



# **BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

---



Facultad De Ciencias Químicas  
Departamento de Farmacia

## **Efecto del AMG9810 sobre el desarrollo folicular y la pubertad de la cobaya**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**Licenciada en Química Farmacobióloga**

Presenta

**Laura Cano Rosas**

Directores de tesis

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

*Puebla, Pue, 4 de marzo del 2016*

## Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el proyecto VIEP NAT-2015, Félix Luna, del Sub-Programa de apoyo al desarrollo de la Investigación y realizado en el laboratorio de Neuroendocrinología, FCQ-BUAP. Las fotografías fueron capturadas en el laboratorio de Neurofarmacología de la FCQ-BUAP cuyo responsable es el Dr. I. Daniel Limón Pérez de León.



La sustentante del presente trabajo fue apoyada parcialmente por el programa Beca Tesis 2015 otorgado por la Coordinación Nacional De Educación Superior, SEP.

<b>Índice</b>	<b>Pág.</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 <i>La pubertad en los mamíferos</i>	<i>1</i>
1.2 <i>Factores metabólicos que regulan la reproducción de los mamíferos</i>	<i>3</i>
1.3 <i>Localización y estructura de los ovarios</i>	<i>3</i>
1.4 <i>Desarrollo folicular</i>	<i>4</i>
1.5 <i>Atresia folicular</i>	<i>6</i>
1.6 <i>Papel de las neurotrofinas en el desarrollo de las células ováricas</i>	<i>8</i>
1.7 <i>Fibras nerviosas de los ovarios</i>	<i>8</i>
1.8 <i>Expresión tisular de los receptores TRPV1</i>	<i>9</i>
1.9 <i>Transducción de estímulos por los receptores TRPV1</i>	<i>11</i>
1.10 <i>Importancia farmacológica de los antagonistas del receptor TRPV1</i>	<i>12</i>
1.11 <i>El AMG9810, un antagonista de los receptores TRPV1</i>	<i>14</i>
1.12 <i>Los receptores TRPV1 modulan la pubertad y el desarrollo folicular en la cobaya</i>	<i>16</i>
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>18</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>19</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>19</b>
4.1 <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>19</b>
<b>5. DIAGRAMA DE TRABAJO</b>	<b>20</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>21</b>
6.1 <i>Animales</i>	<i>21</i>
6.2 <i>La cobaya, <u>Cavia porcellus</u> como modelo para estudiar procesos de reproducción</i>	<i>21</i>
6.3 <i>Administración del AMG9810 en la bolsa ovárica</i>	<i>22</i>
6.4 <i>Registro de la primera apertura vaginal (PAV)</i>	<i>22</i>
6.5 <i>Obtención de los ovarios</i>	<i>23</i>

6.6	<i>Inclusión de los ovarios en parafina</i>	23
6.7	<i>Número de folículos en los ovarios</i>	23
6.8	<i>Inmunohistoquímica para los receptores TRPV1</i>	24
6.9	<i>Número de células TRPV1-positivas</i>	24
6.10	<i>Pruebas estadísticas</i>	24
7.	<b>RESULTADOS</b>	25
7.1	<i>Edad de la primera apertura vaginal</i>	25
7.2	<i>Efecto del AMG9810 sobre el desarrollo de los folículos</i>	25
7.3	<i>Efecto del AMG9810 sobre las células TRPV1-positivas en los folículos ováricos</i>	28
8.	<b>DISCUSIÓN</b>	35
9.	<b>CONCLUSIÓN</b>	40
10.	<b>REFERENCIAS</b>	41
11.	<b>ANEXO</b>	48

## ***ABREVIATURAS***

ADN: ácido desoxirribonucleico

AEA: anandamida

AMG9810: antagonista selectivo y específico del receptor TRPV1

ATP: adenosin trifosfato

BCTC: antagonista del receptor TRPV1

BDNF: factor nervioso derivado del cerebro

CaMKII: calcio calmodulina quinasa

CGPR: péptido relacionado con el gen de la calcitonina

CGPRr: receptor del péptido relacionado con el gen de la calcitonina

CN: calcineurina

DGR: ganglio de la raíz dorsal

E2: estradiol

EAA: aminoácidos excitadores

EGF: factor de crecimiento epidérmico

FAA: folículo antral atrésico

FAAH: enzima amida hidrolasa de los ácidos grasos

FAS: folículo antral sano

FPA: folículo preantral atrésico

FPS: folículo preantral sano

FSH: hormona estimulante de los folículos

GABA: ácido- $\gamma$ -amino butírico

GDNF: factor nervioso derivado de la glía

GnRH: hormona liberadora de las gonadotropinas

HHG: eje hipotálamo-hipófisis-gónadas

LH: hormona luteinizante

NA: noradrenalina

NADA: N-araquidonil-dopamina

NGF: factor de crecimiento nervioso

NK<sub>r</sub>: receptor a neuroquinina

NT3: neurotrofina 3

NT4-5: neurotrofina 4/5  
NTs: neurotrofinas  
OLDA: oleildopamina  
OP: plexo ovárico  
P10: postnatal diez  
P57: receptor de factor de crecimiento nervioso de baja afinidad  
PAV: primera apertura vaginal  
PBS: buffer de fosfatos  
PI3K: fosfatidilinositol-3-quinasa  
PIP2: fosfatidilinositol bifosfato  
PKA: proteína quinasa A  
PKC: proteína quinasa C  
PLC: proteína fosfolipasa C  
RTX: toxina resinífera  
SON: nervio ovárico superior  
SP: sustancia P  
Src: proteína quinasa  
SSI: solución salina isotónica  
TrKA: receptor de factor de crecimiento nervioso de alta afinidad  
TRPV1: receptor a vaniloides de potencial transitorio tipo 1  
VIP: péptido intestinal vasoactivo

## ***Resumen***

Las células de la teca de los folículos ováricos expresan receptores TRPV1 y al administrar 1 o 10nM de capsaicina *in situ* los folículos atrésicos disminuyeron, mientras que con 1μM aumentó el número de ellos. En esta tesis mostramos que cuando administramos en la bolsa ovárica 1nM, 10nM o 1μM de AMG9810, un antagonista de los receptores TRPV1, el número de folículos atrésicos disminuyó y la edad de la primera apertura vaginal no se modificó, además con 1 nM de AMG9810, el número de células TRPV1-positvas aumentó en los folículos sanos y no cambió con 10nM o 1μM del mismo antagonista. Estos resultados sugieren que el AMG9810 protege de la atresia folicular y que los receptores TRPV1 son reguladores locales que modulan el desarrollo de los folículos ováricos, pero no la edad para iniciar la pubertad de las cobayas.

## ***1. INTRODUCCIÓN***

La reproducción es un proceso fisiológico fundamental para mantener y propagar las especies y es regulado por señales neuroendocrinas del sistema hipotálamo-hipófisis-gónadas (HHG) (Maffucci *et al.*, 2009, Pinilla *et al.*, 2012). La función de este sistema se basa en la interacción dinámica de los tres principales grupos de señales que surgen del; el hipotálamo, donde un grupo de neuronas dispersas sintetizan y liberan la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH); la hipófisis anterior donde se encuentran las neuronas que secretan las gonadotropinas; hormona leutinizante (LH) y hormona estimulante de los folículos (FSH) y las gónadas, que generan los ovocitos y secretan las hormonas esteroides y las hormonas peptídicas. El hipotálamo y la hipófisis se comunican por los nervios y la hormonas que viajan por los vasos portales, donde la GnRH estimula la secreción de gonadotropinas y estos, a su vez, promueven la maduración y la función de las gónadas (Maffucci *et al.*, 2009; Pinilla *et al.*, 2012).

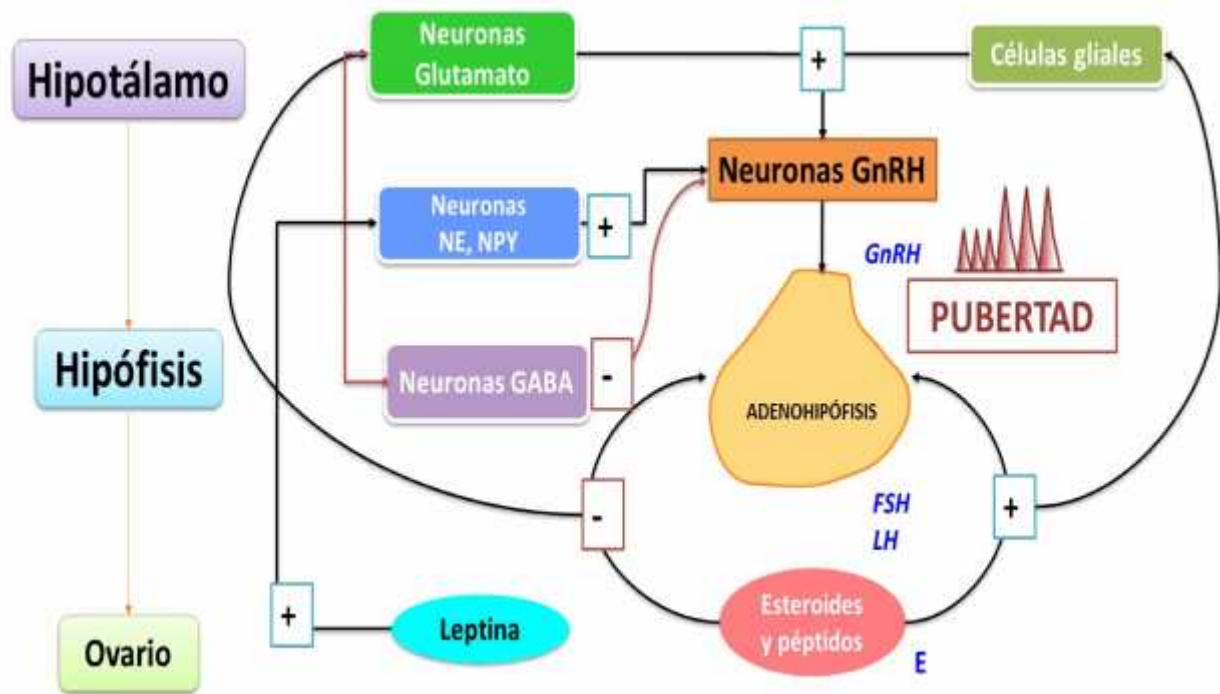
### ***1.1 La pubertad en los mamíferos***

Con la pubertad inicia la capacidad reproductiva de los individuos. Es un periodo de la vida en el que se caracteriza por aumento gradual de la frecuencia y de la amplitud de la secreción de la GnRH, hormona que regula la síntesis y la secreción de la FSH y LH que estimulan la producción de estradiol, progesterona, activina e inhibina para el desarrollo de los folículos ováricos. La síntesis y la secreción de estas hormonas también se regula por el sistema nervioso simpático, parasimpático y sensorial que se unen a los ovarios, lo hacen a través de diferentes neurotransmisores como la noradrenalina, la acetilcolina, la dopamina y de péptidos como sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Luna y Martínez, 2005). En los mamíferos, los ciclos reproductivos son controlados por una interacción compleja de hormonas y neurotransmisores a diferentes niveles del HHG (Figura 1) (Ojeda, 2000).

El hipotálamo es la región cerebral clave en la regulación de la pubertad, contiene neuronas que liberan la GnRH al sistema portal, donde se transporta hacia la glándula pituitaria anterior localizada en la parte media y basal del cerebro. En la pituitaria, la GnRH se une a sus receptores en las neuronas encargadas de liberar a las gonadotropinas, estas hormonas se liberan a la sangre y llegan a sus receptores en las células de las gónadas.



(Maffucci *et al.*, 2009). La LH y la FSH son hormonas funcionalmente complementarias para la ovulación; en los ovarios, la FSH estimula el desarrollo de los folículos al estimular la división celular y la esteroidogénesis, pero también favorece el aumento en el número de receptores a LH haciendo sinergia con FSH para mantener el crecimiento de los folículos. En la fase final del ciclo ovárico, la secreción de LH aumenta y es responsable de la ovulación y la luteinización de las células de los cuerpos lúteos (Palermo, 2007). El eje hipotálamo-hipófisis-ovarios, es un sistema regulados por diversos neurotransmisores que coordinan los procesos de secreción de las gonadotropinas y la producción de ovocitos. En el hipotálamo, el glutamato y el GABA son los principales neurotransmisores excitadores e inhibidores respectivamente que regulan a las neuronas GnRHérgicas e intervienen en el desarrollo y mantenimiento de la función reproductiva de los animales adultos (Figura 1) (Maffucci *et al.*, 2009).



**Figura 1.** Esquema de la regulación neuroendocrina del eje hipotálamo-hipófisis-ovarios. La secreción de GnRH del hipotálamo aumenta de forma pulsátil, llega a la hipófisis por la circulación sanguínea donde se estimula la liberación de LH y FSH, estas viajan hasta los ovarios provocando la secreción de esteroides y péptidos que intervienen en el desarrollo folicular, e iniciar la pubertad. Factores externos como la alimentación también influyen en el inicio de la pubertad (+)= regulación positiva, (-)=regulación negativa. (Ojeda, 2000).

## ***1.2 Factores metabólicos que regulan la reproducción de los mamíferos***

Se ha establecido que el estado metabólico del cuerpo está ligado a la reproducción, una función que demanda gran cantidad de energía. En el periodo puberal, las reservas metabólicas del cuerpo ejercen fuerte influencia para que los animales alcancen la pubertad, siendo el hipotálamo, el centro cerebral para regular la alimentación pero también la reproducción. Cabe señalar que en los humanos, el estrés metabólico y las condiciones de desequilibrio energético como la anorexia y la obesidad alteran los procesos de pubertad y la reproducción de los individuos (Wahab *et al.*, 2015; Di Yorio *et al.*, 2008). La leptina es una hormona peptídica producida en el sistema nervioso central pero también en los adipocitos, los ovarios y la placenta. La secreción de leptina tiene un ritmo circadiano asociado con la ingesta de alimentos, en humanos con hábitos diurnos aumenta a lo largo del día, mientras que en animales nocturnos como los roedores disminuye (González *et al.*, 2013). La producción y secreción de la leptina se relacionan con la masa grasa corporal y son afectados por los cambios en el consumo de alimentos. En varias especies como los humanos, los roedores y las vacas, la leptina circulante aumenta durante el desarrollo puberal y juega un papel importante en el estado nutricional y facilita el inicio de la pubertad (Zieba *et al.*, 2005). Sin embargo, en los ovarios, el tratamiento agudo con leptina inhibe la ovulación, pero el tratamiento crónico a bajas dosis mejora la ovulación en ratas (Di Yorio *et al.*, 2008), se ha reportado que la leptina aumenta la liberación de GnRH en la hipófisis contribuyendo así al inicio de la pubertad. En los últimos 50 años, en los humanos, la edad en la que inicia la pubertad ha disminuido aunque no se ha alcanzado la regularidad del ciclo ovárico. Una interpretación ha sido que la regularidad del ciclo ovárico depende de la nutrición y del estado metabólico de las mujeres y se ha asociado a la obesidad y a los niveles de leptina alterados que se presentan en el tejido adiposo (Cortés *et al.*, 2015).

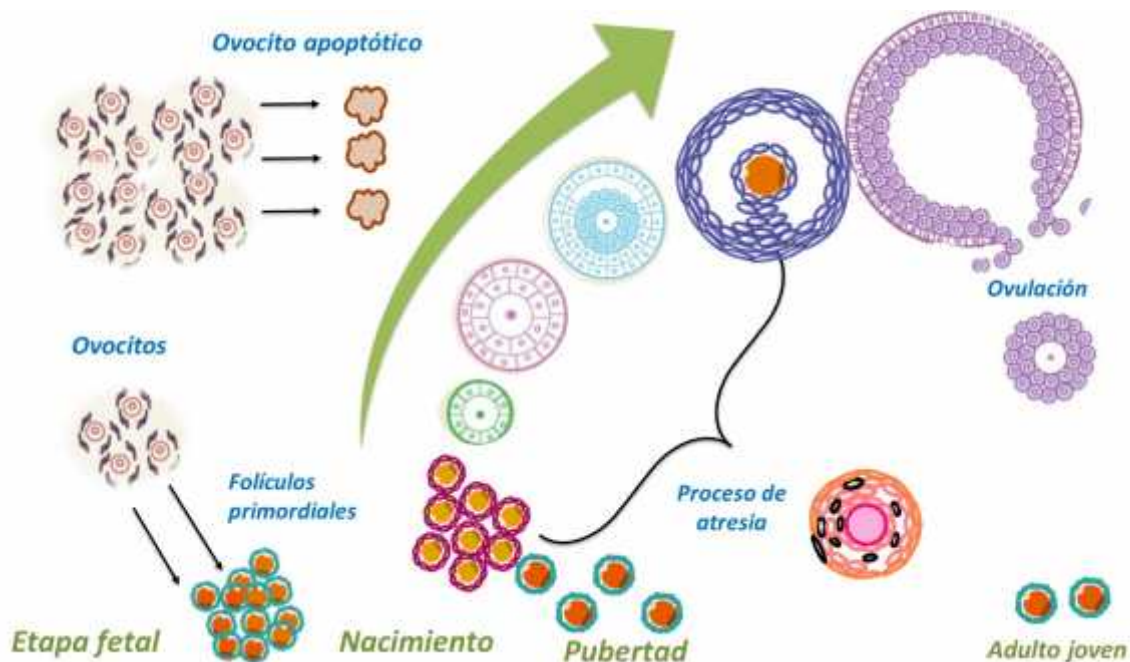
## ***1.3 Localización y estructura de los ovarios***

En las cobayas, los ovarios tienen forma ovalada y superficie lisa, se encuentran en la cavidad pélvica de la zona lumbar y están unidos por el mesovario a la cavidad peritoneal. Los nervios y los vasos sanguíneos ingresan al ovario por el ílio, que es la zona central del polo anterior. Los ovarios tienen dos regiones; la corteza y la médula, en la superficie de la corteza hay células cubicas del epitelio germinal y cercanas a ellas están los folículos primordiales (Palma *et al.*, 2012) y los folículos en diferente estado de desarrollo. El número

y el tamaño de ellos dependen de la edad del individuo y del ciclo reproductivo. Por otro lado, la medula ovárica es la región central de la glándula, contiene células intersticiales y abundante tejido conectivo, además se encuentran las arterias, venas y fibras nerviosas (Luna y Martínez, 2005).

