



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**PARTICIPACIÓN DE LA REMODELACIÓN
VASCULAR COMO FACTOR INDUCTOR DE
INSUFICIENCIA LÚTEA EN RATAS CON
SÍNDROME DIABÉTICO PROVOCADO CON
ESTREPTOZOTOCINA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

EILEEN ALEJANDRA TERRAZAS VÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. DANIEL DÍAZ ESPINOSA DE LOS MONTEROS

CDMX

2016





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno
Terrazas
Vázquez
Eileen Alejandra
55 21 77 92 77
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
309225173
2. Datos del Tutor
M. en C.
Daniel
Díaz
Espinosa de los Monteros
3. Datos de sinodal 1
Dra.
Rosario
Ortiz
Hernández
4. Datos de sinodal 2
Dr.
Francisco
Gallardo
Vera
5. Datos de sinodal 3
Dr.
Arnulfo
Montero
Pardo
6. Datos de sinodal 4
M. en C.
José Luis
Bortolini
Rosales
7. Datos de trabajo escrito
Participación de la remodelación vascular como factor inductor de insuficiencia lútea
en ratas con síndrome diabético provocado con estreptozotocina
62 p.
2016

A ti mamá, gracias por todo lo que haces por mí...

*"La ciencia la hacen personas, donde sea, en una buhardilla, cuando tienen el genio
investigador, y no los laboratorios, por ricos que se construyan y se doten."
Marie Curie*

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por la educación brindada y en especial a la Facultad de Ciencias, por el espacio y la virtud de sus profesores en formar científicos profesionales.

Al Dr. Arnulfo Montero Pardo, Dr. Francisco Gallardo por la revisión del trabajo y sus apreciables comentarios que lo enriquecieron.

A la Dra. Rosario Ortiz por la entrega y dedicación en sus clases de histología, las cuales apoyaron mucho mi visión durante este proyecto. Gracias por la revisión y asesoría en mi escrito.

Al M. en C. José Luis Bortolini gracias por todo el apoyo brindado, por ser un ejemplo a seguir como persona y como biólogo. Te agradezco mucho la amistad, los comentarios, los consejos y las enseñanzas que me has brindado.

A mi tutor Daniel Díaz, gracias infinitas por brindarme la oportunidad de trabajar a tu lado, el apoyo, la confianza y paciencia al realizar este proyecto. Eres uno de mis ejemplos a seguir como biólogo-matemático, gracias por la enseñanza y la amistad.

A mi familia, en especial a mi mamá gracias por nunca dejar de creer en mí, te agradezco infinitamente todo. A mi hermana por ser una guía y ejemplo durante toda mi vida, simplemente eres la mejor. Gracias a mi mamá Jovita y a mi tío Jairo, porque sin su apoyo y amor incondicional no sería nada.

A mis amigas: Fátima, Elena, Nayeli y Guille gracias por todo el apoyo, por nunca dejarme sola en mis peores momentos, por alentarme a ser mejor siempre. Las quiero muchísimo.

A todos mis amigos de la Facultad, en especial a: Mauricio Polanco, Luis Bautista, Antonio Fuentes, Olivia Ortiz y Nuria Galindo son muy importantes para mi. Gracias por compartir tanto conmigo.

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN..... | 8 |
| II. ANTECEDENTES..... | 11 |
| A. <i>Fisiología de los procesos reproductivos cíclicos del ovario.....</i> | <i>11</i> |
| 1. Foliculogénesis..... | 11 |
| a) Características de la microvasculatura ovárica asociada a los folículos..... | 14 |
| 2. Luteogénesis | 15 |
| a) Etapas de formación y regresión del cuerpo lúteo | 15 |
| b) Remodelación vascular durante la formación y regresión del cuerpo lúteo | 19 |
| B. <i>Patologías de la vasculatura asociadas a la hiperglucemia: Posibles fallas en la remodelación vascular del cuerpo lúteo y su asociación con una disfunción luteal.....</i> | <i>23</i> |
| III. JUSTIFICACIÓN..... | 26 |
| IV. HIPÓTESIS..... | 26 |
| V. OBJETIVOS..... | 26 |
| VI. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 27 |
| A. <i>Animales y diseño experimental.....</i> | <i>27</i> |
| B. <i>Obtención del tejido lúteo.....</i> | <i>28</i> |
| C. <i>Marcaje de la microvasculatura ovárica mediante histoquímica.....</i> | <i>30</i> |
| D. <i>Evaluación de la remodelación vascular durante la luteogénesis con perfusión intravital con lectina.....</i> | <i>30</i> |
| E. <i>Evaluación de la función vascular in vivo mediante perfusión intravital con dextrán.....</i> | <i>30</i> |
| F. <i>Determinación de la concentración de progesterona circulante.....</i> | <i>31</i> |
| G. <i>Análisis de imágenes.....</i> | <i>31</i> |
| H. <i>Análisis estadístico.....</i> | <i>32</i> |
| VII. RESULTADOS | 33 |
| A. <i>El tratamiento con STZ induce hiperglucemia, polifagia, polidipsia y pérdida de peso corporal.</i> | <i>33</i> |
| B. <i>Durante las etapas de luteogénesis se presenta una remodelación vascular.....</i> | <i>36</i> |
| C. <i>La administración de STZ reduce la cantidad de brotes angiogénicos y la densidad de la vasculatura en la rata.....</i> | <i>37</i> |
| D. <i>La hiperglucemia inducida con STZ reduce el calibre de los vasos sanguíneos y disminuye la complejidad de la red vascular del cuerpo lúteo.....</i> | <i>41</i> |
| E. <i>La hiperglucemia afecta la función vascular del cuerpo lúteo induciendo hiper-permeabilidad vascular.....</i> | <i>43</i> |
| F. <i>Las ratas tratadas con STZ presentan una reducción en la producción de progesterona.....</i> | <i>44</i> |
| VIII. DISCUSIÓN..... | 47 |
| IX. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS..... | 51 |
| X. LITERATURA CONSULTADA..... | 52 |
| XI. APÉNDICES | 58 |
| A. <i>Marcaje de la microvasculatura ovárica mediante histoquímica.....</i> | <i>58</i> |
| B. <i>Evaluación de la remodelación vascular durante la luteogénesis y perfusión intravital.....</i> | <i>58</i> |
| C. <i>Análisis de imágenes</i> | <i>59</i> |

ÍNDICE DE IMÁGENES

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Representación esquemática de las etapas de crecimiento folicular | 13 |
| Figura 2. Representación esquemática de las etapas de formación del cuerpo lúteo en el humano | 17 |
| Figura 3. Características histológicas del cuerpo lúteo en diferentes etapas de crecimiento ... | 18 |
| Figura 4. Etapas de la angiogénesis durante la remodelación vascular en la luteogénesis | 21 |
| Figura 5. Microvasculatura durante la remodelación vascular en la luteogénesis | 22 |
| Figura 6. Cambios hemodinámicos asociados a la remodelación vascular fisiológica o patológica | 24 |
| Figura 7. Diagrama de la inducción del modelo experimental de hiperglucemia en ratas hembras tratadas con STZ | 29 |
| Figura 8. La administración de estreptozotocina induce hiperglucemia | 34 |
| Figura 9. El tratamiento con estreptozotocina induce pérdida de peso corporal, polifagia y polidipsia | 35 |
| Figura 10. Remodelación vascular durante la luteogénesis en condiciones fisiológicas | 38 |
| Figura 11. Marcaje de la microvasculatura luteal en diferentes etapas del desarrollo del cuerpo lúteo | 39 |
| Figura 12. Remodelación vascular durante la transición folículo-luteal y la luteogénesis temprana | 40 |
| Figura 13. Cambio en el tamaño y en el número de brotes angiogénicos y en el área vascular durante las etapas de formación del cuerpo lúteo | 42 |
| Figura 14. Cambio en el calibre vascular de acuerdo al tipo de ramificación y en el número de nodos asociados al desarrollo del cuerpo lúteo | 45 |
| Figura 15. Comparación de la permeabilidad vascular en el cuerpo lúteo de ratas control y tratado con STZ | 46 |

RESUMEN

En condiciones fisiológicas la formación del cuerpo lúteo en mamíferos se caracteriza por presentar procesos de angiogénesis y remodelación vascular, los cuales pudieran ser afectados por diversas patologías que generan alteraciones vasculares. Tal podría ser el caso de la *Diabetes mellitus*, la cual es una enfermedad que genera un síndrome vascular que afecta a diferentes órganos y sistemas. De hecho la hiperglucemia afecta de forma negativa a la fisiología ovárica, ya que el compartimento folicular y luteal resultan dañados. En este sentido, el trabajo experimental realizado por Garris y colaboradores en ratas diabéticas demostró la existencia de una disfunción del cuerpo lúteo asociada a fallas en la función vascular de la glándula. Sin embargo, no se ha investigado si dicho resultado se asocia a fallas durante la remodelación vascular que ocurre en la luteogénesis. En consecuencia, en el presente estudio evaluamos si la hiperglucemia inducida con estreptozotocina (STZ) provoca cambios en los procesos fisiológicos de remodelación vascular que ocurren durante la luteogénesis. Además evaluamos si una remodelación patológica se asocia con una disfunción vascular en la glándula. Para ello se indujo un modelo experimental de hiperglucemia y se comparó a los 7, 14 y 21 días post-tratamiento con su respectivo control. Se describieron y compararon los patrones de remodelación vascular durante las etapas de luteogénesis. Además se evaluaron los cambios en la permeabilidad vascular y la producción de progesterona. Los resultados demuestran que el tratamiento con STZ produjo hiperglucemia, pérdida de peso corporal, polidipsia y polifagia. En comparación al grupo control, en las ratas hiperglúcemicas se observó una reducción en el número de brotes angiogénicos durante la etapa temprana de luteogénesis, menor calibre de los vasos sanguíneos, reducción en el porcentaje de área vascular a lo largo de la luteogénesis y una menor complejidad de la red vascular. También, se presentó hiper-permeabilidad en las vasculatura luteal y por último, una reducción de la progesterona en los animales tratados. En conclusión encontramos evidencia que sugieren fallas en la remodelación y función vascular provocadas por una hiperglucemia durante la luteogénesis.

Palabras clave: Angiogénesis, Brotes angiogénicos, Extravasación, Función lútea, Luteogénesis, Red vascular, Remodelación vascular, Síndrome diabético. .

I. INTRODUCCIÓN

La función del ovario en mamíferos se caracteriza por presentar patrones cíclicos de proliferación y diferenciación celular durante el desarrollo folicular y la formación del cuerpo lúteo. Por su parte, la foliculogénesis inicia cuando un conjunto de folículos primordiales entran en la fase de crecimiento [1]; después, las células de la granulosa y de la teca de dichos folículos en crecimiento, en respuesta a una estimulación gonadotrópica, primero con la hormona folículo estimulante (FSH) y después con la hormona luteinizante (LH), continúan su proliferación y diferenciación morfológica-funcional hasta la ovulación [2]; por último, después de la ovulación, el folículo post-ovulatorio entra en la etapa de transición folículo-luteal a partir de la cual comienza el proceso de formación del cuerpo lúteo que se encarga de iniciar y mantener las condiciones propicias para la gestación [3].

En particular durante la luteogénesis o formación del cuerpo lúteo, ocurren eventos de remodelación celular, vascular y bioquímicos que aseguran la correcta formación y función del cuerpo lúteo, lo cual se logra mediante la luteinización de las células de la granulosa y la expresión de las enzimas esteroideogénicas (P450ssc y 3 α -HSD) que se encargan de producir progesterona a partir del colesterol [4, 5]; además, se requiere del establecimiento de un lecho vascular intraovárico que facilite el aporte de sangre hacia dicha glándula [3, 6], esto es debido a la formación de una red vascular densa en el ovario que provee una vía para el aporte de factores tróficos, oxígeno y los precursores hormonales necesarios para soportar el crecimiento de sus estructuras, las cuales son fundamentales para mantener la función gonadal [2].

Dentro del ovario, los cambios en la microvasculatura ocurren mediante un proceso de remodelación vascular, el cual está mediado por el crecimiento y la regresión de los vasos sanguíneos. Por su parte, la extensión de la vasculatura ocurre en respuesta a estímulos angiogénicos que provocan la proliferación de las células endoteliales, mientras que la regresión de la vasculatura se asocia con la ausencia de crecimiento, seguido de un incremento en los procesos de apoptosis de las células endoteliales [7]. El principal proceso responsable de la expansión de la red vascular se conoce como angiogénesis y consiste en la formación de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes [8], ésta inicia con la proliferación de los capilares y culmina en la formación del nuevo lecho microvascular que se compone de arteriolas, capilares y vénulas [9].

Una vez iniciada la pubertad el ovario presenta procesos ciclos de remodelación vascular que acompañan el crecimiento y regresión de folículos y cuerpos lúteos [6, 10]; sin embargo, la existencia de alteraciones hemodinámicas, así como diferentes estímulos intra y extracelulares pueden alterar el equilibrio de los procesos de remodelación vascular [7]. En consecuencia, debido a que la función del ovario depende del establecimiento cíclico de una red vascular, es posible que en respuesta a diversas condiciones patológicas se produzcan vasculopatías ocasionadas por fallas en la remodelación vascular y en la función de la microvasculatura intraovárica. En este contexto, es posible pensar que la hiperglucemia crónica que caracteriza a la *Diabetes mellitus* podría ser una causa de vasculopatías a nivel de la gónada femenina. En apoyo a esta idea basta mencionar que gran parte de la elevada morbilidad y mortalidad que se asocia a la *Diabetes mellitus* se debe a una disfunción del endotelio vascular [11], así como al efecto nocivo que la hiperglucemia provoca sobre la macro y la microcirculación [12].

A pesar de que la condición hiperglucémica produce un síndrome vascular que incluye macro y microvasculopatías que afectan a diferentes órganos y sistemas [13], actualmente se desconoce la existencia de fallas reproductivas femeninas que puedan surgir en consecuencia a alteraciones de la remodelación vascular intraovárica. En este sentido, el trabajo experimental realizado por Garris y colaboradores [14, 15] en ratas diabéticas demostró la existencia de una disfunción del cuerpo lúteo asociada a fallas en la función vascular de la glándula. Sin embargo, no se ha investigado si la disfunción lútea de las hembras diabéticas se debe a fallas durante la remodelación vascular que acompaña a la luteogénesis. Cabe mencionar que durante la hiperglucemia se originan alteraciones en la proliferación de las células del endotelio vascular, fallas en su función de barrera, además de que surgen modificaciones en sus características de adhesión con otras células circulantes y se incrementan los procesos apoptóticos en dichas células vasculares [11, 16]; además, las microvasculopatías diabéticas típicamente se asocian con fallas en la regulación de la remodelación vascular y un crecimiento deficiente de la red vascular, a la vez que se produce una reducida respuesta a estímulos angiogénicos y también se presentan procesos anormales de neovascularización [17].

En virtud de este escenario, consideramos que el ovario es un buen modelo de estudio para evaluar si la diabetes es capaz de inducir de forma específica fallas en la remodelación vascular fisiológica que ocurre de forma cíclica. En particular proponemos estudiar la remodelación vascular que ocurre durante la formación del cuerpo lúteo. Lo anterior debido a que 1, durante la luteogénesis ocurre un proceso de remodelación vascular sustentado por una angiogénesis intensa y 2, la función del cuerpo lúteo es dependiente del adecuado establecimiento de una densa red vascular. Es posible esperar entonces que una falla en la remodelación vascular sea un factor que contribuya al establecimiento de una microvasculopatía diabética a nivel del cuerpo lúteo. En consecuencia, el objetivo del estudio es probar si durante la formación del cuerpo lúteo en condiciones de hiperglucemia se presentan alteraciones del proceso de remodelación vascular, las cuales a su vez se traduzcan en una disfunción vascular en el tejido luteal.

II. ANTECEDENTES

A. *Fisiología de los procesos reproductivos cíclicos del ovario*

La función reproductiva femenina depende de la participación de los elementos que conforman el eje reproductor: hipotálamo-hipófisis-gónada. Dentro de dicha actividad el ovario desempeña un papel crucial en la regulación de los eventos fisiológicos que mantienen la capacidad reproductiva [18], lo anterior se logra mediante los eventos cíclicos de crecimiento y regresión de sus dos estructuras principales: folículos y cuerpos lúteos.

Los ovarios son estructuras pareadas intra-abdominales de forma amigdaloides que tiene entre sus principales funciones el mantenimiento de la función reproductiva y la producción de las hormonas esteroides necesarias para proveer una regulación endocrina, la cual resulta fundamental en el control de los procesos cíclicos y dinámicos de la fisiología reproductiva femenina. La función reproductiva se logra mediante la liberación cíclica de ovocito(s) a partir de folículo(s) preovulatorio(s), dicho ovocito(s) es plenamente competente para su fertilización. En consecuencia a la ovulación, el folículo post-ovulatorio se transforma en un cuerpo lúteo, el cual se encarga de iniciar y mantener las condiciones propicias para la gestación. Por otra parte, mediante la producción de hormonas esteroides sexuales: estrógenos, andrógenos y progestágenos se logra mantener una función endocrina, la cual es fundamental en el control del desarrollo cíclico folicular y para la fertilidad [5, 18]. A partir de una serie de cambios cíclicos en las estructuras intraováricas se producen los elementos que aseguran la continuidad reproductiva femenina [18]. Dichos eventos incluyen el crecimiento de los folículos en el proceso denominado foliculogénesis, así como la generación del cuerpo lúteo después de la ovulación, durante la luteogénesis.

1. Foliculogénesis

El folículo es la unidad fundamental del ovario porque contiene al ovocito que eventualmente va a ser ovulado para posteriormente, en caso de ocurrir los eventos necesarios, ser fertilizado y formar un embrión. Dicho folículo también proporciona las hormonas esteroideas, proteínas y factores de crecimiento, entre otros, requeridos para el mantenimiento del ciclo ovárico, además de que ayuda a desarrollar las características secundarias del sexo. A pesar de que el crecimiento folicular es un proceso bien documentado para varias especies de

mamíferos, hasta la fecha no se conocen los determinantes que controlan las reservas foliculares y la entrada de los folículos en el camino de crecimiento hacia la ovulación o la atresia [19]. La foliculogénesis comienza cuando los folículos inmaduros dejan la reserva ovárica y culmina, dependiendo de la especie de mamífero, con la producción de uno o varios folículos preovulatorios durante cada ciclo. En la figura 1 se esquematizan las tres etapas principales en las que se divide este proceso: iniciación, crecimiento del folículo antral temprano y selección y maduración del folículo preovulatorio. En cada etapa de la foliculogénesis existen diferentes factores hormonales que actúan de manera específica, cada uno está involucrado en la supervivencia y el desarrollo de los folículos; sin embargo, esta fuera del alcance de este trabajo enlistarlos y describirlos (Para una revisión, véase [5, 20]).

