Figura 2. Micrografías representativas de citología vaginal de la rata Wistar teñidas con hematoxilina-eosina. Amplificación 10X.

Tabla 1 Características morfológicas de las células en los ovarios, útero y vagina durante el ciclo estral de la rata

FASE	OVARIO	ÚTERO	VAGINA
Metaestro	Formación de cuerpos lúteos	Degeneración vacuolar, pero también regeneración.	Descamación del epitelio queratinizado. Epitelio delgado. Invasión de leucocitos. Frotis vaginal con abundancia de células escamosas.
Diestro	Crecimiento de los cuerpos lúteos, folículos de varios tamaños.	Regeneración del epitelio uterino.	Epitelio delgado, regeneración del epitelio, frotis vaginal con abundancia de leucocitos y células epiteliales.
Proestro	Crecimiento rápido de folículos. Degeneración de los cuerpos lúteos del ciclo previo.	Útero distendido por fluido aumentado.	Epitelio grueso, células epiteliales superficiales, frotis vaginal con abundantes células epiteliales.
Estro	Maduración de folículos, ovulación.	Máxima distención, Inicio de degeneración vacuolar del epitelio uterino.	Epitelio grueso, capa de células queratinizadas en superficie, frotis vaginal con abundantes células escamosas.

(Gartner, 2008)

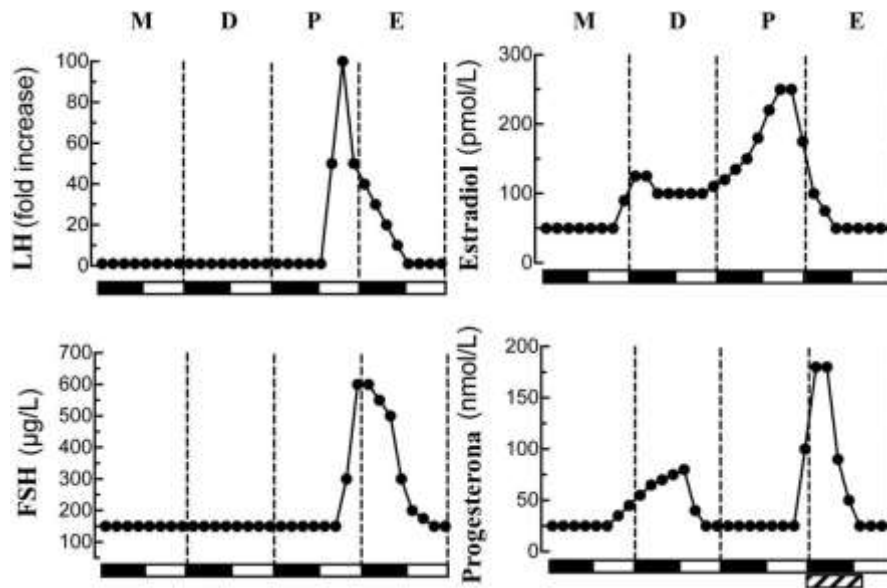


Figura 3. Concentración plasmática de LH, FSH, estradiol y progesterona durante el ciclo ovárico de las ratas con ciclos luz/oscuridad de 12: 12 horas (Asarian & Geary, 2013).

El endometrio del útero está constituido por epitelio cilíndrico simple y lámina propia. El epitelio se compone de células cilíndricas secretorias no ciliadas y ciliadas, en tanto que la lámina propia contiene glándulas tubulares simples ramificadas que se extienden hasta el miometrio. Aunque las células glandulares se asemejan a las del epitelio de superficie, las glándulas carecen de células ciliadas. Mientras que el miometrio está compuesto por la capa longitudinal interna, circular media y longitudinal externa de músculo liso (Gartner, 2008).

El desarrollo de los folículos ováricos se divide en cuatro estadios: primordiales, primarios, secundarios y preovulatorios. Los folículos primordiales están compuestos por una capa de células foliculares aplanadas que rodean el ovocito primario que se separan del estroma ovárico por una membrana basal. Hay dos tipos de folículos primarios unilaminares y multilaminares según el número de capas de células foliculares que rodean el ovocito. Los folículos secundarios son similares a los primarios excepto por la presencia de acumulaciones de líquido folicular entre las células de la granulosa. Los folículos preovulatorios, también se conocen como folículos maduros; estos folículos son los que liberan el ovocito durante la ovulación. Los folículos que se degeneran son folículos atróficos, un fenómeno que ocurre en cualquier etapa del desarrollo de los folículos (Gartner, 2008).

JUSTIFICACIÓN

Por lo anterior, estudiar nuevos compuestos orgánicos con actividad biológica que interfieran en la proliferación o en la apoptosis es clave para desarrollar nuevos tratamientos contra las enfermedades que afectan a los humanos. Desde el punto de vista del desarrollo biotecnológico, estos estudios son importantes para proponer nuevos fármacos.

La diferenciación, proliferación y apoptosis son respuestas de las células debidas a factores genéticos y epigenéticos. En ellas, la transcripción de los genes aumenta o disminuye modificando la estructura y la función de las células en los tejidos del organismo. Los tejidos en desarrollo requieren el aporte de nutrientes dado por la mayor circulación de la sangre a través de las arterias y venas que previamente se desarrollaron. La desregulación de estos procesos está ligada a numerosas patologías como; cáncer, diabetes y obesidad, entre otros.

Previamente, en nuestro laboratorio se ha probado el efecto de la DG y 26OH-DG a dosis de 0.1, 1.0 y 4.0 mg/kg en la rata Wistar y estudiado el desarrollo folicular, la ovulación y el desarrollo de endometrio y miometrio uterino. A estas dosis, las dos sapogeninas producen apoptosis tanto en los ovarios como en el útero de las ratas. Sin embargo, a dosis de 0.1 mg/kg se estimuló el desarrollo folicular (López, 2015; Hilario-Martínez et al., 2015). En este trabajo estudiaremos el efecto de la DG y de la 26OH-DG a dosis de 50 µg/kg sobre el desarrollo folicular y desarrollo del útero de la rata en diferentes momentos del ciclo reproductivo. Lo anterior con el fin de conocer la acción de las sapogeninas a dosis bajas en la distinta concentración de hormonas que regulan el ciclo reproductivo de la rata.

HIPÓTESIS

La DG o la 26OH-DG estimulan el desarrollo folicular, la ovulación y el desarrollo del útero de la rata Wistar.

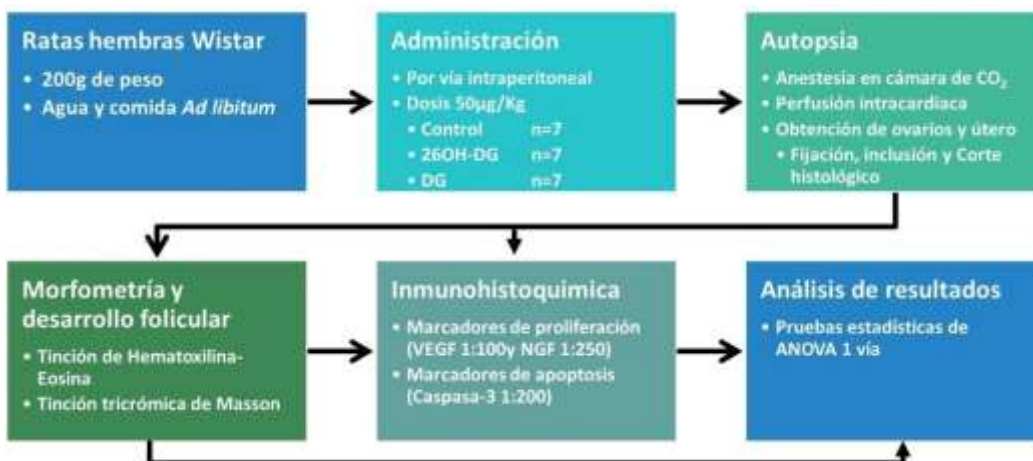
OBJETIVO GENERAL

Probar el efecto agudo de la DG y la 26OH-DG sobre los ovarios y el útero de la rata Wistar en diferentes fases del ciclo estral.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el desarrollo folicular y la ovulación de ratas administradas con 50 µg/kg de DG o 26OH-DG en la fase de metaestro, diestro y proestro.
2. Evaluar el desarrollo del endometrio y miometrio uterino de ratas administradas con 50 µg/kg de DG o 26OH-DG en la fase de metaestro, diestro y proestro.

DIAGRAMA DE TRABAJO



MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Los procedimientos experimentales se realizaron siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 que establece las especificaciones técnicas sobre la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Además, Javier García Castañeda fue capacitado por profesionales del bioterio “Claude Bernard” de la BUAP y certificado para el manejo y vías de administración en ratas de laboratorio.

Utilizamos ratas de la cepa Wistar con 180-200 gramos de peso del bioterio Claude Bernard de la BUAP. Las ratas fueron mantenidas en condiciones estándar; 20 ± 2 grados Celsius, fotoperiodos de luz-oscuridad de 12 horas, humedad al 50 % y a libre acceso al alimento y al agua. El seguimiento del ciclo estral (CE) de las ratas lo realizamos por citología vaginal entre las 8:00-9:00 horas, las muestras fueron teñidas por Hematoxilina & Eosina y analizadas bajo microscopio óptico de campo claro, se tomaron fotografías, mismas que se guardaron en PC para posterior análisis. Previo a la administración del vehículo, DG o 26OH-DG registramos dos CE consecutivos de 4 días, mismos que sirvieron como criterio de inclusión a de los animales experimentales en los diferentes grupos. Posteriormente continuamos el registro del CE para conocer el momento del sacrificio y la obtener los ovarios y el útero.

Administración de DG o 26OH-DG por vía intraperitoneal

Usamos suspensiones patrón de DG o 26OH-DG de 1.0 mg/ml. Las sustancias fueron disueltas en 10 μ l de alcohol etílico absoluto, posteriormente se diluyeron con solución salina isotónica al 0.9% (SSI) obteniendo una suspensión, la concentración final de alcohol etílico fue del 1%. Las suspensiones fueron almacenadas en oscuridad a 4 grados Celsius. Antes de la administración, las suspensiones se diluyeron a hasta 100 μ g/ml y las administramos dosis de 50 μ g/Kg. Aplicamos dosis únicas por 3 días consecutivos en el metaestro (M), diestro (D) y proestro (P) entre las 8:00-10:00 horas y las muestras fueron obtenidas en el D, P y E posteriores al tratamiento.

Obtención y tratamiento de los ovarios y útero de las ratas

Las ratas fueron colocadas en cámara CO₂ e inmediatamente después perfundidas por vía intracardiaca con SSI por 20 minutos y posteriormente con buffer de fosfatos-paraformaldehído al 4 % por otros 20 minutos. Posteriormente disecamos el útero y los ovarios y obtuvimos su peso húmedo en una balanza de precisión. Los órganos se

mantuvieron en paraformaldehído al 4 % hasta su inclusión en parafina. Los ovarios y un segmento de un centímetro del cuerno uterino derecho se deshidrataron en alcohol a concentración creciente de 70, 80, 96 y 100 %, respectivamente. Después se colocaron en xileno, parafina líquida y finalmente se realizaron los bloques de parafina. Posteriormente se realizaron cortes histológicos de 5 micras de espesor que se tiñeron con Hematoxilina-Eosina. Los cortes se observaron en un microscopio de campo claro, se obtuvieron fotografías con una cámara acoplada al microscopio, mismas que se almacenaron en una PC. Finalmente medimos el espesor de la mucosa, del miometrio y del endometrio con el software Motic 2.0. En los ovarios y con base en su morfología celular contamos los folículos preantrales sanos (FPS), folículos preantrales atrésicos (FPA), folículos antrales sanos (FAS), folículos antrales atrésicos (FAA).

Inmunohistoquímica

Los cortes histológicos fueron desparafinados, hidratados y lavados con buffer de fosfatos-Triton al 2%; la recuperación antigénica se realizó con buffer de citratos a pH de 6 a 55 grados Celsius y los epitopes se bloquearon con albumina libre de IgG. El anticuerpo primario fue incubado en cámara húmeda por 18 horas, posteriormente lavado con buffer de fosfatos mientras que el anticuerpo secundario fue incubado por 2 horas a temperatura ambiente y lavado con buffer de fosfatos-tritón al 2% y después con buffer de fosfatos. Los núcleos se tiñeron con yoduro de propídido y finalmente los cortes histológicos fueron lavados, montados con vectashield y sellados con barniz para uñas. Las muestras se mantuvieron a 4 grados Celsius y en oscuridad hasta tomar fotografías en el microscopio UV. Las laminillas se observaron usando un microscopio Leica-DM100, se tomaron fotografías mismas que se almacenaron en una PC. Por último y con el programa IM50 se contabilizaron las células positivas.

Análisis estadístico

La comparación estadística de los datos se realizó con la prueba t de Student y con una prueba ANOVA de 1 vía y los grupos fueron diferentes cuando la probabilidad fue menor al 5 %. En las gráficas está el promedio \pm EEM del espesor de la mucosa, endometrio, miometrio y número de glándulas endometriales. Se calculó el promedio de folículos ováricos en las categorías de: folículos preantrales sanos (FPS), folículos preantrales atrésicos (FPA), folículos antrales sanos (FAS) y folículos antrales atrésicos (FAA). Se obtuvo el número promedio de cuerpos lúteos y de células inmuno-positivas.

RESULTADOS

Peso corporal y peso húmedo de los ovarios y del útero

En el peso corporal de las ratas administradas con la DG o con la 26OH-DG no se modificó en comparación con las ratas administradas con SSI, ANOVA, (Tabla 2). Sin embargo, el peso de los ovarios de las ratas administradas con 26OH-DG aumentó en relación a las ratas del grupo control. Contrariamente, con DG, el peso de los ovarios disminuyó (Tabla 2). El peso del útero de las ratas las ratas tratadas con 26OH-DG no se modificó en relación a las ratas del grupo control, mientras que con la administración de DG disminuyeron (Tabla 2).

Tabla 2. Peso corporal y peso húmedo de los ovarios y útero de las ratas Wistar administradas con el vehículo (SSI), DG o 26OH-DG a dosis de 50 µg/kg. * $p \leq 0.5$ ANOVA.