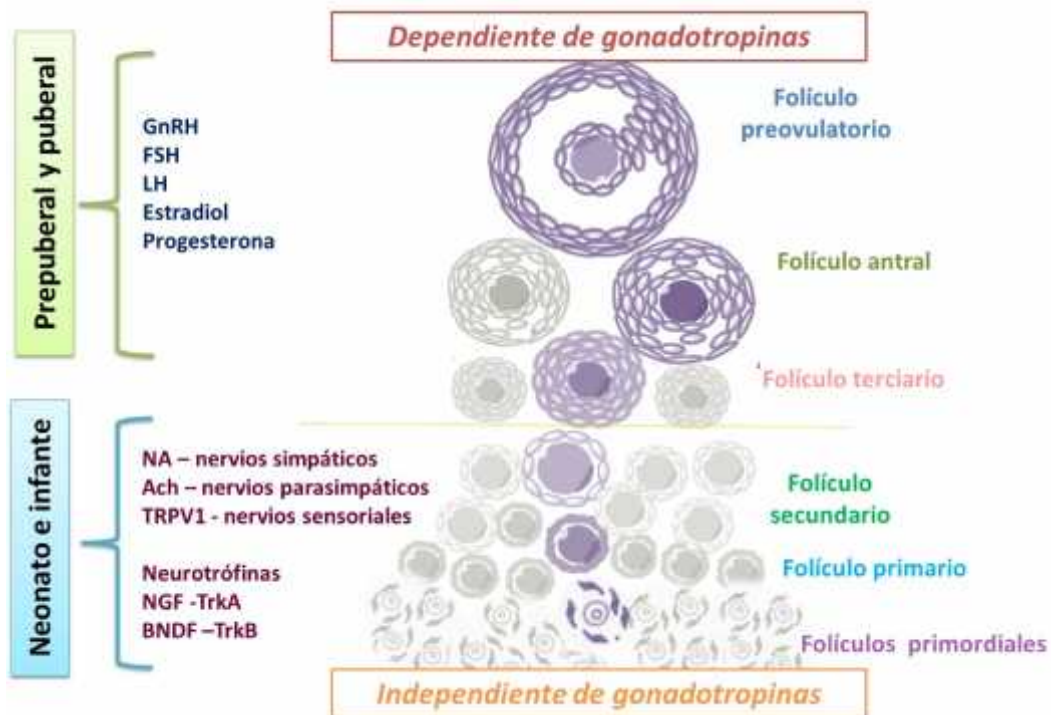
#### 1.4 Desarrollo folicular

En los mamíferos, los ovarios de las hembras al nacimiento tienen un número de folículos primordiales que caracteriza a cada especie. Así en ratas, las ovejas y las mujeres tienen alrededor de 20000, 160000, y 1000000 folículos primordiales respectivamente, sin embargo, sólo un número limitado de ellos se desarrollará hasta la fase preovulatoria y la mayoría de ellos (99%) degenerará por atresia (Figura 2) (Jin *et al.*, 2003).



**Figura 2.** Esquema de los estadios del desarrollo folicular. En las mujeres, de los 7 millones de ovocitos que se producen en la etapa fetal, la mayoría muere por apoptosis antes del nacimiento. Al nacer, solo quedan de uno a dos millones de ovocitos y durante la pubertad solo hay alrededor de 300000, de los cuales solo ovularán 400 a 500, el resto mueren por atresia (Tomado y modificado de Jin *et al.*, 2003).

El desarrollo de los folículos requiere de eventos coordinados que inducen cambios morfológicos y funcionales que incluyen diferenciación de las células de la teca, de la granulosa y desarrollo del ovocito (Palma *et al.*, 2012). Durante el desarrollo folicular aumenta la división de las células foliculares. Específicamente, la transformación del folículo preantral a folículo antral depende de las gonadotropinas, en ellos hay crecimiento del folículo pero también hay degeneración por atresia (Palma *et al.*, 2012). La atresia folicular se presenta por la muerte del ovocito o por muerte de las células de la granulosa (Figura 4). Hay atresia tipo A cuando degenera el ovocito y atresia de tipo B cuando degeneran las células de la granulosa (Luna y Martínez, 2005; Wang *et al.*, 2010). En las etapas iniciales de desarrollo folicular suceden lentamente y sin atresia. En contraste, en la etapa antral, el crecimiento folicular es rápido y los folículos son seleccionados para continuar su desarrollo y ovular o degenerar por atresia. Cabe precisar que la mayoría de los folículos se convierten en atrésicos y solo pocos de ellos son seleccionados y llegan a ser dominantes (Jin *et al.*, 2003). Los folículos primordiales son los menos desarrollados, contienen las células germinales para todo el periodo de reproducción de las hembras, están formados por el ovocito y una capa de células planas (Sánchez *et al.*, 2012; Luna y Martínez, 2015). Al nacimiento, el número de los folículos primordiales es alto, sin embargo, posteriormente decrecen hasta desaparecer en la edad senil. A partir de los folículos primordiales se desarrollan los folículos primarios en donde las células aplanadas se transforman a células cubicas (Sánchez *et al.*, 2012), este cambio morfológico contribuye a que el folículo aumente de tamaño y cambie su forma, esta etapa del desarrollo es independiente de la FSH (Sánchez *et al.*, 2012; Luna y Martínez, 2005). Posteriormente, los folículos se desarrollan a secundarios, las células de la granulosa proliferan y el ovocito completa su crecimiento. En esta etapa aparecen las células de la teca que posteriormente se diferencian en células de la teca interna y teca externa. Los folículos secundarios se convierten en terciarios cuando aparece el antro, es un espacio entre las células de la granulosa que está lleno de líquido folicular (Luna y Martínez, 2005), los folículos antrales expresan receptores de FSH y LH y su desarrollo responde de la acción de ellas (Figura 3) (Sánchez *et al.*, 2012).



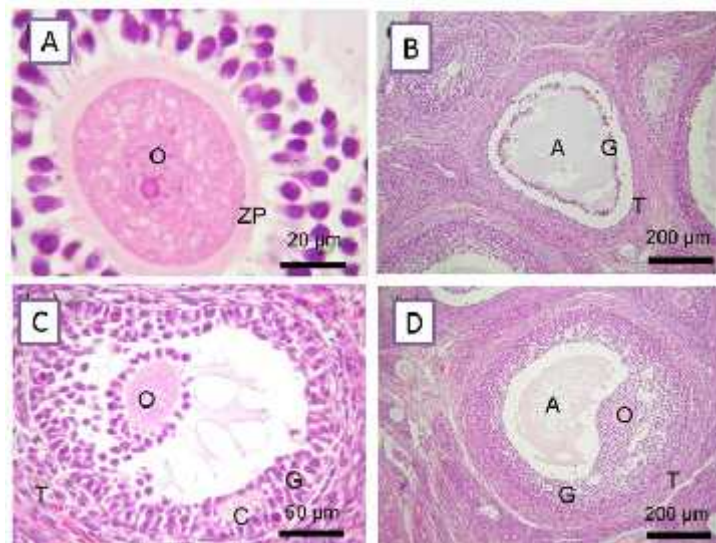
**Figura 3.** Etapas del desarrollo folicular en los ovarios de los mamíferos. Fase independiente y fase dependiente de las gonadotropinas (FSH y LH).

### 1.5 Atresia folicular

La muerte celular por apoptosis es un evento vital en el desarrollo embrionario de diversas especies y es esencial en la conservación y en la homeostasis de los sistemas vivos. En tejidos con capacidad de proliferación limitada como el sistema nervioso, el corazón y los riñones, la muerte celular por apoptosis es de baja frecuencia. En contraste, es amplia en el sistema hematopoyético, en el epitelio intestinal y en las gónadas. Específicamente, en el ovario, la apoptosis folicular ocurre continuamente durante todo el periodo de reproducción (Pérez *et al.*, 2004; Parborell *et al.*, 2008; Rosales *et al.*, 2008).

La atresia folicular, es un proceso por el cual los folículos se degeneran y mueren en una forma genéticamente programada, llamada apoptosis. El desarrollo y la atresia folicular son regulados por señales de supervivencia y de muerte celular que, en los sistemas sanos están en equilibrio, incluyen reguladores extra-ováricos (neuroendocrinos) como FSH y la LH y a reguladores intra-ováricos (paracrinos) como el estradiol, la progesterona, citoquinas, factores de crecimiento y proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas. Otros receptores que participan en el mismo proceso son los receptores TRPV1 (Alatríste *et al.*, 2013). El estado sano o

atrésico del folículo depende del equilibrio entre los factores que promueven la diferenciación, la proliferación y el crecimiento de las células y los que inducen apoptosis (Pérez *et al.*, 2004; Parborell *et al.*, 2008; Rosales *et al.*, 2008). En humanos se calcula que el 99.9% de los folículos sufren de atresia durante el funcionamiento regular de los ovarios, evolutivamente puede ser una ventaja, dado que solo se seleccionan aquellos folículos que contienen ovocitos viables (Parborell *et al.*, 2008). La comunicación paracrina entre células de la teca y de la granulosa es de suma importancia debido que se encargan del control de la esteroidogénesis, las células de la teca proporcionan los andrógenos que son los sustratos para la aromatización y la producción de estradiol por células de la granulosa (Ojeda, 2000). Inicialmente, el proceso de apoptosis afecta a las células de la granulosa, por lo cual ya no hay producción de estradiol y posteriormente a las células de la teca, sin embargo estas aun producen progesterona, para el mantenimiento de la función del tejido ovárico. En la muerte celular por apoptosis hay disminución del tamaño de las células, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN (Jin *et al.*, 2003). Diversos estudios sugieren que las hormonas (FSH) y los factores de crecimiento (NGF) contribuyen a la proliferación celular, aumentan la sobrevivencia y disminuyen la apoptosis. Se ha demostrado que los receptores TRPV1 aumentan la comunicación paracrina de las células del ovario y se ha propuesto que aumentan el desarrollo de los folículos (Alatraste *et al.*, 2013).



**Figura 4.** Folículos atrésicos en ovarios de cobaya. Atresia tipo A, apoptosis del ovocito (A, C), atresia tipo B, apoptosis de las células de la granulosa (B, D. A=antro, G=células de la granulosa, T= células de la teca, O= ovocito, ZP= zona pelúcida. (Wang *et al.*, 2010).

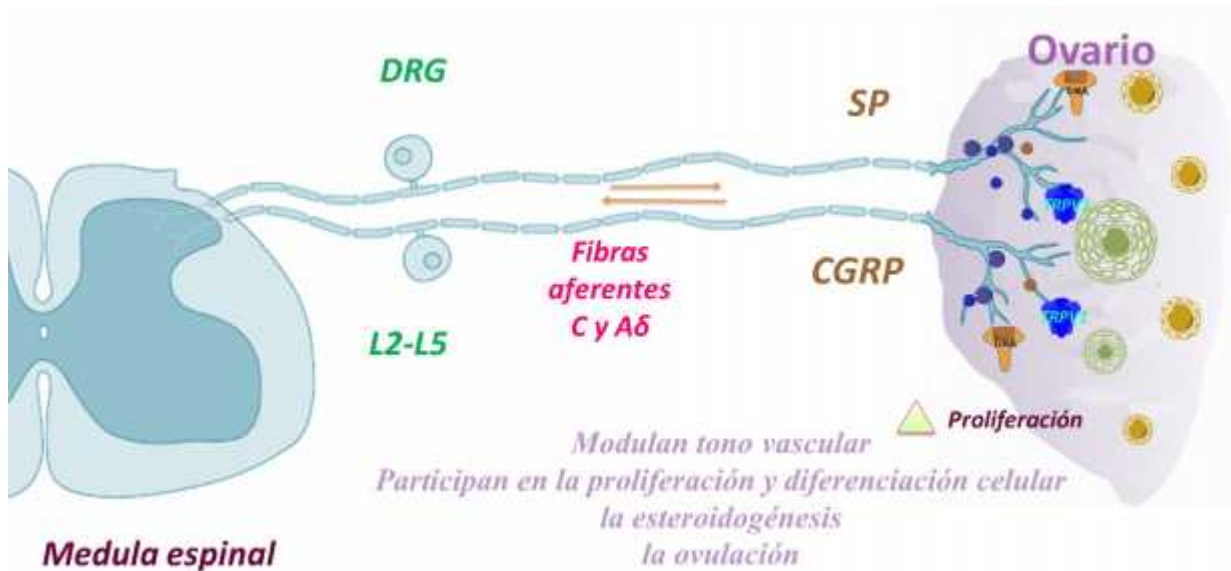
### ***1.6 Papel de las neurotrofinas en el desarrollo de las células ováricas***

Entre los factores para la supervivencia de los folículos se encuentran las hormonas hipotalámicas (FSH, LH) y hormonas ováricas (estradiol) siendo para los folículos antrales, los factores de supervivencia más importantes. Por lo que la atresia de los folículos ocurre cuando la producción de estradiol disminuye, lo cual precede a la muerte de las células de la granulosa por apoptosis (Jin *et al.*, 2003). En ovarios de rata, tratados con el factor de crecimiento nervioso (NGF) disminuye la apoptosis y aumenta la respuesta a la FSH, siendo un factor de supervivencia en los folículos antrales en desarrollo (Streiter, *et al.*, 2015). Otras neurotrofinas que participan en el desarrollo de los folículos son la neurotrofina 3 (NT3) y la neurotrofina 4/5 (NT4/5), el factor neuronal derivado del cerebro (BDNF), el factor neuronal derivado de la glía (GDNF) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP). Cada uno de ellos tiene un rol importante en el proceso normal y patológico del ovario. Así, las neurotrofinas intervienen positivamente en las diferentes etapas de desarrollo de los folículos y sus receptores están expresados en las diferentes células foliculares y en diferente proporción, participan en la ovulación, la esteroidogénesis, la proliferación y en la diferenciación de las células. En contraste, las neurotrofinas, también participan en patologías como; síndrome del ovario poliquístico, de manera particular, el NGF a través de su receptor TrkA promueve la proliferación de células foliculares, se encuentra en las células de los folículos preantrales y en la maduración posterior de los folículos; en folículos antrales se encuentra principalmente en células de la teca externa y no en la teca interna, además de las células intersticiales. Además, el NGF estimula la secreción de esteroides en los ovarios (Streiter *et al.*, 2015).

### ***1.7 Fibras nerviosas de los ovarios***

El ovario de los mamíferos posee fibras nerviosas parasimpáticas, simpáticas y fibras sensoriales, así como neuronas intrínsecas. Las fibras simpáticas liberan predominantemente noradrenalina NA y péptido intestinal vasoactivo VIP estimulando la ovulación (Luna *et al.* 2015), sin embargo otras son peptidérgicas y secretan SP y CGRP, sustancias que modulan el tono vascular en los ovarios (Figura 5). En el ovario, las fibras nerviosas censan estímulos y los transmiten a la medula espinal, también modulan el tono vascular, la esteroidogénesis y la ovulación (Alatríste *et al.*, 2013). El desarrollo de los folículos es mediado por el NGF a través de sus receptores de alta y baja afinidad, TrKA y p75 respectivamente, mientras que el factor

derivado del cerebro (BDNF) y factor derivado de la glía (GDNF) lo hacen a través de sus propios receptores. La liberación de las neurotróficas de las terminales nerviosas aferentes depende del calcio que proviene de los canales iónicos como el receptor de potencial transitorio a vaniloide tipo1 (TRPV1) (Luna *et al.*, 2013). Cabe mencionar que la expresión de los receptores TRPV1 aumenta por el NGF, lo hace al unirse a los receptores TrkA estimulando la traslocación de los receptores a la membrana plasmática, y con ello aumentando la sensibilidad del sistema sensorial (Zhang *et al.*, 2005).



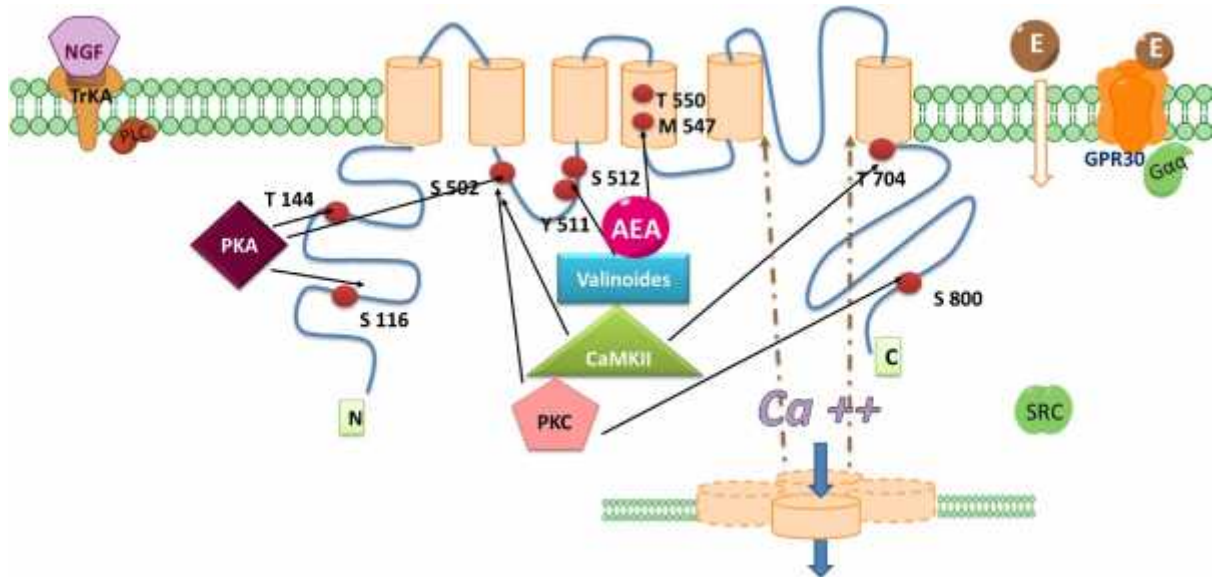
**Figura 5.** Esquema que ilustra los nervios sensoriales del ovario y su conexión con los ganglios de la raíz dorsal y la médula espinal. Estas fibras liberan a la sustancia P (SP) y al péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP).