Los eventos de crecimiento y formación folicular progresan a un ritmo creciente mediante la división de las células de la granulosa y el incremento del diámetro folicular. Estos eventos ocurren hasta que el folículo es capaz de avanzar a la etapa de selección del folículo preovulatorio, adicionalmente, las células de la granulosa que rodean al ovocito conforman el denominado *cumulus oophorus* [5]. En conjunto, la formación de una capa gruesa y bien definida de células de la granulosa, el incremento del diámetro folicular y el *cumulus oophorus* son las principales características morfológicas que definen al folículo preovulatorio (Figura 1).

En términos funcionales, una de las principales características del folículo preovulatorio es la producción de estrógenos, la cual se logra mediante una elevada actividad de la enzima P450aromatasa que se expresa en el compartimiento de las células de la granulosa. Lo anterior es posible debido a que las células de la granulosa pueden convertir los andrógenos a estradiol pero son incapaces de hacer una síntesis de andrógenos, la cual se produce exclusivamente en las células de la teca interna [21]. Por lo general, sólo el folículo que se convierte en preovulatorio es la principal fuente de estradiol circulante. Típicamente, durante la maduración del folículo preovulatorio ocurren diversos cambios morfológicos en la pared folicular ya que justo antes de la ovulación, las células de granulosa se disocian y los capilares de la teca interna invaden la capa granulosa [5]. Además, se presentan cambios en la proliferación celular, así como en la producción de esteroides en respuesta a la estimulación diferencial, primero con FSH y después con LH.

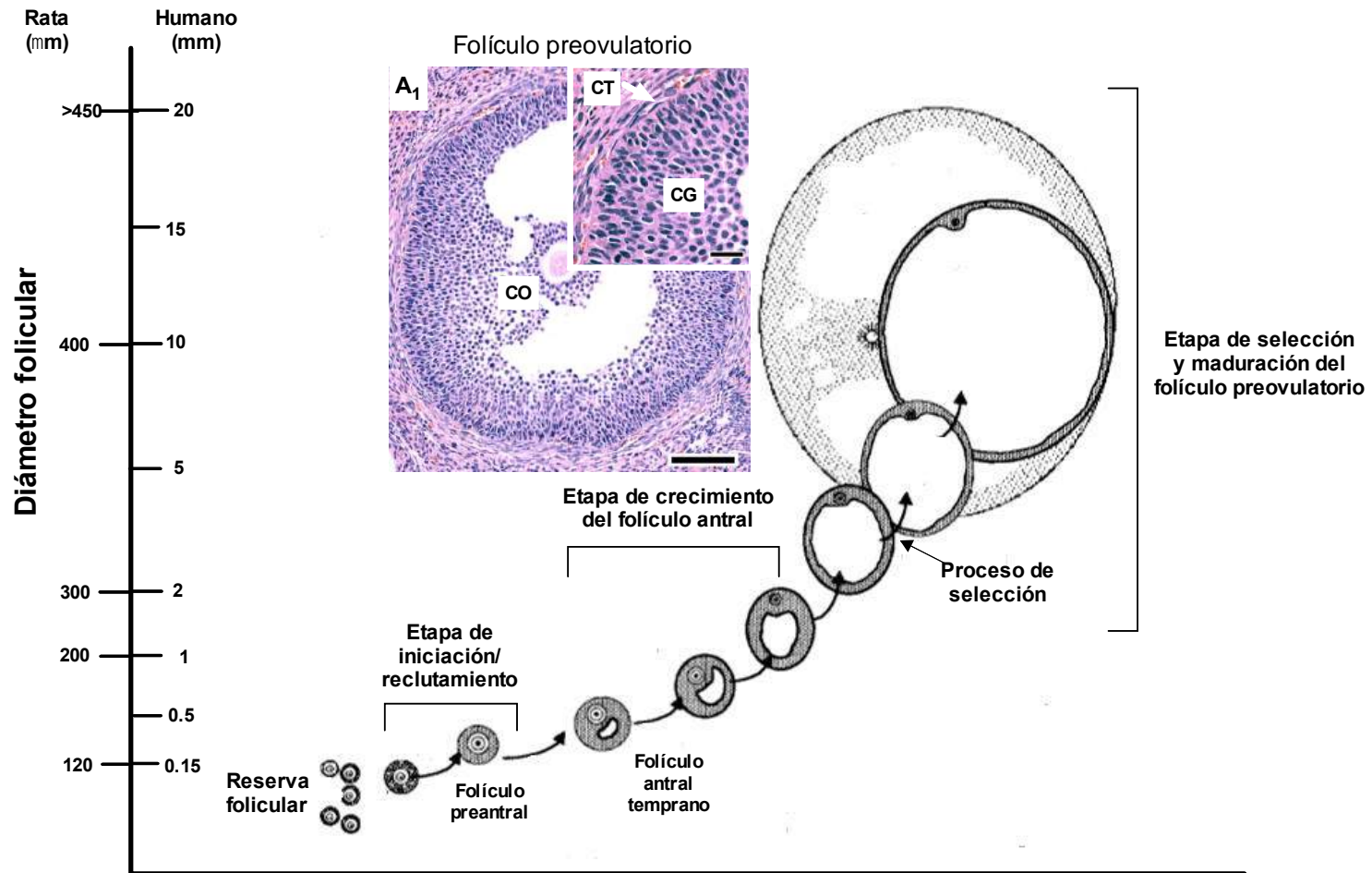


Figura 1. **Representación esquemática de las etapas de crecimiento folicular.** A partir de una reserva folicular se va desarrollando un folículo preantral (etapa de iniciación), al tiempo que aumenta el número de células en la capa de la granulosa y de la teca se da una transición de folículo preantral a folículo antral temprano (etapa de crecimiento del folículo antral), durante dicha etapa se forma la cavidad antral. Finalmente el folículo sigue creciendo hasta madurar y llegar al proceso de selección del folículo preovulatorio para culminar en el proceso de ovulación. En A1 se muestran las características del folículo preovulatorio donde se observa el ovocito rodeado por células del *cumulus oophorus* (CO) y por células de la corona radiata. CT= células de la teca; CG= células de la granulosa.

Tomado y modificado de [5, 22].

a) Características de la microvasculatura ovárica asociada a los folículos

La foliculogénesis es un proceso complejo que no depende únicamente de la función y la diferenciación morfológica de las células de la pared folicular, sino que también requiere de cambios significativos en la extensión de la microvasculatura en la periferia [23]. En este sentido se sabe que los folículos en etapas tempranas de crecimiento presentan una cantidad limitada de vasos sanguíneos. De hecho, los folículos primordiales están rodeados por capilares individuales, es por ello que la extensión de su microvasculatura se inicia por una brote local de los vasos sanguíneos perifoliculares [24], conforme el folículo primordial hace la transición a folículo primario, el suministro vascular necesita incrementarse gradualmente en la periferia de la estructura puesto que la capa de células de granulosa en los folículos es avascular [6]. Durante la formación del folículo preovulatorio, la membrana basal, que consiste en colágeno tipo IV, laminina $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$ y fibronectina, forma una barrera dentro de la pared folicular que evita que la vasculatura tecal invada el estrato granuloso. El desarrollo del folículo preovulatorio se asocia con un aumento de la densidad de los vasos sanguíneos dentro de las capas de células de la teca que rodean el folículo [3]. Además se presenta un aumento progresivo en la tortuosidad y el diámetro de los vasos sanguíneos, así como la zona capilar de las células de la teca que muestran cambios notables cuando existe un aumento de LH [6], entre los que se encuentran: el aumento de los vasos sanguíneos, cambios en la permeabilidad de las paredes capilares y extravasación de la sangre hacia el estroma pericapilar [1].

Con el fin de satisfacer las demandas del crecimiento folicular se requiere una remodelación vascular que asegure el establecimiento de una red microvascular para aportar los elementos necesarios que mantienen el desarrollo de los folículos seleccionados. En este sentido la angiogénesis es esencial [25] y se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la migración y proliferación de las células endoteliales de vasos preexistentes. La angiogénesis en el útero, la placenta y las glándulas mamarias en los animales domésticos se relaciona con el estado de preñez, mientras que, en los ovarios cada fase del ciclo hormonal esta acompañado de cambios radicales en la vasculatura. La transición del folículo a cuerpo lúteo y la subsecuente luteólisis es el resultado de un crecimiento masivo y una regresión de vasos sanguíneos, respectivamente. La angiogénesis en el sistema reproductor femenino es dirigida por factores de crecimiento y citocinas, además, es regulada por inhibidores angiogénicos [26].

2. Luteogénesis

El cuerpo lúteo es una glándula transitoria cuyo desarrollo se produce en el ovario después de la ovulación, su principal función es sintetizar hormonas entre las que destaca la progesterona que es una hormona esteroide esencial para el establecimiento y el mantenimiento de la gestación [3, 27]. La formación del cuerpo lúteo se denomina luteogénesis y se divide en tres etapas denominadas: transición folículo-luteal, luteogénesis temprana y 3 maduración [28]. En la figura 2 se presentan de forma esquemática las estructuras que conforman a la luteogénesis. Durante la luteogénesis se presenta una remodelación morfológica conocida como *luteinización*, el cual es un proceso de diferenciación que ocurre después de la ruptura del folículo preovulatorio. El proceso de luteinización también involucra un cambio en la expresión de enzimas esteroideogénicas y de proteínas reguladoras para lograr una mayor síntesis de progesterona [5]. Dentro de los procesos de luteogénesis el crecimiento de nuevos capilares durante la angiogénesis sigue una cascada de eventos que incluyen cambios en la membrana basal, la migración y proliferación de células endoteliales y el desarrollo de capilares [6].

La función del compartimiento lúteo es fundamental durante el proceso de gestación debido a la secreción de progesterona, ya que esta hormona esteroide es importante para la formación de un ambiente hormonal óptimo que asegure una adecuada transformación endometrial [29]. En las células luteales la producción de progesterona se logra mediante el cambio de las enzimas esteroideogénicas, ya que durante el proceso de diferenciación se induce la expresión de la enzima P450_{scc}, mientras que la expresión y función de la enzima P450_{arom} se reduce [4].

a) Etapas de formación y regresión del cuerpo lúteo

Durante la *transición folículo-luteal*, el folículo post-ovulatorio se transforma en un cuerpo lúteo (Figura 2) mediante una serie de procesos dinámicos relacionados con cambios morfológicos y bioquímicos, los cuales ocurren después del pico preovulatorio de LH y que se mantienen después de la ovulación y durante el tiempo que dura la luteogénesis [30]. Para que ocurra esta etapa se deben presentar características específicas en los folículos a partir de los cuales se va a formar el cuerpo lúteo: el folículo preovulatorio debe tener suficientes células de la granulosa antes de la ovulación, ya que después de dicho evento se detiene la proliferación de

células granulosa-luteales, el folículo debe contener células de la granulosa con capacidad para secretar suficiente progesterona después de la ovulación y las células de granulosa y de la teca interna deben ser sensibles a los estímulos tróficos provocados por la LH y la FSH [28].

Como se observa en la figura 2, al final de la transición folículo-luteal comienza la etapa de *luteogénesis temprana*, la cual se reconoce por la presencia de contornos plegados (invaginaciones), así como una pared formada por las que antes eran las células de la granulosa y de la teca, además de la presencia de un centro hemorrágico que es parte de la microvasculatura que va invadiendo la estructura conforme avanza su crecimiento [19]. En esta etapa el cuerpo lúteo es de tamaño pequeño con respecto a la glándula madura, además se caracteriza por presentar una cavidad central llena de líquido de la etapa folicular y células basófilas derivadas de la granulosa, las cuales mediante proliferación gradualmente invaden el antro folicular previo (Figura 3A). En etapas tempranas de desarrollo aún se aprecian las células de la teca del folículo previo. Durante la luteogénesis temprana las células de la granulosa y de la teca interna provenientes de la fase folicular se diferencian a células luteales mediante la luteinización, el cual se considera la principal característica en el proceso de transformación del folículo que ovuló [4].

La *Maduración* se considera la etapa de desarrollo máximo del cuerpo lúteo y se caracteriza por la finalización del proceso de luteinización. Además se presenta un incremento gradual en el diámetro de la glándula, se cierra la cavidad central y cesa la proliferación de las células luteales y endoteliales. Los cuerpos lúteos maduros se caracterizan histológicamente por presentar células eosinófilas de tamaño variado (Figura 3B). De forma característica el cuerpo lúteo adquiere un aspecto amarillo causado por un pigmento liposoluble conocido como lipocromo, que se encuentra en el citoplasma de las células luteales [6]. En dicha etapa la función secretora de la glándula es máxima y por ello se produce la mayor concentración de progesterona.

En caso de que no ocurra la fecundación del óvulo y con ello el inicio de la gestación, entonces el destino del cuerpo lúteo es la degeneración, este proceso de regresión de la glándula se conoce como luteólisis y se caracteriza por la reducción del tamaño del cuerpo lúteo, así como por la pérdida de secreción de progesterona. Uno de los rasgos distintivos de dicha etapa de degeneración es la formación de tejido fibroso al centro de la glándula, así como la formación de vacuolas en el citoplasma de las células luteales (Figura 3C).

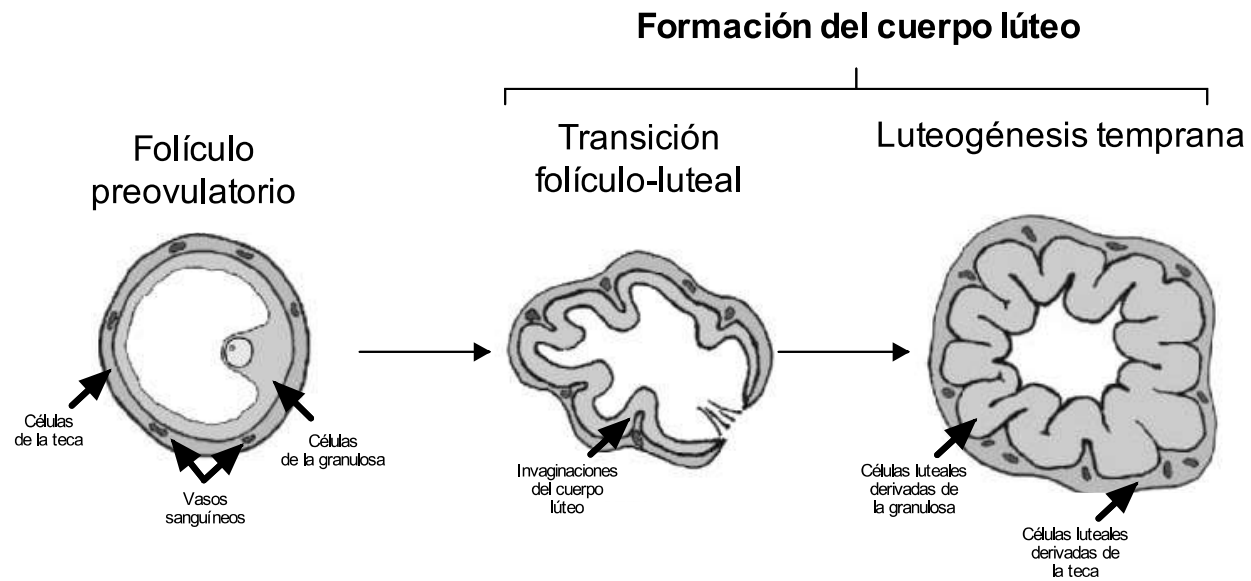


Figura 2. **Representación esquemática de las etapas de formación del cuerpo lúteo en el humano.** Los elementos estructurales del folículo preovulatorio (células de la granulosa, células de la teca y vasos sanguíneos) son los precursores en el proceso de formación del cuerpo lúteo. El colapso del folículo durante la etapa de transición folículo-luteal permite la incursión de la vasculatura tecal, así como de las células de la teca interna hacia el compartimiento de células de la granulosa durante el proceso de luteinización. Durante estos eventos de invasión se forman invaginaciones, las cuales persisten en la luteogénesis temprana. Los procesos de neovascularización continúan hasta abarcar todo el compartimiento luteal. En el humano, el cuerpo lúteo presenta cavidad y se compone de dos compartimientos discretos originados por cada tipo celular de la pared folicular. Tomado y modificado de [5].