Grupo	Peso corporal	Ovarios (mg/100g)	Útero (mg/100g)	Duración del CE	Sacrificio
Vehículo	198±3	20.1±2.0	177±7.8	4	Diestro
DG	197±3.8	22.1±1.7	165±13.0	4	Diestro
26OH-DG	193±2.7	18.7±1.0	189±8.3	4	Diestro
Vehículo	206±5.3	22.1±2.5	239±32.5	4	Proestro
DG	212±5.7	23.8±1.3	259±25.3	4	Proestro
26OH-DG	197±2.3	18.1±1.6	235±24.0	4	Proestro
Vehículo	202±3.2	24.6±2.0	277±21.2	4	Estro
DG	202±5.7	29.4±1.3*	261±12.8	4	Estro
26OH-DG	200±2.3	20.6±1.3*	245±12.9	4	Estro

Espesor del epitelio endometrial, endometrio y miometrio uterino

En la figura 4 se muestran micrografías panorámicas representativas de cortes histológicos en sección transversal del útero de las ratas administradas con el vehículo, con DG o con 26OH-DG en la fase de diestro, proestro y estro del ciclo estral de las ratas. En la figura 5, a mayor aumento regiones representativas que muestra el epitelio endometrial, endometrio y miometrio del útero y que a continuación se describen.

Espesor del epitelio endometrial de las ratas administradas DG aumentó significativamente 47 % en el diestro en relación a las ratas control, mientras que con 26OH-DG disminuyó 17 % en el proestro y no se modificó en la fase de estro (Figura 6A). Además, el espesor del endometrio de las ratas administradas DG aumentó significativamente 48% en el proestro en relación con las ratas control (Figura 6B). Mientras que con 26OH-DG, este parámetro no se modificó en ninguna de las fases del ciclo estral de las ratas reportadas aquí (Figura 6B). También, el espesor del miometrio de las ratas administradas DG aumentó significativamente 41 % en el proestro y 64 % en

el diestro en comparación con las ratas control, mientras que con la 26OH-DG no se modificó en ninguna de las fases estudiadas (Figura 6C), $*p < 0.05$, ANOVA.

En la figura 6D se muestra la gráfica del espesor del útero. En el diestro y proestro de las ratas administradas con DG, el espesor del útero aumentó, sin embargo, solo en el proestro fue significativamente mayor llegando a 47 %. Con 26OH-DG el espesor del útero no se modificó en ninguna de las fases del ciclo estral estudiadas (Figura 6D), $*p < 0.05$, ANOVA.

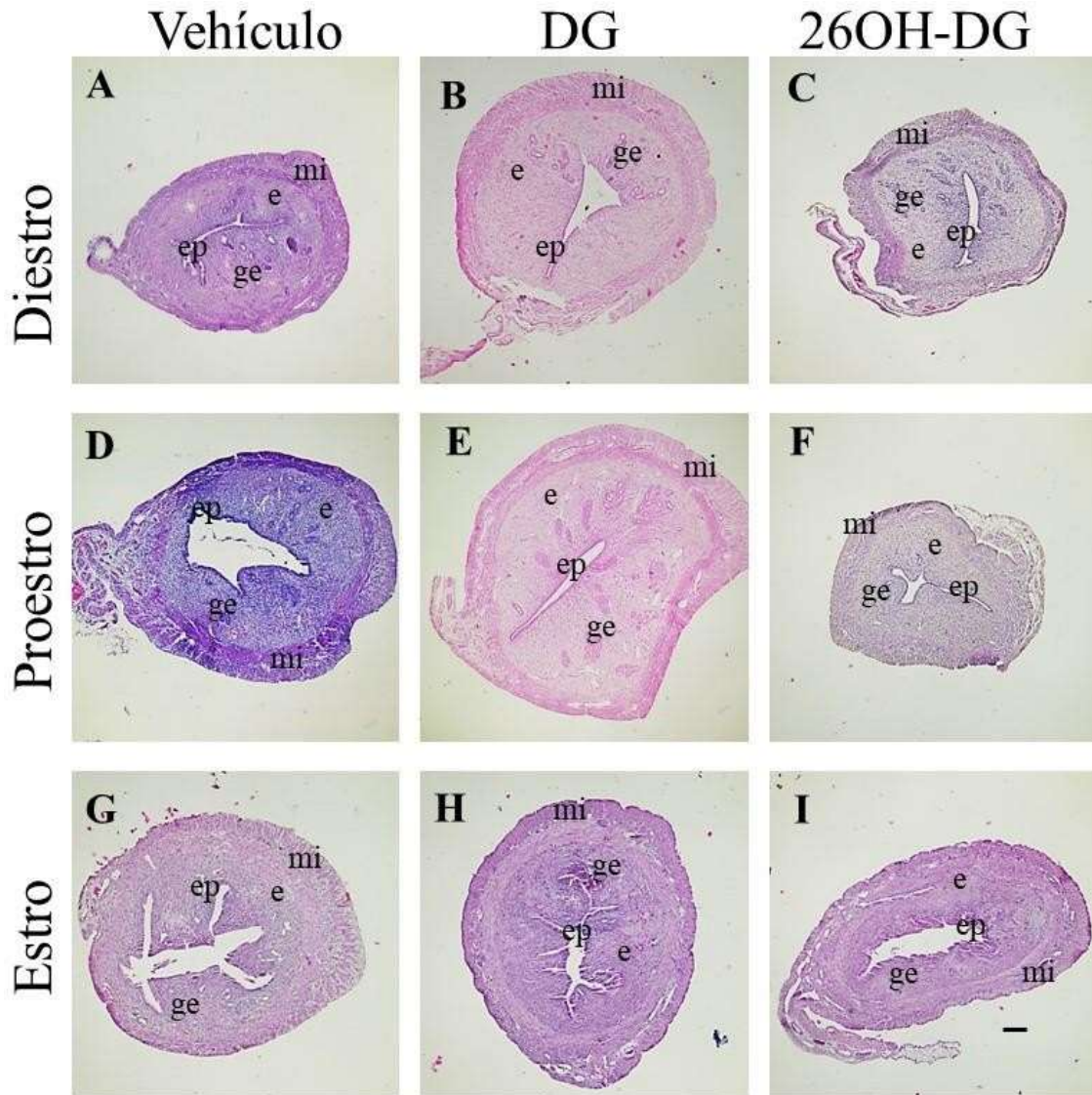


Figura 4. Micrografías panorámicas representativas de cortes histológicos transversales del útero derecho de ratas Wistar administradas con el vehículo, DG o 26OH-DG (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Los cortes histológicos fueron teñidos con H&E. Endometrio (e), miometrio (mi), epitelio endometrial (ep), glándula endometrial (ge). Escala 200 μm . A) Útero con vehículo en el diestro, B) Útero con DG en el diestro, C) Útero con 26OH-DG en el diestro, D) Útero con vehículo en el proestro, E) Útero con DG en el proestro, F) Útero con 26OH-DG en el proestro, G) Útero con vehículo en el estro, H) Útero con DG en el estro, I) Útero con 26OH-DG en el estro.

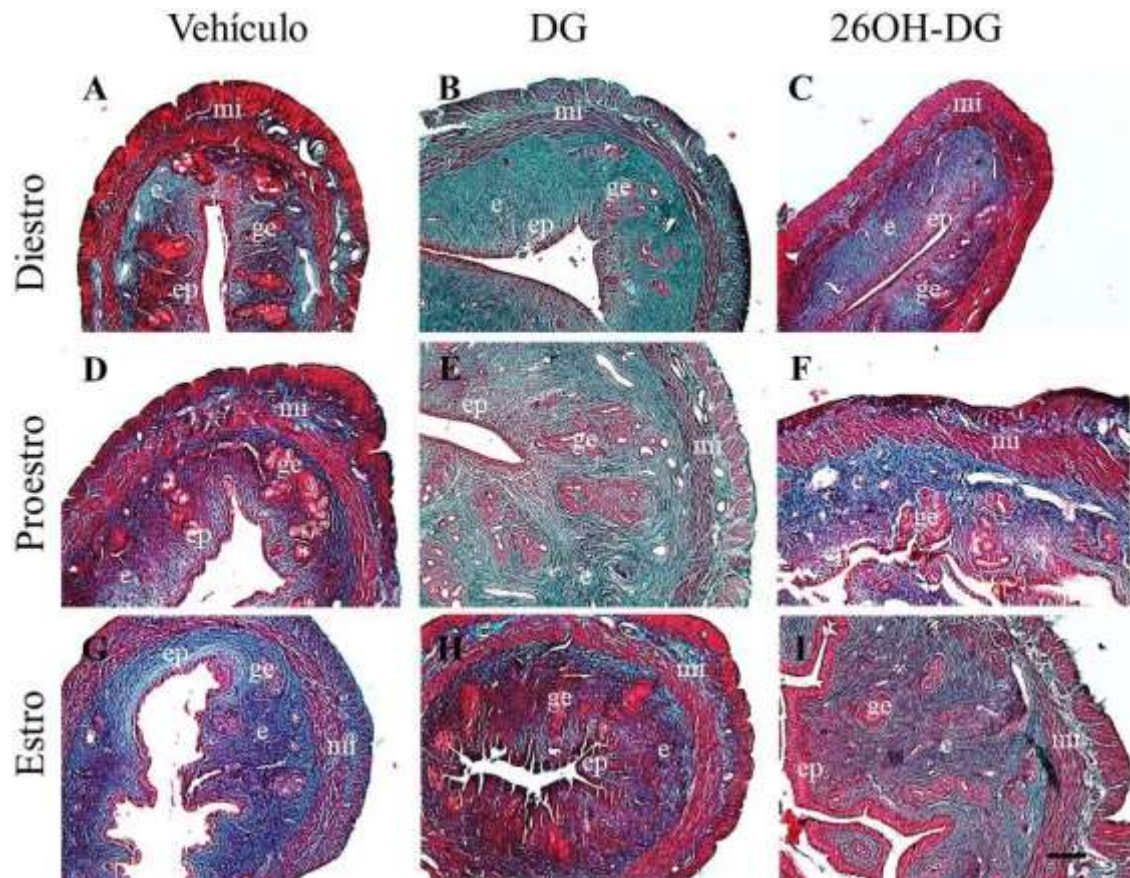
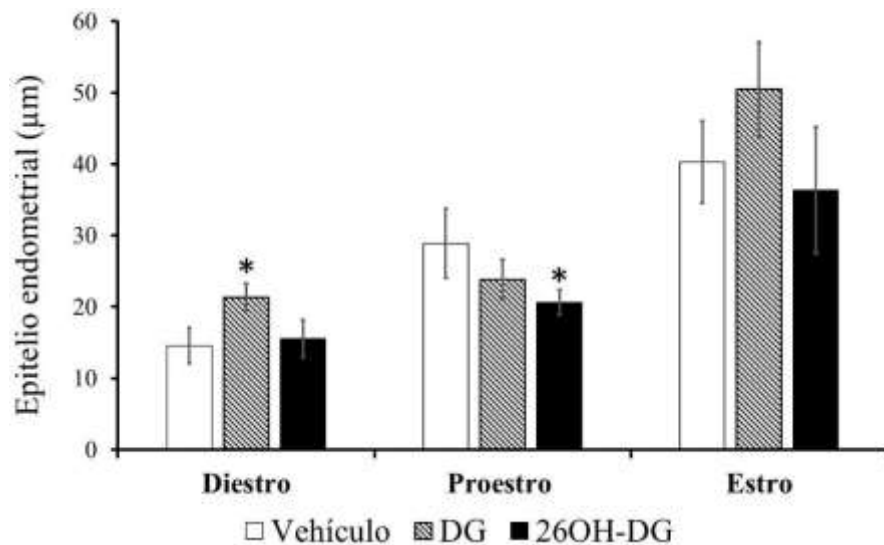


Figura 5. Cortes transversales representativos del útero derecho de las ratas Wistar administradas con el vehículo, DG o 26OH-DG (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Los cortes histológicos fueron teñidos con la técnica Tricrómica de Masson. Endometrio (e), miometrio (mi), epitelio endometrial (ep), glándula endometrial (ge). Escala, 200 micras. A) Útero con vehículo en el diestro, B) Útero con DG en el diestro, C) Útero con 26OH-DG en el diestro, D) Útero con vehículo en el proestro, E) Útero con DG en el proestro, F) Útero con 26OH-DG en el proestro, G) Útero con vehículo en el estro, H) Útero con DG en el estro, I) Útero con 26OH-DG en el estro.



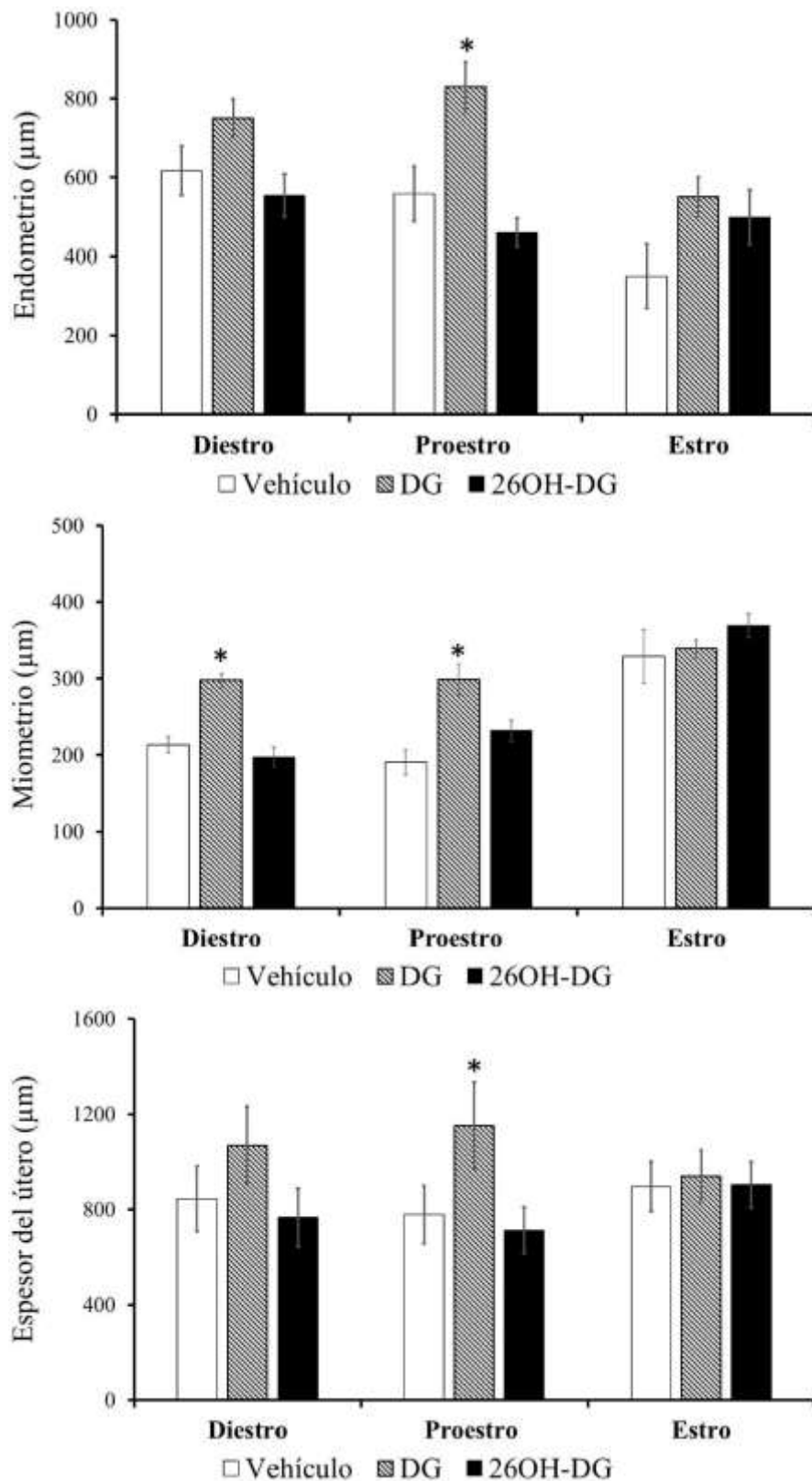


Figura 6. A. Espesor del epitelio endometrial; B. Espesor del endometrio; C. espesor del miometrio; D. Espesor del total del útero de las ratas Wistar administradas con el vehículo, DG o 26OHDG (50 µg/kg). Las barras representan la media y el EEM, *p≤0.5 ANOVA.