### 1.8 Expresión tisular de los receptores TRPV1

La proteína TRPV1 pertenece a la súper familia de receptores de potencial transitorio (TRP). Es una proteína que tiene seis dominios transmembrana con un poro formado por los segmentos transmembrana 5 y 6 (Figura 6). El poro es un canal de calcio que se expresa de forma abundante en las fibras aferentes C y A (Szallasi *et al.*, 2007, Wong y Gavva, 2008). La lista de los agentes endógenos que activan al receptor TRPV1 incluye; la Bradiquinina, el NGF, la anandamida (AEA), el N-araquidonil-dopamina (NADA), la N-oleoildopamina, las prostaglandinas y la adenosina. También se activa por calor con temperatura mayor a 43



grados Celsius y por agentes exógenos como la capsaicina (Morales-Lázaro *et al.*, 2013; Szallasi *et al.*, 2007).

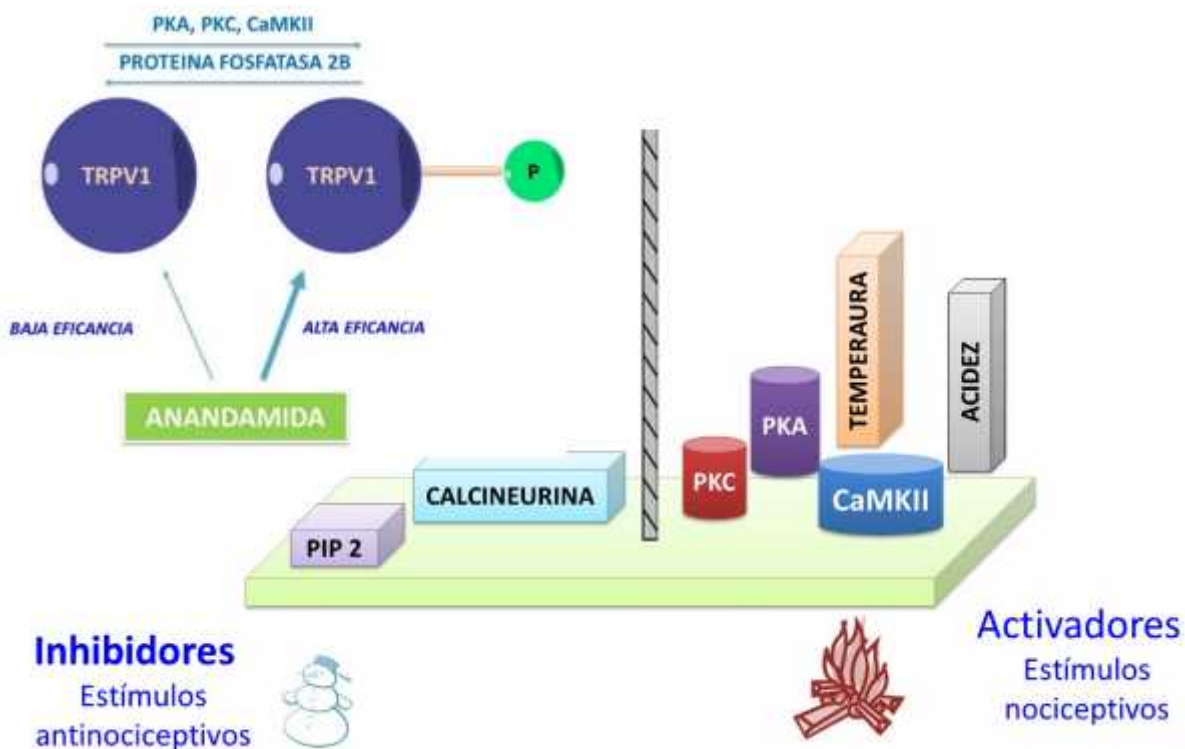


**Figura 6.** Modelo del receptor TRPV1 en la membrana celular. La proteína tiene seis segmentos transmembranales con dominios N y C terminal en el citoplasma, además se muestran sus sitios de fosforilación por quinasas (PKA, PKC, CaMKII, SRC) que pueden ser activados indirectamente por los receptores TrkA, GPR30, NGF y E2 y directamente por AEA en el sitio de unión a vaniloides (Oseguera *et al.*, 2008).

La función de los receptores TRPV1 se ha estudiado en diversas situaciones como en la inflamación, en el dolor agudo, en el dolor crónico, en la artritis reumatoide y en la hiperalgesia, entre otros. Inicialmente, la expresión tisular del receptor TRPV1 fue descrita en las neuronas pequeñas y medianas de los DGR, posteriormente en neuronas del hipotálamo, del hipocampo y de la amígdala y después en células no neurales (Oseguera *et al.*, 2008). Se han localizado en la vejiga urinaria, la uretra, en los intestinos, también en el sistema respiratorio y el sistema cardiovascular. En estos órganos se ha relacionado con la inflamación, el dolor, la secreción de moco, tos y en la contracción de los bronquios. Recientemente la expresión de los receptores TRPV1 también se ha relacionado con algunos tipos de cáncer (Oseguera *et al.*, 2008; Morales-Lázaro *et al.*, 2013).

### 1.9 Transducción de estímulos por los receptores TRPV1

El canal del receptor TRPV1 se encuentra en equilibrio entre el estado abierto y cerrado. En reposo, algunos aminoácidos del canal se encuentran en un estado fosforilado (Szallasi *et al.*, 2007; Tóth *et al.*, 2009) y los estímulos nociceptivos promueven el estado abierto del canal. En contraste, los agentes antinociceptivo inducen el estado cerrado de los canales TRPV1 (Figura 7). El fosfatidilinositol (4,5) bifosfato (PIP2), es el ligando endógeno que mantiene cerrado el canal del receptor TRPV1, mientras que la desensibilización se activa por el flujo de calcio a través del canal y activa varias vías de señalización intracelular. En el espacio intracelular, la desensibilización de los receptores TRPV1 dependen de la concentración de PIP2, siendo un control inhibitorio que se facilita por la adenosina, en contraste, el ATP activa esta vía. La sensibilización del receptor TRPV1 aumenta por la fosforilación de algunos aminoácidos que ocurre por la acción de las cinasas como la PKC, PKA y CaMKII. Cabe señalar que con la desfosforilación hay un efecto antinociceptivo (Szallasi *et al.*, 2007; Rosembaum *et al.*, 2007)

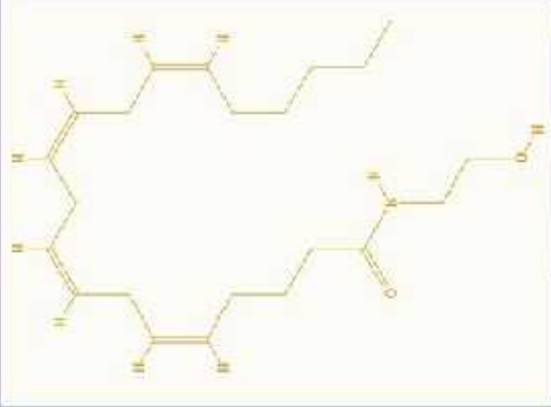
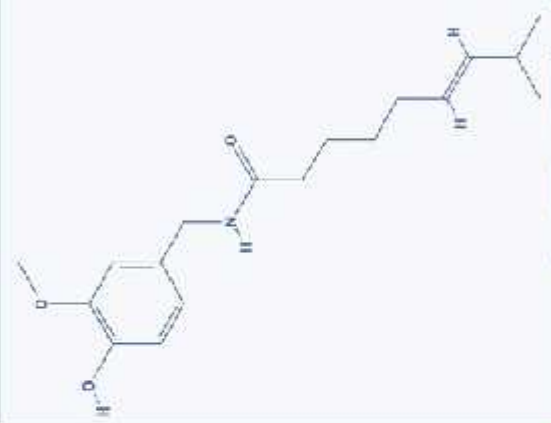
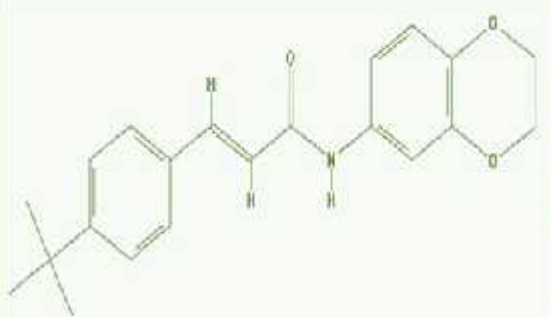
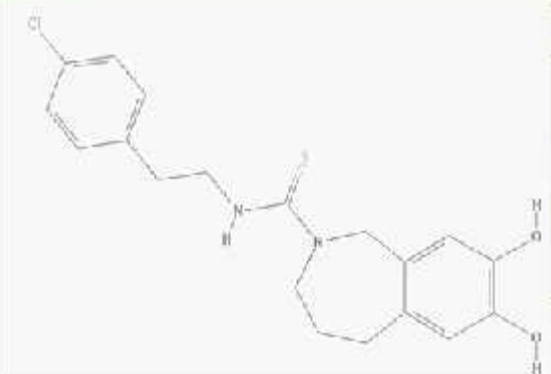


**Figura 7.** Reguladores del receptor TRPV1. El receptor se encuentra en equilibrio entre el estado cerrado o abierto. Los inhibidores, son estímulos antinociceptivos y mantienen al canal en estado cerrado, mientras que los activadores se inducen por los estímulos nociceptivos y lo mantienen abierto (Rosembaum *et al.*, 2007; Tóth *et al.*, 2009).

Un ligando endógeno que activa a los receptores TRPV1 es el NFG, lo hace a través del receptor de alta afinidad TrkA y del receptor de baja afinidad p75 lo cual inducen la activación por el PLC e hidrolisis de PI2P, a la vez, el NGF activa a PKA y PKC y la cascada de señalización mediada por CaMKII. Por otra parte, la vía de señalización de PI3K también activa la quinasa Src que fosforila a aminoácidos del TRPV1 e induce su translocación en las membranas de la célula (Rosebaum *et al.*, 2007). De los ligandos endógenos, la AEA es un agonista completo de baja afinidad (Ross, *et al.*, 2003; Tóth *et al.*, 2009).

### ***1.10 Importancia farmacológica de los antagonistas del receptor TRPV1***

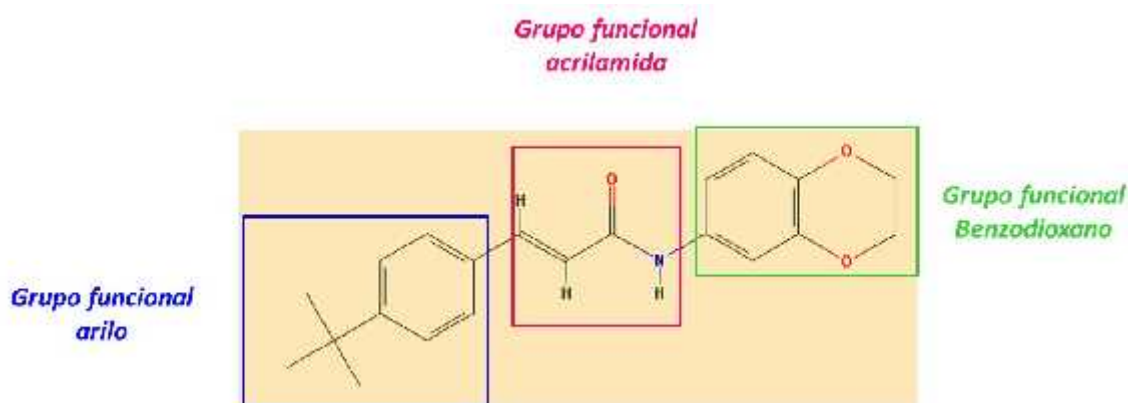
En los últimos 10 años, el receptor TRPV1 ha sido uno de los mejores para probar y obtener antagonistas y mejorar los procesos patológicos en los que participan. Los receptores TRPV1 juegan un papel clave en la sensación térmica y en la traducción del dolor. El ligando endógeno es la anandamida, pero también se activa por los protones en medio ácido (pH=5.7) y por las lipoxigenasas activando vías de señalización de proteínas acopladas a proteínas G (Wong *et al.*, 2009). Los receptores TRPV1 se han encontrado implicados en diferentes patologías que cursan con dolor agudo y crónico, tal como la osteoartritis, dolor neuropático, migraña, inflamación de los intestinos y dolor por cáncer de hueso, también se han implicado en el dolor, termorregulación, neurogénesis y proliferación, entre otras funciones (Feng *et al.*, 2015). En estas patologías, los receptores TRPV1 han sido un blanco terapéutico para tratamiento del dolor (Szallasi *et al.*, 2007; Gomtsyan, 2010). Se han usado agonistas específicos como la capsaicina a alta dosis que produce desensibilización y analgesia, mientras el uso de antagonistas representa un nuevo enfoque terapéutico para el tratamiento del dolor (Feng *et al.*, 2015). Por lo tanto, el uso de agonistas y antagonistas de los receptores TRPV1 resulta interesante para evaluar diversos procesos fisiológicos (Wong y Gavva, 2008). En la figura 8 se muestra una lista de agonistas y antagonistas del receptor TRPV1.

	<b>Anandamida</b>		<b>Referencia</b>	
	Agonista endógeno	EC50	0.7–5 $\mu$ M	Ross et al., 2003
	Aceptor H		2	<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281969">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281969</a>
	Donador H		2	
	XLogP3		5.4	
	<b>Capsaicina</b>		<b>Referencia</b>	
	Agonista exógeno	EC50	0.04–1 $\mu$ M	Vetter et al., 2011
	Aceptor H		3	<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1548943">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1548943</a>
	Donador H		2	
	XLogP3		3.6	
	<b>AMG9810</b>		<b>Referencia</b>	
	Antagonista	IC50	25nM	Szallasi et al., 2007
	Aceptor H		3	<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/680502#section=Top">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/680502#section=Top</a>
	Donador H		1	
	XLogP3		4.6	
	<b>Capsazepina</b>		<b>Referencia</b>	
	Antagonista	IC50	420nM	Szallasi et al., 2007
	Aceptor H		3	<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2733484#section=Top">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2733484#section=Top</a>
	Donador H		3	
	XLogP3		3.9	

**Figura 8.** Agonista y antagonistas del receptor TRPV1

### 1.11 El AMG9810, un antagonista de los receptores TRPV1

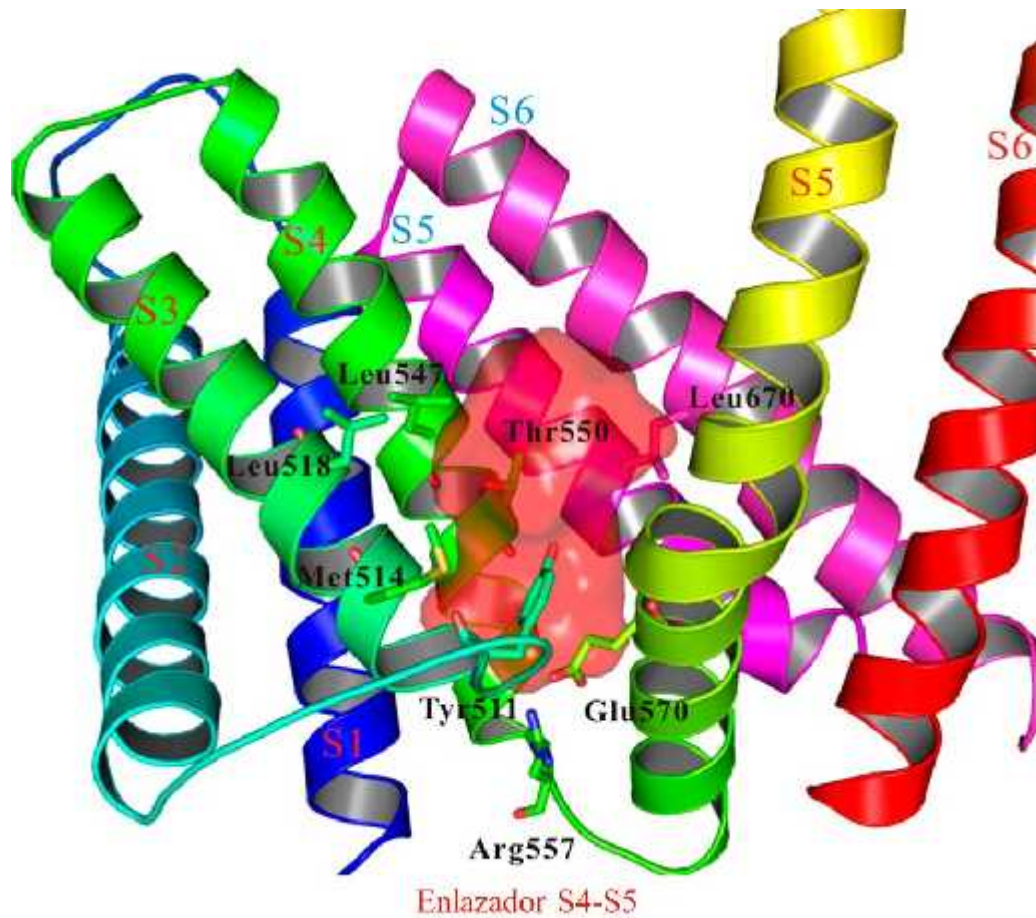
El AMG9810 [(E)-3-(4-*t*-butilfenil)-*N*-(2,3-dihidrobenzo [b] [1,4] dioxin-6-il) acrilamida] (Figura 9). Es un antagonista potente (IC<sub>50</sub> 25 nM) de los receptores TRPV1 con alta selectividad y afinidad, es un antagonista competitivo de la capsaicina y bloquea todos los modos conocidos de activación de TRPV1 incluyendo, los protones, el calor y los ligando endógenos como la anandamida, en donde disminuye la liberación del CGRP y bloquea la corriente de calcio (Gharat, 2007; Li S, *et al.*, 2011). En vivo, AMG9810 fue efectivo en revertir la hiperalgesia en ratones y disminuir la inflamación (Gavva *et al.*, 2005). La estructura principal se divide en tres secciones: grupo funcional benzodioxano, el núcleo de acrilamida y un grupo arilo (Gharat, 2007). AMG9810 y sus análogos tienen una estructura molecular básica similar. (Gharat, 2007 Szallasi *et al.*, 2007, Feng *et al.*, 2015).