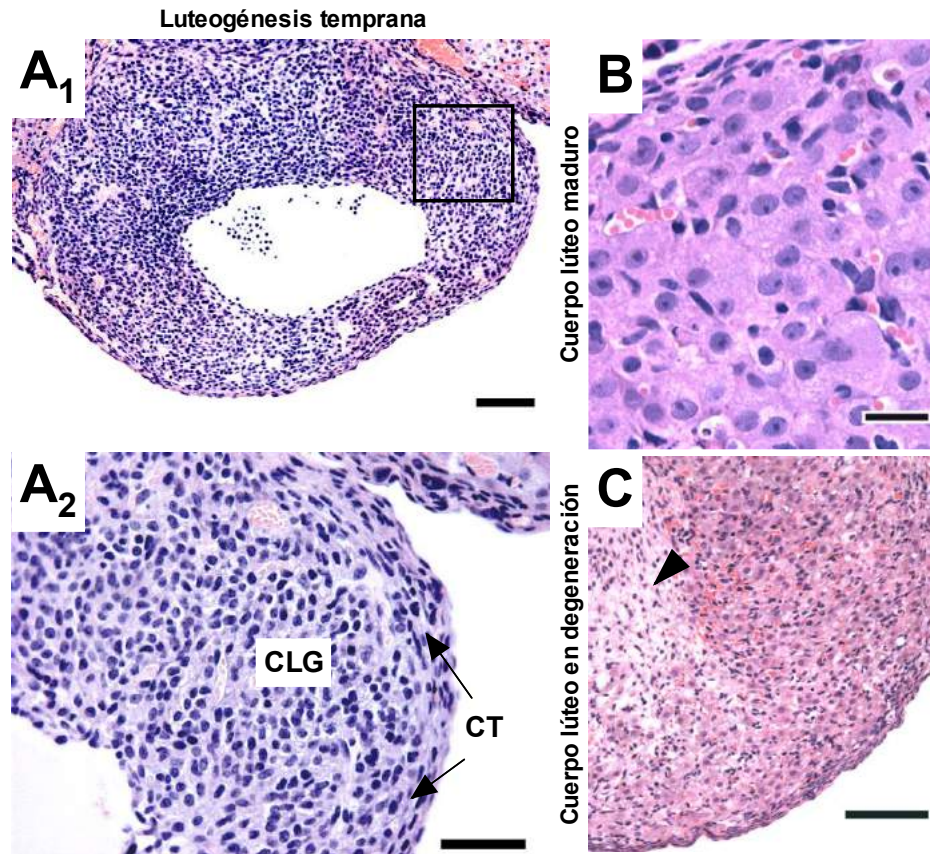


Figura 3. **Características histológicas del cuerpo lúteo en diferentes etapas de crecimiento.** A) El cuerpo lúteo temprano se caracteriza por presentar células luteales derivadas de la granulosa (CLG), la presencia de un espacio luminal y la existencia de células de la teca interna (CT), B) En el cuerpo lúteo maduro se observan las células luteales diferenciadas y de tamaño homogéneo y C) En el cuerpo lúteo en degeneración se observa un depósito central de tejido fibroso (cabeza de flecha) y células con vacuolas en su citoplasma. Nótese la existencia de células de la teca. Barra de escala: A1-A2= 50 mm, B= 20mm y C=100 mm. Foto de nuestro grupo de trabajo.

b) Remodelación vascular durante la formación y regresión del cuerpo lúteo

En el ovario y en particular en el cuerpo lúteo ocurren de forma cíclica procesos de crecimiento, maduración y degeneración de los vasos sanguíneos [31]. Específicamente, durante la transición folículo-luteal se llevan a cabo eventos de angiogénesis mediante los cuales se generan cambios en la vasculatura perifolicular [6]. Los principales pasos que se requieren durante la vascularización del cuerpo lúteo son: ruptura de la membrana basal del folículo post-ovulatorio, migración de las células endoteliales hacia el estímulo angiogénico, proliferación de las células endoteliales y formación del nuevo brote angiogénico [32]. Esta serie de eventos aseguran la formación de una red microvascular con las características necesarias para proveer de oxígeno, nutrientes y precursores hormonales a las células luteales para producir, principalmente, progesterona [26].

En la figura 5 se presenta un modelo esquemático de los procesos de angiogénesis que ocurren durante la formación del cuerpo lúteo de rumiantes. El paso inicial de la angiogénesis es la degradación de la membrana basal por proteasas. La ruptura de la membrana basal requiere de una plétora de proteasas que incluye miembros de la metaloproteasas (MMP) de la familia de la matriz tales como colagenasas, gelatinasas y de tipo membrana (MT) MMP. Las proteasas tales como plasmina, que se genera a partir de plasminógeno, también participan mediante la degradación de fibrinógeno y fibrina. Varias de estas proteasas son reguladas por el pico de LH (por ejemplo MMP1, MMP9, MMP13, MT-MMP1 y activadores del plasminógeno) [3, 6]. El pico de LH activa a las proteasas del folículo preovulatorio, incrementa la hipoxia e induce la producción de factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FGF2) en las células foliculares. El aumento de FGF2 estimula la dispersión y migración de las células endoteliales cercanas a la teca. Adicionalmente, se activan los fibroblastos y en combinación con el factor de crecimiento transformante b (TGFb) se producen miofibroblastos. El pico de LH estimula la producción de angiopoyetina 2 (ANGPT2) para desestabilizar las interacciones de los pericitos con la vasculatura y lograr su desprendimiento. En esta fase se produce factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA), el cual activa las células endoteliales y la degradación de la matriz extracelular (Figura 4A).

Durante la transición folículo-luteal, los miofibroblastos y pericitos migran por delante de las “tip cells” para establecer un andamio de matriz extracelular y fibronectina, proporcionando con ello un marco estructural que guía a las células endoteliales hacia el estímulo angiogénico. El VEGFA induce la proliferación y supervivencia de las células endoteliales (Figura 4B). Finalmente, en el cuerpo lúteo en desarrollo las células endoteliales se reconectan y se alinean para formar los vasos sanguíneos, los cuales se estabilizan por pericitos reclutados mediante la producción de factor de crecimiento derivado de las plaquetas B (PDGFB) y la actividad de ANGPT1. En consecuencia, las células lúteas están totalmente vascularizadas y así los niveles de hipoxia disminuyen (Figura 4C).

En conjunto, los eventos mencionados resultan fundamentales para provocar los cambios en la vascularización del cuerpo lúteo, los cuales se han documentado en diversas especies de mamíferos (para una revisión véase [3, 6]). Los cambios temporales de vascularización que suceden durante la luteogénesis requieren de la formación de vasos sanguíneos “brotes angiogénicos” a partir de la vasculatura tecal, formando con ello un patrón radial hacia el interior de la glándula en desarrollo (Figura 5A). En la figura 5B se esquematiza la remodelación vascular que ocurre en el ovario de ratón en respuesta a una estimulación con PMSG/hCG (5 IU Pregnant Mare Serum Gonadotropin y 5 IU Human Chorionic Gonadotropin). Durante el curso temporal de estos cambios se ha determinado que la angiogénesis luteal es intensa durante la etapa temprana de la luteogénesis, ya que se ha reportado que entre 85 y 95% de la proliferación en el cuerpo lúteo corresponde a las células del endotelio vascular [33]. La extensa vascularización del cuerpo lúteo funcional se refleja en el hecho de que las células asociadas con la microvasculatura comprenden aproximadamente el 50% de la población total de células y son adyacentes a cada célula esteroidogénica [31].

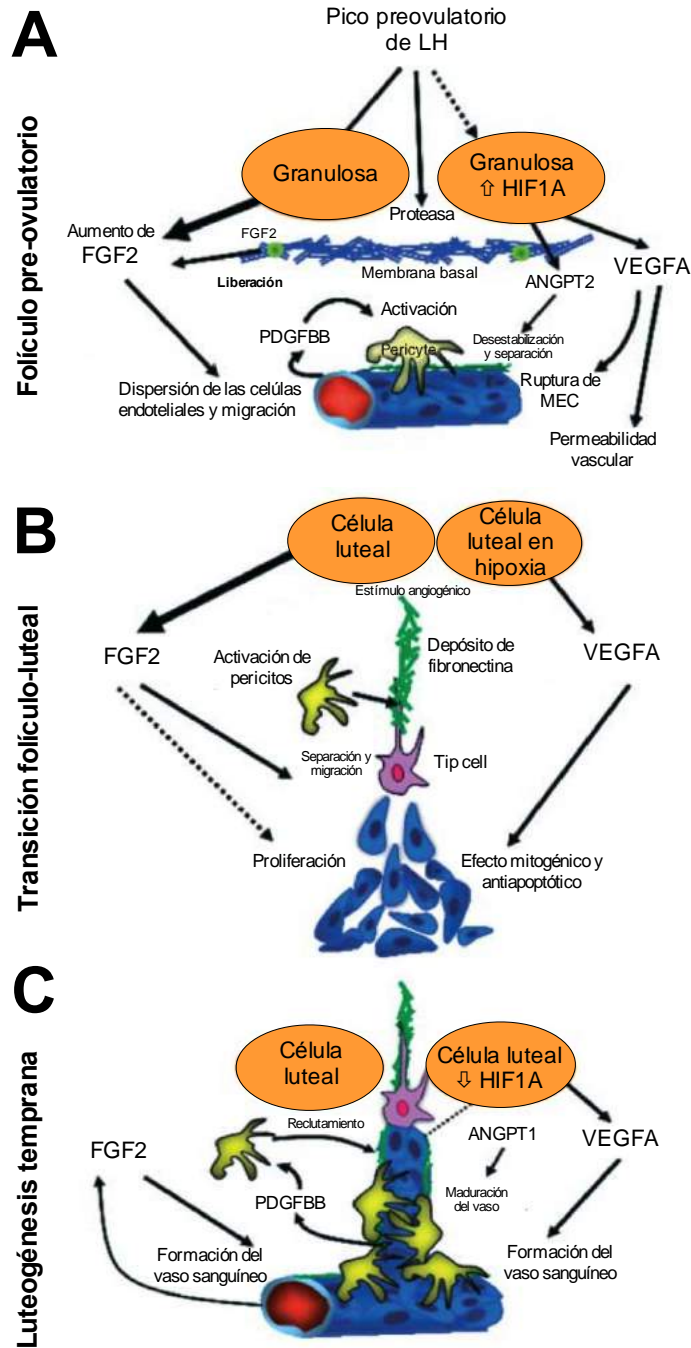


Figura 4. **Etapas de la angiogénesis durante la remodelación vascular en la luteogénesis.** A) En el folículo preovulatorio el pico de LH induce la actividad de las proteasas y un incremento en la hipoxia y la producción de factores de crecimiento (FGF2 y VEGFA). B) Durante la transición folículo-luteal el incremento en la concentración de los factores estimula la dispersión y migración de las células endoteliales a partir de la vasculatura tecal. Los miofibroblastos y pericitos migran por delante de las “tip cells” endoteliales hacia el estímulo angiogénico. C) Finalmente, en el cuerpo lúteo en fase de desarrollo temprano, las células endoteliales se reconectan y se alinean para formar los vasos sanguíneos. En ésta fase la participación de los pericitos es fundamental para estabilizar la nueva vasculatura. Tomado y modificado de [3].

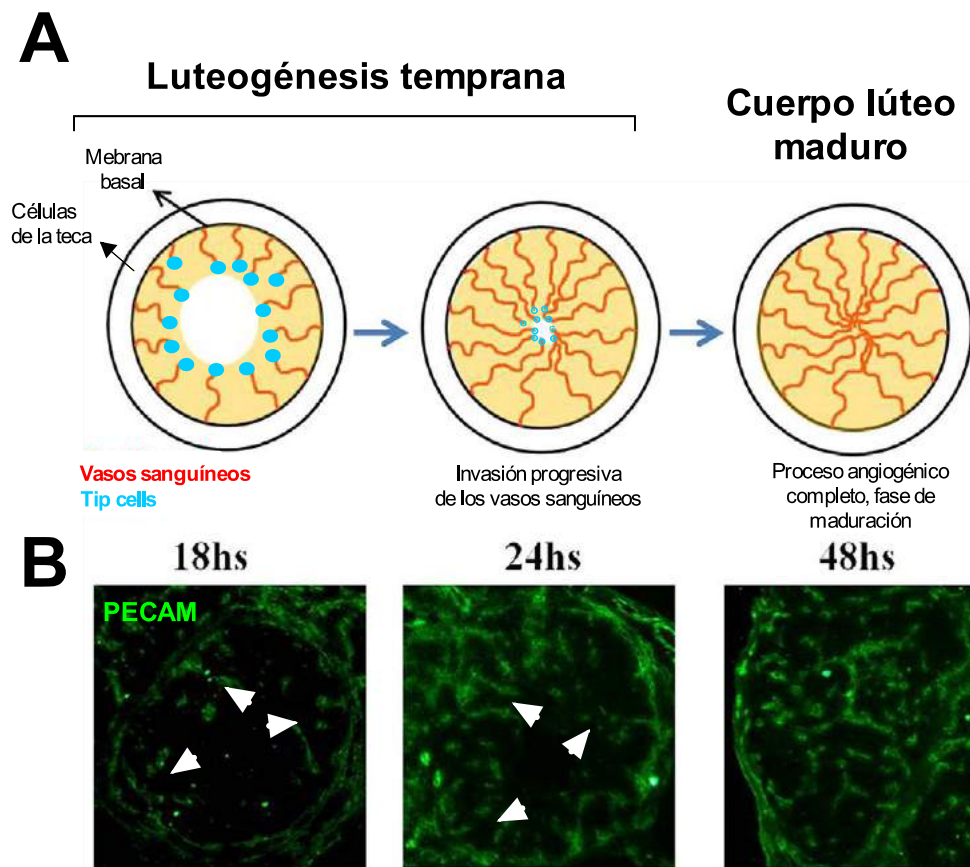


Figura 5. **Microvasculatura durante la remodelación vascular en la luteogénesis.** A) Modelo esquemático de la remodelación vascular durante la formación del cuerpo lúteo. B) Imágenes de la microvasculatura luteal teñida de forma específica con PECAM (verde) dentro de secciones de ovarios de ratones estimulados con PMSG/hCG en diferentes momentos de desarrollo del cuerpo lúteo. Durante la luteogénesis temprana, los brotes vasculares liderados por las “Tip cells” (azul claro) se observan como estructuras longitudinales, similares a los radios de una rueda, que se derivan perpendicularmente desde la capa circulante de la teca. La nueva vasculatura se extiende hasta que toda la glándula se llena de vasos sanguíneos. En B, las puntas de flecha indican las tip cells y la formación de la microvasculatura marcada con PECAM (Platelet endothelial cell adhesion molecule). Tomado y modificado de [34]

B. Patologías de la vasculatura asociadas a la hiperglucemia: Posibles fallas en la remodelación vascular del cuerpo lúteo y su asociación con una disfunción luteal

Como se mencionó previamente, la fisiología ovárica requiere de cambios periódicos en la microvasculatura de sus estructuras. En particular, el establecimiento y función del cuerpo lúteo es dependiente de los eventos de remodelación vascular que ocurren después de la ovulación, durante la transición folículo-luteal así como durante la regresión de la glándula [6]. Esta remodelación vascular depende de un fino balance en los estímulos extra e intracelulares que provocan cambios en la proliferación y la apoptosis de las células endoteliales durante la extensión o regresión de la vasculatura pre-existente [3, 8]. Es por ello que los cambios hemodinámicos que ocurren en diferentes condiciones patológicas tienen la capacidad de alterar el equilibrio de los procesos de remodelación vascular, generando con ello vasculopatías (Figura 6). En este sentido, la hiperglucemia que caracteriza al síndrome diabético [35], podría representar una condición capaz de generar una falla en la remodelación fisiológica y cíclica del cuerpo lúteo. Lo anterior debido a que en consecuencia a la condición hiperglicémica se presenta un elevado número de complicaciones, entre las que sobresale el daño provocado sobre el sistema circulatorio; particularmente, el daño al endotelio vascular.

El síndrome diabético es una enfermedad metabólica que se integra por la triada clásica polifagia, polidipsia y poliuria [35]. La elevada morbilidad y mortalidad provocadas por esta patología se asocian con la inducción de una disfunción del endotelio vascular [11] y con el efecto nocivo que la hiperglucemia crónica provoca sobre la macro y microcirculación [12]. Lo anterior es debido a que durante dicha patología se produce un síndrome vascular que incluye: macrovasculopatías que afectan a todos los órganos, particularmente al corazón, el cerebro y a la circulación periférica y microvasculopatías que producen disfunciones endoteliales, ocasionando con ello problemas como la retinopatía, neuropatía y nefropatía diabéticas [13]. Sin embargo, los daños provocados por la hiperglucemia también afectan al sistema reproductivo. Es por ello que en las hembras diabéticas se presenta atrofia gonadal, foliculogénesis anormal, capacidad esteroidogénica disminuida, fallas en la maduración de los ovocitos, así como patrones anormales de ovulación [36-39]. Por lo tanto la hiperglucemia crónica establece condiciones que en conjunto generan efectos adversos durante la implantación y el mantenimiento de la gestación [40-42].

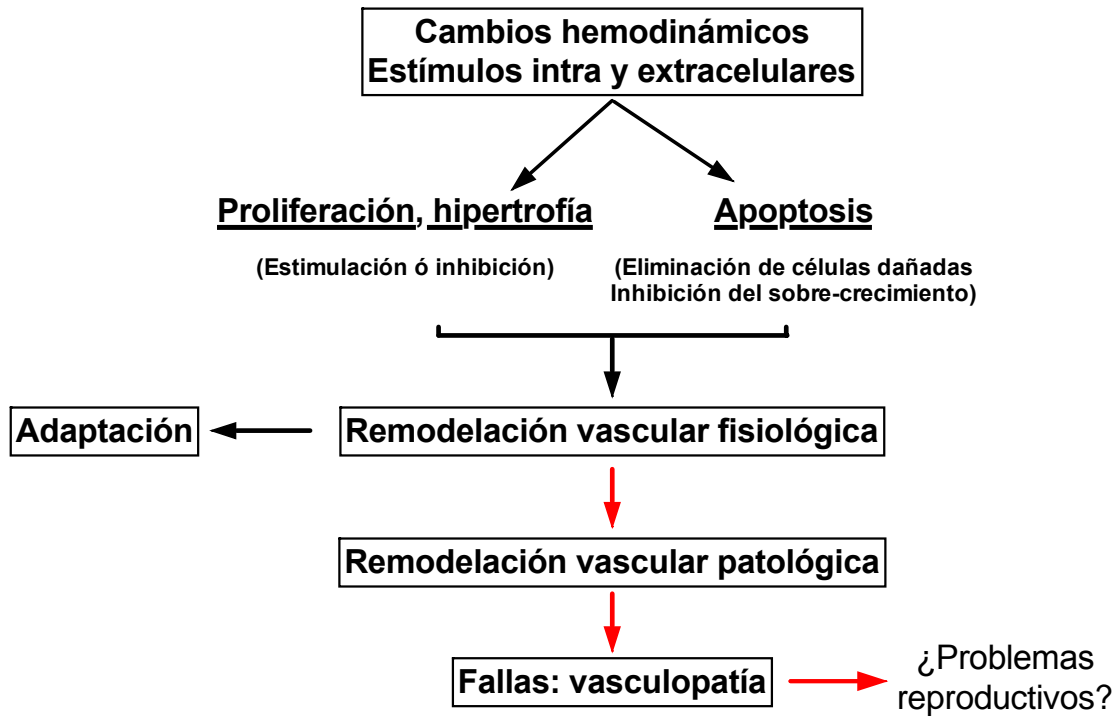


Figura 6. **Cambios hemodinámicos asociados a la remodelación vascular fisiológica o patológica.** La remodelación vascular está determinada por el equilibrio del crecimiento celular y la apoptosis. Los cambios hemodinámicos, así como estímulos extracelulares e intracelulares modulan el crecimiento celular y/o el proceso de apoptosis. La remodelación vascular está determinada por un balance adecuado entre células apoptóticas, células hipertrofiadas y en proliferación, lo cual conduce a la adaptación fisiológica. Estímulos no fisiológicos producen un desequilibrio que favorece la muerte celular, la cual contribuye a algunos estados de enfermedad vascular y remodelación patológica. Tomado y modificado de [7].