Glándulas endometriales

En las ratas administradas DG, el número de glándulas endometriales aumento significativamente 37% en el diestro y 116% en la fase de proestro en relación a los animales del grupo control, mientras que con la administración de 26OH-DG no se modificó su número en ninguna de las fases des ciclo estral estudiado (Figura 7), * $p < 0.05$, ANOVA.

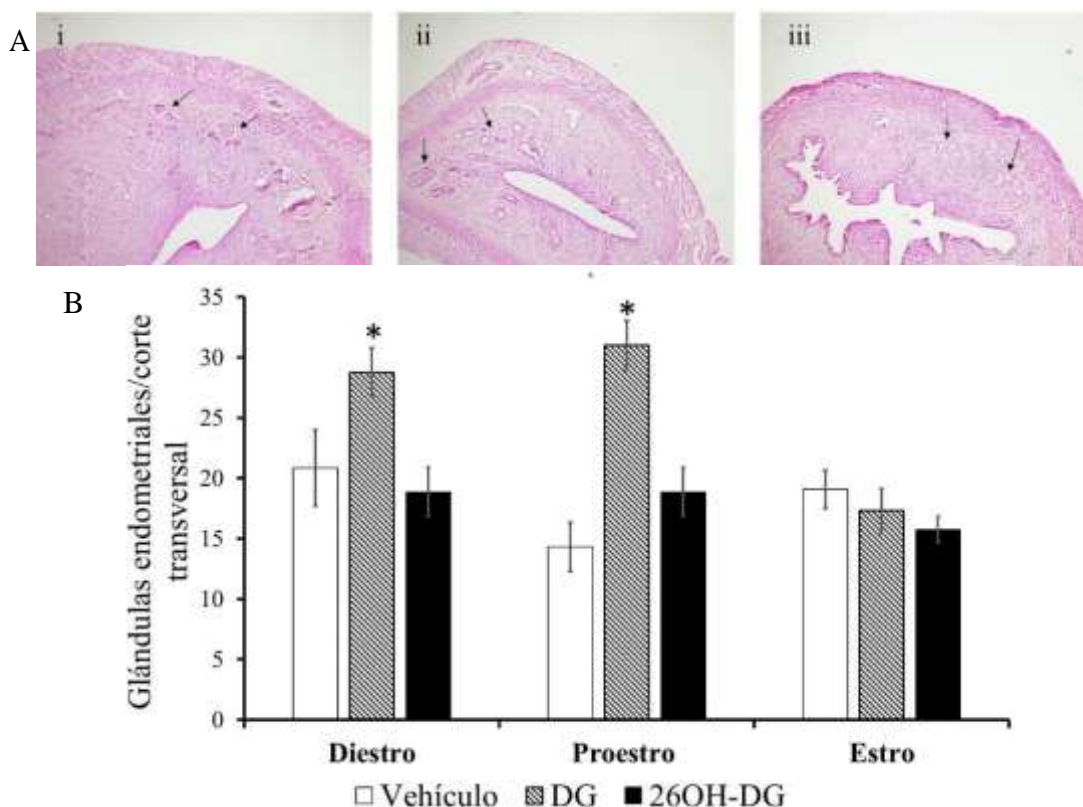


Figura 7. A. Micrografía de sección transversal representativo del útero con glándulas del endometrio de las ratas Wistar indicadas con fechas. i, vehículo, ii, DG y iii, 26OH-DG. B. Gráfica con el número de glándulas endometriales. Las barras representan la media \pm EEM, * $p \leq 0.5$ ANOVA.

Folículos ováricos sanos y atrésicos

En las figuras 8, se muestran folículos en diferentes estados de desarrollo; FPS, FPA, FAS y FAA teñidos con la tinción de tricrómica de Masson. El número de FPS, FAS y FAA aumentaron significativamente 0.97, 0.59 y 0.2 veces respectivamente en los ovarios de las ratas administradas DG en el diestro en comparación con el grupo control, mientras que con 26OH-DG no se modificaron (Figura 9) indicar en la figura. En el proestro incrementaron significativamente los FPS y FAS 0.91 y 0.44 veces respectivamente, mientras que los FPA disminuyeron 0.44 y 0.41 veces tanto en ratas

administradas con DG como con 26OH-DG (Figura 10). En el estro, los FPA y los FAA aumentaron significativamente 0.62 y 0.67 veces en las ratas administradas con DG, mientras que con 26OH-DG no se modificó su número (Figura 11), * $p < 0.05$, ANOVA.

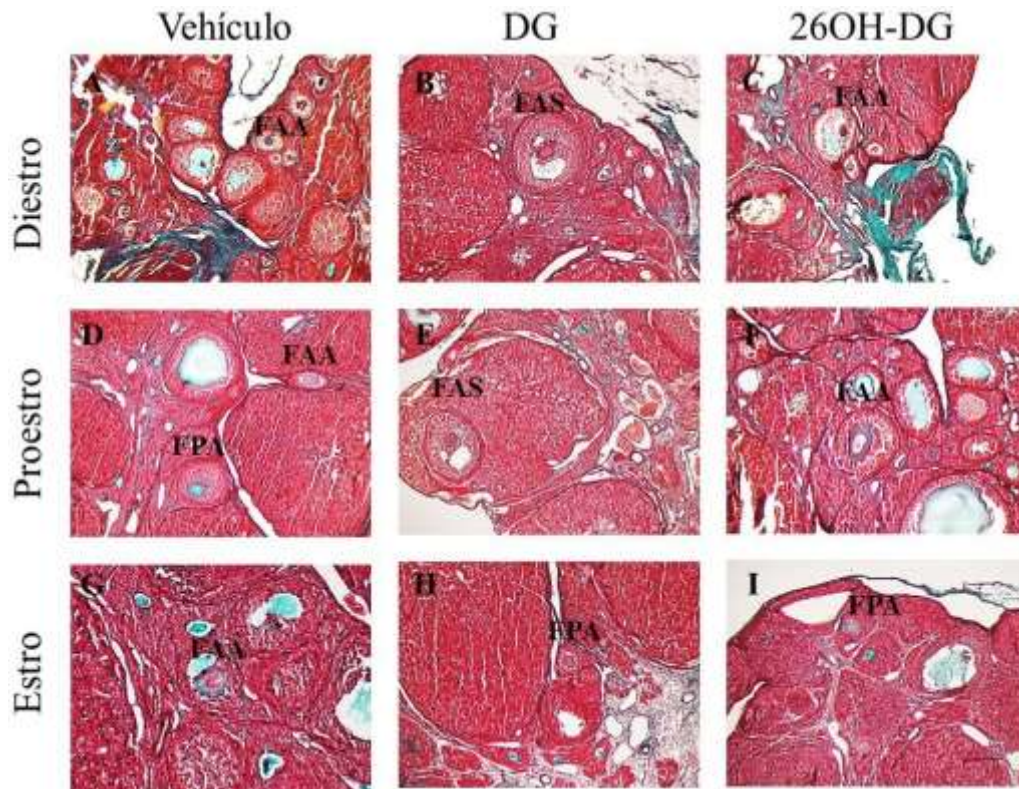


Figura 8. Cortes histológicos representativos de los ovarios en diestro, proestro y estro teñidos con la tinción de Tricrónica de Masson. Vehículo (SSI, 0.9%), DG o 26OH-DG (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Folículo preantrales sanos (FPS), folículo preantrales atrésicos (FPA), folículos antrales sanos (FAS) y folículos antrales atrésicos (FAA), cuerpo lúteo (cl). Escala 200 μm . A) Ovario con vehículo en el diestro, B) Ovario con DG en el diestro, C) Ovario con 26OH-DG en el diestro, D) Ovario con vehículo en el proestro, E) Ovario con DG en el proestro, F) Ovario con 26OH-DG en el proestro, G) Ovario con vehículo en el estro, H) Ovario con DG en el estro y I) Ovario con 26OH-DG en el estro.

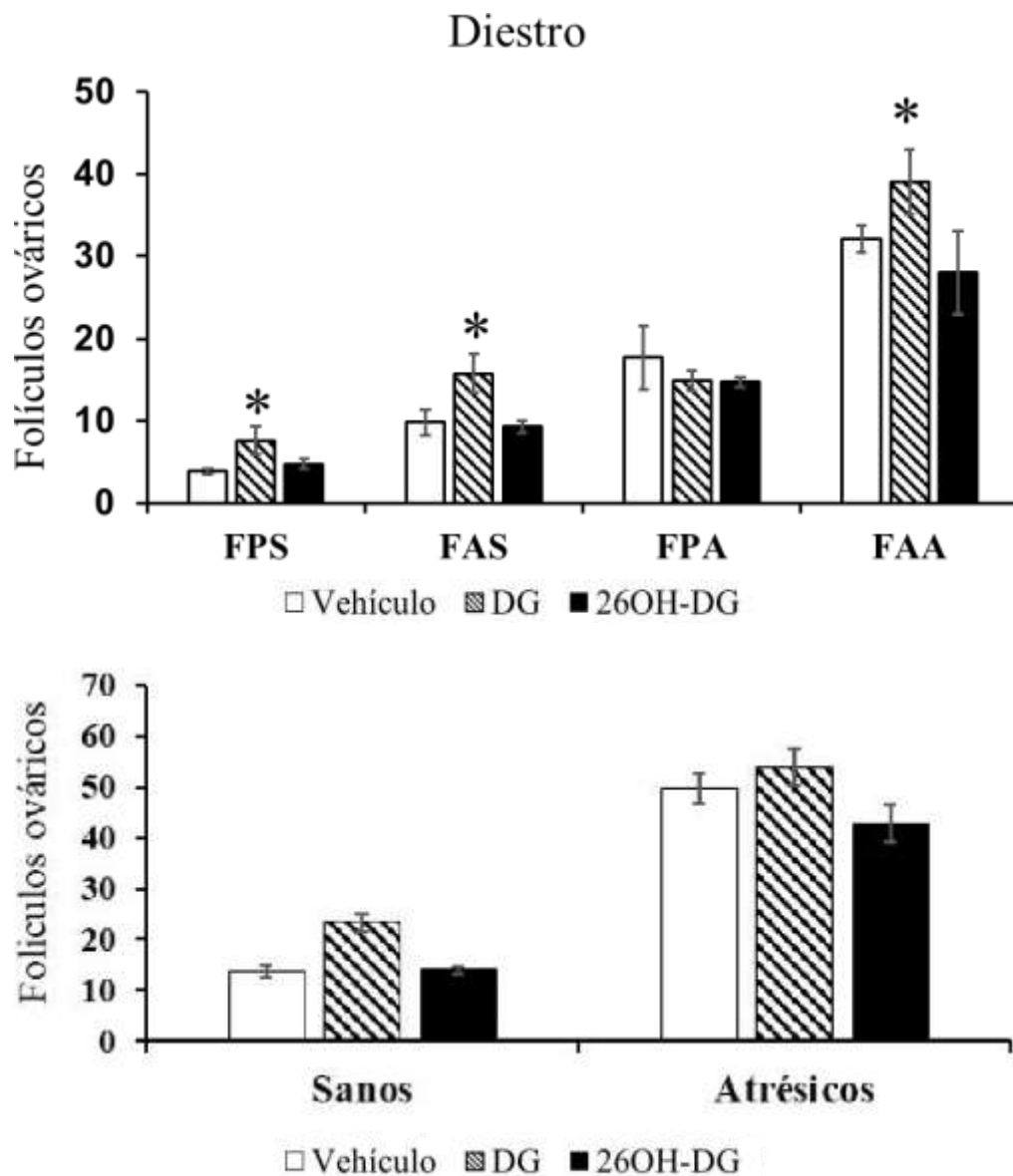


Figura 9. Folículos ováricos en la rata Wistar en diestro. Vehículo (SSI, 0.9%), DG o 26OH-DG (50 μ g/kg). Folículos preantrales sanos (FPS), folículos antrales sanos (FAS), folículos preantrales atrésicos (FPA) y folículos antrales atrésicos (FAA). Las barras representan la media \pm EEM, * $p \leq 0.05$ ANOVA.