**Figura 9.** Estructura molecular del AMG9810 [(E)-3-(4-*t*-butilfenil)-*N*-(2,3-dihidrobenzo[b] [1,4] dioxin-6-il) acrilamida] (Gavva *et al.*, 2005).

Los residuos que afectan la sensibilidad de TRPV1 por los ligando vaniloides, como RTX, la capsaicina, AMG9810 y capsazepina se han identificado principalmente en el bolsillo de unión a vaniloides, se encuentra formado por cinco dominios tras membrana de dos monómeros adyacentes (figura 10) que incluye los dominios S3, S4, el enlazador que une al dominio S4 y S5, y el dominio S5 que se encuentran localizados en el mismo monómero y S6 del monómero adyacente. Los residuos importantes que intervienen en el bolsillo de unión se incluyen los aminoácidos Try511(S3), Met514(S3), Leu518 (S3), Leu547 (S4), Thr550 (S4),

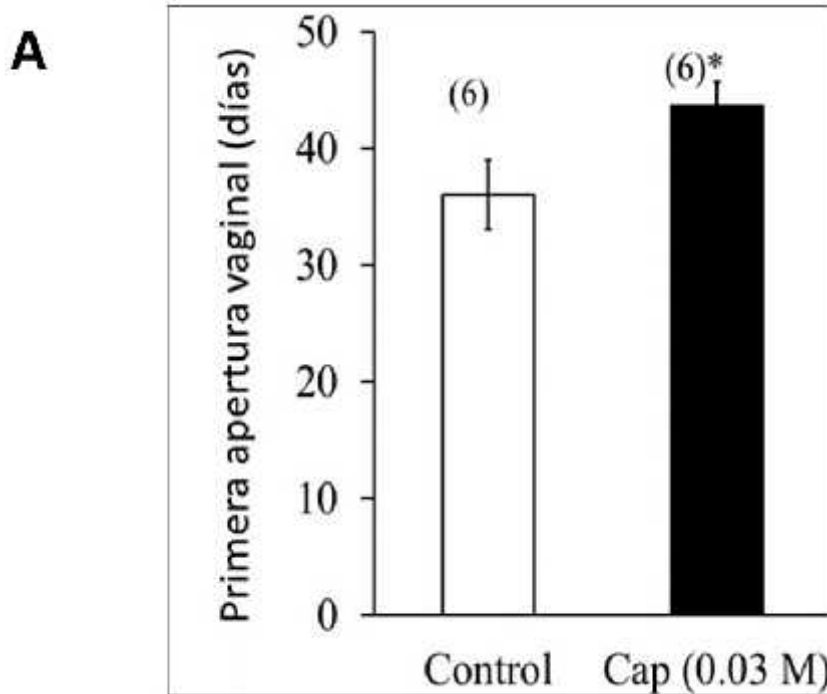
Arg557 (enlazador S4-S5), Glu570 (S5 del primer monómero), y Leu670 (S6 del segundo monómero). Estos residuos se han informado ser críticos para la unión de ambos agonistas y antagonistas, incluyendo AEA, NADA, OLDA, RTX, la capsaicina, BCTC, A-425619, AMG9810, SB-366791, capsazepina, entre otros.



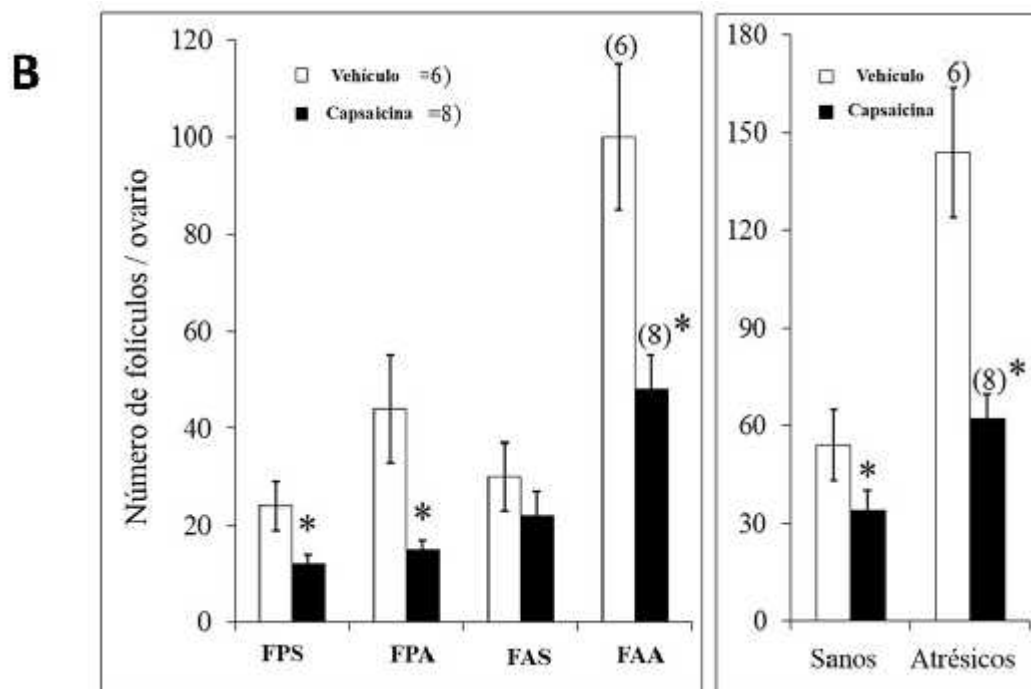
**Figura 10.** Predicción del bolsillo de unión de TRPV1. El bolsillo se forma por cinco dominios tras-membrana a partir de dos monómeros. El bolsillo se resalta en color rojo, mientras que los dominios transmembrana de diferentes monómeros se indican con letras en dos colores diferentes (rojo y azul) los residuos importantes se muestran, incluyendo Try511, Met514, Leu518, Leu518, Leu547, Thr550, Arg557, Glu570 y Leu670 (Feng et al., 2015).

### ***1.12 Los receptores TRPV1 modulan la pubertad y el desarrollo folicular en la cobaya***

La capsaicina es un agonista selectivo de los receptores TRPV1, cuando se une a ellos a altas concentraciones produce la apertura del canal y la entrada masiva de calcio, lo que produce muerte celular, sin embargo a dosis bajas, hay despolarización de la membrana lo que produce la liberación de péptidos como el CGRP y SP. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio hechos en cobayas con dosis altas (0.03M, ip) atrasa la pubertad y el desarrollo folicular (Figura 11 y 12) (Alatriste *et al.*, 2013). Es aceptado que las fibras nerviosas aferentes (C y A ) tienen cuerpos celulares en los ganglios de la raíz dorsal (Szallasi *et at.*, 2007) de los segmentos lumbares L2-L5, son fibras que liberan NGF, SP y CGRP que actúan a través de sus receptores específicos TrKA, NKr o CGRPr, respectivamente, a través de los receptores TRPV1 modulan el desarrollo folicular y la pubertad siendo sensores que integran la transmisión sensorial del ovario al SNC (Alatriste *et al.*, 2013). En los ovarios, el NGF se libera de las células de la teca y de las células de la granulosa y estimula el desarrollo folicular y la esteroidogénesis. En la médula espinal, las terminales nerviosas regulan la liberación de glutamato y la excitabilidad activando las vías ascendentes espinales hacia el tálamo e hipotálamo, regulando así, el inicio de la pubertad (Alatriste, *et al.* 2013; Luna *et al.*, 2013).



**Figura 11.** Edad de la primera apertura vaginal de las cobayas tratadas con capsaicina a los 10 días. En las cobayas tratadas con capsaicina (0.03 M) por vía subcutánea, la PAV fue  $44 \pm 1.8$  días vs  $36 \pm 3$  días en los animales administrados con el vehículo (Alatraste et al., 2013).



**Figura 12.** Folículos en los ovarios de cobayas tratadas con capsaicina (0.03M) por vía subcutánea los 10 días de edad. En número de FPS, FPA, FAS y FAA disminuyo 50, 66, 27 y 52% respectivamente con respecto al grupo administrado con el vehículo. Los folículos atrésicos disminuyeron 37 y 57% respectivamente (Alatraste et al., 2013).



## **2. JUSTIFICACIÓN**

La expresión del receptor TRPV1 se ha localizado en tejidos neurales como no neurales participando en diferentes procesos, al mismo tiempo modula la trasmisión del dolor. Sin embargo su participación en el sistema reproductor aún no ha sido bien dilucidada. Estudios previos en nuestro laboratorio han sugerido que la participación de los receptores TRPV1 en el desarrollo folicular y proliferación celular y al mismo tiempo a la modulación de la pubertad por medio de las fibras aferentes sobre el eje de regulación de la pubertad. Cabe mencionar, que la caracterización funcional de los receptores puede obtenerse no solo por el uso de agonistas, sino también por el uso de antagonistas.

En las cobayas, la administración subcutánea de capsaicina a dosis toxica (0.03M), atrasa la pubertad y disminuye el número de folículos (Alatríste, *et al* 2013). Por otro lado con dosis bajas de capsaicina administrada en la bolsa ovárica, el efecto fue dependiente de la dosis; con 1 y 10 nM, el desarrollo de los folículos aumentó y con 1  $\mu$ M aumenta la atresia (Mora, 2015).

La capsaicina es un potente neurotóxico que ha sido empleado para estudiar al receptor TRPV1, sin embargo se desconoce la respuesta en los ovarios por la inhibición selectiva de los mismos receptores. Por lo cual es pertinente probar el efecto fisiológico que puede presentar por el bloqueo de los receptores, sobre el desarrollo folicular y la pubertad. En este trabajo estudiamos el efecto del AMG9810, un antagonista selectivo de los receptores TRPV1 ( $IC_{50}$  25nM). Usamos dosis bajas (nano y micromolar) que administramos en la bolsa ovárica. Cabe mencionar que la vía de administración local (bolsa ovárica) se utilizó para ejercer acciones en el ovario. Tanto agonistas como antagonistas del receptor TRPV1 son altamente liposolubles y pueden atravesar directamente la membrana interactuando así con el receptor.

### ***3. HIPÓTESIS***

La administración local del AMG9810, un antagonista de los receptores TRPV1 atrasa la pubertad y el desarrollo folicular en los ovarios de la cobaya.

### ***4. OBJETIVO GENERAL***

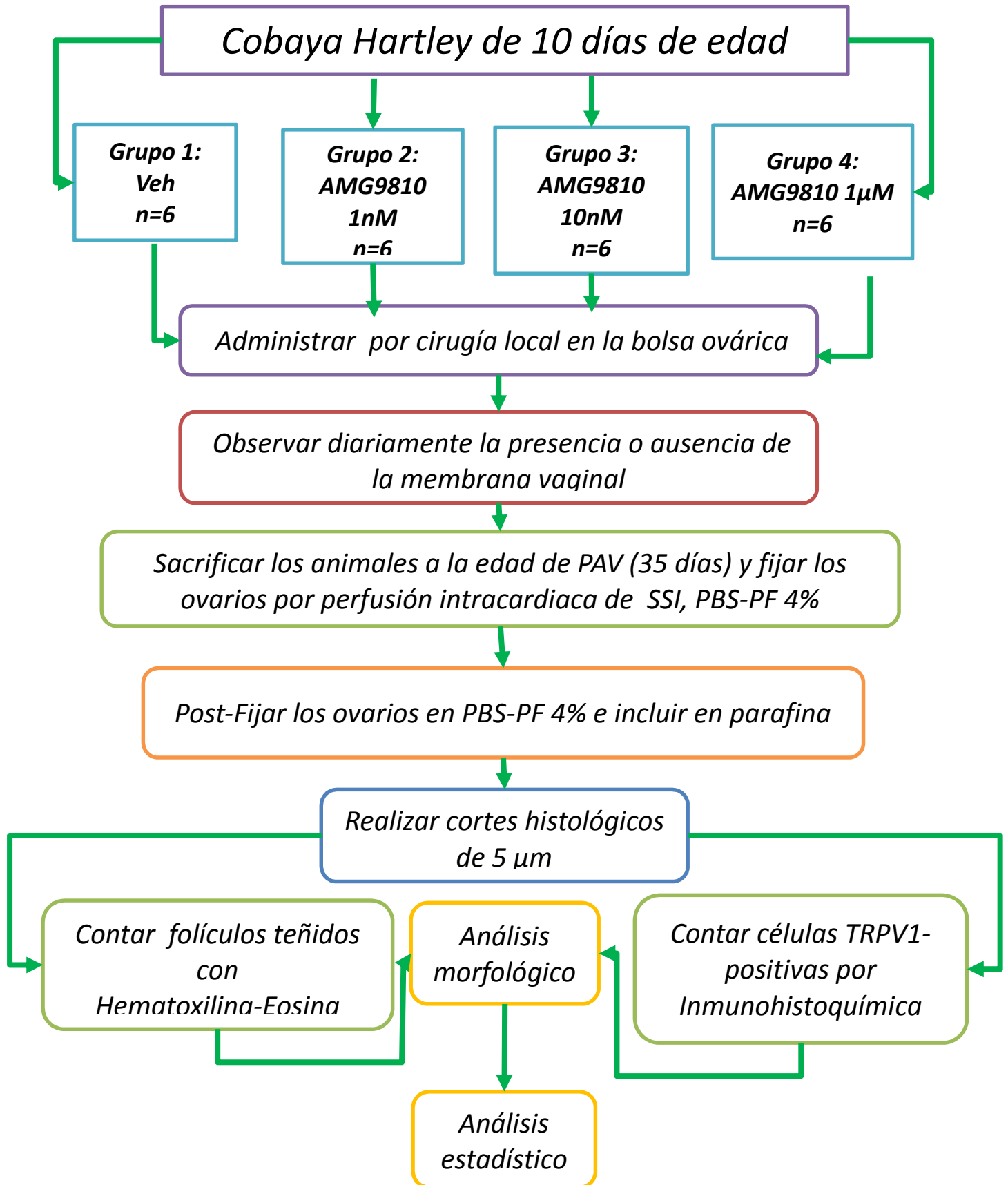
Estudiar el efecto del AMG9810 administrado en la bolsa ovárica sobre la pubertad y el desarrollo folicular de la cobaya.

#### ***4.1 OBJETIVOS PARTICULARES***

4.1.1. Evaluar el inicio de la pubertad de las cobayas después de la administración de AMG9810 en la bolsa ovárica.

4.1.2 Evaluar las poblaciones de folículos y el número de células TRPV1-positivas en los ovarios después de la administración de AMG9810 en la bolsa ovárica

## 5. DIAGRAMA DE TRABAJO



## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Animales**

Los animales empleados en este proyecto se usaron siguiendo los criterios para el cuidado y uso de animales en experimentación que estipula la norma oficial mexicana **NOM-062-ZOO-1999** que esta norma está en concordancia con los criterios internacionales del NIH, USA. Ambos criterios cumplen con los requisitos solicitados en las revistas científicas de circulación internacional.

Utilizamos 24 cobayas hembras Hartley de 10 días de edad que nacieron de hembras que estaban en los últimos días de la gestación. El destete de las crías se llevó a cabo a los 6 días de edad, después del cual, las cobayas infantiles se mantuvieron en cajas colectivas en grupos de 4 hasta finalizar el experimento. Las cobayas incluidas en el experimento se mantuvieron a temperatura de  $20\pm 2$  grados Celsius teniendo alimento y agua a libre acceso. La dieta fue suplementada con alfalfa y vitamina C que fue disuelta en el agua de bebida. Después del destete, las cobayas se dividieron aleatoriamente en 4 grupos: A los animales del grupo 1, por cirugía en la región dorsal se les administró en la bolsa ovárica 100 microlitros del vehículo (solución salina isotónica, SSI), mientras que a los animales del grupo 2, 3 y 4 se les administró en el mismo volumen con 1nM, 10nM o 1  $\mu$ M de AMG9810. Tanto el vehículo como el AMG9810 se administraron a los 10 días de edad y los animales fueron sacrificados a la edad de la primera apertura vaginal (PAV).