A pesar de que la hiperglucemia se ha asociado con una serie de alteraciones del tracto reproductor femenino; en particular en el ovario (revisado por [43, 44]), poco se sabe acerca de las fallas reproductivas que pueden surgir en consecuencia a alteraciones de la remodelación vascular intraovárica. Esto a pesar de que en el cuerpo lúteo, por ejemplo, ocurre una angiogénesis intensa para establecer una intrincada red vascular que asegure el adecuado funcionamiento de la glándula luteal durante la gestación temprana [26]. En virtud de este escenario, pensamos que el cuerpo lúteo representa un buen modelo de estudio para evaluar si la diabetes es capaz de producir fallas en la remodelación vascular que ocurre durante la formación del cuerpo lúteo. De hecho, Fraser y colaboradores [26] sugieren que el cuerpo lúteo representa un modelo único para estudiar angiogénesis. Además, en apoyo a nuestra idea, el trabajo experimental realizado por Garris y colaboradores [14, 15], utilizando modelos murinos tratados con fármacos para inducir diabetes experimental, demostró la existencia de cambios en la función del compartimiento lúteo asociados a alteraciones del flujo sanguíneo y a cambios en la función vascular del tejido luteal.

Cabe mencionar que durante la diabetes se originan cambios en las células del endotelio vascular como: alteraciones en la proliferación, en la función de barrera, la adhesión de células circulantes y la sensibilidad a la apoptosis [11, 16]. Además, las microvasculopatías diabéticas típicamente se asocian a fallas en la regulación de la remodelación vascular y en el crecimiento de la red vascular, a la presencia de una reducción en la respuesta a estímulos angiogénicos, así como a procesos de neovascularización dañados o anormales [17]. En consecuencia, es posible esperar que una remodelación vascular patológica durante la luteogénesis sea un factor que contribuya al establecimiento de una disfunción de la vasculatura luteal y una posible falla reproductiva asociada a la función del cuerpo lúteo, la cual prodría ser el caso de la producción de progesterona.

El objetivo del estudio consistió en probar si durante la formación del cuerpo lúteo en condiciones de hiperglucemia, la cual se considera un aumento no fisiológico, crónico y sostenido de la concentración de glucosa en sangre, se presentan alteraciones del proceso de remodelación vascular, así como de la función vascular del tejido luteal y de la producción de progesterona en los animales tratados con estreptozotocina (STZ) para inducir hiperglucemia.

III. JUSTIFICACIÓN

La hiperglucemia afecta de forma negativa a la fisiología ovárica, ya que el compartimento folicular y luteal resultan dañados. En este sentido, se ha demostrado en modelos de diabetes la existencia de una disfunción del cuerpo lúteo asociada a fallas en la función vascular de la glándula. Sin embargo, no se ha investigado si dicho resultado se asocia a fallas durante la remodelación vascular en la luteogénesis. En consecuencia, en el presente estudio evaluamos si la hiperglucemia inducida con estreptozotocina provoca cambios en los procesos fisiológicos de remodelación vascular que ocurren durante la luteogénesis.

IV. HIPÓTESIS

Las ratas hembra tratadas con STZ para inducir hiperglucemia presentarán fallas en los procesos de remodelación vascular, así como pérdida de la función vascular durante la formación del cuerpo lúteo. Si lo anterior ocurre, se esperaría observar una deficiencia del cuerpo lúteo la cual podría reflejarse en una menor producción de progesterona.

V. OBJETIVOS

El objetivo general del presente proyecto consistió en describir y comparar la remodelación vascular durante la formación del cuerpo lúteo, así como evaluar los posibles cambios en la permeabilidad vascular de esta glándula y la producción de progesterona en animales tratados o no con STZ para inducir un modelo de hiperglucemia no controlada. A continuación se detallan los objetivos específicos:

- Describir los patrones de remodelación vascular durante la transición folículo-luteal y durante la formación temprana y tardía del cuerpo lúteo en ratas control y ratas tratadas con STZ.
- Comparar las características de la vasculatura durante la luteogénesis.
- Evaluar *in vivo* los posibles cambios en la permeabilidad vascular del cuerpo lúteo en ratas control y ratas con hiperglucemia inducida con STZ.
- Comparar la producción de progesterona en animales control e hiperglucémicos.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Para nuestro estudio fue necesario, en primera instancia, establecer un modelo experimental de hiperglucemia mediante la administración de estreptozotocina (STZ). La estreptozotocina es un fármaco obtenido del hongo *Streptomyces achomogenes* con propiedades antitumorales, el cual posee una acción citotóxica sobre las células beta (β) del páncreas y también se utiliza en medicina para el tratamiento de determinados tumores del páncreas, así mismo, se emplea experimentalmente para provocar artificialmente *Diabetes mellitus* en animales de laboratorio [14]. A partir de dicho modelo se caracterizó y comparó, con respecto a los animales no tratados, la remodelación vascular durante la formación del cuerpo lúteo, así como los posibles cambios en su permeabilidad vascular. Segunda, evaluamos la concentración de progesterona y la utilizamos como un indicativo del adecuado funcionamiento del cuerpo lúteo para determinar la existencia de una alteración reproductiva asociada a la glándula luteal.

A. *Animales y diseño experimental*

Para el modelo experimental de hiperglucemia se utilizaron ratas hembras primíparas de la cepa Wistar de 6-8 semanas de edad y con un peso de 180-220 g. Los animales se obtuvieron del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Las hembras se mantuvieron en pares y se colocaron en la colonia de ratas a 21 grados con un fotoperíodo de 12 horas luz: oscuridad (con inicio y término a las 7 y 19 horas). Los animales tuvieron un periodo de aclimatación de 4 días con acceso libre de agua y alimento (LabDiet, St. Louis, MO, USA). Todos los procedimientos experimentales se realizaron bajo las condiciones establecidas por la NOM-062-ZOO-1999 para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio y con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE).

Los animales se dividieron de forma aleatoria en dos grupos: control ($n = 40$) y STZ ($n = 60$). Al grupo de animales tratados con STZ (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) se les aplicó una inyección intraperitoneal de 1 ml de una solución conteniendo 75 mg de STZ por kg de peso corporal, los cuales se diluyeron en el vehículo conteniendo 50 mM de citrato de sodio, pH 4.5. El grupo control recibió únicamente la inyección con la solución de citrato de sodio. En la figura 7 se presenta un diagrama esquemático de la forma en la que se indujo el modelo experimental de hiperglucemia no controlada.

Los animales de cada grupo se subdividieron en tres períodos de evaluación con el objeto de analizar la progresión de los daños asociados a la hiperglucemia: 7 días ($n = 10$ para el grupo control y $n = 15$ para STZ), 14 días ($n = 10$ para el grupo control y $n = 15$ para STZ) y 21 días ($n = 20$ para el grupo control y $n = 30$ para STZ) post-tratamiento. En cada grupo se evaluó el ciclo estral diariamente durante 12 días previos al momento de inducción y a lo largo del tiempo de experimentación. Lo anterior se realizó para incluir únicamente animales con dos ciclos estrales completos, así como para evaluar la etapa del ciclo estral al momento de la muerte de los animales de cada grupo. Los organismos utilizados se sacrificaron durante las etapas de proestro, estro y metaestro, mediante una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital (100mg/kg), esto con la intención de obtener estructuras intraováricas correspondientes a las fases de transición folículo-luteal, luteogénesis temprana y luteogénesis tardía [45]. El día 0 se consideró el momento de la inducción. A partir de éste día y de forma semanal a los animales de cada grupo se les midió en condiciones de ayuno (8-12 horas) la concentración de glucosa en sangre periférica mediante un glucómetro y tiras reactivas (FreeStyle Optium Exceed, Laboratorios Abbot, USA). Además para corroborar el establecimiento de un síndrome diabético (hiperglucemia, polifagia, polidipsia y pérdida de peso corporal) provocado por la administración de STZ, durante los días de evaluación se registró el peso de los animales, así como su consumo de agua y alimento. Para el grupo STZ solo se incluyeron animales que presentaron valores de glucemia > 250 mg/dL, lo cual se considera un modelo de diabetes severa [46]. Cabe resaltar que de los grupos de animales evaluados en cada período, la mitad de ellos se utilizaron para los estudios de histoquímica y el resto para la evaluación *in vivo* de la permeabilidad vascular.

B. Obtención del tejido lúteo

De los animales de los grupos 7, 14 y 21 días post-tratamiento se obtuvo una muestra de sangre intracardíaca la cual fue centrifugada a 1500 rpm durante 10 min a 4°C , para obtener el suero y almacenarlo a -70°C hasta su evaluación. Los ovarios de los animales se disectaron; una vez limpios se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 48 h posteriormente se fijan en concentraciones crecientes de sacarosa del 10, 20 y 30 % durante 24 h cada una para después ser criopreservados. Los ovarios fueron embebidos en Optimal Cutting Temperature compound (OCT), congelados en metilbutano enfriado en hielo seco y almacenados a -80°C hasta su procesamiento mediante histoquímica fluorescente. (**Apéndice A**).

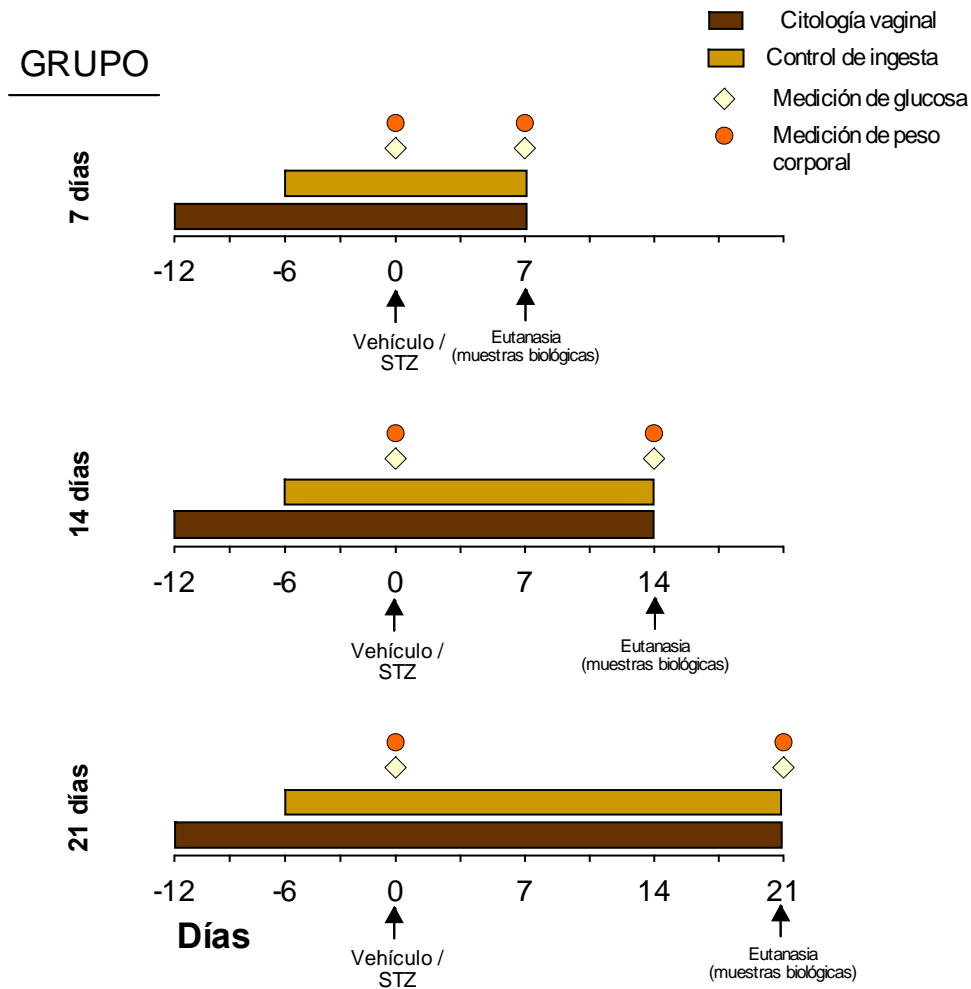


Figura 7. **Diagrama de la inducción del modelo experimental de hiperglucemia en ratas hembras tratadas con STZ.** Se representan los tres grupos con sus respectivos períodos de evaluación: 7, 14 y 21 días post-tratamiento. Cada línea de tiempo presenta los 12 días previos al momento de inducción (medición del ciclo estral) y el día 0 el cual se consideró el momento de la inducción, a cada grupo se les midió la concentración de glucosa en sangre periférica y peso corporal hasta el día de la eutanasia. Figura original.

C. *Marcaje de la microvasculatura ovárica mediante histoquímica*

Para caracterizar los cambios fisiológicos que ocurren en la morfología de la microvasculatura durante la formación del cuerpo lúteo se realizaron tinciones con técnica histoquímica fluorescente para la lectina de cacahuete PNA acoplada al fluoróforo Alexa Fluor 488 (Lectin PNA From *Arachis hypogaea* (peanut), Alexa Fluor® 488 Conjugate, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, USA) en cortes de ovarios de ratas del grupo control. Dicha lectina se une de forma específica a los residuos terminales de β -galactosa localizados en la cara luminal de las células endoteliales [47]. Los procedimientos para el marcaje fluorescente de la microvasculatura con lectina PNA se describen en el **Apéndice A**.

D. *Evaluación de la remodelación vascular durante la luteogénesis con perfusión intravital con lectina*

Para comparar entre las ratas de ambos grupos los patrones de remodelación vascular del cuerpo lúteo se administró por vía intracardíaca lectina de frijol de soya *Ricinus communis* (RCA) acoplada al fluoróforo TRITC (Tetramethylrhodamine isotiocyanate-labeled Ricinus Communis Agglutinin I, Vector Labs, USA). Esta lectina se une a los residuos terminales de β -galactosa o los residuos de N-acetilgalactosamina localizados en la cara luminal de las células endoteliales [47]. Este procedimiento se realizó para marcar de forma específica los cambios en la vasculatura asociados a la remodelación morfológica que ocurre durante la transición folículo-luteal y en la formación del cuerpo lúteo.

E. *Evaluación de la función vascular in vivo mediante perfusión intravital con dextrán*

Se utilizó una perfusión intravital con dextrán de diferentes tamaños para evaluar la función vascular en cuerpos lúteos de ratas del grupo control y STZ. Para ello se utilizó un microscopio estereoscópico de epifluorescencia equipado con objetivos de larga distancia de trabajo y una cámara CCD (charge-coupled device) enfriada (HQ-Roper Scientific, USA). Brevemente, los animales fueron anestesiados con xilacina-ketamina (5- 15 mg/kg de xilacina y 40-90 mg/kg de ketamina) administrada intraperitonealmente. Después de que el animal presentó signos de anestesia profunda se realizó una incisión abdominal hasta exponer el tracto reproductor y el corazón para realizar la perfusión intravital. En primer lugar se perfundió la lectina RCA para identificar el lecho vascular ovárico y después se administró el dextrán

acoplado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Vector Labs, USA), de esa forma fue posible evaluar y comparar entre grupos el patrón de extravasación de los marcadores [48] (El procedimiento de la perfusión intravital con dextrán se encuentra en el **Apéndice B**).

F. Determinación de la concentración de progesterona circulante

Para estimar la concentración de progesterona, se obtuvo una muestra de sangre mediante punción al corazón (aguja calibre 21 BD Vacutainer, Becton Dickinson, México) previa anestesia de los animales (pentobarbital 100 mg/kg de peso corporal). La muestra se dejó coagular durante quince minutos a 4 °C, y luego las muestras de sangre se centrifugaron primero a 3,000 rpm durante 10 min a 4 °C y, después de recoger el suero, se volvieron a centrifugar a 4,000 rpm durante 10 min a 4 °C. A continuación, las muestras de suero se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su análisis. La concentración de progesterona en las muestras de suero se estimó por medio de RIA (radioinmunoensayo) de fase sólida (Coat-A-Count®, Siemens Medical Solutions Diagnostics; [60]) previamente validado [49] y siguiendo las especificaciones del proveedor. Para la progesterona la reactividad cruzada estimada con otros esteroides sexuales osciló entre 0.002% y 9%. La sensibilidad del ensayo fue de 0.02 ng/ml con un coeficiente de variación intra e interensayo de 6.9 y 7.9%, respectivamente.

G. Análisis de imágenes

Se observaron cortes de ovario de 60 micras de grosor obtenidos durante la transición folículo-luteal. En esta etapa se determinó el número de brotes angiogénicos, mientras que la fase tardía se evaluó el porcentaje de área que ocupó la vasculatura marcada con lectina. En ambos casos se utilizaron de 5 a 8 cortes para estimar tanto la cantidad de brotes angiogénicos como el área vascular de cada folículo en cada etapa. Se contabilizaron todos los folículos que presentaron las características adecuadas para ser incluidos: marcaje completo de la vasculatura, sin signos de atresia ni de daño en las capas de la pared folicular y diámetro folicular > 600 µm. Las imágenes provenientes de la histoquímica fluorescente se analizaron con el programa Image J (NIH, USA) mediante un procedimiento previamente publicado [49]. El procedimiento consistió en: obtener la escala en micras, definir el contorno de cada estructura, separar los canales y seleccionar el correspondiente al color de emisión del fluoróforo acoplado a la lectina, filtrar la imagen, obtener la imagen binaria correspondiente al marcaje fluorescente y finalmente determinar el porcentaje

de área ocupada por la marca dentro del contorno definido. El procedimiento de análisis se describe a detalle en el **Apéndice C**.

H. Análisis estadístico

El análisis de los datos experimentales inició con la aplicación de la prueba de distribución normal Shapiro Wilk-W que se incluye en el paquete estadístico Prism 6.0 (Graph Pad, Inc., USA). Después, los grupos de ratas control y ratas tratadas con STZ se compararon mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA). La homogeneidad de varianzas se comprobó mediante la prueba de Brown-Forsythe incluida en Prism 6.0. En caso de que el ANOVA resultara significativa se aplicó la prueba de comparación múltiple para encontrar la diferencia entre los grupos en cada uno de los períodos evaluados. Este análisis se utilizó para comparar la glucemia, el peso corporal y la ingesta de comida y agua. Para comparar el número de brotes angiogénicos, el % de área vascular, así como las características de la morfología vascular (calibre vascular y número de nodos) se utilizó ANOVA de dos vías seguida de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Dentro del modelo sólo se incluyeron los factores principales (Grupo y etapa de desarrollo del cuerpo lúteo). En todos los casos se consideró un nivel de $p < 0.05$ como significativo.