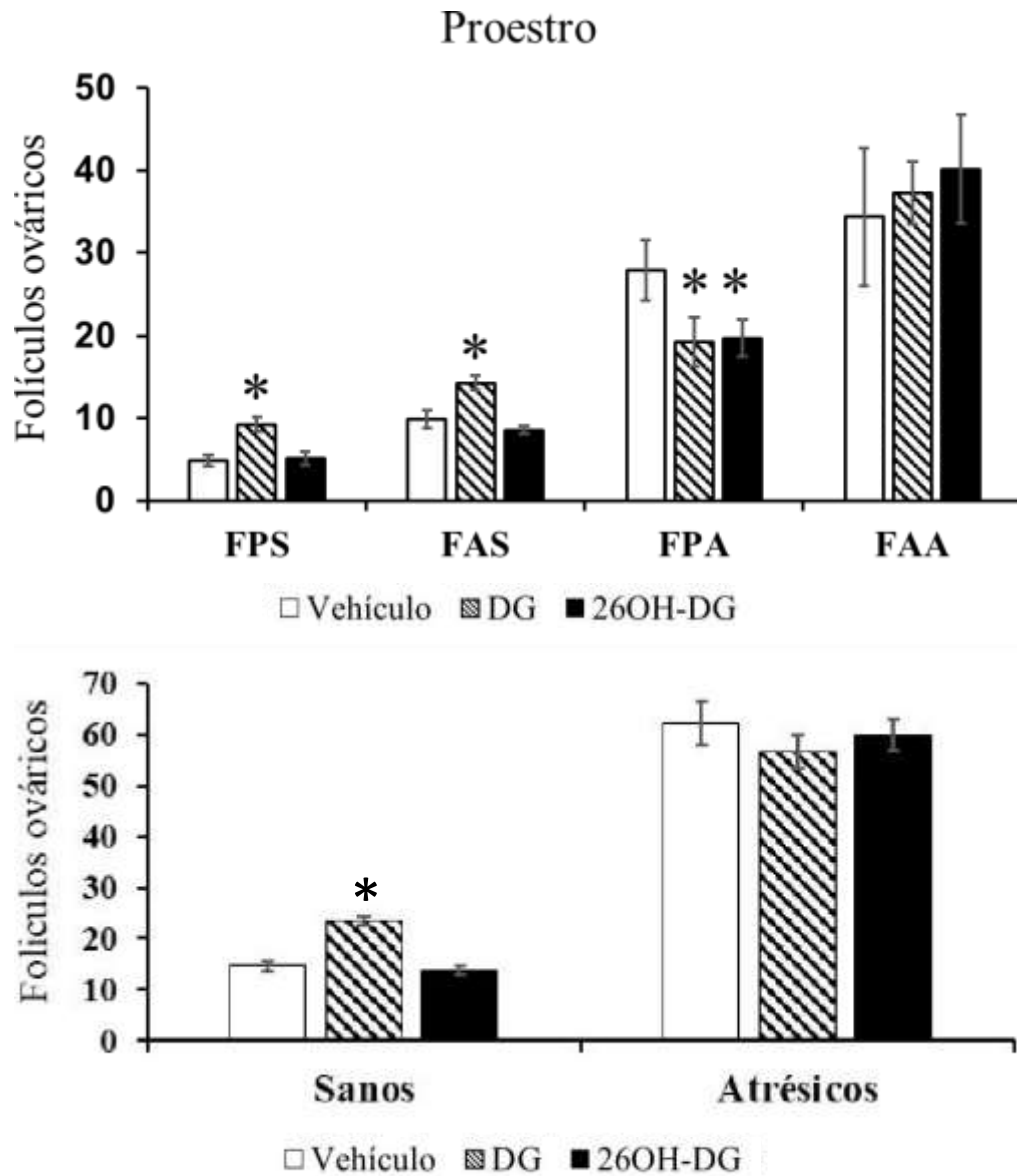


Figura 10. Folículos ováricos en la rata Wistar en proestro. Vehículo (SSI, 0.9%), DG o 26OH-DG (50 μ g/kg). Folículos preantrales sanos (FPS), folículos antrales sanos (FAS), folículos preantrales atrésicos (FPA) y folículos antrales atrésicos (FAA). Las barras representan la media \pm EEM, * $p \leq 0.05$ ANOVA.

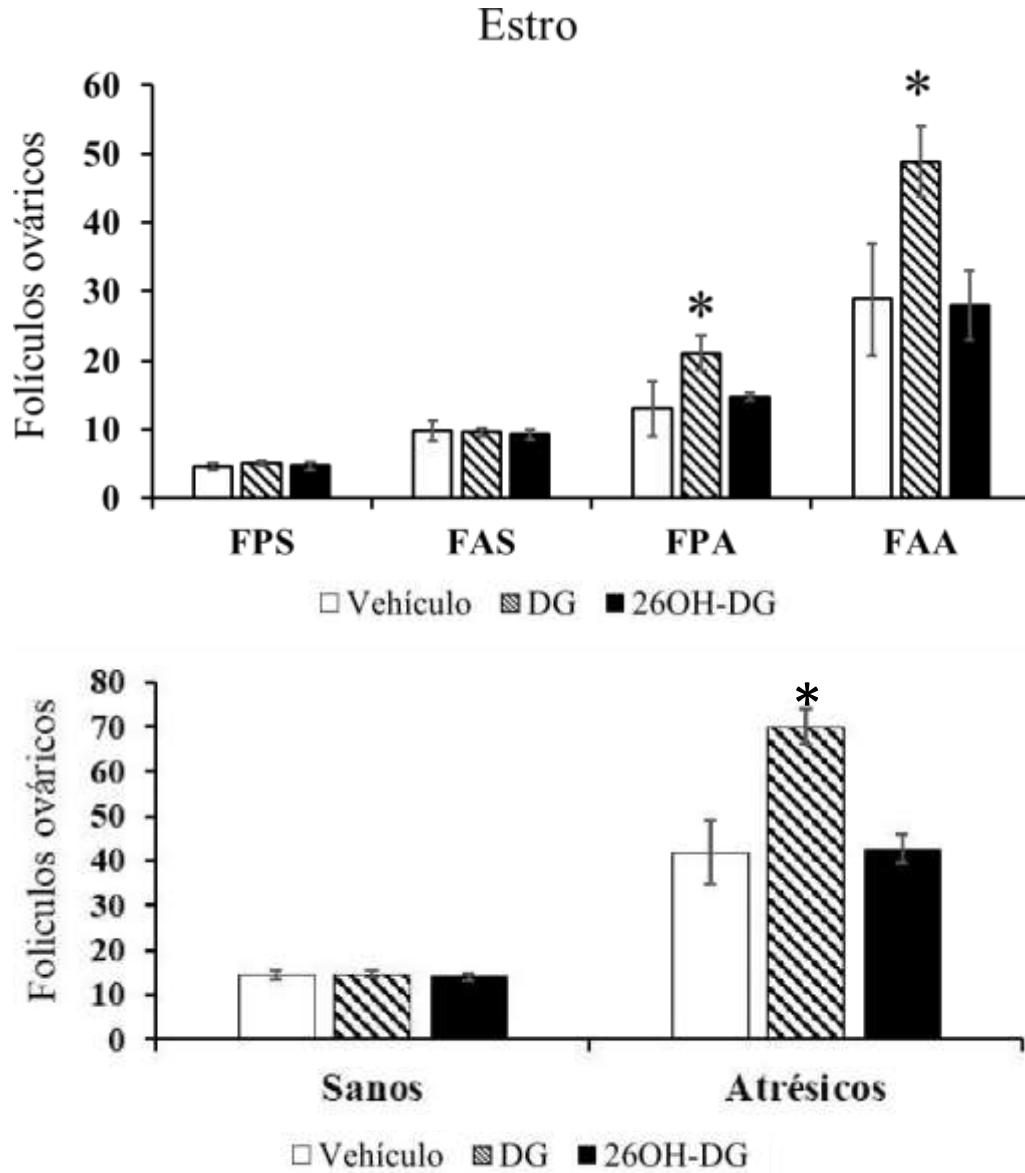


Figura 11. Folículos ováricos en la rata Wistar en estro. Vehículo (SSI, 0.9%), DG o 26OH-DG (50 μ g/kg). Folículos preantrales sanos (FPS), folículos antrales sanos (FAS), folículos preantrales atrésicos (FPA) y folículos antrales atrésicos (FAA). Las barras representan la media \pm EEM, * $p \leq 0.05$ ANOVA.

Cuerpos lúteos

El número de cuerpos lúteos aumentó significativamente 0.66 veces en las ratas administradas con DG y disminuyó significativamente 0.15 veces en las ratas administradas con 26OH-DG (Figura 12).

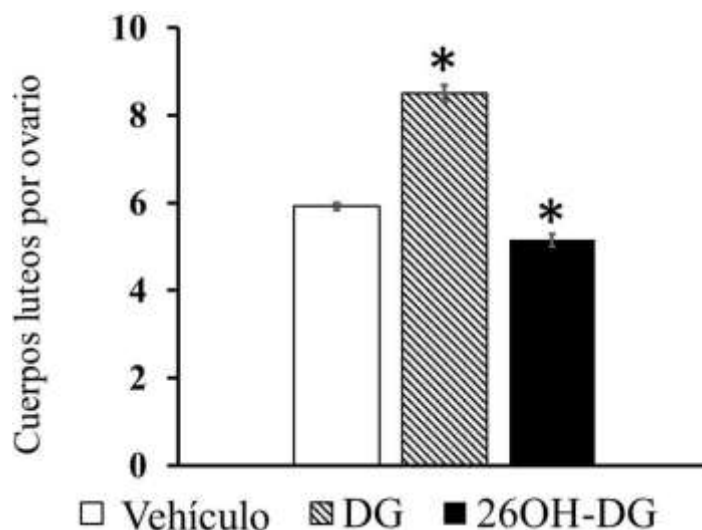


Figura 12. Cuerpos lúteos en la rata Wistar. Vehículo (SSI, 0.9%), DG o 26OH-DG (50 µg/kg). Las barras representan la media ±EEM, *p<0.5 ANOVA.

Identificación por inmunohistoquímica de células caspasa3-positivas en los ovarios

En las figuras 13, 14 y 15 se muestran microfotografías representativas de la inmunohistoquímica para caspasa-3 en las fases de diestro, proestro y estro del ciclo estral de las ratas respectivamente. En los ovarios de las ratas, las células caspasa3-positivas fueron las células tecales e intersticiales del ovario, mientras que las células de la granulosa no se marcaron en ninguno de los estadios del desarrollo de los folículos ováricos. Además, con DG, las células caspasa3-positivas disminuyeron significativamente 0.43 y 0.53 veces respectivamente en los folículos en el diestro y proestro.

Diestro

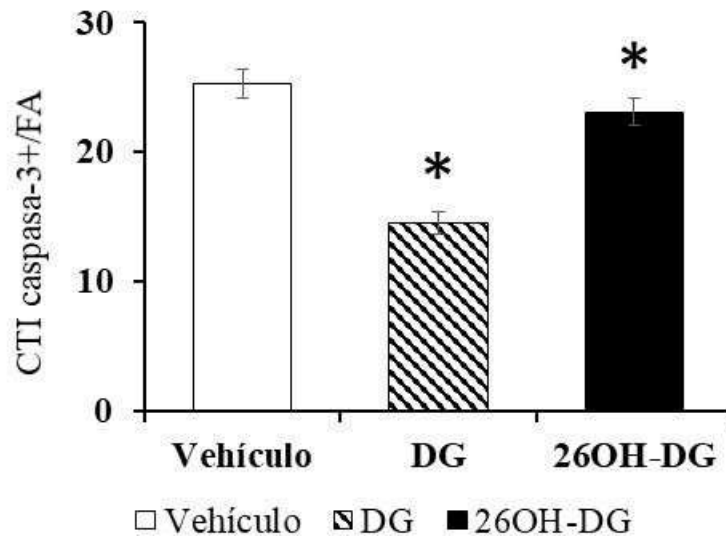
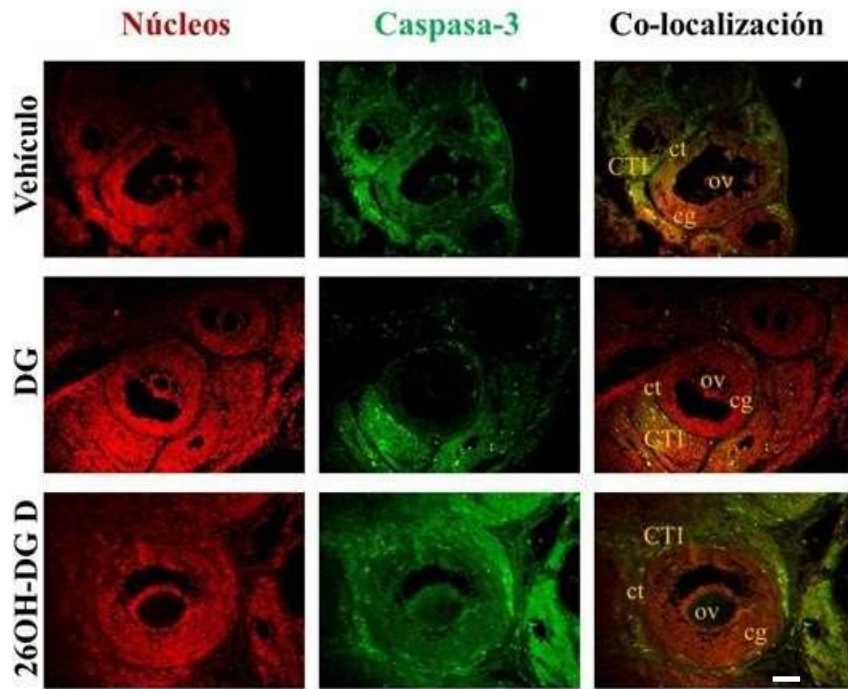


Figura 13. Células teco-intersticiales (CTI) caspasa 3-positivas en los ovarios de ratas en diestro. Control, DG y 26OH-DG en proestro (A). Gráfica, las barras representan la media \pm EEM (B). Los núcleos están en rojo y fueron marcados con yoduro de propídeo y en verde las células caspasa3-positivas marcadas con FITC. Folículos antrales. ov, ovocito; cg, células de la granulosa; ct, células tecaes. * $p \leq 0.05$, ANOVA. Escala 200 μ m.