### **6.2 La cobaya, Cavia porcellus como modelo para estudiar procesos de reproducción**

Las cobayas, son excelente modelo animal para estudiar el sistema reproductivo considerando que comparten similitudes a los humanos y con los grandes animales domésticos como la vaca. Son animales que tienen ciclos estrales largos (16 a 18 días), ovulan espontáneamente y sus cuerpos lúteos funcionan durante varios días (12). El inicio de la pubertad ocurre a los 35 días de edad con masa ovárica bien desarrollada (27 mg/100 g). Las cobayas ovulan 3 ovocitos y su periodo de gestación es de 70 días teniendo en promedio 3 crías por camada, a diferencia de otros roedores como ratas, los ratones y los hámster, las cobayas al nacer ya tienen folículos en desarrollo. Además, en las cobayas, la duración de los procesos fisiológicos son parecidos a los primates no humanos y a los humanos en

comparación con las ratas y los ratones (Alatríste *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2010, Sun *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2015).

### **6.3 Administración del AMG9810 en la bolsa ovárica**

A cobayas de 10 días de edad y por cirugía en la región dorsal lumbar L2 y L5 se les colocó en la bolsa ovárica un implante de gelatina (Hemospon) que contenía el vehículo (etanol-SSI, 1:100 a pH 7.4), 1nM, 10 nM o 1  $\mu$ M de AMG9810. Con el fin de conseguir anestesia, analgesia y relajación muscular de los animales, las cobayas fueron inyectadas con ketamina (35 mg/Kg, im), a los 2.5 minutos xilacina (5 mg/Kg, im), a los 2.5 minutos después, cloropiramina como antihistamínico (10 mg/Kg, ip). Finalmente y después de 2.5 minutos, salbutamol como broncodilatador (1mg/Kg, ip). Para la cirugía primero se hizo una pequeña incisión en la piel, posteriormente se separaron los músculos para acceder a la bolsa ovárica donde se colocó el bloque de gelatina hidrolizada estéril (Hemospon) e impregnada con las correspondientes soluciones (vehículo o AMG9810). Posteriormente, se suturó por capas, primero los músculos y después de la piel, en seguida aplicamos azul de metileno para ayudar a la cicatrización. Una vez concluida la cirugía, los animales se tuvieron en observación hasta su recuperación de la anestesia y después regresados al bioterio. En los días siguientes, se revisó la zona de la cirugía y la alimentación de los animales hasta completar el experimento aproximadamente a los 35 días.

### **6.4 Registro de la primera apertura vaginal (PAV)**

Después de finalizar la cirugía antes descrita, las cobayas se mantuvieron en cajas de plástico en grupos de 4 animales, a partir del día 25, se observó a simple vista la región anogenital de los animales para verificar la presencia o ausencia de la membrana vaginal, cuando la membrana vaginal desapareció se tomó como edad de inicio de la pubertad. Cabe mencionar, que en las cobayas, cuando presentan el estro la cavidad de la vagina se encuentra totalmente abierta, con respecto a los demás días del ciclo (diestro).

### ***6.5 Obtención de los ovarios***

A la edad de la primera apertura vaginal, para el sacrificio, las cobayas se colocaron en una cámara de CO<sub>2</sub> a baja presión, posteriormente se hizo perfusión por vía intracardiaca de solución salina isotónica (150 mililitros, SSI), seguida de paraformaldehído-PBS al 4% (150 mililitros). Después se diseccionaron los ovarios, se pesaron en fresco en una balanza analítica de precisión (Ohaus) y se post-fijaron con paraformaldehído-PBS al 4%. A partir de los pesos absolutos que fueron los pesos (mg) en fresco de los ovarios y del peso de las cobayas (gramos) se calculó el peso relativo (mg/100g) sin diferenciar entre el ovario izquierdo y el ovario derecho. Cabe señalar que el peso relativo es una forma de estandarización de los datos considerando que el peso de los órganos pélvicos varía y depende del peso corporal de los individuos.

### ***6.6 Inclusión de los ovarios en parafina***

Los ovarios fueron incluidos en parafina usando los métodos de deshidratación con alcohol a concentraciones crecientes, clarificados con xilol y después infiltrados con parafina líquida que fue realizado en un histoquinete de banda (Leica). Posteriormente, se realizaron bloques con parafina que contenían los ovarios. Después se realizaron cortes histológicos seriados de 5 µm de espesor de todo el ovario en un micrótomos de deslizamiento (Leica SM2010R) obteniendo cortes histológicos a intervalos de 100 micras, los cuales fueron teñidos con hematoxilina-eosina y destinados para contar los folículos.

### ***6.7 Número de folículos en los ovarios***

Los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina se analizaron con un microscopio de campo claro (Zeiss). Los folículos fueron clasificados con base en las características morfológicas de las células de la teca, las células de la granulosa y del ovocito (Wang et al., 2010). Los folículos se clasificaron en cuatro categorías; folículos preantrales sanos (FPS), folículos preantrales atrésicos (FPA), folículos antrales sanos (FAS), folículos antrales atrésicos (FAA).

### **6.8 Inmunohistoquímica para los receptores TRPV1**

Por la técnica descrita antes y de los ovarios que contamos los folículos, tomamos cortes para realizar la inmunohistoquímica. Los cortes histológicos se desparafinaron, hidrataron y lavaron con solución de PBS. La recuperación antigénica se realizó con buffer de citratos (0.1 mM, pH= 6), se permeabilizaron con PBS-Triton-100X al 2%, y las proteínas inespecíficas se bloquearon con albúmina bovina libre de IgG al 0.5% en PBS-T. Posteriormente, los cortes histológicos se incubaron por 18 horas con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-receptor a capsaicina (Millipore) (1:50) a 4 grados Celsius, y por 2 horas con el anticuerpo secundario IgG de cabra (H&L) conjugado con fenil-isotiocianato (FITC) (Santa Cruz Biotechnology) (1:250) a temperatura ambiente. Los núcleos de las células se marcaron con yoduro de propidio por 2 minutos (1:1000, Millipore). Finalmente, las laminillas se protegieron con fluido de montaje (Millipore). La fluorescencia se detectó con un microscopio Leica DM1000 que tiene acoplada una cámara con la que se tomaron fotografías que se procesaron con el programa IM50 para PC.

### **6.9 Número de células TRPV1-positivas**

Por animal experimental realizamos 5 ensayos independientes y contamos las células TRPV1-positivas en 5 campos representativos usando la herramienta “cellcounter” del software NIH ImageJ (NCBI, USA). El resultado cuantitativo final fue medido con la herramienta “measure” y las células fueron positivas cuando la medición de color fue  $\geq 50$  unidades arbitrarias (AU) y negativas todas aquellas que tengan  $< 50$  AU.

### **6.10 Pruebas estadísticas**

El número folículos y número de células TRPV1-positivas se compararon con el valor del grupo control con la prueba de ANOVA de dos vías por haber múltiples variables de afectación, seguida de la prueba U de Mann-Whitney, por ser una variable de distribución no paramétrica que compara agrupando los datos por su valor, independientemente del grupo al que pertenece. Para la edad de la primera apertura vaginal se usó la prueba T-Student seguida de U Mann-Whitney. El análisis estadístico se realizó en el programa GraphPad Prism 5 y las gráficas fueron realizadas en el programa Microsoft Office 2013 Excel. Los resultados se tomaron como diferentes cuando la probabilidad resultó menor al 5%.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Edad de la primera apertura vaginal

El AMG9810 en la bolsa ovárica no modificó la edad de la primera apertura vaginal, tampoco afectó el peso corporal y el peso de los ovarios como lo mostramos en la tabla 1.

**Tabla 1.** Edad de la primera apertura vaginal (PAV), peso corporal y de los ovarios de las cobayas control y administradas con AMG9810 en la bolsa ovárica a los 10 días de edad.

	PAV (días)	Peso corporal (g)	Ovarios (mg/100 g)
Vehículo (n=7)	36±3	345±19	17±3
AMG9810 1 µM (n=6)	35±1.5	316±23	13±2
AMG9810 10 nM (n=6)	31±2	374±12	19±2
AMG9810 1 nM (n=6)	44±4	348±10	14±2

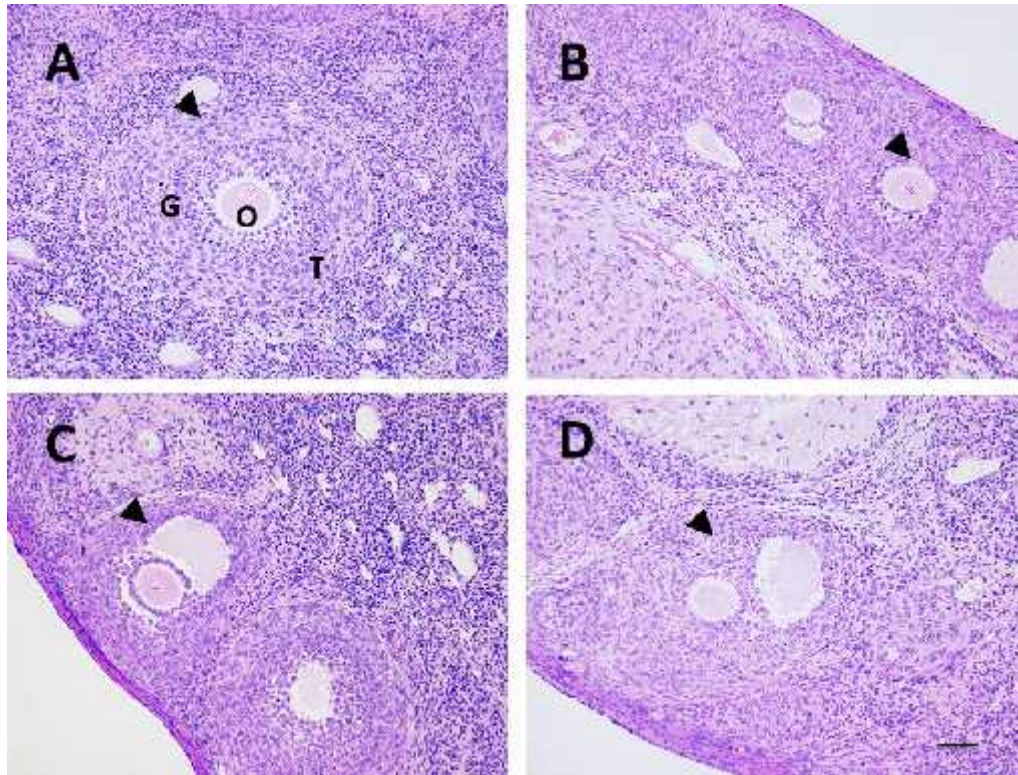
Los valores representan el promedio±EEM, t-Student y U de Mann-Withney

### 7.2 Efecto del AMG9810 sobre el desarrollo folicular

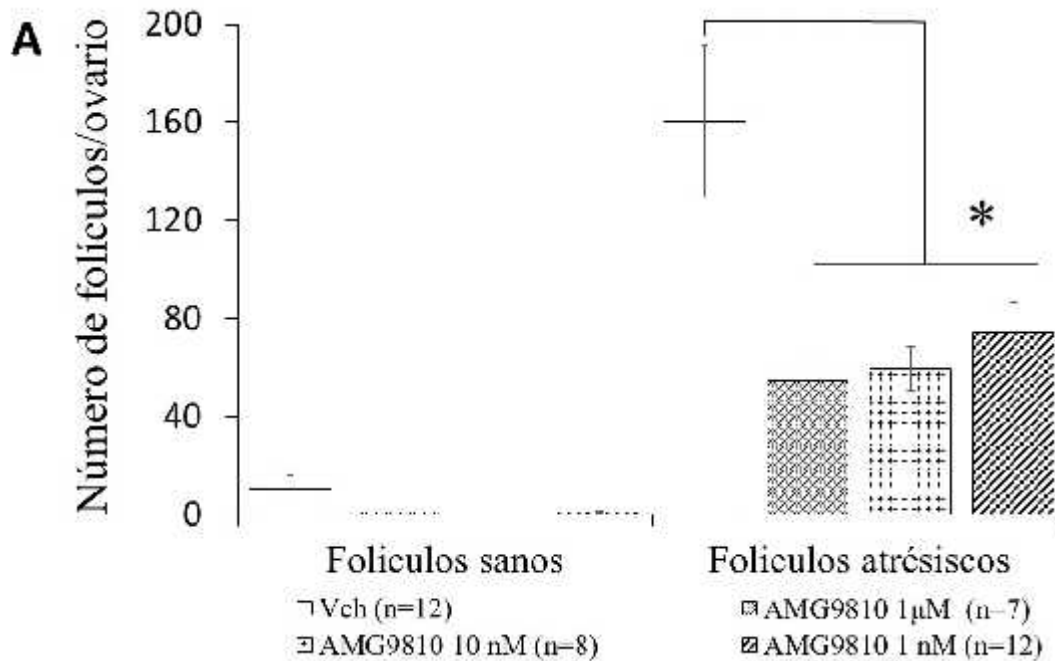
En los ovarios de cobayas tratadas con AMG9810 (1nM, 10 nM y 1µM), el número de folículos atrésicos disminuyó significativamente en comparación a los del grupo control, sin embargo el número de folículos sanos no aumento como se observa en la (Figura 14). Por otro lado, en la categorización de acuerdo al desarrollo de los folículos, el número de folículos preantrales atrésicos (FPA) y folículos antrales atrésicos (FAA) disminuyeron significativamente en comparación con el número de folículos obtenidos en los ovarios de las cobayas administradas con el vehículo. Sin embargo, no hubo diferencia significativa en el número de folículos preantrales sanos y folículos antrales sanos (FPS, FAS) (Figura 15).



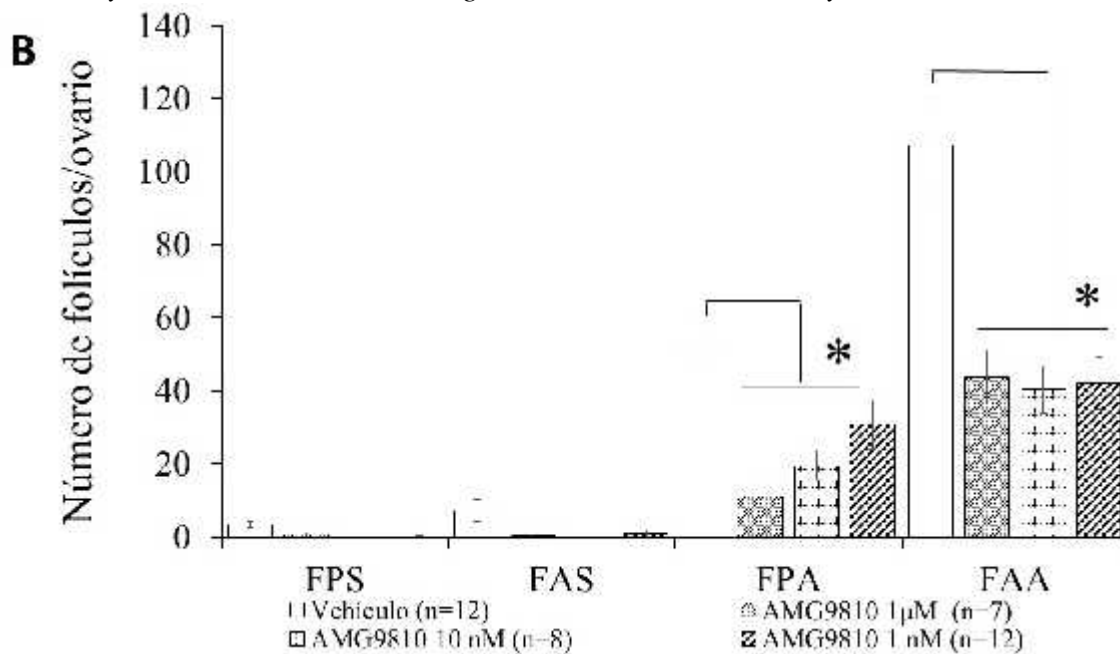
Con base en sus características morfológicas identificamos 4 grupos de folículos; FPS, FPA, FAS, y FAA (Figura 13). La clasificación de los folículos como sanos o atrésicos se realizó en base a los criterios establecidos por Wang (Wang *et al.*, 2010).



**Figura 13.** Folículos en los ovarios de las cobayas. A. folículo preantral sano (FPS), B. Folículo preantral atrésico (FPA), C. Folículo antral sano (FAS), D. Folículo antral atrésico. Los folículos están señalizados con punta de flecha, O=ovocito, G= células de la granulosa y T= células de la teca. Fotografías tomadas con microscopio óptico de capo claro de cortes teñidos con hematoxilina-eosina. Escala 25 $\mu$ m



**Figura 14.** Folículos sanos y atrésicos en los ovarios de las cobayas tratadas con AMG9810 o con el vehículo en la bolsa ovárica a los 10 días de edad. Las barras representan el promedio y el EEM. \* 0.5 ANOVA seguida de U de Mann-Withney.