VII. RESULTADOS

A. *El tratamiento con STZ induce hiperglucemia, polifagia, polidipsia y pérdida de peso corporal.*

La eficacia de STZ para inducir hiperglucemia varió de 80 a 86.6% entre los grupos. En particular, en el grupo de STZ evaluado a los 7 días post-tratamiento, el 80% (12/15) de los animales tratados desarrollaron hiperglucemia; para los organismos de 14 días post-tratamiento el 86.6% (13/15) y para los organismos de 21 días post-tratamiento el 80% (24/30), desarrollaron una condición hiperglucémica.

Las ratas del grupo control presentaron de forma consistente valores de glucemia <100 mg/dL. En contraste, la administración de STZ provocó un incremento > 250 mg/dL en la concentración de glucosa de los animales tratados (Figura 8). A pesar de que se presentó una respuesta individual variable en el desarrollo de la condición hiperglucémica, la administración de STZ provocó un incremento gradual en la concentración de glucosa, el cual inició desde los 7 días post-tratamiento (Figura 8A) y continuó hasta los 14 y 21 días post-tratamiento (Figura 8B y C, respectivamente). Los valores promedio de glucosa en sangre se ubicaron en 385 ± 21.9 , 363 ± 16.3 y 417 ± 10.2 mg/dL en la fase final del experimento para los días 7, 14 y 21, respectivamente. En el caso de las ratas tratadas con STZ, las concentraciones de glucosa en sangre medidos durante la fase final fueron 4.6, 5.0 y 5.5 veces mayor que en las ratas no tratadas evaluadas en el día 7, 14 o 21, respectivamente ($p < 0.05$).

Adicionalmente, en respuesta a la administración de STZ se presentó una pérdida de peso corporal sostenida a lo largo de los períodos de evaluación, la cual contrastó con el incremento en el peso corporal de los animales no tratados (Figura 9A). Al comparar el peso final de los animales con respecto al peso normalizado inicial (100%), las hembras tratadas con STZ tuvieron una reducción significativa ($p < 0.05$) de hasta en un 14.5% del peso corporal a los 21 días post-tratamiento. Por otra parte, las ratas tratadas con STZ mostraron polifagia y polidipsia (Figura 9B y C, respectivamente) de forma consistente a partir de 14 días post-tratamiento. Durante la fase final del experimento en las ratas del grupo de 21 días, se incrementó significativamente ($p < 0.05$) en 1.3 veces el consumo de alimento y 2.8 veces el de agua con respecto a los animales no tratados.

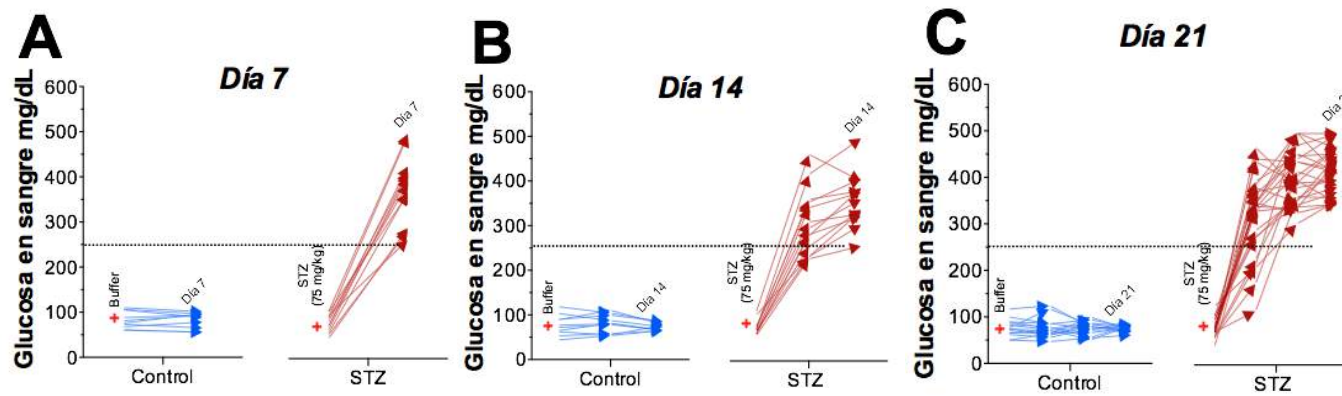


Figura 8. **La administración de estreptozotocina induce hiperglucemia.** Cambios temporales de la concentración de glucosa en sangre en grupos de ratas evaluadas a los (A) 7, (B) 14 o (C) 21 días post-tratamiento. Las ratas hembra se trataron con vehículo (control) o estreptozotocina (STZ) para inducir un modelo experimental de síndrome diabético. La condición diabética se confirmó cuando los niveles de glucosa sobrepasaron los 250 mg/dL (línea punteada). La punta de flecha indica la dirección del cambio y la longitud de la cola indica la intensidad del cambio.

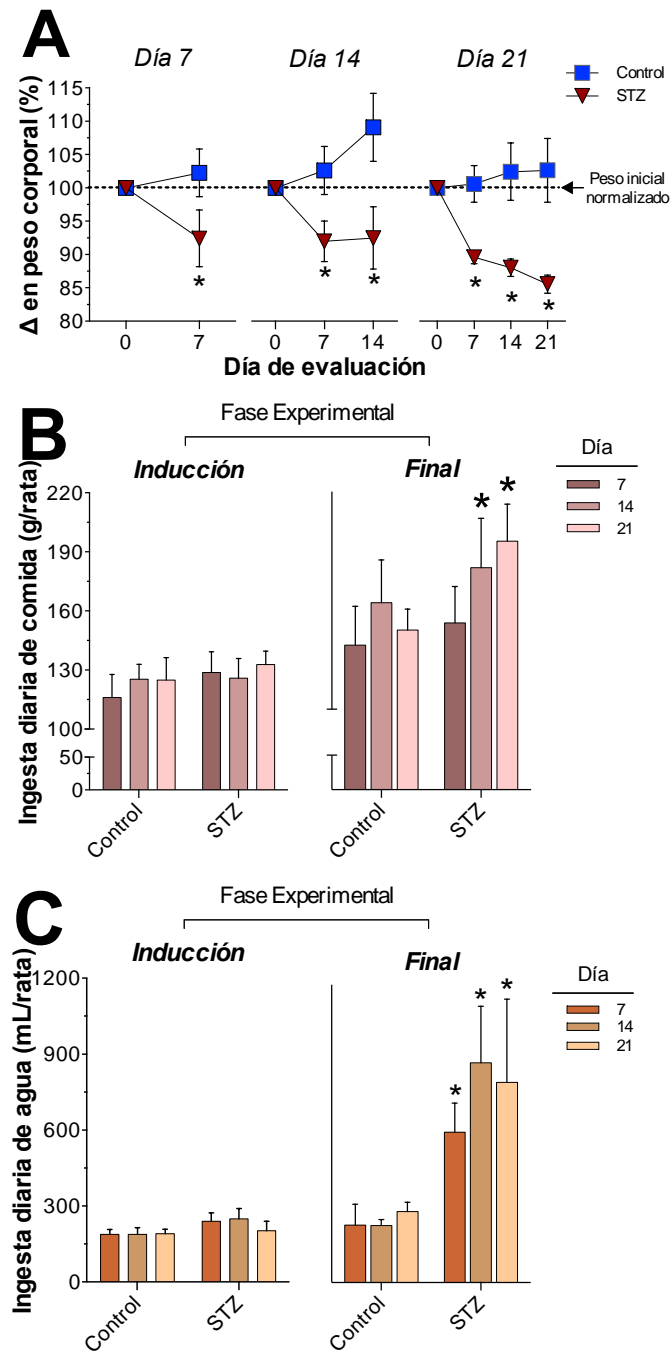


Figura 9. **El tratamiento con estreptozotocina induce pérdida de peso corporal, polifagia y polidipsia.** (A) Evolución de los cambios temporales en el peso corporal normalizado de ratas hembras pertenecientes al grupo control o STZ y comparación del consumo de alimento y agua (B y C, respectivamente) durante las fases de experimentación en ratas de ambos grupos. * Indica diferencias significativas entre los grupos al nivel de $p < 0.05$.

B. Durante las etapas de luteogénesis se presenta una remodelación vascular

Resultados previos de nuestro grupo de trabajo muestran que únicamente las ratas evaluadas a los 21 días después de la administración de STZ presentaron alteraciones en las características del ovario [22]. Además, reportes previos realizados en ovario de rata demuestran que los cambios en la gónada se presentan entre la semana 3 y 4 posterior al tratamiento con diversos compuestos que inducen toxicidad gonadal[50, 51], es por ello que en el presente estudio nos enfocamos en presentar los resultados descriptivos y comparativos del grupo de 21 días para la caracterización y remodelación vascular, mientras que los grupos de 7 y 14 días se utilizaron para evaluar y comparar la función vascular con las perfusiones intravitalas con Dextrán y comparar la función de la gónada a través de la producción de progesterona.

En cortes de ovario de ratas del grupo control de 21 días de post-tratamiento observamos la presencia de una diversidad de folículos y cuerpos lúteos en diferentes etapas de crecimiento, los cuales presentaron de forma consistente una tinción específica de su vasculatura. En la figura 12A se muestra una imagen representativa de un corte de ovario en etapa de proestro en el cual se observa la microvasculatura intraovárica teñida con la lectina PNA. En particular, la vasculatura folicular se caracterizó por presentar un patrón perifolicular, mientras que la vasculatura del cuerpo lúteo, tanto en la etapa de luteogénesis temprana como en la glándula madura, presentó una vasculatura internalizada en el tejido.

Los folículos preovulatorios se caracterizaron por presentar una capa de células de la granulosa avascular y dos capas de vasculatura perifoliculares (externa e interna) ubicadas en el compartimiento de las células de la teca (Figura 10B). Durante la etapa de transición folículo-luteal se observaron las invaginaciones que surgen en respuesta a la ovulación y que caracterizan morfológicamente a la etapa de formación del cuerpo lúteo. Además, también se observó la formación de brotes angiogénicos a partir de la vasculatura tecal, los cuales se extendieron en forma radial hacia el antro folicular previo, el cual a su vez se comenzó a llenar con las células de la granulosa (Figura 10C₁ y C₂). Conforme avanzó el proceso de luteogénesis, la vasculatura dejó de ser periférica y comenzó a invadir el espacio antral, formando con ello una red radial que progresivamente se fue ramificando (Figura 10D₁ y D₂), de hecho, en los acercamientos (Figura 10D₁) se observa la formación de vasos sanguíneos de mayor calibre debido a la anastomosis de la vasculatura, así como una imagen representativa de los procesos de extensión de la

vasculatura hacia el interior de la glándula. Conforme la estructura se desarrolló, las células luteales llenaron gradualmente el lumen del cuerpo lúteo. Al final de la luteogénesis, la remodelación vascular se completó y con ello se observaron cuerpos lúteos maduros caracterizados por presentar una red vascular densa, compleja e intrincada, la cual abarcó todo el tejido lúteo (Figura 10E).

C. *La administración de STZ reduce la cantidad de brotes angiogénicos y la densidad de la vasculatura en la rata*

En la figura 11, se muestran imágenes representativas del tipo de estructuras luteales que analizamos para comparar los patrones de remodelación vascular entre los grupos: transición folículo-luteal, caracterizado por la presencia de brotes angiogénicos y la extensión de la vasculatura hacia el lumen de la glándula en desarrollo; luteogénesis temprana, representada por estructuras con una red vascular extensa, ramificada e internalizada en las células luteales; y luteogénesis tardía, caracterizada por una densa red vascular y con un alto grado de ramificación que abarcó todo el tejido luteal.

En el grupo control durante la transición folículo-luteal se presentó un marcaje vascular homogéneamente distribuido en la glándula, durante esta etapa la vasculatura mostró una disposición radial y se caracterizó tener vasos sanguíneos gruesos extendiéndose desde los brotes angiogénicos de la vasculatura tecal previa hacia el lumen del cuerpo lúteo en desarrollo (Figura 12A). En comparación al grupo no tratado, durante la transición folículo-luteal observamos cambios morfológicos en la vasculatura de las ratas con hiperglucemia (Figura 12B). A juzgar por el marcaje fluorescente con la lectina RCA, observamos una disminución en la vascularización de la glándula, así como vasos de menor calibre. Por otra parte, como se observa en la figura 12C, durante la etapa de luteogénesis temprana en el grupo control se presentó un incremento tanto en la densidad vascular, así como en la complejidad de la red de vasos sanguíneos. De esta forma, la microvasculatura luteal de los animales no tratados se caracterizó por una red abundante, intrincada y con vasos de diferente calibre abarcando la mayor parte del área de la glándula (Figura 12C). En contraste, los cuerpos lúteos de ovarios provenientes de ratas tratadas con STZ presentaron una red vascular con baja densidad, escasamente ramificada y con un menor calibre de los vasos (Figura 12D).

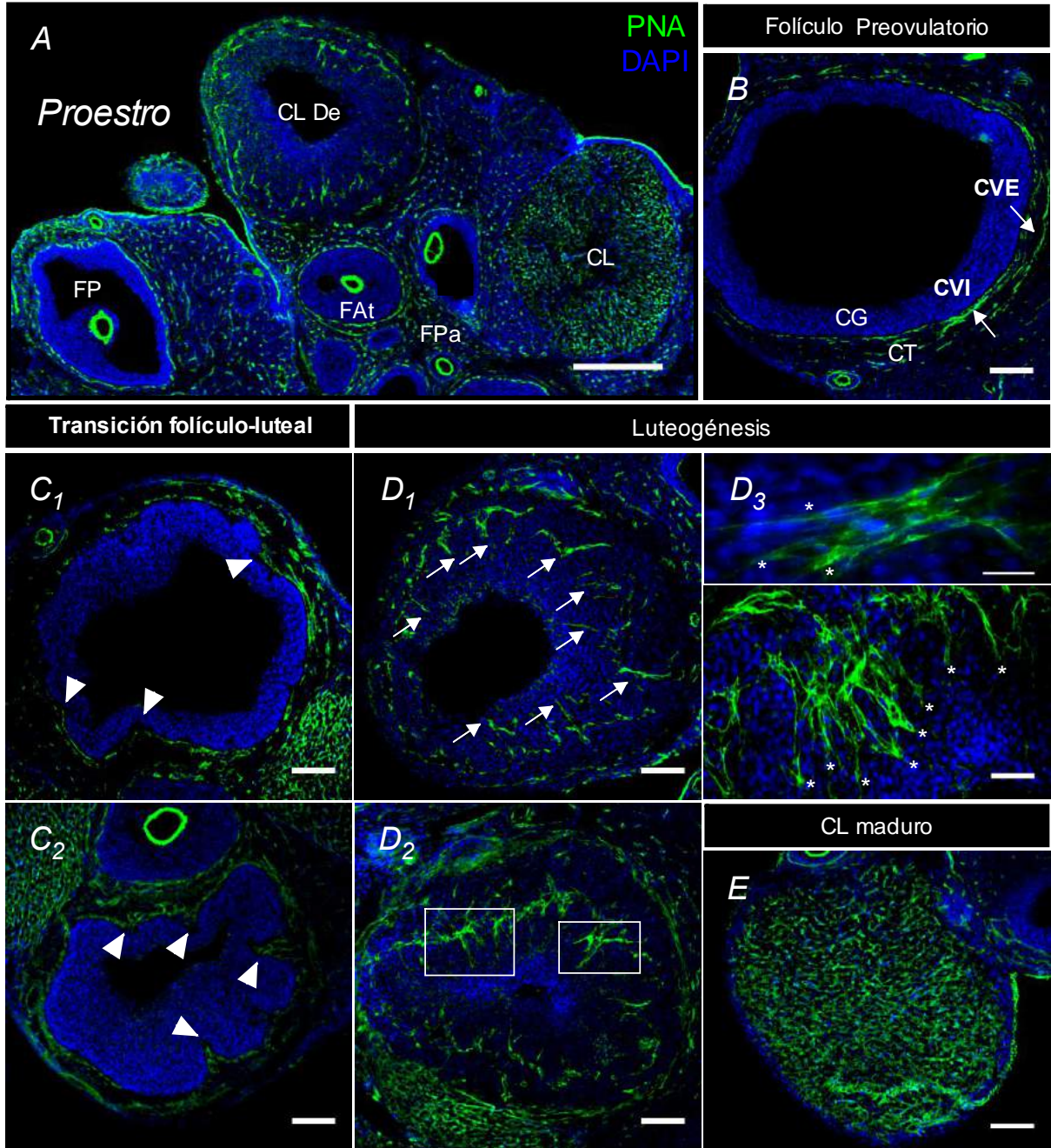


Figura 10. **Remodelación vascular durante la luteogénesis en condiciones fisiológicas.** (A) Imagen representativa de una sección de ovario de rata control en proestro, (B-C₂) Imágenes representativas del cambio en la morfología vascular durante la etapa de transición folículo-luteal y (D₁-E) Imágenes representativas de los cambios temporales en los patrones de la vasculatura que acompañan el desarrollo y crecimiento del cuerpo lúteo. Las puntas de flecha muestran los brotes angiogénicos, las flechas indican la vasculatura en extensión y los asteriscos muestran las tip cells del endotelio en extensión. CL = cuerpo lúteo, CL DE = cuerpo lúteo en desarrollo, FP = folículo preovulatorio, FAt = folículo antral temprano, FPa = folículo preantral, CG = células de la granulosa, CT = células de la teca. Barra de escala: A = 250 μ m, B-E = 100 μ m y D (mayor resolución) = 25 μ m.