Proestro

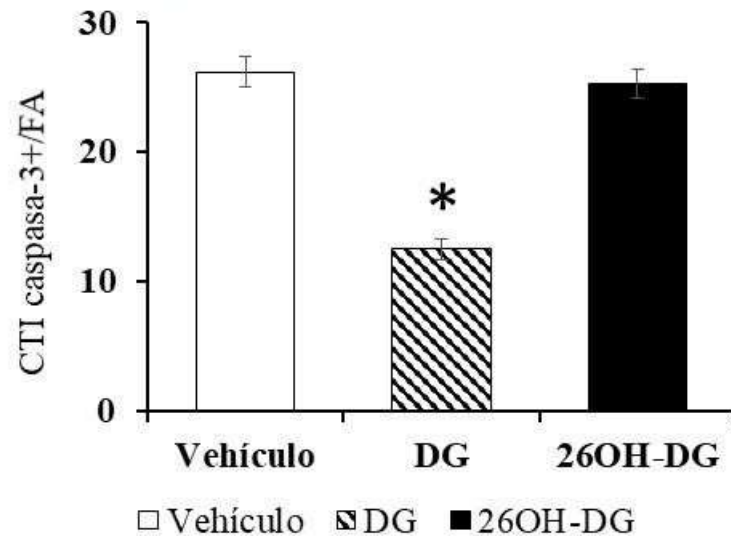
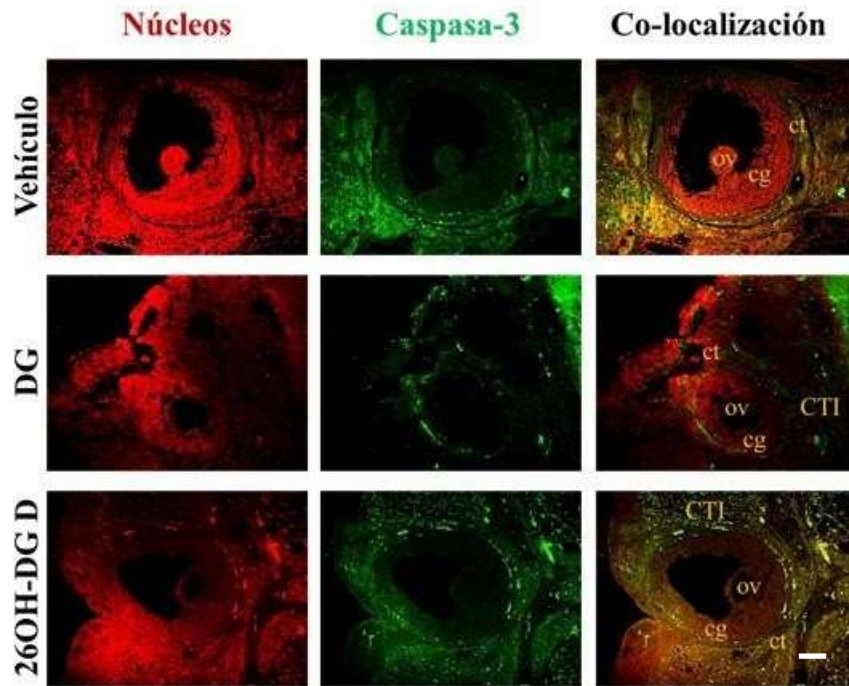


Figura 14. Células teco-intersticiales (CTI) caspasa 3-positivas en los ovarios de ratas en proestro. Control, DG y 26OH-DG en proestro (A). Gráfica, las barras representan la media \pm EEM (B). Los núcleos están en rojo marcados con ioduro de propídeo y en verde las células caspasa3-positivas marcadas con FITC. Folículos antrales. ov, ovocito; cg, células de la granulosa; ct, células tecales. * $p \leq 0.05$, ANOVA. Escala 200 μ m.

Estro

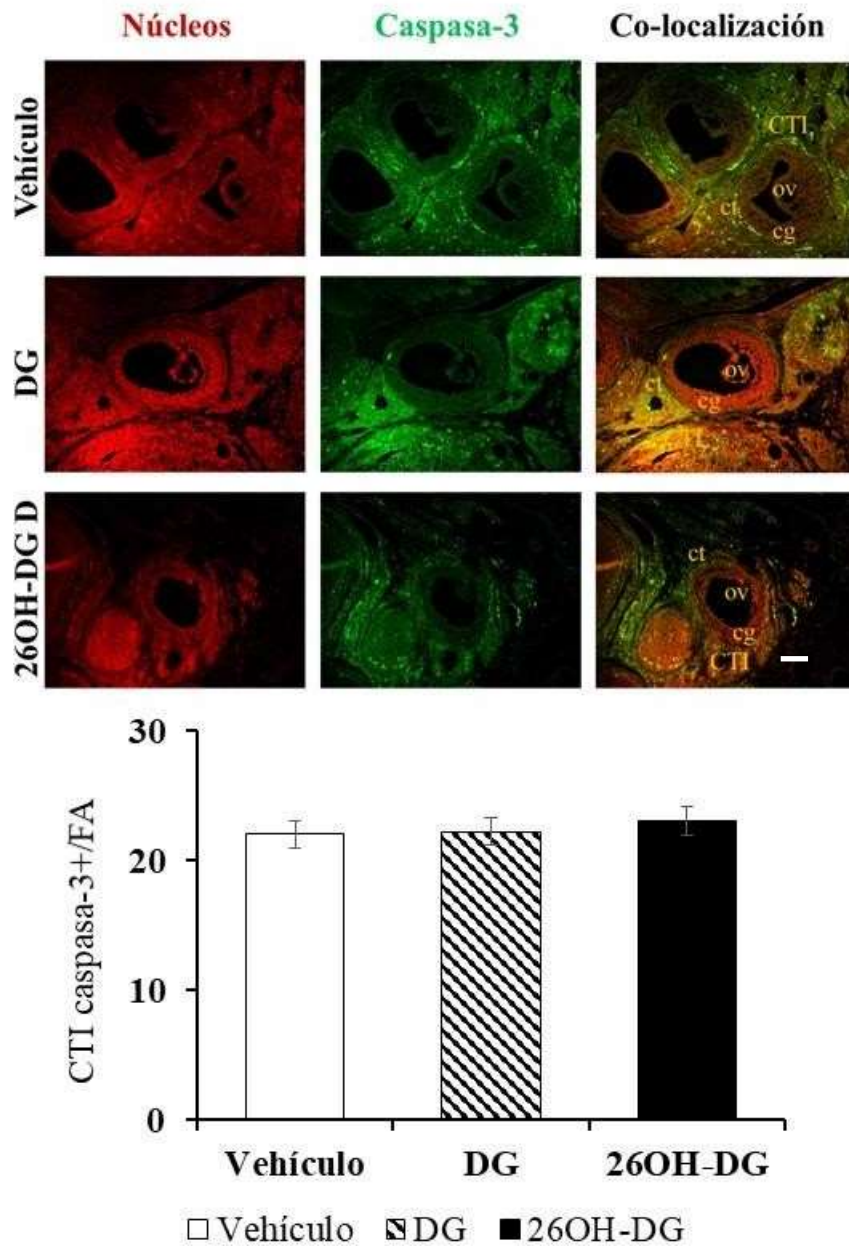


Figura 15. Células teco-intersticiales (CTI) caspasa 3-positivas en los ovarios de ratas en estro. Control, DG y 26OH-DG en proestro (A). Gráfica, las barras representan la media \pm EEM (B). Los núcleos están en rojo marcados con ioduro de propídeo y en verde las células caspasa3-positivas marcadas con FITC. Folículos antrales. ov, ovocito; cg, células de la granulosa; ct, células tecaes. * $p \leq 0.05$, ANOVA. Escala 200 μ m.

Identificación por inmunohistoquímica de células VEGF-positivas en los ovarios

En las figuras 16, 17 y 18 micrografías representativas de las células VEGF-positivas identificadas por inmunohistoquímica. No hubo diferencias de las células

VEGF-positivas entre las ratas administradas con DG o 26OG-DG en comparación con las ratas del grupo control en ninguna de las fases del ciclo estral reportadas aquí.

Diestro

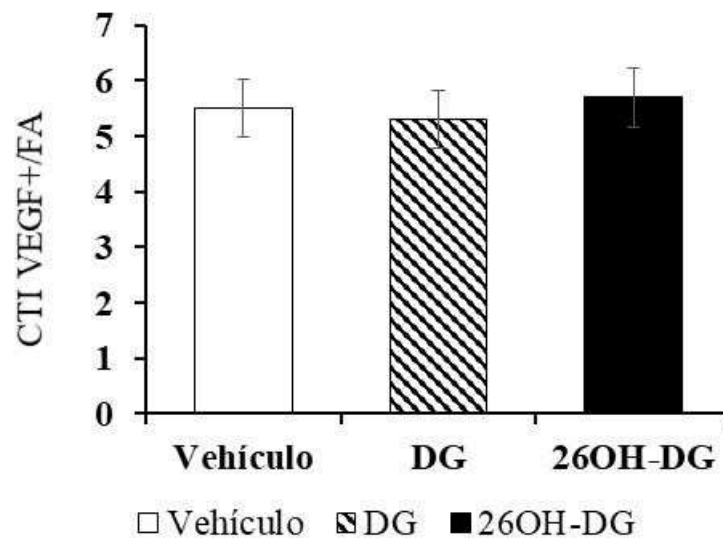
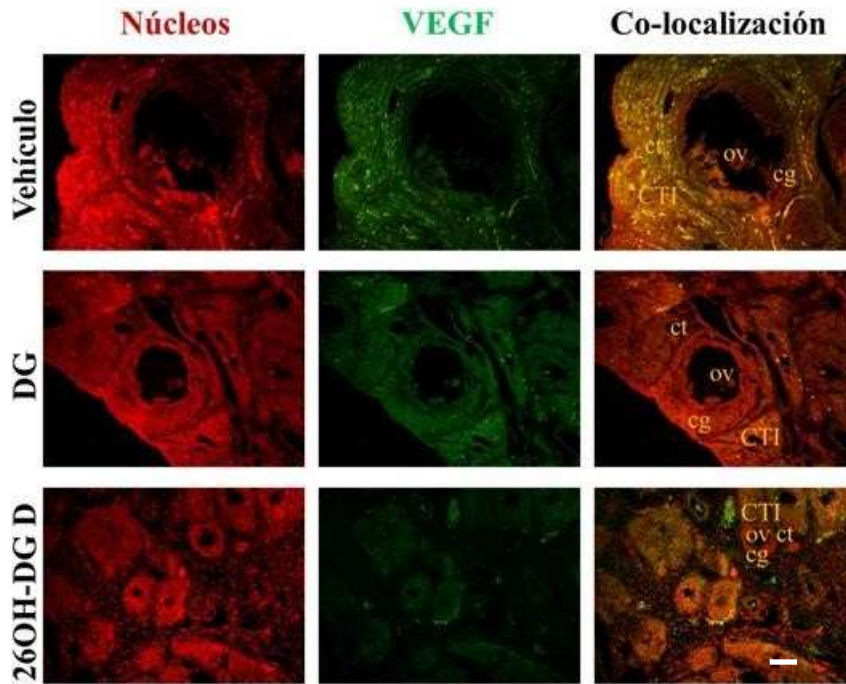


Figura 16. Células teco-intersticiales (CTI) VEGF-positivas en los ovarios de ratas en diestro. Control, DG y 26OH-DG en proestro (A). Gráfica, las barras representan la media \pm EEM (B). Los núcleos están en rojo marcados con yoduro de propídeo y en verde las células VEGF-positivas marcadas con FITC. Folículos antrales. ov, ovocito; cg, células de la granulosa; ct, células tecaes. * $p \leq 0.05$, ANOVA. Escala 200 μ m.

Proestro

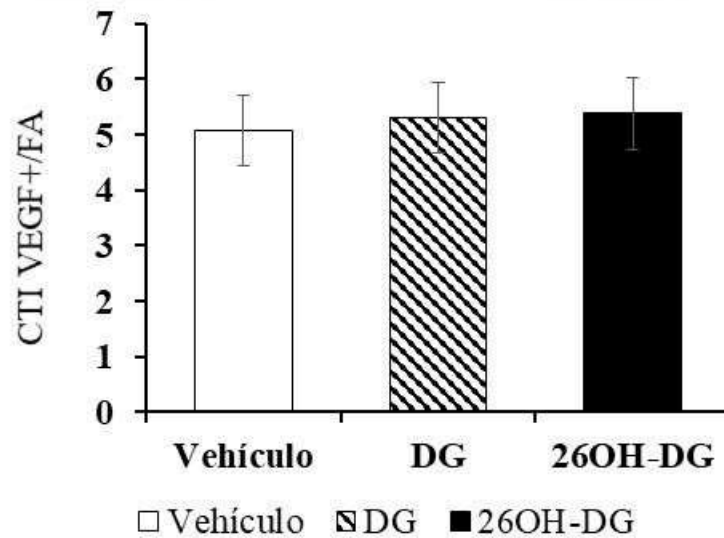
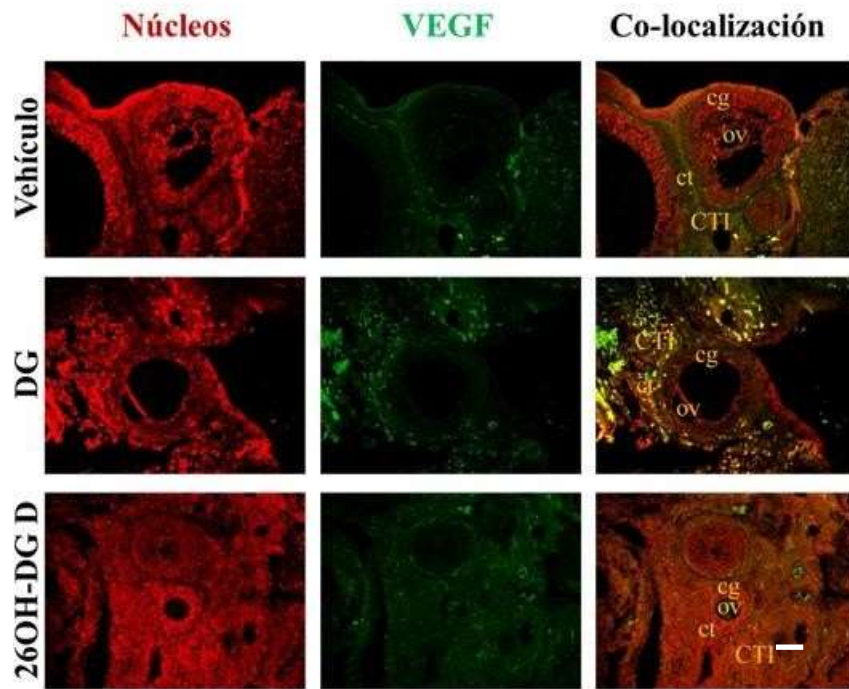


Figura 17. Células teco-intersticiales (CTI) VEGF-positivas en los ovarios de ratas en proestro. Control, DG y 26OH-DG en proestro (A). Gráfica, las barras representan la media \pm EEM (B). Los núcleos están en rojo marcados con yoduro de propídeo y en verde las células VEGF-positivas marcadas con FITC. Folículos antrales. ov, ovocito; cg, células de la granulosa; ct, células tecaes. * $p \leq 0.05$, ANOVA. Escala 200 μ m.