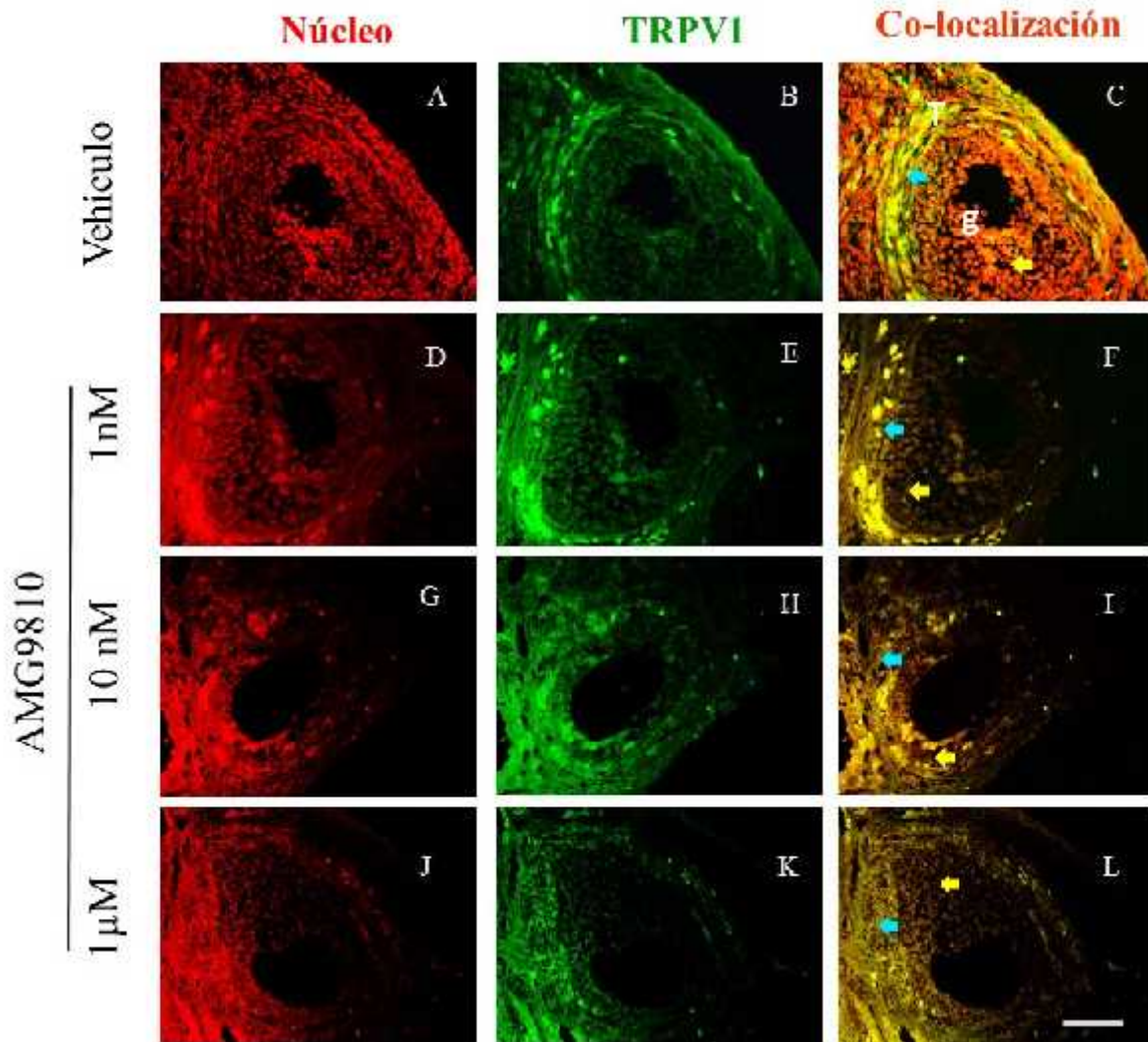


**Figura 15.** Número de folículos en los ovarios de cobayas administradas con AMG9810 o con el vehículo en la bolsa ovárica a los 10 días de edad. Las barras representan el promedio y el EEM. \* 0.5 ANOVA seguida de U de Mann-Withney.

### ***7.3 Efecto del AMG9810 sobre las células TRPV1-positivas en los folículos ováricos***

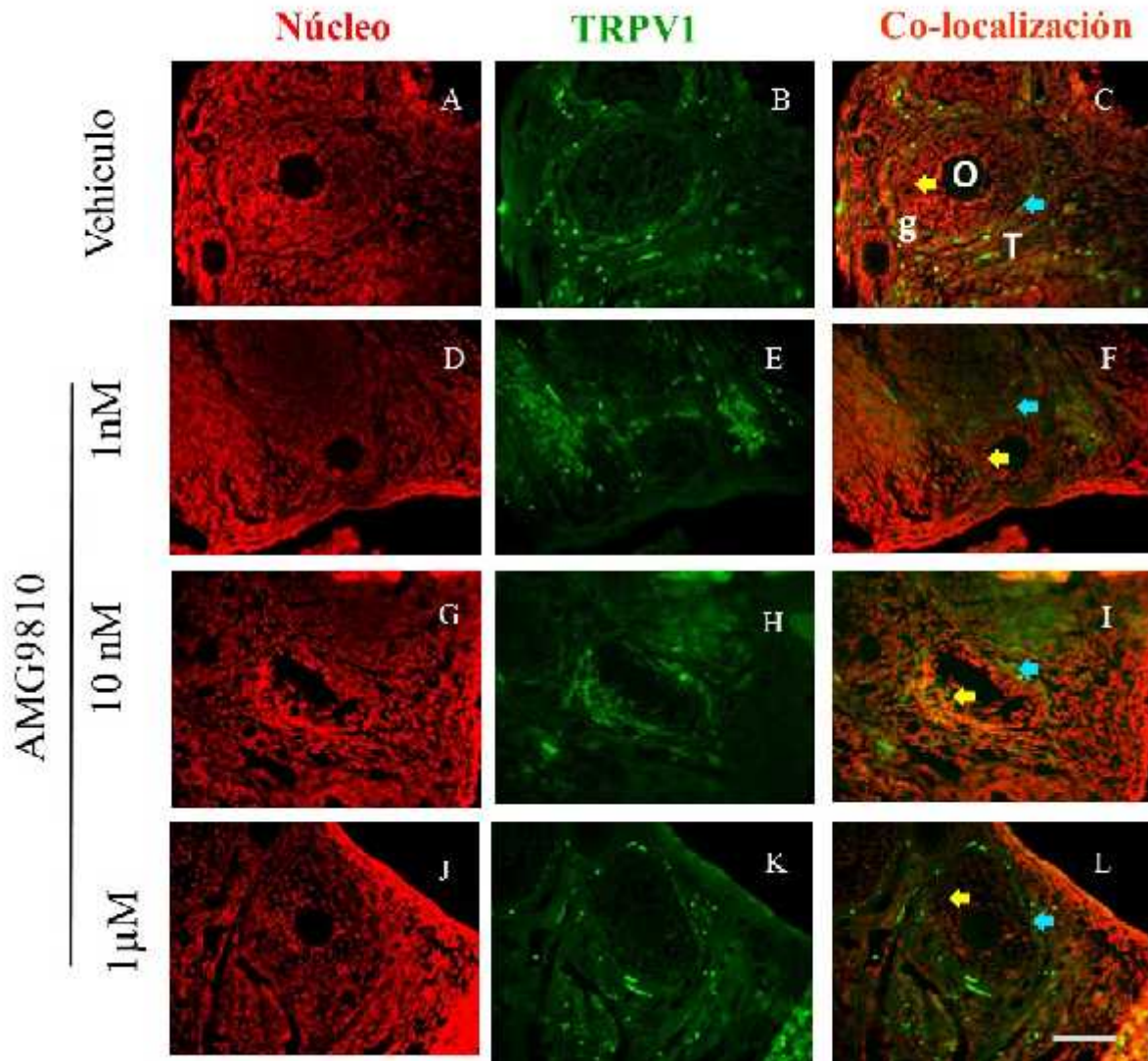
En todas las categorías de folículos (FPS, FPA, FAS, FAA) encontramos células TRPV1-positivas, sin embargo el número de ellas cambio con el AMG9810. Las células TRPV1-positivas fueron células de la teca, células del intersticio y pocas células de la granulosa. Con 1nM, 10 nM y 1 $\mu$ M, los folículos preantrales sanos (FPS) y folículos antrales sanos (FAS), cualitativamente, las células tuvieron mayor fluorescencia (Figuras 16, 18). En contraste, en los folículos preantrales atrésicos (FPA) y folículos antrales (FAA) hubo menor fluorescencia en comparación con el vehículo (Figuras 17, 19). Con 1nM de AMG9810, encontramos que el número de folículos antrales sanos (FAS) aumentó sin afectar a los otros grupos de folículos (FPA y FAS y FAA) y con 1 $\mu$ M y 10nM, el número de folículos no fue significativamente diferente en comparación con el grupo control (FPS, FPA) (figura 21). Cuando agrupamos los folículos como sanos y atrésicos obtuvimos que el número de células TRPV1-positivas fue mayor con 1nM en comparación con el grupo control (Figura 20).

## Folículos Preantrales Sanos

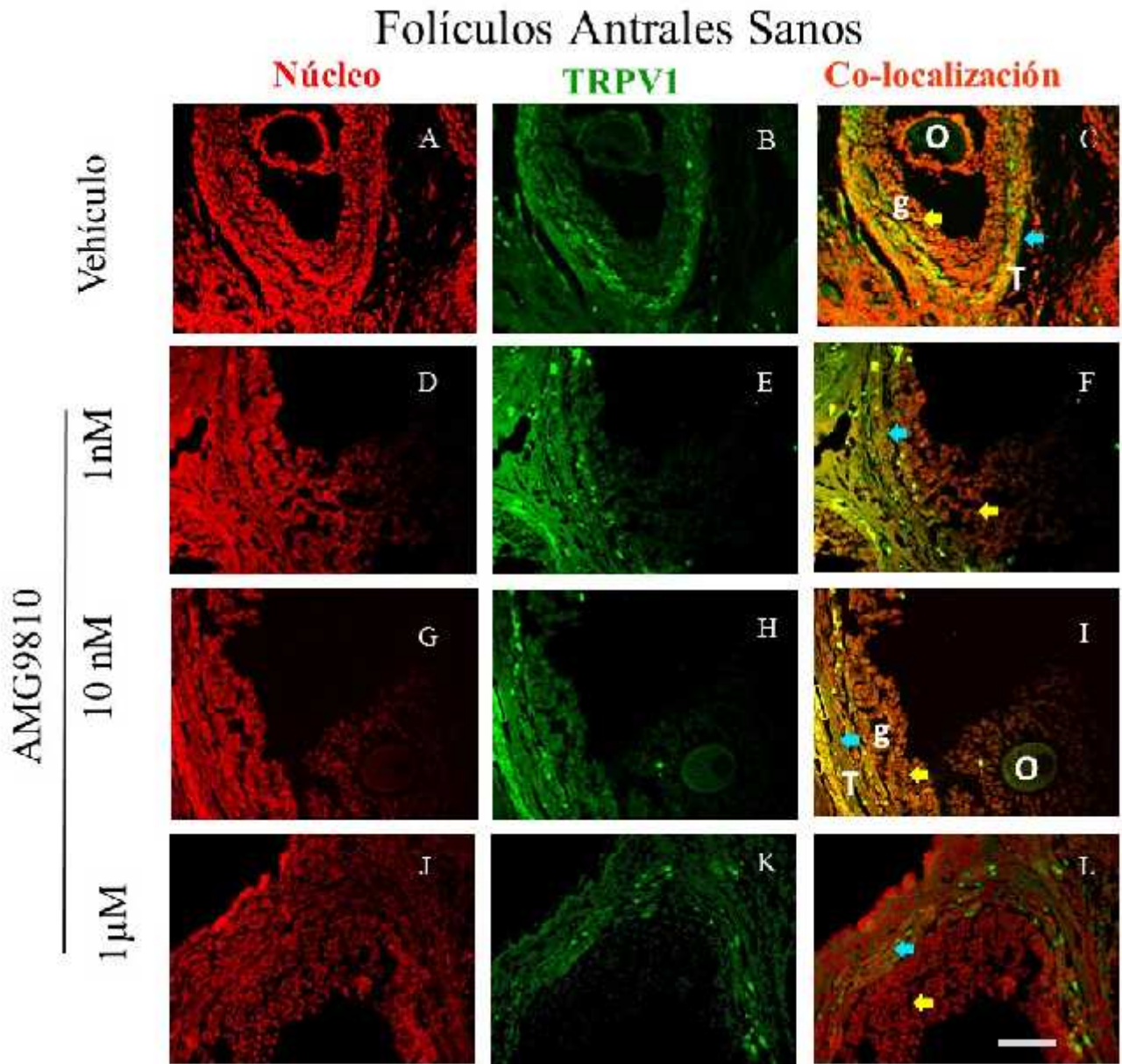


**Figura 16.** Células TRPV1-positivas en los folículos preantrales sanos localizados por inmunohistoquímica a la edad de la PAV de las cobayas. En rojo están los núcleos teñidos con yoduro de propidio (A, D, G, J), en verde las células-TRPV1 marcadas con FITC (B, E, H, K) y en amarillo la Co-localización (C, F, I, L). Las células de la granulosa están señaladas con flecha amarilla, mientras que células de la teca están señaladas con flecha azul. Células de la granulosa (g), células de la teca (t) y ovocito (o). Escala, 100μm.

## Folículos Preantrales Atrésicos

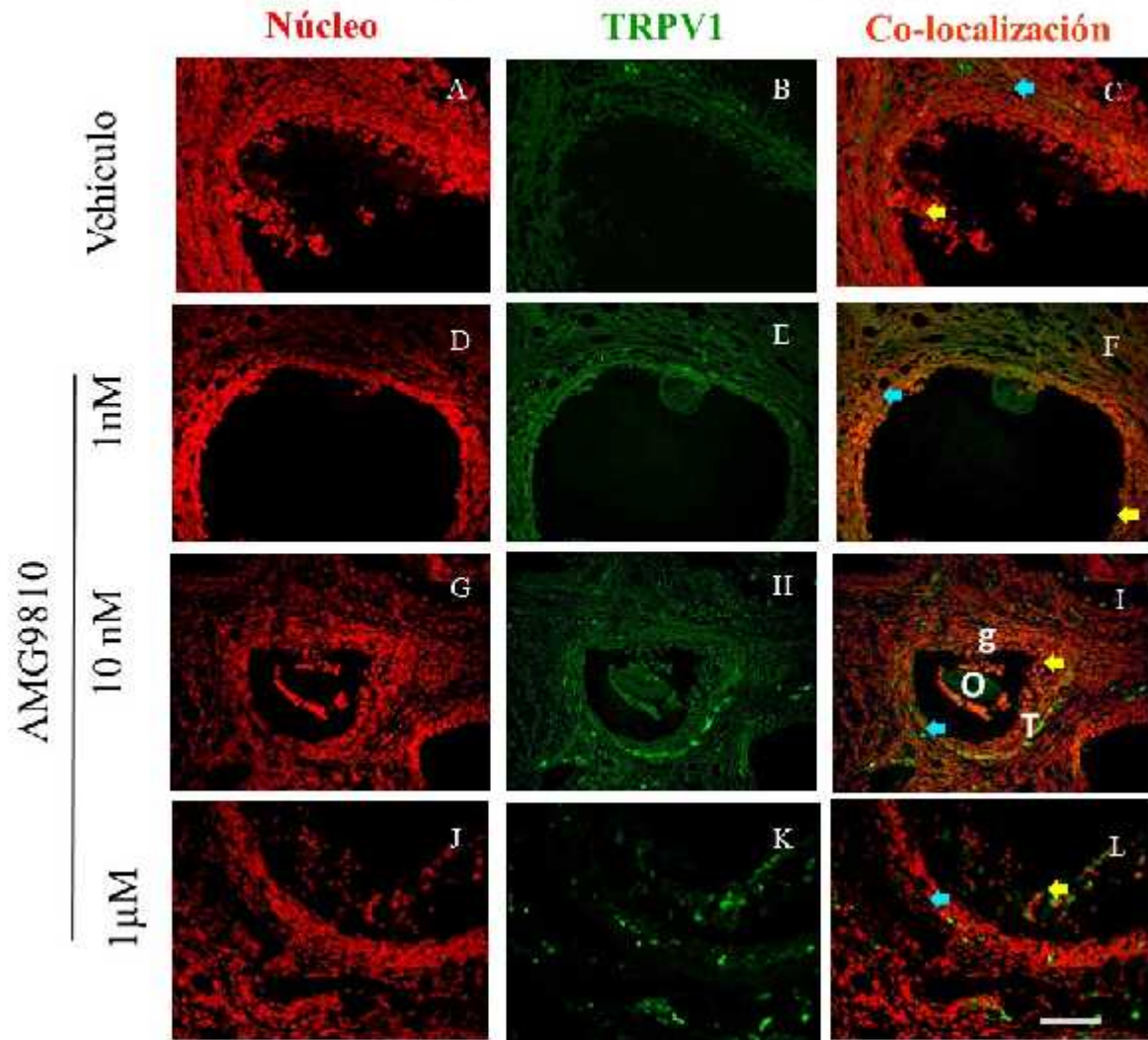


**Figura 17.** Células TRPV1-positivas en los folículos preantrales atrésicos localizados por inmunohistoquímica a la edad de la PAV de las cobayas. En rojo se presentan los núcleos teñidos con yoduro de propidio (A, D, G, J), en verde las células-TRPV1 marcadas con FITC (B, E, H, K) y en amarillo la Co-localización (C, F, I, L). Las células de la granulosa están señaladas con flecha amarilla, mientras que células de la teca están señaladas con flecha azul. Células de la granulosa (g), células de la teca (t) y ovocito (o). Escala, 100μm.