Transición folículo-luteal

Luteogénesis temprana

Luteogénesis tardía

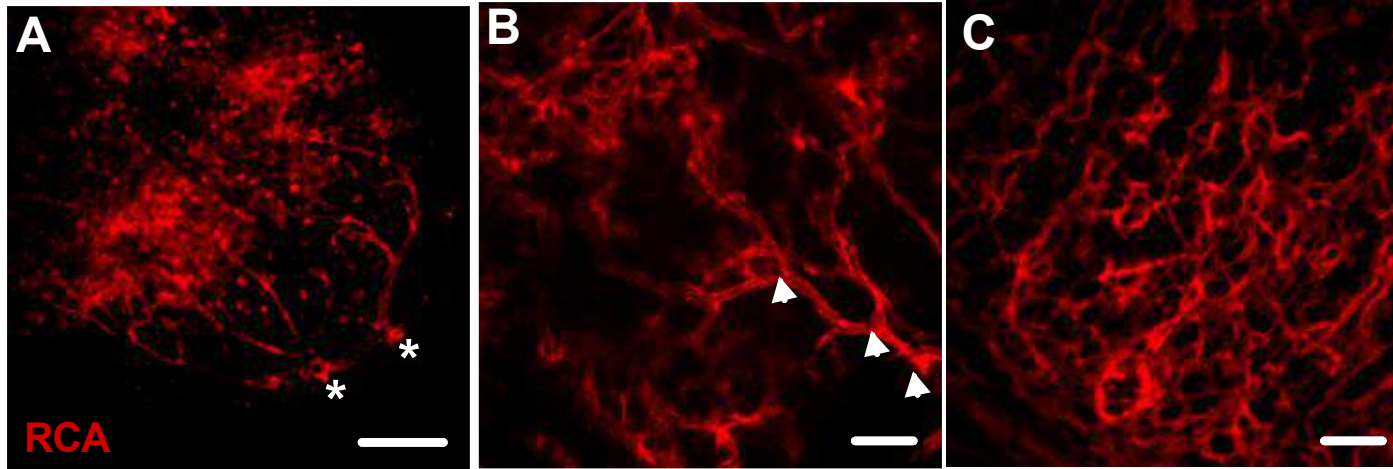


Figura 11. **Imágenes representativas del marcaje de la microvasculatura luteal en diferentes etapas del desarrollo del cuerpo lúteo.** Marcaje específico de la vasculatura con la lectina RCA perfundida intravitalmente durante (A) Transición folículo-luteal, (B) Luteogénesis temprana y (C) Luteogénesis tardía de ratas del grupo control. En A, nótese la extensión vascular a partir de los brotes angiogénicos (asteriscos) y la disposición radial de la vasculatura. En B y C, nótese el incremento gradual de la complejidad en la red vascular. En B, las puntas de flecha señalan nodos primarios, secundarios y terciario. En C se aprecia la microvasculatura bien desarrollada formando una red compleja de vasos sanguíneos de menor calibre. Barra de escala: A = 150 μm ; B-C = 20 μm .

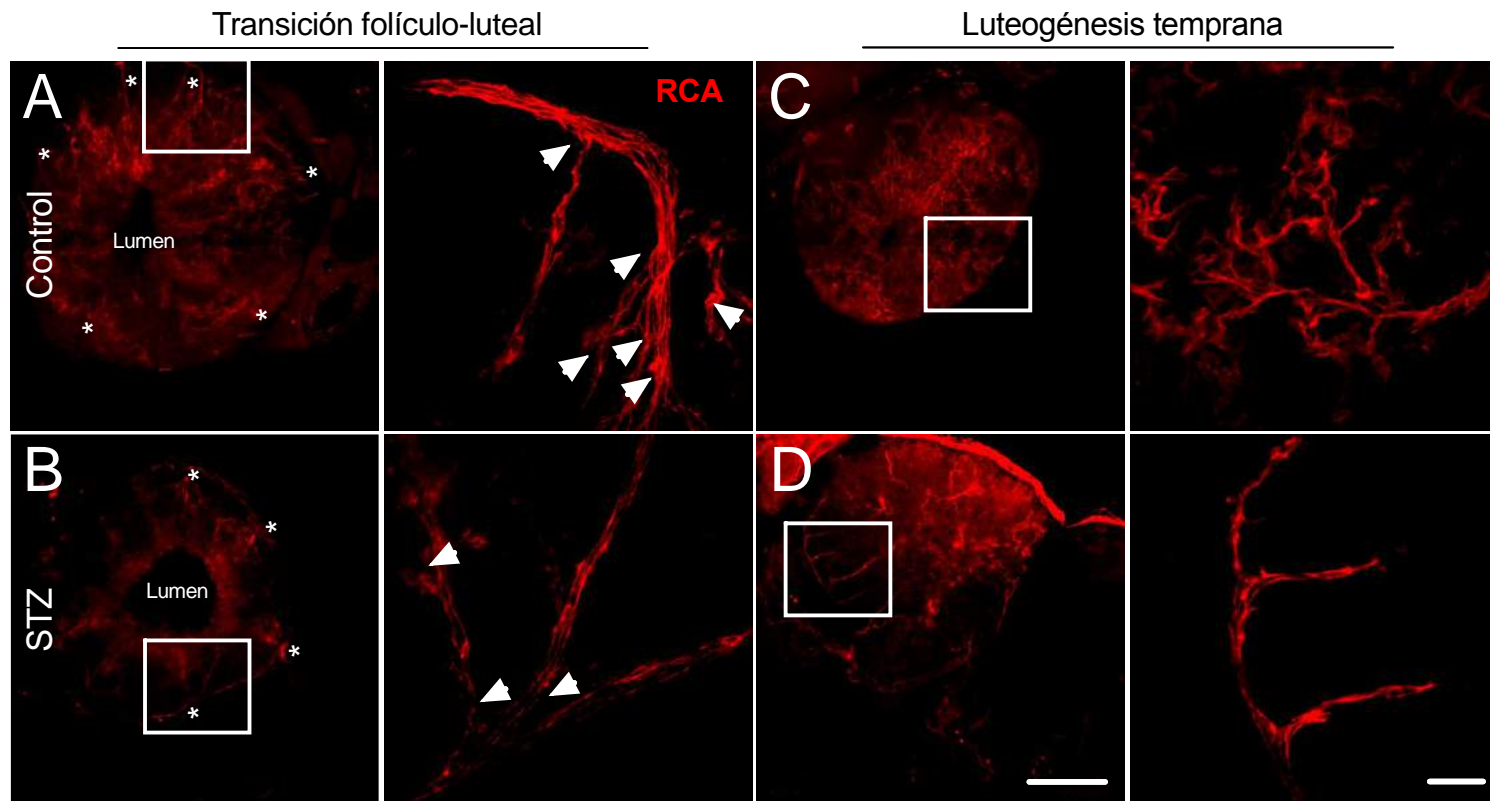


Figura 12. **Imágenes representativas de la remodelación vascular durante la transición folículo-luteal y la luteogénesis temprana.** Imágenes representativas de las características de la microvasculatura luteal durante la transición folículo-luteal en cortes de ovario de ratas del grupo control y STZ (A y B, respectivamente) y durante la luteogénesis temprana en control y tratadas con STZ (C y D, respectivamente). En A y B los asteriscos señalan los brotes angiogénicos, mientras que en los aumentos de las zonas seleccionadas, las puntas de flecha señalan la ramificaciones vasculares. Nótese en C una vasculatura más compleja y ramificada que en caso del grupo STZ en D. Barra de escala: A, B, C y D = 150 μm ; aumentos = 20 μm .

Para comparar cuantitativamente los cambios observados en la morfología de la vasculatura entre ambos grupos de ratas, determinamos el tamaño de la glándula en crecimiento con la intención de demostrar que los cambios en la vasculatura no se debieran a una reducción del tamaño de la glándula, de esta forma obtuvimos que conforme el cuerpo lúteo se desarrolló, el área total de la glándula se incrementó gradualmente y sin diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 13A; $p > 0.05$). El cuerpo lúteo de las ratas del grupo control presentó un área promedio que osciló entre 650.3 y 959.4 μm^2 durante la transición folículo-luteal y la luteogénesis tardía, respectivamente. Mientras que los animales tratados con STZ presentaron un área promedio entre 558.5 y 890.0 μm^2 , respectivamente.

D. La hiperglucemia inducida con STZ reduce el calibre de los vasos sanguíneos y disminuye la complejidad de la red vascular del cuerpo lúteo

En la figura 13B y C se presentan los cambios ocurridos en la morfología vascular de los cuerpos lúteos en las ratas hiperglucémicas. Encontramos que el número de brotes angiogénicos presentó una reducción significativa (Figura 13B; $p < 0.05$) en los animales tratados con STZ al ser comparados contra el grupo control; específicamente, en el grupo control, el número de brotes angiogénicos durante las etapas de transición folículo-luteal y de luteogénesis temprana fue de 6.0 ± 1.0 y 10.2 ± 2.8 brotes angiogénicos, respectivamente, mientras que en las ratas tratadas con STZ, el número de brotes angiogénicos fue de 3.5 ± 0.4 y 6.6 ± 0.3 para dichas etapas. Como se observa en la figura 13C, el porcentaje de área vascular que ocupó el marcaje fluorescente dentro de cada toma realizada en el microscopio en los cuerpos lúteos de los animales del grupo control presentó un cambio gradual y ascendente conforme avanzó la formación del cuerpo lúteo. Específicamente en el grupo control obtuvimos 4.0 ± 0.5 , 7.9 ± 0.3 y 9.9 ± 0.9 % de área vascular por cada campo de $40 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ para transición folículo-luteal, luteogénesis temprana y luteogénesis tardía, respectivamente. En contraste, el área que ocupó la vasculatura luteal en los animales con hiperglucemia se mantuvo sin cambios durante las etapas de formación del cuerpo lúteo, ya que los valores se ubicaron entre 4.7 y 5.7% de área vascular por cada campo de $40 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. En consecuencia, el análisis comparativo de las fases demostró la existencia de diferencias entre el área vascular de la glándula durante las etapas de luteogénesis temprana y tardía (Figura 13C; $p < 0.05$).

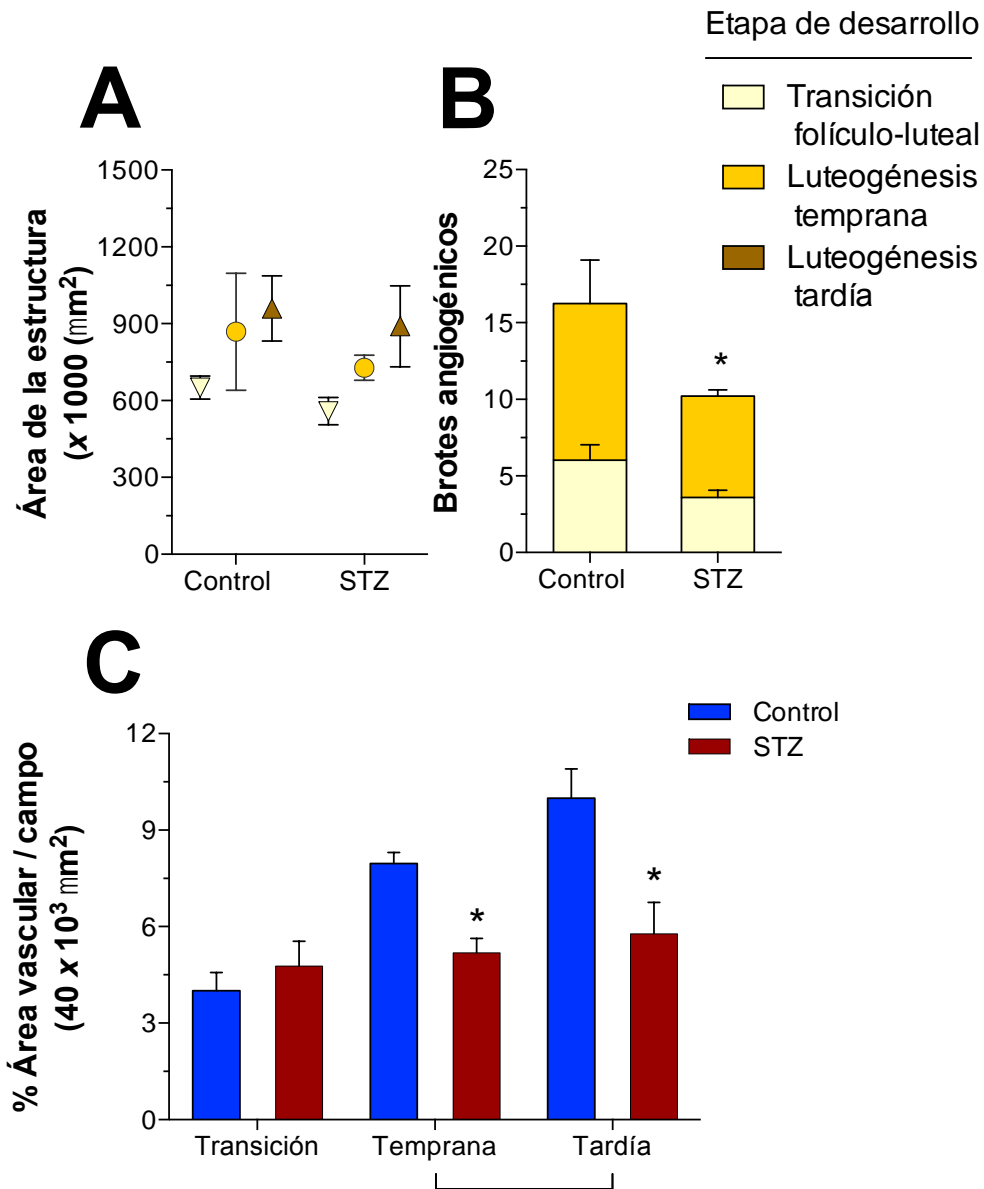


Figura 13. Cambio en el tamaño y en el número de brotes angiogénicos y en el área vascular durante las etapas de formación del cuerpo lúteo. Comparación de los valores de (A) Área del cuerpo lúteo, (B) Número de nodos y (C) Área vascular por campo durante las etapas de desarrollo del cuerpo lúteo en ratas del grupo control y ratas tratadas con STZ para inducir hiperglucemia no controlada. * Indica diferencias significativas entre el grupo control y el grupo STZ al nivel de $p < 0.05$.

Finalmente, como es de esperarse, para que la red vascular se extienda en todo el tejido luteal es necesaria la formación de ramificaciones y nodos, así como el cambio en el calibre de los vasos de acuerdo a su tipo de ramificación [52]. Es por ello, que comparamos el calibre de los vasos sanguíneos de acuerdo a la complejidad de la red vascular, así como la frecuencia de los nodos triples y cuádruples en la vasculatura luteal de ambos grupos de ratas. En la figura 14A se observa que el calibre de los vasos sanguíneos de ambos grupos durante la etapa de luteogénesis temprana es similar ($p > 0.05$); se aprecia de manera particular, que los vasos sanguíneos son más delgados conforme la red vascular se ramifica; sin embargo, al final de la luteogénesis, cuando la vasculatura está en proceso de maduración, los vasos sanguíneos alcanzan su mayor diámetro en las ramificaciones primarias de los animales del grupo control ($16.3 \pm 1.3 \mu\text{m}^2$) con respecto a los tratados con STZ ($11.1 \pm 0.7 \mu\text{m}$, Figura 14A; $p < 0.05$). Un resultado similar se observó en el calibre de los vasos sanguíneos de las ramificaciones secundarias, mientras que el calibre de los vasos sanguíneos de las ramificaciones terciarias resultaron similares ($p > 0.05$) entre los grupos comparados. Con respecto al número de nodos de la vasculatura, encontramos que las ratas del grupo control presentaron en ambas etapas de desarrollo del cuerpo lúteo una mayor cantidad de nodos triples (Figura 14B; $p < 0.05$). Por último el número de nodos cuádruples únicamente fue significativamente mayor durante la fase tardía de desarrollo en los animales control con respecto a los tratados.

E. La hiperglucemia afecta la función vascular del cuerpo lúteo induciendo hiperpermeabilidad vascular

Para evaluar la función de la vasculatura en el cuerpo lúteo de ratas control y tratadas con STZ, se administró de manera intracardíaca Dextrán de 10, 40 y 70 KDa con el objetivo de observar los cambios de la permeabilidad vascular. Los resultados obtenidos indican que únicamente cuando se utilizó el Dextrán de 70 kDa se presentaron diferencias entre los grupos control y tratado con STZ. Por lo tanto, solo mostramos en la figura 15 los resultados correspondientes al ensayo con Dextrán de 70 kDa. Además, dicho resultado sólo fue observado en las ratas de 21 días post-tratamiento, los animales de 7 y 14 días post-tratamiento presentaron un comportamiento similar de permeabilidad en presencia de esta molécula.

En el grupo control se observó que el llenado de la vasculatura es gradual y con una ligera extravasación del marcador. En contraste, el grupo tratado con STZ presenta una extravasación abundante desde los primeros segundos de captura, lo cual impidió visualizar de forma clara el llenado de la vasculatura con el marcador (Figura 15A); otra característica del grupo tratado con STZ es la permanencia de la marca de Dextrán en el tejido circundante a la vasculatura luteal al final del tiempo de captura (Figura 15B).

F. Las ratas tratadas con STZ presentan una reducción en la producción de progesterona

Con respecto al grupo control, los animales tratados con STZ presentaron una disminución significativa ($p < 0.05$) en la concentración de progesterona únicamente a los 21 días post-tratamiento (Cuadro 1). La disminución en la producción de progesterona por parte de las hembras con hiperglucemia fue de 33% con respecto a los valores séricos de dicha hormona en los animales no tratados.

Cuadro 1. Concentración de progesterona en suero (ng/ml) de animales del grupo control y animales tratados con STZ para inducir un modelo de hiperglucemia no controlada.

| Grupo | Día post-tratamiento | | |
|---------|----------------------|------------|-------------|
| | 7 | 14 | 21 |
| Control | 17.9 ± 0.9 | 19.7 ± 2.9 | 21.0 ± 3.3 |
| STZ | 23.6 ± 3.5 | 13.1 ± 1.8 | 14.2 ± 2.0* |

* Indica diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$ entre grupos para cada día de evaluación.