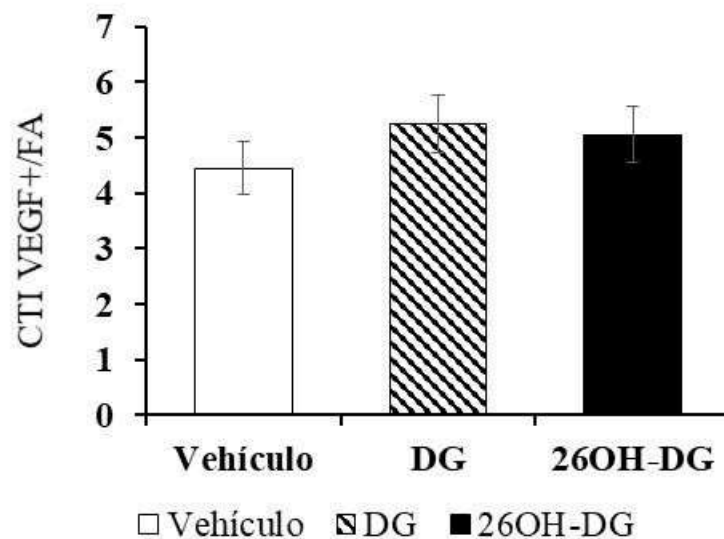
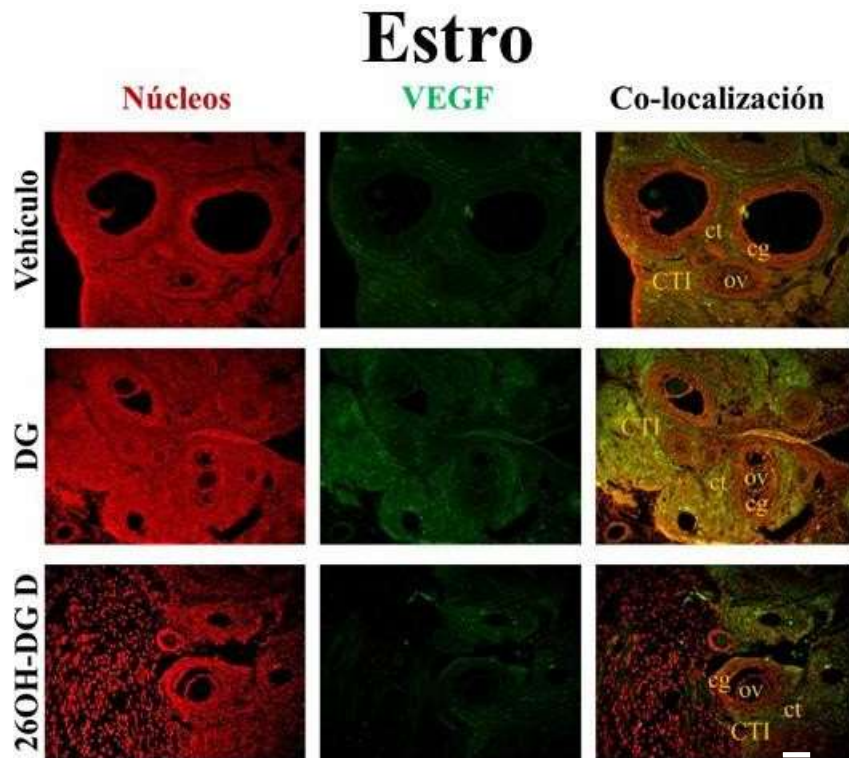


Figura 18. Células teco-intersticiales (CTI) VEGF-positivas en los ovarios de ratas en estro. Control, DG y 26OH-DG en proestro (A). Gráfica, las barras representan la media \pm EEM (B). Los núcleos están en rojo marcados con yoduro de propídeo y en verde las células VEGF-positivas marcadas con FITC. Folículos antrales. ov, ovocito; cg, células de la granulosa; ct, células tecales. * $p \leq 0.05$, ANOVA. Escala 200 μ m.

Identificación por inmunohistoquímica de células NGF-positivas en los ovarios

En las figuras 19, 20 y 21 micrografías representativas de las células NGF-positivas identificadas por inmunohistoquímica en el diestro, proestro y estro respectivamente. Las células NGF-positivas incrementaron significativamente 0.27 veces

en la fase de estro en las ratas administradas con DG en comparación con las ratas control y no se modificaron en las fases de diestro y proestro del ciclo estral de la rata.

Diestro

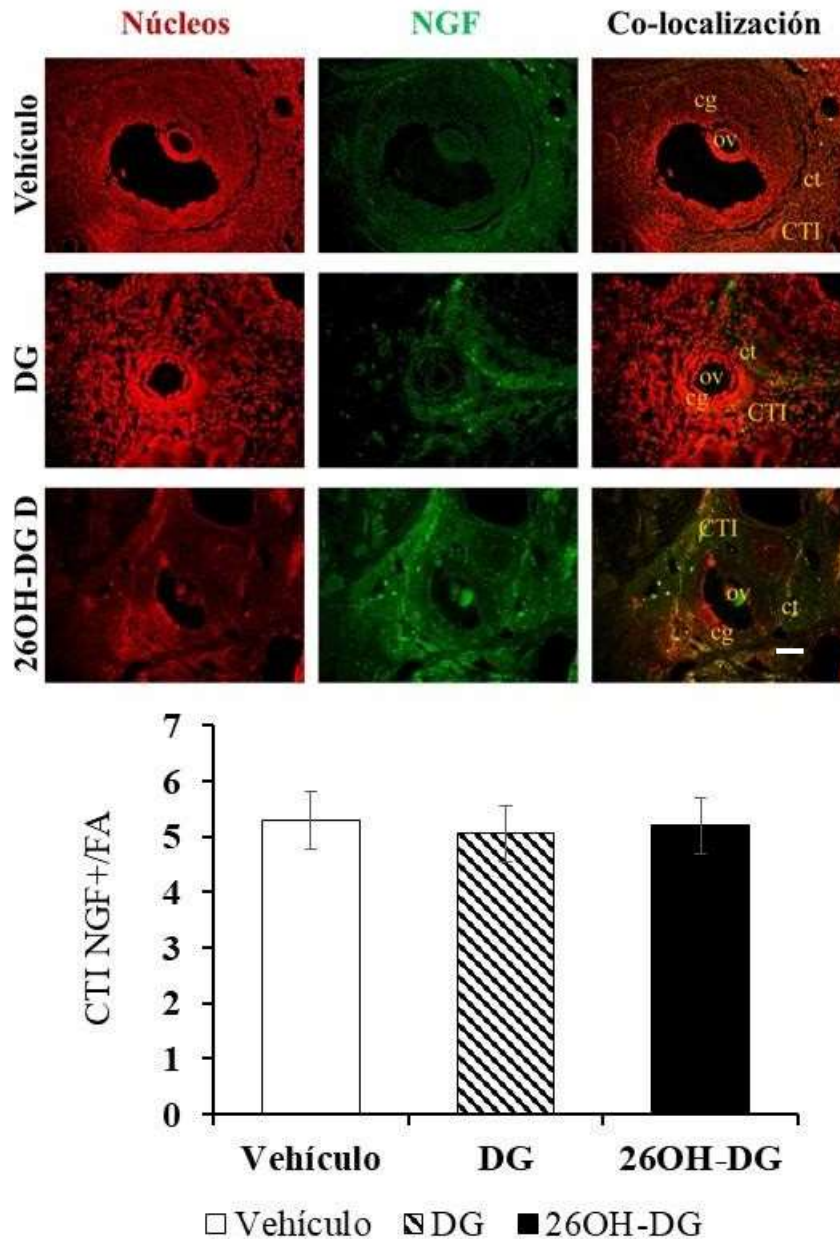


Figura 19. Células teco-intersticiales (CTI) NGF-positivas en los ovarios de ratas en diestro. Control, DG y 26OH-DG en diestro (A). Gráfica, las barras representan la media \pm EEM (B). Los núcleos están en rojo marcados con ioduro de propídeo y en verde las células NGF-positivas marcadas con FITC. Folículos antrales. ov, ovocito; cg, células de la granulosa; ct, células tecales. * $p \leq 0.05$, ANOVA. Escala 200 μ m.

Proestro

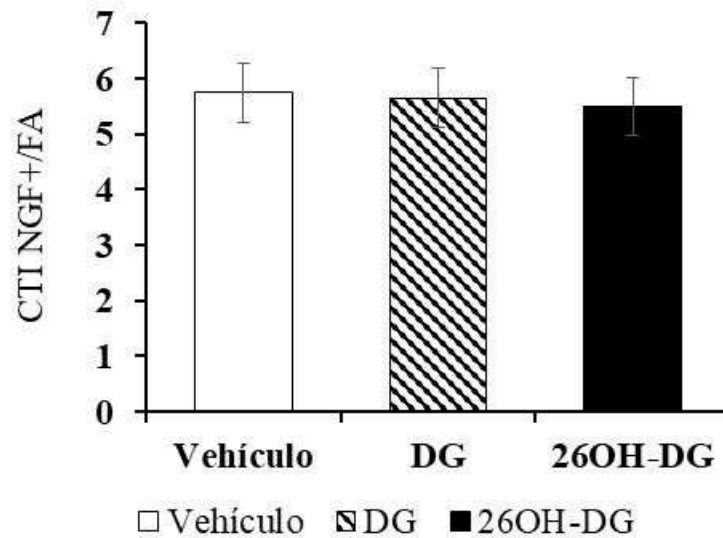
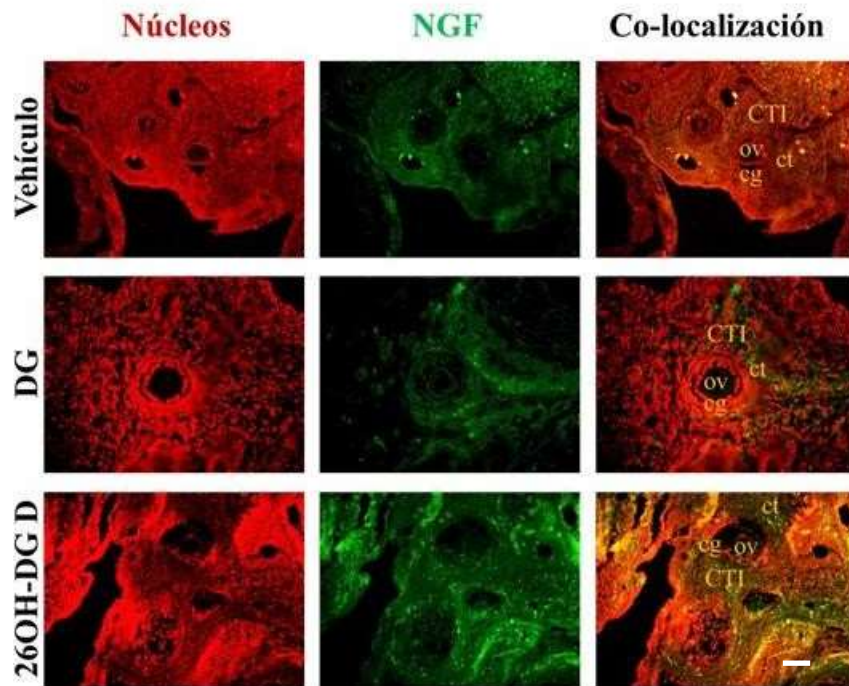


Figura 20. Células teco-intersticiales (CTI) NGF-positivas en los ovarios de ratas en proestro. Control, DG y 26OH-DG en proestro (A). Gráfica, las barras representan la media \pm EEM (B). Los núcleos están en rojo marcados con ioduro de propídeo y en verde las células NGF-positivas marcadas con FITC. Folículos antrales. ov, ovocito; cg, células de la granulosa; ct, células tecaes. $*p \leq 0.05$, ANOVA. Escala 200 μ m.

Estro

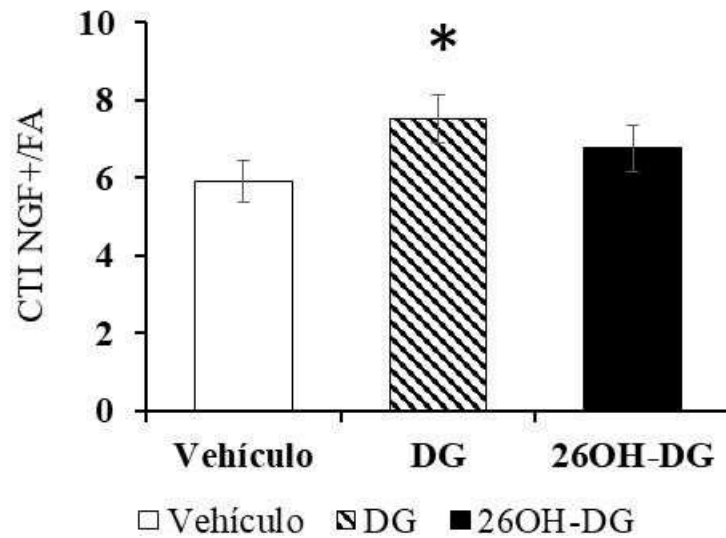
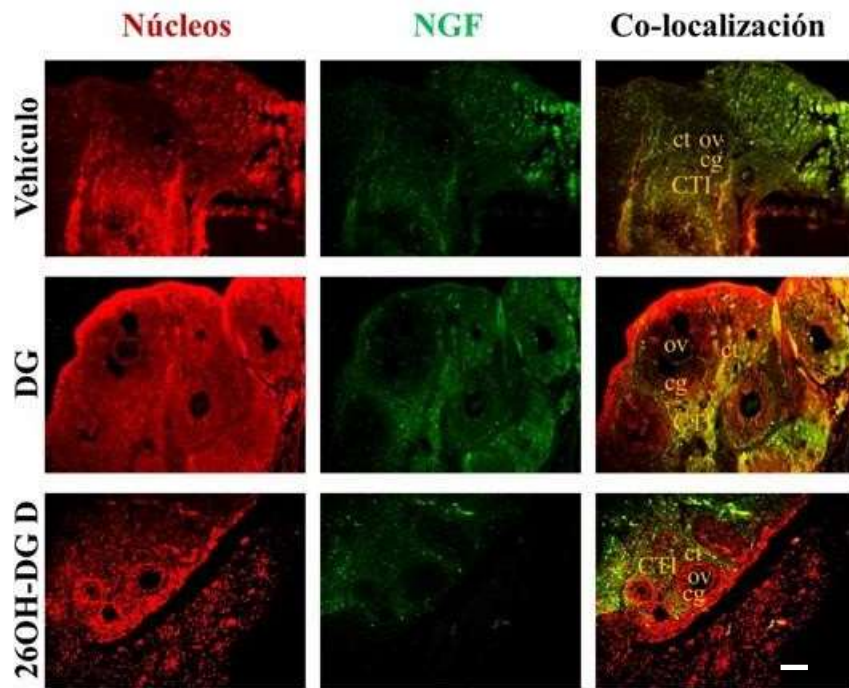


Figura 21. Células teco-intersticiales (CTI) NGF-positivas en los ovarios de ratas en estro. Control, DG y 26OH-DG en estro (A). Gráfica, las barras representan la media \pm EEM (B). Los núcleos están en rojo marcados con yoduro de propídeo y en verde las células NGF-positivas marcadas con FITC. Folículos antrales. ov, ovocito; cg, células de la granulosa; ct, células tecaes. * $p \leq 0.05$, ANOVA. Escala 200 μ m.