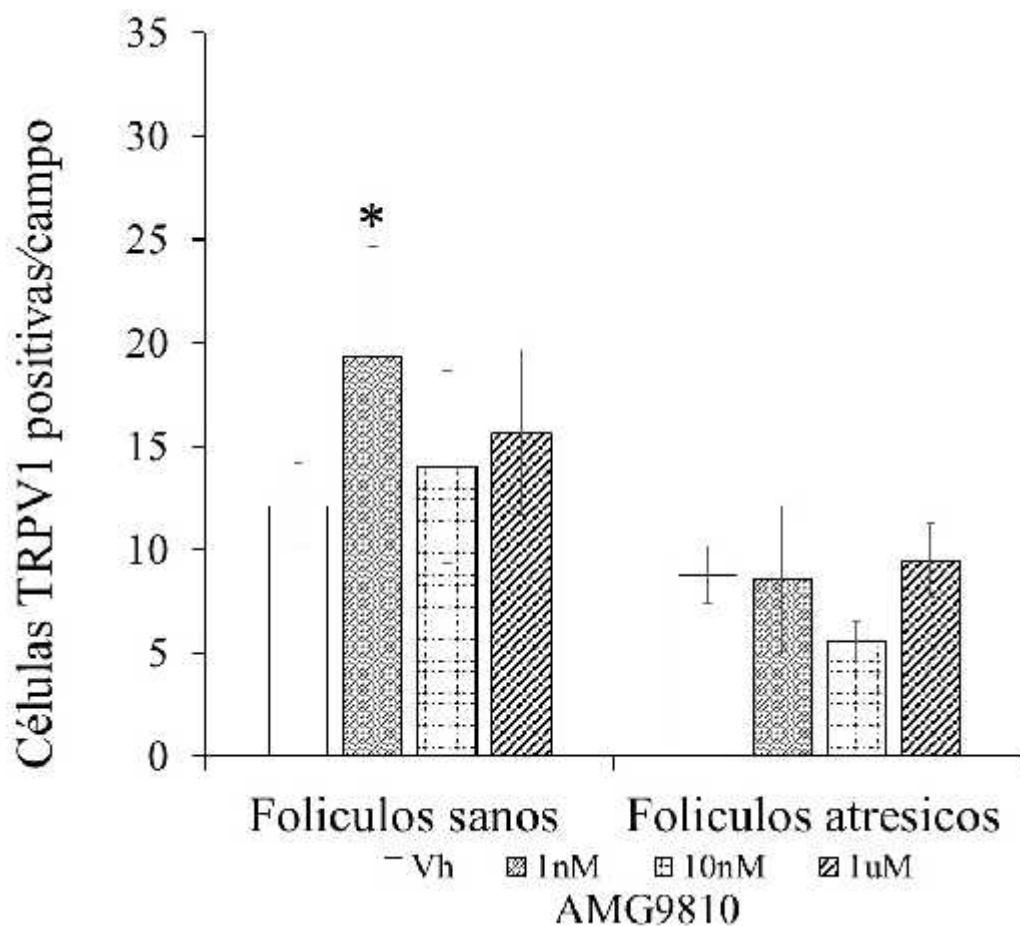


**Figura 18.** Células TRPV1-positivas en los folículos antrales sanos localizados por inmunohistoquímica a la edad de la PAV de las cobayas. En rojo se presentan los núcleos teñidos con yoduro de propidio (A, D, G, J), en verde las células-TRPV1 marcadas con FITC (B, E, H, K) y en amarillo la Co-localización (C, F, I, L). Las células de la granulosa están señaladas con flecha amarilla, mientras que células de la teca están señaladas con flecha azul. Células de la granulosa (g), células de la teca (t) y ovocito (o). Escala, 100 $\mu$ m.

## Folículos Antrales Atrésicos

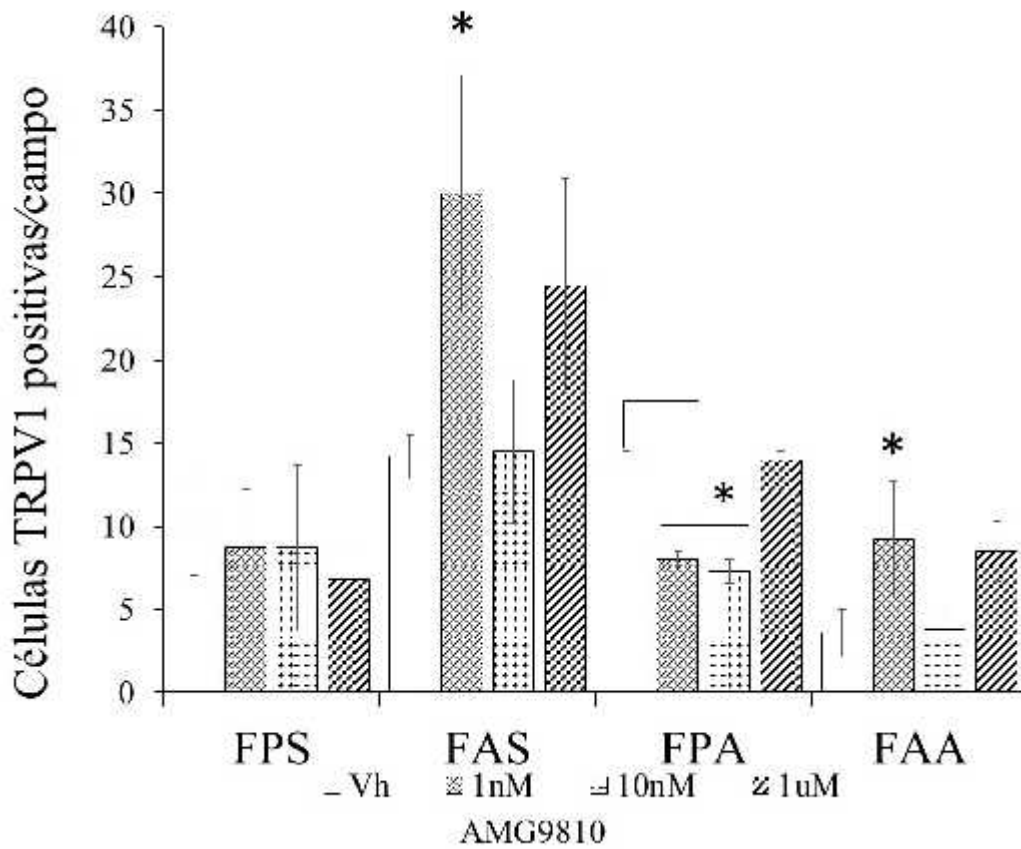


**Figura 19.** Células TRPV1-positivas en los folículos antrales atrésicos localizados por inmunohistoquímica a la edad de la PAV de las cobayas. En rojo se presentan los núcleos teñidos con yoduro de propidio (A, D, G, J), en verde las células-TRPV1 marcadas con FITC (B, E, H, K) y en amarillo la Co-localización (C, F, I, L). Las células de la granulosa están señaladas con flecha amarilla, mientras que células de la teca están señaladas con flecha azul. Células de la granulosa (g), células de la teca (t) y ovocito (o). Escala, 100 $\mu$ m.



**Figura 20.** Células TRPV1-positivas en los folículos ováricos de cobayas administradas con AMG9810 o con el vehículo en la bolsa ovárica a los 10 días de edad. Folículos preantrales sanos (FPS), folículos antrales sanos (FAS), folículos preantrales atrésicos (FPA), folículos antrales atrésicos (FAA). Las barras representan el promedio y el EEM (n=5). \* 0.5 ANOVA y U de Mann-Withney.





**Figura 21.** Células TRPV1-positivas en los folículos ováricos de las cobayas administradas con AMG9810 o con el vehículo en la bolsa ovárica a los 10 días de edad. Folículos preantrales sanos (FPS), folículos antrales sanos (FAS), folículos preantrales atrésicos (FPA), folículos antrales atrésicos (FAA). Las barras representan el promedio y el EEM (n=5). \* 0.5 ANOVA y U de Mann-Withney.

## 8 DISCUSIÓN

En los ovarios, el desarrollo folicular es regulado por mecanismos neuroendocrinos y paracrinos. La regulación neuroendocrina es ejercida por hormonas hipofisarias (FSH y LH) y los neurotransmisores secretados por los nervios periféricos (noradrenalina y la acetilcolina), mientras que, entre la comunicación paracrina se lleva a cabo por las neurotrofinas (NGF, NT3/4) y la anandamida que actúan a través de sus receptores específicos. Los receptores TRPV1 se han involucrado entre la comunicación paracrina y neuroendocrina, en el último caso por medio de las fibras sensoriales que censan estímulos que transmiten al SNC. En este trabajo, probamos la acción del AMG9810, un antagonista de los receptores TRPV1, encontramos que la edad de la primera apertura vaginal de las cobayas no cambió sugiriendo que el bloqueo local de los receptores TRPV1 no modifica el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovarios (Maffucci, *et al.*, 2009; Wahab *et al.*, 2015) proponiendo que el receptor juega un papel en la modulación del desarrollo folicular local. Sin embargo, en los ovarios disminuyó el número de folículos atrésicos. Este resultado, está en concordancia con otros obtenidos previamente en nuestro laboratorio, en los que la administración local de capsaicina (1 $\mu$ M) aumenta la atresia de los folículos y disminuye el número de células TRPV1-positivas en ellos (Mora, 2015). En condiciones basales, la anandamida es el agonista endógeno de los receptores TRPV1 (Ross, 2003; Morales-Lázaro, *et al.*, 2013) mensajero que se encuentra presente en los folículos antrales de los ovarios de las ratas e implicados en la esteroidogénesis. Los endocannabinoides también están en el fluido folicular, son regulados por la hormonas hipofisarias y aumenta su secreción antes de la ovulación (El-Talatini *et al.*, 2009; Bagavandoss *et al.*, 2010; Gervasi *et al.*, 2013).

Adicionalmente, encontramos que con 1 y 10 nM de AMG9810 también disminuye la atresia sugiriendo efecto protector del AMG9810. Este resultado fue similar al obtenido con capsaicina a concentración de 1 y 10 nM (Mora, 2015) en donde se reportó que la baja estimulación de los receptores aumenta el desarrollo folicular de los ovarios. En estado fisiológico, los receptores TRPV1 se encuentran en estado fosforilado inducido por la anandamida, por el NGF o por ambos (Szallasi *et al.*, 2007; Tóth *et al.*, 2009) y encontrado en los ovarios (Dissen *et al.*, 2002; El-Talatini *et al.*, 2009; Bagavandoss *et al.*, 2010; Streiter *et al.*, 20015). Además es aceptado que la activación masiva de los receptores TRPV1 produce entrada fuerte de calcio (Tóth *et al.*, 2009; Solima *et al.*, 2015) promoviendo la formación de

cuerpos apoptóticos, fragmentación del ADN y muerte de las células por apoptosis (Maccarrone *et al.*, 2000, Solima *et al.*, 2015). Se ha establecido, que las corrientes de calcio conducen a resultados fisiológicamente opuestos; por un lado aumentar el desarrollo celular o por otro conducir a la apoptosis. Una u otra respuesta depende de la magnitud de la corriente y esta de la cantidad de receptores TRPV1 activos. Cabe señalar que la población de ellos cambia según el estado de desarrollo, ejemplo de ello es el aumento que hay a la edad de la pubertad de las cobayas (Alatraste *et al.*, 2013). Cabe precisar que al bloquear los receptores TRPV1, la muerte celular disminuye, se ha establecido que la activación del receptor provoca la entrada de calcio que y se ha relacionado con mayor estrés oxidativo y del retículo endoplásmico que conduce a la muerte celular por apoptosis (Solima *et al.*, 2015) sugiriendo protección ante la muerte por apoptosis.

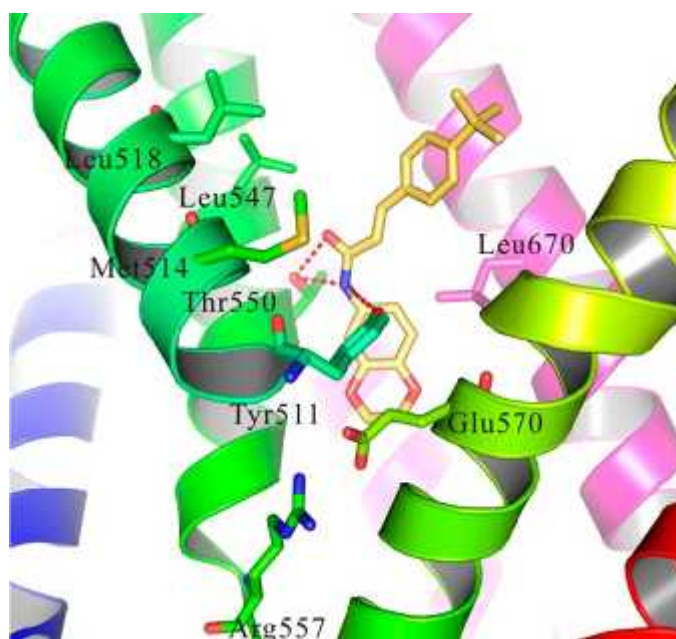
El mayor número de folículos sanos que obtuvimos cuando aplicamos 1 nM de AMG9810 puede interpretarse de dos maneras; por el número de receptores TrkA (Dissen *et al.*, 2002) y por el número de receptores TRPV1, ambos cambian con el desarrollo de los folículos del ovario, aumentando su expresión en el inicio de la pubertad (Alatraste *et al.*, 2013; Luna *et al.*, 2015). Esta interpretación es posible considerando que en los ovarios de ratones, ratas y monos, el NGF interviene en el desarrollo de los folículos (Vera *et al.*, 2014; Streiter *et al.*, 2015) y que aumenta por acción de las gonadotropinas (Dissen *et al.*, 2002). Cabe precisar que la expresión de los receptores TRPV1 es diferente en cada órgano y su acción depende de la eficacia de los reguladores directos como la anandamida o de reguladores indirectos como NGF y estradiol además del nivel de expresión de receptores TRPV1. Cabe destacar que la señalización por la anandamida también se modula por el estradiol ya que este modula a la enzima FAAH, enzima encargada de la degradación de la anandamida, por lo tanto habría mayor cantidad de anandamida que interactuara con el receptor (Ho, 2013). Se ha reportado que los niveles más altos de la anandamida se encuentran en las etapas periovulatorias siendo de 1.5 a 1.7 nM en el líquido folicular de las ratas (Gervasi *et al.*, 2013) y coincidiendo con la etapa del estro, cuando las cobayas presentan la primera apertura vaginal. La concentración de anandamida endógena estaría compitiendo con la concentración del antagonista, a lo que atribuimos el cambio estadístico cuando usamos la concentración de 1nM de AMG9810. Al mismo tiempo, el receptor sería activado tanto por anandamida, por el NGF y por el estradiol y la pequeña concentración del antagonista será insuficiente para

bloquear al receptor. Cabe precisar, que estradiol es secretado por los folículos de mayor desarrollo, a lo que le atribuimos el aumento en el número de células TRPV1-positivas en los folículos antrales sanos, además en los ovarios estradiol estimula el desarrollo folicular.

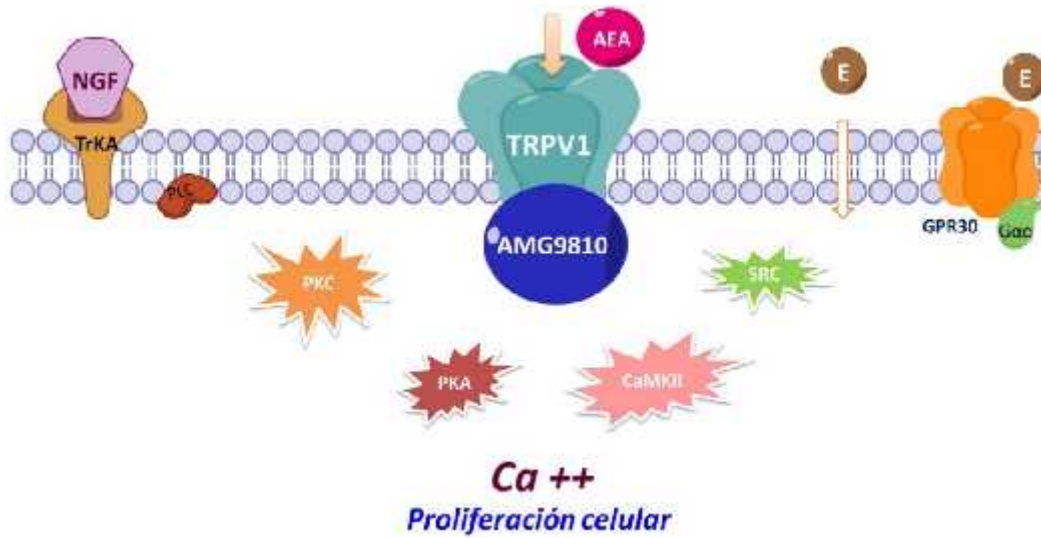
Con 1 $\mu$ M de AMG9810 el número de folículos y el número de células TRPV1-positivas no cambió significativamente en relación con el vehículo. Este resultado es congruente con la mayor atresia que obtuvimos cuando administramos 1  $\mu$ M de capsaicina. También se ha reportado que en la línea celular de carcinoma de ratón tratado con anandamida, la corriente de calcio se inhibió con 0.125 y 0.5 $\mu$ M de AMG9810, concentración que podemos relacionar con la menor atresia que obtuvimos con 1 $\mu$ M (Soliman *et al.*, 2015). Se puede inducir que el antagonismo de los receptores TRPV1 inhibe la corriente masiva de calcio y por lo tanto la atresia de los folículos en los ovarios. Una vía alterna de regulación es mediada por el NGF presente en los ovarios (Dissen *et al.*, 2002) que modula la expresión de los receptores TRPV1 (Alatraste *et al.*, 20013) y que coincide el número de células TRPV1-positivas que fue similar a los del grupo de animales administrados con el vehículo ya que el bloqueo del receptor no modifica su expresión. Cabe precisar que la activación de los receptores TRPV1 por la anandamida es reforzada por NGF considerando que cuando el NGF aumenta favorece la unión de la anandamida (Evans *et al.*, 2007). Desde el punto de vista molecular, la anandamida es similar a la capsaicina y se ha propuesto que se une al mismo sitio intracelular del receptor TRPV1, bolsillo de unión a vaniloides (figura 22) (Ross, 2003; Tóth *et al.*, 2009). Una vía de activación indirecta es a través del NGF que al unirse al receptor TrKA activa a la fosfolipasa C, aumenta el IP3, activa a PKA, PKC y CaMKII, activa al receptor TRPV1 y promueve su traslocación desde el retículo hacia la membrana celular (Szallasi *et al.*, 2007), mientras que para estradiol, se sabe activa directamente a la proteína SRC fosforilando a aminoácidos del dominio N-terminal del receptor TRPV1 promoviendo así su traslocación del retículo endoplásmico a la membrana. En la figura 23, resumimos las vías de regulación de los receptores TRPV1 que proponemos para el desarrollo o atresia folicular.