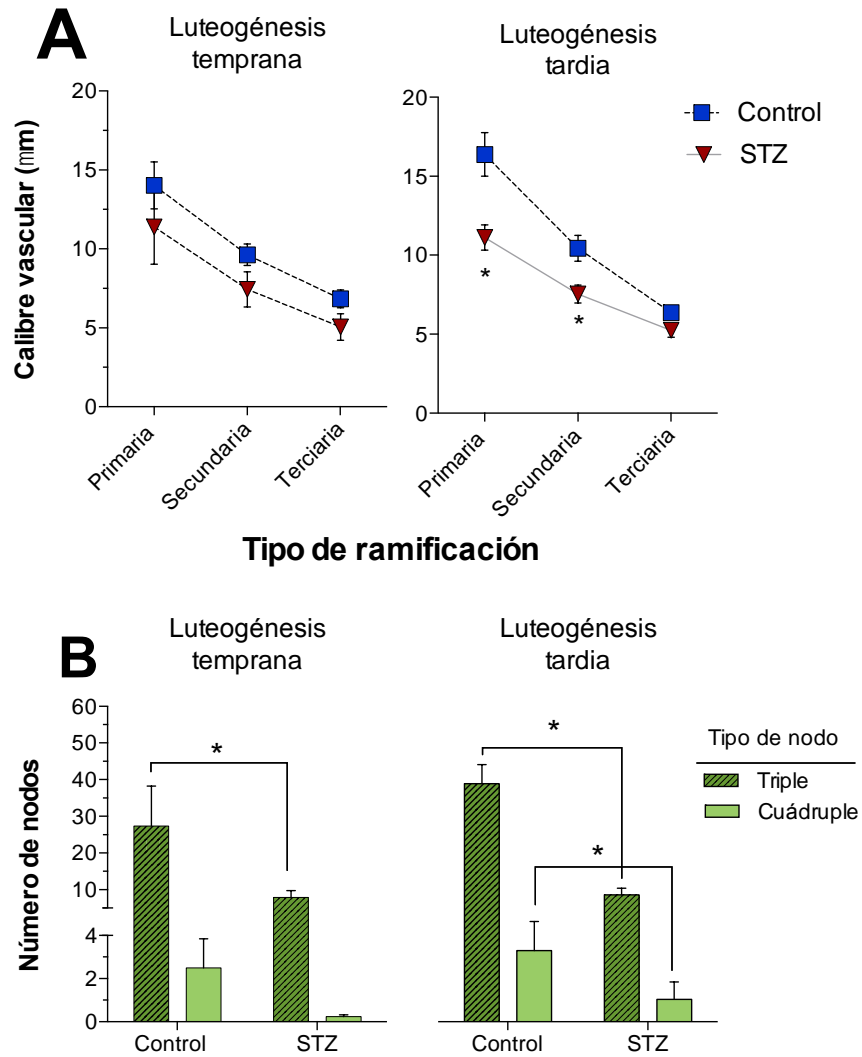


Figura 14. Cambio en el calibre vascular de acuerdo al tipo de ramificación y en el número de nodos asociados al desarrollo del cuerpo lúteo. Comparación del (A) Calibre vascular de acuerdo al tipo de ramificación y (B) Número de nodos de la vasculatura durante la luteogénesis temprana y tardía en ratas control y ratas tratadas con STZ. * Indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambos grupos.

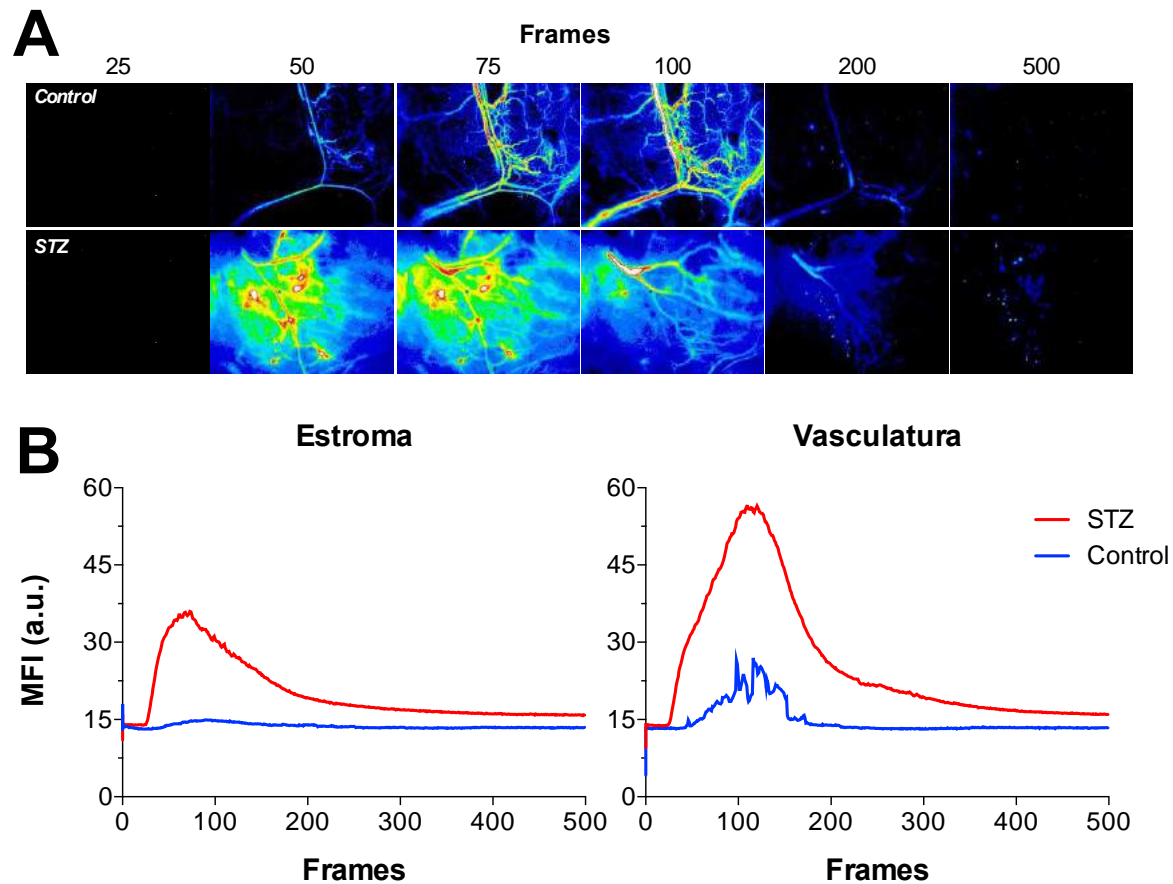


Figura 15. **Comparación de la permeabilidad vascular en el cuerpo lúteo de ratas control y tratado con STZ.** (A) Imágenes representativas de la permeabilidad vascular en cuerpos lúteos de ratas control y ratas tratadas con STZ antes, durante y a final de la inyección intracardíaca con Dextrán de 70 kDa. Las fotos se obtuvieron a una exposición de 150 ms y se obtuvieron en total 500 frames de captura. Nótese la evidente extravasación del marcador fluorescente en el animal con hiperglucemia. (B) Para comparar la permeabilidad entre ambos grupos se presentan los cambios temporales en la intensidad de fluorescencia media (MFI) en el estroma ovárico y en la vasculatura del cuerpo lúteo. Nótese que en ambos casos, en el animal con hiperglucemia se presenta un incremento considerable de la marca fluorescente, la cual no solo es mayor, sino que dura más a lo largo del proceso de captura.

VIII. DISCUSIÓN

Nuestros resultados demuestran que la hiperglucemia induce fallas en la remodelación vascular durante la luteogénesis de las ratas tratadas con STZ; las ratas hiperglucémicas presentaron: A) Reducción en el número de brotes angiogénicos durante la etapa temprana de luteogénesis, B) Menor calibre de los vasos sanguíneos, C) Reducción en el porcentaje de área vascular a lo largo de la luteogénesis y D) Menor complejidad de la red vascular. Así mismo, en los estudios *in vivo* se demostró que la microvasculatura del cuerpo lúteo de las ratas tratadas con STZ presentó hiper-permeabilidad; en conjunto, esta serie de resultados apoyan nuestra hipótesis. Además, es posible que la alteración en la remodelación vascular en las ratas con hiperglucemia, se asocie a una disfunción del cuerpo lúteo ya que encontramos una concentración menor de progesterona en los animales tratados con respecto al grupo control.

En las hembras con hiperglucemia se presentó una reducción del número de brotes angiogénicos, la cual posiblemente sea la causa de la reducción en la densidad vascular que observamos en etapas de luteogénesis avanzadas en los animales tratados con STZ. En apoyo a esta idea, basta mencionar que el desarrollo de una vasculatura adecuada en el ovario depende del establecimiento de los brotes angiogénicos [53]. Es por ello que el número reducido de brotes angiogénicos posiblemente interfiera con el proceso de luteogénesis, así como en la función de la glándula, debido a que como menciona Fraser y colaboradores [26], el cuerpo lúteo requiere de procesos intensos de angiogénesis para lograr una alta vascularización y asegurar una adecuada función. De hecho, nuestros resultados sugieren que en las capas de células de la granulosa en diferenciación a células luteales no se produce una red intrincada de vasculatura, la cual es fundamental en esta etapa de formación del cuerpo lúteo [52]. Por otra parte, estudios realizados por Gottsch [54] donde se administró un anticuerpo anti-MMP-2 a los folículos preovulatorios de ovejas no sólo interrumpió la ovulación sino también propició una deficiente formación vascular en el tejido lúteo. Esto sugiere que la actividad de la proteasa y/o la ruptura de la membrana basal es importante para la iniciación de la angiogénesis luteínica y es probable que tenga numerosos efectos: elimina el bloqueo físico a la vascularización de la capa granulosa y genera mejor motilidad y migración de las células endoteliales [3, 6]. Por consiguiente, los inhibidores de las proteasas

se consideran factores anti-angiogénicos, ya que impiden la ruptura de las proteínas de la matriz y por lo tanto mantienen la integridad del endotelio

La remodelación vascular fisiológica se produce en el ovario y durante la reparación de tejidos y además se sabe que diversas condiciones patológicas pueden alterar estos procesos [55]. De hecho, se ha sugerido que la diabetes pudiera estar generando este efecto a nivel reproductivo. Sin embargo, esta hipótesis no se había probado antes. En este contexto, de acuerdo a nuestro conocimiento, los resultados que presentamos en este estudio son los primeros que demuestran que en respuesta a la hiperglucemia producida por STZ se produce una remodelación vascular patológica que afecta la función reproductiva, por lo menos en el cuerpo lúteo. Las fallas de la vasculatura del cuerpo lúteo se han asociado con una disfunción de dicha glándula. De hecho, diversas investigaciones sugieren que la disminución del flujo de sangre al ovario juega un papel importante en la regresión del cuerpo lúteo, así como en su capacidad disminuida para producir progesterona en ratas tratadas con aloxano para producir diabetes experimental [56, 57]. En apoyo a esta idea, nuestros resultados sugieren que en realidad en el cuerpo lúteo de la rata hiperglucémica se presenta hiper-permeabilidad, siendo esta una de las posibles causas de la disminución del flujo sanguíneo que se observó previamente. Además, la evidencia que aportamos en este estudio sugiere que las fallas en la función del cuerpo lúteo posiblemente también están asociadas a un desarrollo deficiente de la vasculatura que documentamos durante las etapas tempranas de desarrollo de dicha glándula.

Durante el proceso de angiogénesis el reclutamiento de células perivasculares (pericitos) es un paso fundamental durante la etapa de estabilización de la nueva vasculatura formada. De hecho, el reclutamiento de pericitos es detectable desde la fase luteal temprana y el porcentaje de capilares asociados a los pericitos aumenta a medida que la fase lútea progresa [26]. Por tal motivo, los pericitos son miembros integrales de los nuevos microvasos y resultan fundamentales para regular la función vascular en la glándula recién formada [32]. Por esta razón, es posible pensar que la neovasculatura del cuerpo lúteo bajo una hiperglucemia no se estabilice y en consecuencia no sea debidamente regulada su función vascular. Esta hipótesis estaría sustentada por los estudios que sugieren un papel fundamental de este tipo de células durante la luteogénesis [34]. En particular, es posible que no se reclute

el número necesario de pericitos [26]. En este sentido sería importante para futuros estudios comprobar si los pericitos se reclutan de forma adecuada y si cumplen su función regulatoria en la vasculatura luteal de ratas con hiperglucemia [52]. Resulta interesante pensar que la hiper-permeabilidad en animales tratados se puede relacionar o no con una pérdida de la función regulatoria que los pericitos ejercen sobre la vasculatura del tejido lúteo.

Por otra parte, la disminución en el calibre de los vasos sanguíneos puede ser una consecuencia de una falla en las células endoteliales o en algún proceso durante la formación de los vasos sanguíneos. Esta modificación podría estar asociada con una disminución en la cantidad de nutrientes y de sustancias necesarias para el establecimiento y función adecuadas de las células en proliferación y en diferenciación durante la formación del cuerpo lúteo en los animales tratados [55]. Adicionalmente, observamos una reducción en el porcentaje de área vascular a lo largo de la luteogénesis. En conjunto, estos dos resultados pudieran tener implicaciones en la distribución de los nutrientes hacia el tejido en desarrollo y durante su etapa funcional. Sin embargo, ambas hipótesis necesitan ser probadas en estudios futuros. En apoyo a nuestras ideas sabemos que en estudios morfométricos realizados en varias especies, se ha demostrado que las células endoteliales constituyen aproximadamente el 50% de las células en el cuerpo lúteo maduro [58, 59]. Es por ello que el cuerpo lúteo maduro recibe la mayor parte del suministro de sangre al ovario, y el flujo sanguíneo del ovario es altamente correlacionado con la secreción de progesterona [56, 57]. En consecuencia, se ha propuesto que la función lútea inadecuada está asociada con una disminución del flujo sanguíneo luteal. En particular, Niswender y Reynolds han sugerido que la disminución del flujo de sangre al ovario juega un papel importante en la regresión del cuerpo lúteo [55].

Diversos estudios han demostrado la participación fundamental del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) durante los procesos de angiogénesis que ocurren en la formación del cuerpo lúteo (para una revisión veáse [3, 6]). En particular, se sabe que en las glándulas endocrinas esta molécula induce la proliferación, migración y fenestración de las células endoteliales [60]. Los capilares fenestrados se forman principalmente en el páncreas, el tubo digestivo y las glándulas endocrinas, tal como el cuerpo lúteo. Las proporciones relativas de áreas fenestradas y no fenestradas, varían en los capilares de los distintos órganos. Por lo tanto la fenestración de los vasos sanguíneos

desempeña un papel importante en la permeabilidad de las células endoteliales del ovario, ya que las fenestras son altamente permeables a los solutos y pequeños fluidos, y por lo tanto se cree que facilitan el intercambio de materiales entre el líquido intersticial y el plasma asociado con el cuerpo lúteo [32]. Aunado a lo anterior es posible pensar que exista una extravasación de nutrientes y sustancias fundamentales para el desarrollo y mantenimiento del tejido y por ende de las funciones básicas que desarrolla como: la producción de progesterona. Por tal motivo se propone evaluar en ensayos futuros la producción de VEGF en el cuerpo lúteo de los animales tratados con STZ. La relevancia de dicha evaluación es comprobar la presencia de VEGF en las ratas diabéticas, ya que se considera una molécula fundamental en la angiogénesis, esto debido a que existen estudios que han demostrado que los niveles de expresión, sobreexpresión o ausencia de dicha molécula puede generar una marcada disrupción en el proceso normal de angiogénesis (para una revisión véase [3, 6]).

Para finalizar, cabe mencionar que Redmer [55] y Reynolds [30] sugieren que el folículo durante su etapa final de desarrollo requiere de un adecuado establecimiento de la vasculatura. Dentro de la foliculogénesis, dicho evento se considera como un paso limitante para proveer de nutrientes, oxígeno, factores de crecimiento, gonadotropinas y precursores de las hormonas esteroides como el colesterol. Nosotros pensamos que un escenario similar se puede extrapolar hacia los eventos de vascularización del cuerpo lúteo, en donde la existencia de un aporte vascular insuficiente podría limitar el crecimiento y función de la glándula. Tomados en conjunto, nuestros resultados demuestran un cambio en la función de la vasculatura que irriga al cuerpo lúteo, la cual pensamos que se asocia a la falla en la función del cuerpo lúteo evaluada mediante la producción de progesterona. Sin embargo, se requieren estudios futuros para evaluar si la función de la glándula con hiperglucemia realmente esta asociada con una reducción en la capacidad reproductiva de las hembras tratadas.

IX. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En el presente trabajo encontramos evidencia experimental que sugiere la existencia de fallas en los procesos de remodelación vascular, así como en la función vascular del cuerpo lúteo provocadas por una condición hiperglucémica. Los resultados que presentamos en este estudio son los primeros que demuestran que en respuesta a la hiperglucemia producida por STZ se produce una remodelación vascular patológica que afecta la función reproductiva, al menos en el cuerpo lúteo y la cual se refleja en una menor producción de progesterona.

La remodelación vascular de los animales tratados se caracterizó por presentar una reducción en el número de brotes angiogénicos durante la etapa temprana de luteogénesis, un menor calibre de los vasos sanguíneos, una reducción en el porcentaje de área vascular a lo largo de la luteogénesis y menor complejidad de la red vascular. En general nuestro trabajo ofrece una base para continuar evaluando experimentalmente la angiogénesis, la remodelación y función vascular, así como la funcionalidad del cuerpo lúteo en presencia de una condición hiperglucémica. Además, sería interesante evaluar el efecto que tienen otras patologías reproductivas sobre la microsvaculatura ovárica.

En virtud de nuestros resultados nosotros proponemos realizar experimentos para evaluar los posibles cambios que sufren los tipos celulares que participan en la luteogénesis. Así mismo, proponemos evaluar y comparar los mecanismos morfológicos y fisiológicos de la luteogénesis en animales gestantes con hiperglucemia y animales gestantes control.

Por último, sería interesante evaluar en estudios futuros si el tratamiento con insulina en los animales con hiperglucemia inducida con STZ es capaz de revertir el efecto que provoca la hiperglucemia en los procesos de remodelación vascular de los animales tratados. También, sería importante estudiar si la insulina previene o controla la hiper-permeabilidad que se observó en el cuerpo lúteo de los animales tratados. Por último, consideramos importante evaluar si una disfunción vascular en el cuerpo lúteo es una de las causas subyacentes al problema de insuficiencia lútea que afecta a algunas mujeres en edad reproductiva.

X. LITERATURA CONSULTADA

1. Gougeon, A., *Ovarian follicular growth in humans: ovarian ageing and population of growing follicles*. Maturitas, 1998. **30**(2): p. 137-42.
2. Kaczmarek, M.M., D. Schams, and A.J. Ziecik, *Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology - an overview*. Reprod Biol, 2005. **5**(2): p. 111-36.
3. Robinson, R.S., et al., *Angiogenesis and vascular function in the ovary*. Reproduction, 2009. **138**(6): p. 869-81.
4. Murphy, B.D., *Models of luteinization*. Biol Reprod, 2000. **63**(1): p. 2-11.
5. Leung, P.C., *Dynamics for Human Follicular Growth: Morphologic, Dynamic, and Functional Aspects The Ovary in The Ovary*, A. Gougeon, Editor. 2004: San Diego, California 92101-4495,USA. p. 25-38.
6. Plendl, J., *Angiogenesis and vascular regression in the ovary*. Anat Histol Embryol, 2000. **29**(5): p. 257-66.
7. Dzau, V.J. and M. Horiuchi, *Vascular remodeling--the emerging paradigm of programmed cell death (apoptosis): the Francis B. Parker lectureship*. Chest, 1998. **114**(1 Suppl): p. 91S-99S.
8. Patan, S., *Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling*. J Neurooncol, 2000. **50**(1-2): p. 1-15.
9. Abramovich, D., et al., *Spatiotemporal analysis of the protein expression of angiogenic factors and their related receptors during folliculogenesis in rats with and without hormonal treatment*. Reproduction, 2009. **137**(2): p. 309-20.
10. Reynolds, L.P. and D.A. Redmer, *Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary*. J Anim Sci, 1998. **76**(6): p. 1671-81.