El resumen de los marcadores celulares en los ovarios de las ratas administradas con el vehículo, DG y 26OH-DG se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Resumen de los marcadores celulares en los ovarios de la rata; caspasa-3, VEGF y NGF en los ovarios de las ratas administradas con el vehículo, DG o 26OH-DG.

	Vehículo	DIESTRO		PROESTRO		ESTRO	
		DG	26OH-DG	DG	26OH-DG	DG	26OH-DG
Caspasa-3	—	↓	↓	↓	—	—	—
VEGF	—	—	—	—	—	↑	↑
NGF	—	—	—	—	—	↑	—

Sin Cambio —, Aumento ↑, Disminución ↓

DISCUSIÓN

En esta tesis estudiamos el efecto de la DG y la 26OH-DG sobre el útero y los ovarios de la rata Wistar, el efecto agudo de DG y 26OH-DG a dosis de 50 µg/kg sobre el desarrollo celular en el útero y los ovarios en las fases de diestro, proestro y estro. Las dos sustancias probadas no afectaron la conducta general de las ratas ni la anatomía macroscópica de los órganos viscerales examinados al momento de la autopsia, por lo que inferimos que las sustancias resultaron inocuas para el estado fisiológico general de los animales usados en el experimento. La administración de las sustancias tampoco afectó la duración del ciclo estral en comparación con las ratas del grupo control (4 días) por lo que inferimos que las asas de regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovarios funciona de manera similar a las condiciones basales naturales.

Por otro lado, en el útero, la DG aumentó el espesor del endometrio y miometrio en las fases de diestro y proestro. Esta respuesta estimuladora es posible si consideramos que DG interviene en procesos de diferenciación o apoptosis de los megacariocitos en células HEL humanas dependiendo de la dosis (Ghezali et al., 2014) y en la diferenciación de los oligodendrocitos a través de los receptores a estradiol, una respuesta mediada por la activación de la vía de las cinasas ERK1/2 que estimulan la remielinización de las fibras nerviosas (Xiao et al., 2012). Adicionalmente, el endometrio tiene alta plasticidad durante los procesos de regeneración y re-modelamiento celular, considerando que en la membrana basal del endometrio posee células madre progenitoras y células madre mesenquimales con alta capacidad proliferativa siendo las responsables de la regeneración del endometrio en condiciones fisiológicas y patológicas (Ghezali et al., 2014). Estas respuestas pueden ser estimuladas por el estradiol y la progesterona que incrementan en la fase proliferativa del endometrio (fases de metaestro y diestro) (Asarian & Geary, 2013; Gellersen & Brosens, 2014). Además, se ha reportado que la DG aumenta la translocación de los receptores a estradiol hacia el núcleo incrementando así la viabilidad y la proliferación de las células de Sertoli de ratón de la línea TM4 (Wu et al., 2015). La DG promueve la transición de las fases G1/S del ciclo celular e inhibe la apoptosis. La expresión de las proteínas CDK4/6, CDK2, ciclina D1 y ciclina E aumentan significativamente 24 horas después de la administración de DG (Wu et al., 2015). Otra vía de acción de la DG es la estimulación del factor 1 de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1) que también promueve el progreso de la fase S y la proliferación de las células de la glándula tiroides (Bian et al., 2011). Estas diferentes respuestas de la DG en tiempo y magnitud son congruente con la alta afinidad (IC₅₀, 10 nM) (Yen et al., 2005)

de unión que tiene a los receptores a estradiol ESR1 y ESR2 (Chun, et al., 2014; Powers & Setzer, 2015; Wang X. et al., 2015). Además de los receptores a estradiol, existen los receptores 1,25D₃-MARRS de respuesta rápida que también aumentan su expresión en las células del endometrio en la fase secretoria temprana y media del endometrio (Monohar et al., 2014) y a las cuales la DG se une y ejerce su acción (Tohda et al., 2012). El incremento del espesor de la mucosa endometrial también puede deberse a la acción estimulante de la DG sobre la diferenciación y desarrollo que ha tenido sobre varios tipos de células glandulares y no glandulares (Ghezali el al., 2014; Wang L. et al., 2015) el efecto estimulante de la DG también tiene acción sobre el miometrio (Wu et al., 2015).

Por otro lado, el aumento del espesor del miometrio en la fase de diestro sugiere un efecto anabólico. Esta respuesta es viable considerando que la DG estimula la proliferación de los fibroblastos cardiacos y disminuyendo la fibrosis del corazón (Zhou et al., 2017). En los fibroblastos cardiacos, la DG inhibe la deposición de la matriz extracelular por inhibición de la angiotensina II, además suprime la acción del factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- β 1) y la fosforilación de Smad3 (Zhou et al., 2017). La DG disminuye la capacidad de adhesión de las musculares lisas (Choi et al., 2010) al disminuir las moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) y las moléculas de adhesión de las células vasculares (VCAM-1) a través del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Choi et al., 2010).

En el útero, las glándulas endometriales se forman a partir en epitelio luminal y aumentan en cantidad en la fase proliferativa del ciclo estral (fases de diestro y proestro), su crecimiento depende del factor estimulante de linfocitos y del estradiol que activa la vía celular Wnt- β (Shelton et al, 2012). El incremento de las glándulas endometriales que obtuvimos en diestro y proestro del ciclo estral sugiere acción sinérgica con el estradiol (Asarian & Geary, 2013) y es evidencia de estimular el desarrollo celular, respuesta farmacológica que aumentaría la capacidad secretora y de transporte del útero. Esta condición mejoraría la fertilidad de las ratas (Shelton et al, 2012), sin embargo, es una inferencia que debe probarse experimentalmente con experimentos específicos. Otros reguladores del desarrollo del endometrio es la prolactina que también contribuye a la morfogénesis de las glándulas endometriales (Ghezali el al., 2014; Wang L. et al., 2015; Gray, et al., 2001). Además se han identificado otros factores de crecimiento relacionados con la DG, como al factor de crecimiento epidérmico (EGF), al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor inhibidor de la leucemia (LIF) (Burton, et al., 2007) y al factor estimulante de linfocitos (Shelton et al., 2012).

A diferencia de la DG, su homólogo, la 26OH-DG no modificó el espesor del endometrio ni del miometrio de las ratas. Contrariamente, en el proestro, el espesor de la mucosa luminal disminuyó. Este resultado es oportuno si consideramos que la metabolización de la 26OH-DG sea rápida en comparación con la DG, ya que se ha reportado que las moléculas hidroxiladas se metabolizan a mayor velocidad, modificando así su biodisponibilidad y en consecuencia su acción farmacológica (Sultana & Saify 2013; Sultana 2018). Cabe precisar que previamente en otra serie de experimentos, obtuvimos que a las 24 y 28 horas, la 26OH-DG disminuyó el desarrollo del miometrio (Campos-Sandoval, 2018) sugiriendo que la 26OH-DG tiene diferentes propiedades farmacocinéticas en comparación con la DG. Estos experimentos abren otra línea de investigación sobre las propiedades farmacocinéticas y de comparación entre las dos moléculas en estudio.

En los ovarios de las ratas administradas con DG, en la fase de diestro y proestro aumentaron los folículos sanos siendo indicador de estimular del desarrollo celular ovárico. Es aceptado que en los ciclos reproductivos de las ratas adultas jóvenes con ciclos estrales regulares (4 días), en las fases de metaestro, diestro y mañana del proestro hay baja concentración de FSH y aumenta paulatinamente la concentración de estradiol en sangre. El incremento en los folículos ováricos puede estar relacionado con la estimulación directa de las células de la granulosa activando los receptores a estradiol ESR1 y SR2, o también a los receptores 1,25D₃-MARRS de la membrana de respuesta rápida, y a los cuales se une la DG (Yang et al., 2017; Thoda et al., 2012) o de manera directa en el núcleo activando la transcripción de genes relacionados con la proliferación de las células (Ghezali, et al., 2014). Contrariamente, la 26OH-DG aumentó la atresia de los folículos, siendo indicador de activar la apoptosis, similar a la respuesta que hemos obtenido con dosis mayores (0.1, 1.0 y 4.0 mg/kg).

El incremento en el número de cuerpos lúteos que obtuvimos con DG es evidencia de su acción proteolítica (Chang et al., 2011; Xiao et al., 2012; Ghezali et al., 2014) que aumenta en la ovulación de las ratas (Chang et al., 2011; Chen et al., 2011), además de la acción antiinflamatoria que posee (Singh et al., 2014; Wang et al., 2015). La acción estimuladora del desarrollo celular en los ovarios es congruente con la disminución de la actividad de caspasa-3 que obtuvimos en la fase de diestro y proestro, mientras que las células NGF-positivas aumentaron solo en la fase de estro sugiriendo una respuesta dependiente de la hormona FSH (Salas et al., 2006). Contrariamente, las células VEGF-

positivas no se modificaron con la DG o con la 26OH-DG en los ovarios, inversamente a lo observado en pro-osteoclastos de ratón MC3T3-E1 (Yen et al., 2005).

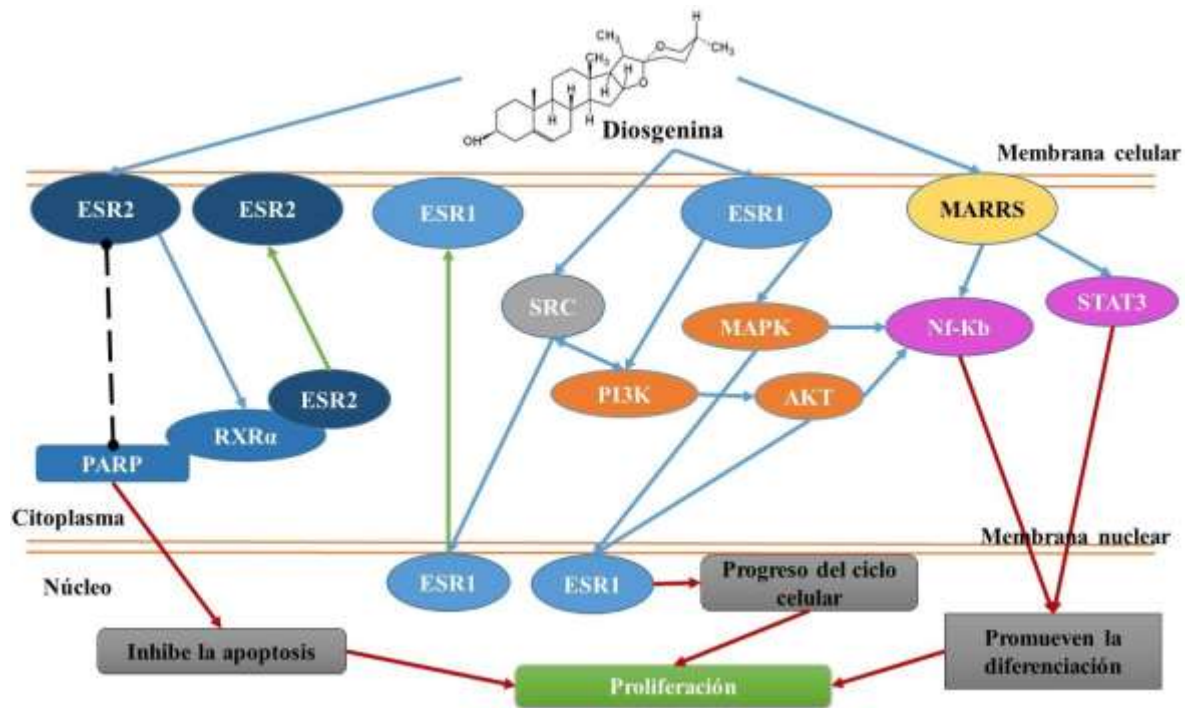


Figura 22. Esquema propuesto del mecanismo de acción de la diosgenina por activación de los receptores a estradiol ESR1 y ESR2 y 1,25D₃-MARRS. Las líneas azules representan interacciones, líneas negras inhibiciones, líneas verdes translocación y líneas rojas efectos producidos.

CONCLUSIÓN

La DG estimuló el desarrollo del endometrio y miometrio y el desarrollo de los folículos ováricos en el diestro y proestro, mientras que la 26OH-DG no tuvo efecto. La DG estimuló el desarrollo celular en la fase proliferativa del útero y los ovarios posiblemente haciendo sinergia con el estradiol al incrementar la traslocación de los receptores ESR1 y ESR2, activando a receptores MARRS o por medio del IGF-1, inferencias que deben probarse experimentalmente.