Los antagonistas de los receptores TRPV1 se han usado para disminuir la inflamación, el dolor y la artritis (Oseguera *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2009; Gomtsyan, 2010; Bhattacharya, 2010) por lo que son atractivos para su uso en la clínica. Cabe señalar que la administración sistémica de capsaicina ha sido eficaz para tratar el dolor, sin embargo las dosis altas producen

efectos colaterales, por lo que en los humanos, para disminuir el dolor se ha optado solamente el uso tópico como las cremas (Zostrix, Capzasin-P) o los parches (NGX-4010) (Wong *et al.*, 2009). Una complicación por el uso de los agonistas o antagonistas de los receptores TRPV1 es la regulación de la temperatura corporal, ya que se ha reportado que la capsaicina y la RTX producen hipotermia, y los antagonistas causan hipertermia en las ratas, perros y monos (Wong *et al.*, 2009; Gomtsyan, 2010). Recientemente se ha reportado que en humanos, el AMG517 disminuye el dolor crónico de manera eficaz pero induce hipertermia (1,5 grados Celsius) por lo que la hipertermia es un obstáculo para su uso como agente terapéutico. Por lo que se debe investigar más sobre los mecanismos de regulación de estos agentes para evitar o minimizar los efectos secundarios (Wong *et al.*, 2009; Gomtsyan, 2010) sin descartar los posibles efectos tóxicos. Finalmente, para sostener que los agonistas o antagonistas de los receptores TRPV1 son seguros como agentes terapéuticos debemos hacer más experimentos con el fin de comprender mejor el funcionamiento de los receptores TRPV1 y los efectos cuando son activados o desactivados por los fármacos usados.



**Figura 22.** Modelo detallado de la interacción del AMG9810 con el bolsillo de unión a vaniloides. Dos residuos, Try511 y Thr550, forman fuertes enlaces de hidrogeno con el antagonista (Feng *et al.*, 2015).



**Figura 23.** Esquema hipotético de la regulación del receptor TRPV1. Unión con los ligandos endógenos (AEA, NGF y estradiol), las moléculas de señalización intracelular (PKC, PKA, CaMKII, SRC,  $Ca^{++}$ ) y el bloqueo del receptor por el AMG9810 (Tomado de Luna et al., 2015).

## ***9. CONCLUSIONES***

1. La administración del AMG9810 a concentraciones de 1nM, 10nM o 1μM no modificaron la edad de la primera apertura vaginal.
2. El AMG9810, a las concentraciones de 1nM, 10nM o 1μM no aumentaron el número de folículos sanos. Sin embargo, disminuyó la atresia en los folículos preantrales sanos y antrales atrésicos.

## **10. REFERENCIAS**

**Alatraste V**, Camacho-Herrera I, Martínez MI, Limón DI, Flores-Gonzales 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 (ARSci)*, 1(3): 29-37.

**Alatraste V**, Paiz B, Jiménez M, Barrientos E, Martínez O, Torres-Soto M, Martínez MI, Limón ID, Escamilla-Weinmann C, Luna F (2009). Paramentos reproductivos en las cobayas *Cavia porcellus* del Bioterio “Claude Bernad” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. *Divulgación y Ciencia de los Animales de Laboratorio*, 4(1):8-13.

**Bagavandoss P**, Grimshaw S (2010). Temporal and spatial distribution of the cannabinoid receptor (CB1, CB2) and fatty acid mide hydroxylase in the rat ovary. *The Anatomical Record*, 293, 1254-1432.

**Bhattacharya A**, Lehto SG, Gavva NR (2010). TRPV1 and inflammatory pain. En: Vanilloid receptor TRPV1 in drug discovery, targeting pain and other pathological disorders. Eds Arthur Gomtsyan and Connie R. Faltynek. pp 153-175.

**Cabrera-Vásquez S** (2007). El control neurotrópico en el desarrollo y la función de dos órganos endocrinos: el ovario y el páncreas. *Rincón del Residente*, 59(3): 219-228.

**Cortés ME**, Carrera B, Rioseco H, Pablo del Rio J, Vigil P (2015). The role of kisspeptin in the onset of puberty and in the ovulatory mechanism: a mini-review. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*, 28, pp 286-291.

**Di Yorio MP**, Bilbao MG, Pustovrh MC, Prestifilippo JP, Faletti AG (2008). Leptin modulates the expression of its receptors in the hypothalamic-pituitary-ovarian axis in a differential way. *Journal Endocrinology*, 198:355-366.

**Dissen GA**, Romero C, Paredes A, Ojeda SR (2002). Neurothophic control of ovarian development. *Microscopy Research and Technique*, 59,509-515.



**El-Talatini MR**, Taylor AH, Elson JC, Brown L, Davidson AC (2009) Localization and Function of the Endocannabinoid System in the Human Ovary. *PLoS ONE* 4(2): e4579.

**Evans RM**, Scott RH, Ross RA (2007). Chronic exposure of sensory neurones to increased levels of nerve growth factor modulates CB1/TRPV1 receptor crosstalk. *British Journal of Pharma Feling P*, 152(3): 404-413.

**Feng Z**, Pearce L, Xu X, Yang X, Yang P, Blumberg PM y Xie XQ (2015). Structural insight into tetrameric hTRPV1 from homology modeling, molecular docking, molecular dynamics simulation, virtual screening, and bioassay validations. *J. Chem. Inf. Model.* 55(3):572-588.

**Gavva NR**, Tamir R, Qu Y, Klionsky L, Zhnag TJ, Immke D, Wang J Zhu D, Vanderah TW, Porreaca F, Doherty EM, Norman MH, Wild KD, Bannon A, Louis JC, Treanor JJ (2005). AMG9810, [(E)-3-(4-t-butylfenil)-N-(2,3-dihidrobenczo [b] [1,4] dioxin-6-il) acrilamida], a novel antagonist vanilloid receptor 1 (TRPV1). *The Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics*. Vol 313(1):475-484.

**Gervasi GM**, Marczylo TH, Lam PM, Rana S, Franchi AM, Konj JC, Martínez-Perez S (2013). Anadamide levels fluctuate in the bovine oviduct during the oestrous cycle. *PLoS ONE* 8(8): e72521.

**Gharat L** y Szallasi A (2007). Medicinal chemistry of the vanilloid (capsaicin) TRPV1 receptor: current knowledge and future perspectives. *Drug Development Research*. 68:477-497.

**Gomtsyan A** (2010). TRPV1 antagonists. En: Vanilloid receptor TRPV1 in drug discovery, targeting pain and other pathological disorders. Eds. Arthur Gomtsyan and Connie R. Faltynek. Pp 295-311.

**González FO**, Melo SA, Hernández LF, Hoffman KL (2013). Biología Celular y molecular de las conductas reproductivas. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Pp 20-30.

**Ho WS** (2013). Modulation by 17 $\beta$ -estradiol of anandamide vasorelaxation in normotensive and hypertensive rats: a role for TRPV1 but not fatty acid amide hydrolase. *Eur J Pharmacol.* 701(1-3):49-56.

**Jian J-Y**, Cheung C.K.M, Wang Y, Tsang BK (2003). Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. *Frontiers in Bioscience.* 8, 222-273.

**Li JR**, Wang W, Shi FX (2015). Induction of follicular luteinization by equine chorionic gonadotropin in cyclic guinea pigs. *Journal of Zhejiang*, 16(12), 980-990.

**Li S**, Bode AM, Zhu F, Liu K, Zhang J, Kim MO, Dong Z (2011). TRPV1-antagonist AMG9810 promotes mouse skin tumorigenesis through EGFR/Akt signaling. *Carcinogenesis*, 32(5), 779-785.

**Luna F**, Alatríste V, Barrientos E, Molina A, Torres-Soto M, Weimann-Escamilla C, Camacho-Herrera I, Limón D, Martínez MI, Flores-Gonzales O (2013). Nuevos moduladores propuestos para el desarrollo celular en los ovarios de los mamíferos. *Mensaje Bioquímico-UNAM*, 2013. XXXVII: 225-240.

**Luna F**, Martínez MI (2005). Fisiología celular del ovario de los mamíferos y su regulación neuroendocrina. En: Fisiología y conducta, aspectos moleculares y celulares. *Textos Científicos, BUAP*, pp 153-184.

**Luna F**, Alatríste V, Martínez MI, Limón DI (2015). Los receptores TRPV1 en órganos del sistema reproductor y su modulación funcional por hormonas. En: efecto de las hormonas esteroideas sobre procesos fisiológicos y reproductivos. Oscar GF, Melo SA, Hernández FL, Hoffman K. Rosset, editores. *Universidad Autónoma de Tlaxcala México*. pp 133-151.

**Maccarrone M**, Lorenzon T, Brai M, Finazzi-Argoz A (2000). Anandamide induces apoptosis in human cell via vanilloid receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 275(41):31938-31945.

**Maffucci JA**, Gore AC (2009). Hypothalamic neural systems controlling the female reproductive life cycle: Gonadotropin-releasing hormone, glutamate, and GABA. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 274, 69.

**Mora L I** (2015). Efecto de la capsaicina administrada en la bolsa ovárica sobre el desarrollo folicular y la pubertad de la cobaya. *Tesis de licenciatura*, FCQ-BUAP.

**Morales-Lázaro SL**, Simon SA, Rosenbaum T (2013). The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid1 (TRPV1). *Journal of Physiology* 591 (13): 3109-3121.

**Ojeda SR** (2000). Female reproduction function. In: *Textbook of Endocrine Physiology. Fourth Edition. Oxford*. 202-252.

**Ojeda RS**, Roth C, Mungenast A, Heger S, Mastronardi C, Parent AS, Lomniczi A, Jung H (2006). Neuroendocrinomechanisms controlling female puberty: new approaches, new concepts. *International Journal of Andrology*, 29 (1): 256-263.

**Oseguera JA**, Simon SA, Rosenbaum T (2008). TRPV1: on the road to pain relief. *Current Molecular Pharmacology*, 1(3), 255-269.

**Palermo R** (2007). Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. *Reproductive BioMedicine Online*. Vol 15. No 3. 326-337.

**Palma GA**, Argañaraz ME, Barrera AD, Rodler D, Mutto AA, Sinowatz F (2012). Biology and Biotechnology of Follicle Development. *The Scientific World Journal*. 2012:938138.

**Parborell F**, Irusta G, Rodríguez Celín A, Tesone M (2008), Regulation of ovarian angiogenesis and apoptosis by GnRH-I analogs. *Mol. Reprod. Dev.*, 75: 623–631.

**Pérez-Fernández FI**, Rosas-Velasco C, Prado-Romano MC, Martínez-Pérez (2004). Apoptosis and follicular atresia: an essential binomial for ovarian development. *Vet. Mex.*, 36(1).

**Pinilla L**, Aguilar E, Diéguez C, Millar RP, Tena-Sempere M (2012). Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *APS Journals*, 92(3):1235-1316.

**Rosales-Torres A. M**, Sánchez Guzmán A (2008). Apoptosis en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo. *Revisión. Téc Pecu Méx.* 46(2), 159-182.

**Rosenbaum T**, Simon SA TRPV1 Receptors and Signal Transduction. In: Liedtke WB, Heller S, editors. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2007. Chapter 5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5260/>

**Ross RA** (2003). Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *British Journal of Pharmacology*. 140, 790-801.

**Sánchez F**, Smitz J (2012). Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Basis of Disease*. ELSEVIER, 1822 (12):1896-1912.

**Sisk Cheryl L.**, Zehr JL (2005). Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 26 (2005) 163-174.

**Soliman E**, Dross R V (2015). Anandamide-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis are mediated by oxidative stress in non-melanoma skin cancer: receptor-independent of endocannabinoid signaling. *Molecular Carcinogenesis*. 1098-2744.

**Streiter S**, Fisch B, Sabbah B, Ao A, Abir R (2015). The importance of neuronal growth factors in the ovary. *Mol. Hum. Reprod. Advance*. 22(1):3-17.

**Sun SY**, Zhang W, Han X, Huang RH, Shi FX (2014). Cell proliferation and apoptosis in the fetal and neonatal ovary of guinea pigs. *Genet Mol Res*. 13(1), 1570-1578.

**Szallasi A**, Blumberg PM. Complex Regulation of TRPV1 by Vanilloids. In: Liedtke WB, Heller S, editors. *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2007. Chapter 6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5246/>

**Szallasi A**, Cortright DN, Blum CA, Samer RE (2007). The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nature*, 6(5):357-72.

**Tóth A**, Blumberg PM, Boczán J (2009). Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV1). *Vitamins and Hormones*, Vol 81, 398-417.

**Uchida S**, Kagitani F (2015). Autonomic nervous regulation of ovarian function by noxious somatic afferent stimulation. *The Journal of Physiological Sciences*, 65:1-9.

**Vera C**, Tapia V, Vega M, Romero C (2014). Role of nerve growth factor and its TRKA receptor in normal ovarian and epithelial ovarian cancer angiogenesis. *Journal Ovarian Research*. 7:82.

**Wahab F**, Shahab M y Behr R (2015). The involvement of gonadotropin inhibitory hormone and kisspeptin in the metabolic regulation of reproduction. *Journal of Endocrinology*. 225(2), 49-66.

**Wang W**, Lui H, Tian W, Zhang F, Gong Y, Chen J, Mao D, Shi F (2010). Morphologic observation and classification criteria of atretic follicles in guinea pigs. *Journal of Zhejiang*. 11(5), 307-314.

**Wong G**, Gavva R. N (2009). Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonist and antagonist as analgesics: recent advances and setbacks. *Brain Research Reviews*. Vol 60 (1), 267-277).

**Zhang X**, Huang J and McNaughton A (2005). NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *The EMBO Journal*. 24, 4211–4223.

**Zieba DA**, Amstalden M, Williams GL (2005). Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: a comparative review. *Domestic Animal Endocrinology* 29, 166-185.

## 11. ANEXO

Tabla 1: Ficha técnica de los anticuerpos primario y secundario que se usaron en esta tesis.

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Origen</b>	<b>Reactividad (especies)</b>	<b>Dilución</b>
Anti-capsaicina receptor monoclonal antibody Santa Cruz Biotechnology	Ratón	Rata, ratón y cobayo	1:50
Anticuerpo secundario	Origen	Flourocromo	Dilución utilizada
Anti-goat IgG-FITC Santa Cruz Biotechnology	Anti-ratón	FITC	1:250

### AMG9810. Antagonista potente, competitivo, selectivo del receptor TRPV1

Proveedor: Sigma Aldrich

Numero de catálogo: 545395-94-6

IC<sub>50</sub>: 25nM

K<sub>i</sub>= < 10μM

XLogP3 (coeficiente de partición)= 4.6



---

### **Efecto del AMG9810 (antagonista de receptor TRPV1) sobre el desarrollo folicular ovárico de la cobaya**

**Cano Laura**<sup>1</sup> (estudiante de licenciatura), Alatríste Victorino<sup>1</sup>, Martínez María Isabel, Limón Daniel<sup>1</sup>, Oscar González-Flores<sup>2</sup> y Luna Félix<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacia, FCQ-BUAP, Puebla CP 72570, México

<sup>2</sup>Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV-UAT, Tlaxcala CP90140, México

En las cobayas, la capsaicina administrada por vía subcutánea a alta concentración (30mM), disminuye el número de células TRPV1-positivas en los folículos ováricos y atrasa la aparición de la pubertad. En este trabajo exploramos el efecto del AMG9810, un antagonista específico de los receptores TRPV1, sobre la aparición de la pubertad, el desarrollo folicular y la expresión de los receptores TRPV1 en las células de los folículos ováricos de la cobaya. 24 cobayas hembras Hartley de 10 días de edad fueron utilizadas. Por cirugía abdominal, a un grupo se les inyectó en la bolsa ovárica, 100µl del vehículo (SSI). Otro grupo, recibió 1 nM, 10 nM o 1 µM de AMG9810 (100 µl). Tanto el vehículo, como el AMG9810 se administraron a los 10 días de edad y las hembras fueron sacrificadas cuando presentaron la primera apertura vaginal (PAV). Por examen histológico, cuantificamos el número de folículos y por inmunohistoquímica (IHC) el número de células TRPV1-positivas. El AMG9810 no modificó la edad de la PAV (1 nM, 44±4 días; 10 nM, 31±2 días y 1µM, 35±1.5 vs 36±3 días del grupo control) ni el peso de los ovarios (14±2, 19±2, 13±2 vs 17±3 mg/100g). El número de folículos antrales sanos y folículos antrales atrésicos disminuyeron con todas las concentraciones probadas de AMG9810 en comparación con los animales control. Sin embargo, las células TRPV1-positivas aumentaron en los folículos sanos y disminuyeron en los folículos atrésicos. Dado que el AMG9810 (1 nM, 10 nM y 1 µM) disminuyó la atresia folicular, inferimos que el AMG9810 pueda ser utilizado como una buena herramienta farmacológica para el estudio del desarrollo folicular a través de los receptores TRPV1. Con base en estos resultados, podemos concluir que los receptores TRPV1 funcionan como reguladores de la proliferación celular en los folículos del ovario de la cobaya.