PERSPECTIVAS

1. Probar la acción estrogénica utilizando ratas infantiles.
2. Probar la regulación de los receptores ESR1, ESR2 y MARRS usando sus antagonistas.
3. Evaluar las rutas intracelulares involucradas (D1, Nf-Kb y STAT3)

REFERENCIAS

- Amaro López, J. C. Efecto de la (26R)-26-hidroxi-diosgenina sobre el desarrollo celular. *Tesis* 2015, BUAP.
- Asarian, L.; Geary, N. Sex differences in the physiology of eating. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2013. 305(11), R1215-R1267.
- Benghuzzi, H.; Tucci, M.; ECKIE, R.; Hughes, J. The effects of sustained delivery of diosgenin on the adrenal gland of female rats. *Biomed Sci Instrum* 2003;39:335-340.
- Bian, D.; Li, Z.; Ma, H.; Mu, S.; Ma, C.; Cui, B.; Gao, L.; Zhao, J. Effects of diosgenin on cell proliferation induced by IGF-1 in primary human thyrocytes. *Arch Pharm Res* 2011;34(6):997-1005.
- Burton, G. J.; Jauniaux, E.; Charnock-Jones, D. S. Human Early Placental Development: Potential Roles of the Endometrial Glands. *Placenta* 2007;28, S64–S69.
- Cai, H.; Wang, Z.; Zhang, HQ.; Wang, FR.; Yu, CX.; Zhang, FX.; Gao, L.; Zhang, J.; Zhao, JJ. Diosgenin relieves goiter via the inhibition of thyrocyte proliferation in a mouse model of Graves' disease. *Acta Pharmacol Sin* 2014;35(1):65-73.
- Cailleteau, C.; Liagre, B.; Beneytout, J.L.; A proteomic approach to the identification of molecular targets in subsequent apoptosis of HEL cells after diosgenin-induced megakaryocytic differentiation. *J Cell Biochem* 2009 ;107(4):785-796.
- Campos-Sandoval, A. Efecto de la (26R)-26-hidroxi-diosgenina sobre el desarrollo folicular, la ovulación, desarrollo del útero y la expresión del VEGF en las ratas Wistar. *Tesis* 2018, BUAP
- Chang, CC.; Kuan, TC.; Hsieh, YY.; Ho, YJ.; Sun, YL.; Lin, CS. Effects of diosgenin on myometrial matrix metalloproteinase-2 and -9 activity and expression in ovariectomized rats. *Int J Biol Sci.* 2011;7(6):837-847.
- Chen, PS.; Shih, YW.; Huang, HC.; Cheng, HW. Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits migration and invasion of human prostate cancer PC-3 cells by reducing matrix metalloproteinases expression. *PLoS One* 2011;6(5): e20164.
- Choi, K.W.; Park, H.J.; Jung, D.H.; Kim, T.W.; Park, Y.M.; Kim, B.O.; Sohn, E.H.; Moon, E.Y.; Um, S.H.; Rhee, D.K.; Pyo, S. Inhibition of TNF- α -induced adhesion molecule expression by diosgenin in mouse vascular smooth muscle cells via downregulation of the MAPK, Akt and NF- κ B signaling pathways. *Vascul Pharmacol* 2010;53(5-6):273-280.
- Chun, J.; Han, L.; Xu, M.Y.; Wang, B.; Cheng, M.S.; Kim, Y.S. The induction of apoptosis by a newly synthesized diosgenyl saponin through the suppression of estrogen receptor- α in MCF-7 human breast cancer cells. *Arch Pharm Res* 2014;37(11):1477-1486.
- Corbiere, C.; Liagre, B.; Terro, F.; Beneytout, J.L. Induction of antiproliferative effect by diosgenin through activation of p53, release of apoptosis-inducing factor (AIF) and modulation of caspase-3 activity in different human cancer cells. *Cell Res* 2004;14(3):188-196.

Cortés, A. P. Inducción y multiplicación de callos de barbasco (*Dioscorea compositae*). Tesis de QFB, 2010. Universidad Veracruzana.

De la Cruz, R.R.; Pásaro, R. Control endocrino del ciclo reproductor en la rata: una experiencia docente utilizando un metodo de caracterización citológico. *Revista de Enseñanza Universitaria* 1998. 545-554.

Dong-Hui, W.; Jing, R.; Cheng-Jie Z.; Zhe, H.; Lu, W. Cheng-Guang, L.; Supplementation with CTGF, SDF1, NGF, and HGF promotes ovine in vitro oocyte maturation and early embryo development. *Domestic Animal Endocrinology* 2018. 0739-7240

Fernandois, D.; Garrido, M.; Lara, H. E.; Paredes, A. H. Regulación neuronal de la función ovárica durante el envejecimiento reproductivo. *Rev Farmacol Chile* 2014; 7(1): 47.

Gartner, L. P. Atlas de histología. 2008 *McGRAW HILL* .

Gellersen, B.; Brosens, J.J. Cyclic Decidualization of the Human Endometrium in Reproductive Health and Failure. *Endocrine Reviews* 2014; 35(6):851-905.

Ghezali, L.; Liagre, B.; Limami, Y.; Beneytout, J.L.; Leger, D.Y. Sonic Hedgehog activation is implicated in diosgenin-induced megakaryocytic differentiation of human erythroleukemia Cells. *PLoS One* 2014; 9(4):e95016.

Gray, C.A.; Bartol, F.F.; Tarleton, B.J.; Wiley, A.A.; Johnson, G.A.; Bazer, F.W. Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod.* 2001;65:1311–1323.

Gu, L.; Feng, J.; Xu, H.; Luo, M.; Su, D. Polyphyllin I inhibits proliferation and metastasis of ovarian cancer cell line HO-8910PM in vitro. *J Tradit Chin Med* 2013;33(3):325-333.

Hilario-Martinez, J. C.; Sandoval-Ramírez, J.; Luna, F.; Fernández-Herrera, M.A.; Amaro, J.; Martínez, I. Biological effect of diosgenin and 26-hydroxydiosgenin on the rat reproductive system. 2015. *EFMC-YMCS. 2nd EFMC Young Medical Chemist Symposium*. Antwerp, Belgium-September 17, 2015. 047.

Manivannan, J.; Arunagiri, P.; Sivasubramanian, J.; Balamurugan, E. Diosgenin prevents hepatic oxidative stress, lipid peroxidation and molecular alterations in chronic renal failure rats. *Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis* 2013;3:289-293

Manohar, M.; Khan, H.; Sirohi, V.K.; Das, V.; Agarwal, A.; Pandey, A.; Siddiqui, W.A.; Dwivedi, A. Alteration in endometrial proteins during early- and mid-secretory phases of the cycle in women with unexplained infertility. *PLoS One.* 2014;9(11):e111687.

Powers, C.N.; Setzer, W.N. A molecular docking study of phytochemical estrogen mimics from dietary herbal supplements. *In Silico Pharmacol.* 2015;3:4.

Raju, J.; Mehta, R. Cancer chemopreventive and therapeutic effects of diosgenin, a food saponin. *Nutr Cancer* 2009;61(1):27-35.

Ravikumar, P.; Anuradha, C. Effect of fenugreek seeds on blood lipid peroxidation and antioxidants in diabetic rats. *Phytother Res* 1999;13(3):197-201.

Roghani-Dehkordi, F.; Roghani, M.; Baluchnejadmojarad, T. Diosgenin Mitigates Streptozotocin Diabetes-induced Vascular Dysfunction of the Rat Aorta: The Involved Mechanisms. *J Cardiovasc Pharmacol* 2015;66(6):584-592.

Salas, C.; Julio-Pieper, M.; Valladares, M.; Pommer, R.; Vega, M.; Mastronardi, C.; Kerr, B.; Ojeda, S.R.; Lara, H.E.; Romero, C. Nerve growth factor-dependent activation of trkA receptors in the human ovary results in synthesis of follicle-stimulating hormone receptors and estrogen secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(6):2396-2403.

Sauvaire, Y.; Ribes, G.; Baccou, J.C.; Loubatières-Mariani, M.M. Implication of steroid saponins and sapogenins in the hypocholesterolemic effect of fenugreek. *Lipids* 1991;26(3):191-197.

Segura Gomez, A.; Carrizales Navarrete, S.; Bautista Pacheco, J. Estudio de la distribución de diosgenina en rizomas de *Dioscorea composita*. *Revista del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales* 1982. 7(39):3-13.

Selim, S.; Al Jaouni, S. Anticancer and apoptotic effects on cell proliferation of diosgenin isolated from *Costus speciosus* (Koen) Sm. *BMC Complement Altern Med* 2015;15:301.

Shelton, D.N.; Fomalik, H.; Neff, T.; Park, S.Y.; Bender, D.; De Geest, K.; Liu, X.; Xie, W.; Meyerholz, D.K.; Engelhardt, J.F.; Goodheart, M.J. The role of LEF1 in endometrial gland formation and carcinogenesis. *PLoS One*. 2012;7(7):e40312.

Shishodia, S.; Aggarwal, B.B. Diosgenin inhibits osteoclastogenesis, invasion, and proliferation through the downregulation of Akt, I κ B kinase activation and NF- κ B-regulated gene expression. *Oncogene* 2006;25(10):1463-1473.

Singh, M.; Hamid, A.A.; Maurya, A.K.; Prakash, O.; Khan, F.; Kumar, A.; Aiyelaagbe, O.O.; Negi, A.S.; Bawankule, D.U. Synthesis of diosgenin analogues as potential anti-inflammatory agents. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;143:323-33.

Sultana, N.; Saify, Z.S. Enzymatic biotransformation of terpenes as bioactive agents, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2013;28(6)1113-1128.

Sultana N. Microbial biotransformation of bioactive and clinically useful steroids and some salient features of steroids and biotransformation, *Steroids* 2018.01.007

Tada, Y.; Kanda, N.; Haratake, A.; Tobiishi, M.; Uchiwa, H.; Watanabe, S. Novel effects of diosgenin on skin aging. *Steroids* 2009;74(6):504-511.

Tohda, C.; Urano, T.; Umezaki, M.; Nemere, I.; Kuboyama, T. Diosgenin is an exogenous activator of 1,25D3-MARRS/Pdia3/ERp57 and improves Alzheimer's disease pathologies in 5XFAD mice. *Sci Rep* 2012;2:535.

Torres-Ortiz, M. C.; Gutiérrez-Ospina, G.; Gómez-Chavarrín, M.; Murcia, C.; Alonso-Morales, R. A.; Perera-Marín, G. The presence of VEGF and Notch2 during preantral-antral follicular transition in infantile rats: Anatomical evidence and its implications. *General and Comparative Endocrinology*, 2017; 249, 82-92.

Wang L, Ma T, Zheng Y, Lv S, Li Y, Liu S. Diosgenin inhibits IL-1 β -induced expression of inflammatory mediators in human osteoarthritis chondrocytes. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 1;8(5):4830-4836.

Wang, X.; Liu, J.; Long, Z.; Sun, Q.; Liu, Y.; Wang, L.; Zhang, X.; Hai, C. Effect of diosgenin on metabolic dysfunction: Role of ER β in the regulation of PPAR γ . *Toxicol Appl Pharmacol* 2015;289(2):286-296.

Wu, L.; Dong, H.; Zhao, J.; Wang, Y.; Yang, Q.; Jia, C.; Ma, J. Diosgenin stimulates rat TM4 cell proliferation through activating plasma membrane translocation and transcriptional activity of estrogen receptors. *Biol Reprod* 2015;92(1):24.

Xiao, L.; Guo, D.; Hu, C.; Shen, W.; Shan, L.; Li, C.; Liu, X.; Yang, W.; Zhang, W.; He, C. Diosgenin promotes oligodendrocyte progenitor cell differentiation through estrogen receptor-mediated ERK1/2 activation to accelerate remyelination. *Glia* 2012;60(7):1037-1052.

Yang, W. S.; Moon, S. Y.; Lee, M. J.; Lee, E. K.; Park, S. K. Diosgenin, an Activator of 1,25D₃-MARRS Receptor/ERp57, Attenuates the Effects of TNF- α by Causing ADAM10-Dependent Ectodomain Shedding of TNF Receptor 1. *Cell Physiol Biochem* 2017;43:2434-2445.

Yen, M.L.; Su, J.L.; Chien, C.L.; Tseng, K.W.; Yang, C.Y.; Chen, W.F.; Chang, C.C.; Kuo, M.L. Diosgenin induces hypoxia-inducible factor-1 activation and angiogenesis through estrogen receptor-related phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in osteoblasts. *Mol Pharmacol* 2005;68(4):1061-1073.

Zhou, H.T.; Yu, X.F.; Zhou, G.M. Diosgenin inhibits angiotensin II-induced extracellular matrix remodeling in cardiac fibroblasts through regulating the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway. *Mol Med Rep* 2017;15(5):2823-2828.



CLu-25

Efecto de la diosgenina y la 26-hidroxi-diosgenina sobre el útero de ratas Wistar

García Castañeda Javier¹ (Estudiante de posgrado), Hilario Martínez Jazmín Ciciolil², Martínez Isabel¹, Sandoval-Ramírez Jesús² y Luna Félix¹

¹Laboratorio de Neuroendocrinología, FCQ-BUAP.

²Laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales, FCQ-BUAP.

Previamente comunicamos que las sapogeninas esteroidales, *diosgenina* (DG) y *26-hidroxi-diosgenina* (26OH-DG) son inductoras de apoptosis en los folículos ováricos y útero de las ratas (0.1, 1 y 4 mg/Kg). En este trabajo evaluamos el efecto de DG y 26OH-DG a dosis baja (50µg/Kg) sobre el útero. Utilizamos 63 ratas adultas jóvenes de la cepa Wistar del bioterio "Claude Bernard" de la BUAP que presentaban ciclos estrales regulares de 4 días. Las ratas fueron divididas aleatoriamente en 9 grupos (n=7); 3 grupos control, 3 grupos con DG y 3 grupos con 26OH-DG (ip). Las sustancias fueron administradas en dosis diaria en el metaestro, diestro y proestro, las ratas control recibieron el vehículo (SSI, 0.9%). El sacrificio de las ratas fue en el diestro, proestro y estro siguiente a la administración de las sustancias. El útero se fijó, incluyó en parafina y se hicieron cortes de 5µm de espesor que fueron teñidos con H&E. Posteriormente y usando un microscopio de campo claro y software Motic 2.0 medimos el espesor de la mucosa uterina, endometrio y miometrio. Obtuvimos que el peso de las ratas, peso del útero y duración del ciclo estral no se modificaron con los tratamientos. Sin embargo, la DG aumentó significativamente el espesor del endometrio y miometrio, además del número de glándulas endometriales en el diestro y proestro. Con la administración de 26OH-DG, los parámetros anteriores no se modificaron en relación al grupo control. El aumento del espesor del endometrio y miometrio sugiere sugiere propiedades anabólicas sobre el útero, y el incremento de las glándulas endometriales indica mayor actividad secretora, en ambos casos se favorecería la capacidad de migración e implantación del útero. La 26OH-DG no tuvo efecto sobre el desarrollo del útero probablemente por menor absorción y biodisponibilidad, inferencias que debemos probar experimentalmente.