11. Georgescu, A., *Vascular dysfunction in diabetes: The endothelial progenitor cells as new therapeutic strategy*. World J Diabetes, 2011. **2**(6): p. 92-7.
12. Aiello, L.P. and J.S. Wong, *Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications*. Kidney Int Suppl, 2000. **77**: p. S113-9.
13. Contreras, F., et al., *Diabetes and hypertension physiopathology and therapeutics*. J Hum Hypertens, 2000. **14 Suppl 1**: p. S26-31.
14. Garris, D.R., *Effects of diabetes on uterine condition, decidualization, vascularization, and corpus luteum function in the pseudopregnant rat*. Endocrinology, 1988. **122**(2): p. 665-72.
15. Garris, D.R., D.S. Whitehead, and C.R. Morgan, *Effects of alloxan-induced diabetes on corpus luteum function in the pseudopregnant rat*. Diabetes, 1984. **33**(7): p. 611-5.
16. van den Oever, I.A., et al., *Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus*. Mediators Inflamm, 2010. **2010**: p. 792393.
17. Jarajapu, Y.P. and M.B. Grant, *The promise of cell-based therapies for diabetic complications: challenges and solutions*. Circ Res, 2010. **106**(5): p. 854-69.
18. Senger, P.L., *Reproductive cyclicality. Pathways from pregnancy to parturition*. 2 ed. ed. 2005, WA, USA: Current Conceptions, Inc: Pullman.
19. Findlay, J.K., Kerr, J.B., Britt, K., Liew, S.H., Simpson, E.R., Rosairo, D., Drummond, A., *Ovarian physiology: follicle development, oocyte and hormone relationships*. Anim. Reprod., 2009. **v.6**(n.1): p. p.16-19.
20. McGee, E.A. and A.J. Hsueh, *Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles*. Endocr Rev, 2000. **21**(2): p. 200-14.
21. Conley, A.J., et al., *Steroidogenesis in the preovulatory porcine follicle*. Biol Reprod, 1994. **51**(4): p. 655-61.

22. Galindo, R.N., *Interrupción progresiva de la foliculogénesis en ovario de rata con síndrome diabético con estreptozotocina.*, 2015, Universidad Nacional Autónoma de México: México, D.F.
23. Martelli, A., et al., *Blood vessel remodeling in pig ovarian follicles during the periovulatory period: an immunohistochemistry and SEM-corrosion casting study.* *Reprod Biol Endocrinol*, 2009. **7**: p. 72.
24. Herrmann, G. and K. Spänzel-Borowski, *A sparsely vascularised zone in the cortex of the bovine ovary.* *Anat Histol Embryol*, 1998. **27**(3): p. 143-6.
25. Fraser, H.M., *Regulation of the ovarian follicular vasculature.* *Reprod Biol Endocrinol*, 2006. **4**: p. 18.
26. Fraser, H.M. and C. Wulff, *Angiogenesis in the corpus luteum.* *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2003. **1**(1): p. 1-8.
27. Niswender, G.D., et al., *Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum.* *Physiol Rev*, 2000. **80**(1): p. 1-29.
28. DiZerega, G.S. and G.D. Hodgen, *Luteal phase dysfunction infertility: a sequel to aberrant folliculogenesis.* *Fertil Steril*, 1981. **35**(5): p. 489-99.
29. Miller, P.B.a.S., M.R., *Luteal Phase Deficiency: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment.* *Women's med.* , 2009.
30. Reynolds, L.P. and D.A. Redmer, *Growth and development of the corpus luteum.* *J Reprod Fertil Suppl*, 1999. **54**: p. 181-91.
31. Leung, P.C., *The functions and regulation of cell populations comprising the corpus luteum during the ovarian cycle.* , in *The Ovary* S. RL, Editor. 2004: San Diego, California, 92101-4495,USA. p. 169-180.
32. Redmer, D.A., Doraiswamy, V., Bortnem, B. J. , Fisher, K., Jablonka-Shariff, A., and A.T. Grazul-Bilska, and Reynolds, L.P., *Evidence for a Role of Capillary Pericytes in*

- Vascular Growth of the Developing Ovine Corpus Luteum*. *Biology of Reproduction*, 2001. **v.65**: p. 879-889.
33. Christenson, L.K. and R.L. Stouffer, *Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997. **82**(7): p. 2135-42.
 34. Garcia-Pascual, C.M., et al., *Delta-like ligand 4 regulates vascular endothelial growth factor receptor 2-driven luteal angiogenesis through induction of a tip/stalk phenotype in proliferating endothelial cells*. *Fertil Steril*, 2013. **100**(6): p. 1768-76 e1.
 35. Rocca, F. and J.A. Plá, *Diabetes mellitus: bases fisiológicas y fisiopatológicas para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la diabetes*. Vol. I. 1963: Departamento de Publicaciones del Sindicato Médico del Uruguay.
 36. Vomachka, M.S. and D.C. Johnson, *Ovulation, ovarian 17 alpha-hydroxylase activity, and serum concentrations of luteinizing hormone, estradiol, and progesterone in immature rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin (41500)*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1982. **171**(2): p. 207-13.
 37. Chabrolle, C., et al., *Effects of high levels of glucose on the steroidogenesis and the expression of adiponectin receptors in rat ovarian cells*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2008. **6**: p. 11.
 38. Colton, S.A., G.M. Pieper, and S.M. Downs, *Altered meiotic regulation in oocytes from diabetic mice*. *Biol Reprod*, 2002. **67**(1): p. 220-31.
 39. Kim, K., et al., *Disordered meiotic regulation of oocytes by duration of diabetes mellitus in BBdp rat*. *Reprod Sci*, 2007. **14**(5): p. 467-74.
 40. Sinden, J.A. and B.B. Longwell, *Effect of alloxan diabetes on fertility and gestation in the rat*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1949. **70**(4): p. 607-10.

41. Becerra, J.E., et al., *Diabetes mellitus during pregnancy and the risks for specific birth defects: a population-based case-control study*. Pediatrics, 1990. **85**(1): p. 1-9.
42. Codner, E., N. Soto, and P.M. Merino, *Contraception, and pregnancy in adolescents with type 1 diabetes: a review*. Pediatr Diabetes, 2012. **13**(1): p. 108-23.
43. Codner, E. and F. Cassorla, *Puberty and ovarian function in girls with type 1 diabetes mellitus*. Horm Res, 2009. **71**(1): p. 12-21.
44. Codner, E., P.M. Merino, and M. Tena-Sempere, *Female reproduction and type 1 diabetes: from mechanisms to clinical findings*. Hum Reprod Update, 2012. **18**(5): p. 568-85.
45. Westwood, F.R., *The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging*. Toxicologic Pathology, 2008. **36**(3): p. 375-384.
46. Jawerbaum, A. and V. White, *Animal models in diabetes and pregnancy*. Endocr Rev, 2010. **31**(5): p. 680-701.
47. Debbage, P.L., et al., *Intravital lectin perfusion analysis of vascular permeability in human micro- and macro- blood vessels*. Histochem Cell Biol, 2001. **116**(4): p. 349-59.
48. Egawa, G., et al., *Intravital analysis of vascular permeability in mice using two-photon microscopy*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 1932.
49. Diaz, D., et al., *Relationship between growth of the preovulatory follicle and its steroidogenic activity on the onset and expression of estrus behavior in CIDR-treated Bos indicus cows: an observational study*. Physiol Behav, 2012. **107**(2): p. 262-70.
50. Dodo, T., et al., *Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 11) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of ethylene glycol monomethyl ether in female rats*. J Toxicol Sci, 2009. **34 Suppl 1**: p. SP121-8.

51. Tsujioka, S., et al., *Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 3) Effects of 2- or 4- week repeated-dose toxicity and fertility studies with tamoxifen in female rats.* J Toxicol Sci, 2009. **34 Suppl 1**: p. SP43-51.
52. Stouffer, R.L., et al., *Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary.* Arch Med Res, 2001. **32**(6): p. 567-75.
53. Holger, G., *VEGF and Endothelial Guidance in Angiogenic Sprouting*, in *VEGF in Development*, C. Ruhrberg, Editor. 2008. p. 68-78.
54. Gottsch, M.L.V.K.E.A.M.W.J., *Role of matrix metalloproteinase 2 in the ovulatory folliculo-luteal transition of ewes.* Reproduction, 2002. **124**: p. 347-352.
55. Redmer, D.A. and L.P. Reynolds, *Angiogenesis in the ovary.* Rev Reprod, 1996. **1**(3): p. 182-92.
56. Niswender, G.D., Nett T.M., *The corpus luteum and its control.* . The Physiology of Reproduction. 1988, New York: Raven Press. 489-525.
57. Reynolds, L.P., et al., *Mitogenic factors of corpora lutea.* Prog Growth Factor Res, 1994. **5**(2): p. 159-75.
58. Farin, C.E., et al., *Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle.* Biol Reprod, 1986. **35**(5): p. 1299-308.
59. Lei, Z.M., N. Chegini, and C.V. Rao, *Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive states.* Biol Reprod, 1991. **44**(6): p. 1148-56.
60. Sims, D.E., *The pericyte--a review.* Tissue Cell, 1986. **18**(2): p. 153-74.

XI. APÉNDICES

A. *Marcaje de la microvasculatura ovárica mediante histoquímica*

Se utilizaron cortes de ovario de 60 μm obtenidos con criostato a -20°C (Leica, GMBH, Alemania) los cuales se montaron en laminillas cargadas (Super slide frost, Fisher Scientific, USA). Para la histoquímica las muestras fueron lavadas por duplicado durante 5 min en un buffer de lectina (0.05 M TBS, 0.025% Tween 20, 0.25 mM CaCl_2 y 0.25 mM MgCl_2 pH 7.6). Después de los lavados, las laminillas fueron incubadas durante 30 min a 37°C con la enzima Neuroaminidasa (Sigma-Aldrich, ST. MO, USA) para cortar los residuos de ácido siálico que impiden la unión de la lectina con su azúcar correspondiente. La lectina PNA se utilizó a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en el buffer de lectina y se incubó durante 1 h a TA. Finalizado este tiempo se lavó por triplicado durante 5 min con una solución de 0.1 M PBS pH 7.4 para después contrateñir durante 1 min los núcleos con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DAPI diluido en PBS, seguido de lavados por duplicado con PBS. Finalmente, se utilizó medio de montaje Dako para fluorescencia. Para demostrar la especificidad en la unión de lectina, se utilizó un control positivo que consistió en la preincubación durante 1 h a TA de la lectina utilizada en una solución 200 mM de Lactosa. Pasado este tiempo se procedió con el protocolo de forma rutinaria. Los resultados de la preincubación de la lectina con su azúcar análogo evitó en todos los casos el marcaje específico de la microvasculatura (datos no mostrados). Las histoquímicas se documentaron con ayuda de un microscopio de epifluorescencia acoplado a una unidad de disco giratorio (OLYMPUS, USA). De cada estructura de interés se obtuvieron imágenes completas a 40X mediante la ayuda del software Stereoinvestigator.

B. *Evaluación de la remodelación vascular durante la luteogénesis y perfusión intravital*

Se registraron 500 secuencias de fotos a 16.5X de imágenes de fluorescencia tomadas cada 150 ms en los campos previamente seleccionados y marcados con lectina RCA perfundida intravitalmente para marcar la vasculatura del cuerpo lúteo. Se utilizó una lámpara de mercurio (Leica EL6000) para excitar a 480 nm y un cubo de epifluorescencia con filtro de emisión y un espejo dichroico apropiado (500-550 nm). Previo al proceso de

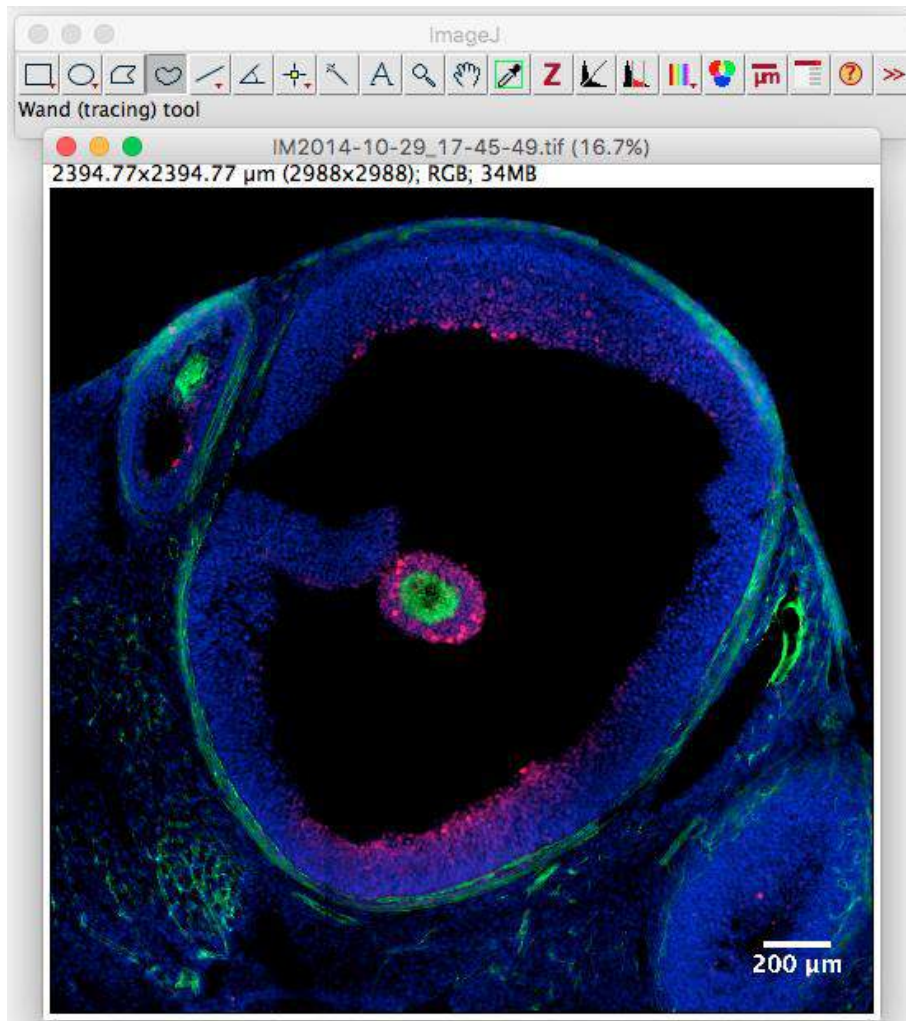
captura de imágenes, los animales de cada grupo y de cada período evaluado se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de ketamina/xilazina. Una vez anestesiados los animales, se realizó el procedimiento para realizar la perfusión intravital. Los ovarios se expusieron y fijaron abdominalmente mediante pinzas y se colocaron debajo del objetivo del microscopio. Para visualizar el torrente sanguíneo *in vivo* se utilizó isotiocianato de fluoresceína conjugado con dextrán (FITC-dextrán) como trazador. El dextrán es un polisacárido que se compone de cadenas de glucosa y su masa molecular es variable de 3-2.000 kDa. Los animales fueron anestesiados y se inyectó FITC-dextrán de 10, 40 ó 70 kDa en experimentos independientes a los grupos de ratas control y ratas tratadas con STZ provenientes de los grupos de 7, 14 y 21 días post-tratamiento. En respuesta a la inyección del trazador, las arteriolas se delinearon inmediatamente después y la visualización de los capilares y vénulas nos permitió evaluar la dinámica de extravasación del dextrán. Posteriormente se cuantificó la intensidad de fluorescencia (MFI) del marcaje a partir de las películas obtenidas [48].

C. *Análisis de imágenes*

En ambos casos, se utilizaron de 5 a 8 cortes para estimar tanto la cantidad de brotes angiogénicos como el área vascular de cada folículo en cada etapa. Se contabilizaron todos los folículos que presentaron las características adecuadas para ser incluidos: marcaje completo de la vasculatura, sin signos de atresia ni de daño en las capas de la pared folicular, y un diámetro $> 650 \mu\text{m}$. El procedimiento de análisis se muestra en la figura 20.

Las imágenes de la histoquímica fueron analizadas con el programa Image J. El procedimiento consistió en: obtener la escala en micras correspondiente para cada imagen, seleccionar la imagen que se desea analizar y abrir en la interfaz del programa Image J.

Apéndice figura 1



Figural1. Imagen seleccionada en la interfaz Image J.

Posteriormente se definió el contorno de cada estructura y se separó en los diferentes filtros verde, rojo y azul y se seleccionó el correspondiente al color de emisión del fluoróforo acoplado a la lectina. Después se marca un contorno en la zona de interés de cada filtro. Apéndice figura 2

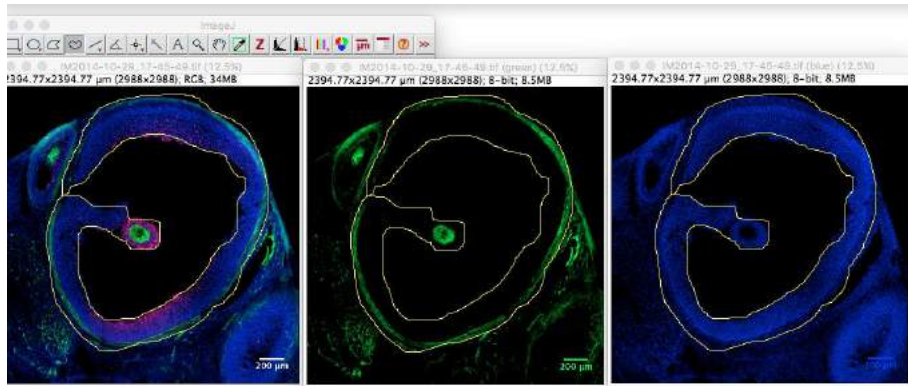


Figura 2. Imagen con el contorno definido y separada mediante los canales de color.

Después se filtra la imagen con el algoritmo mediana a dos píxeles, es procesada con las opciones: Process > Binary > Make Binary y se obtiene la imagen binaria correspondiente al marcaje fluorescente Apéndice figura 3.

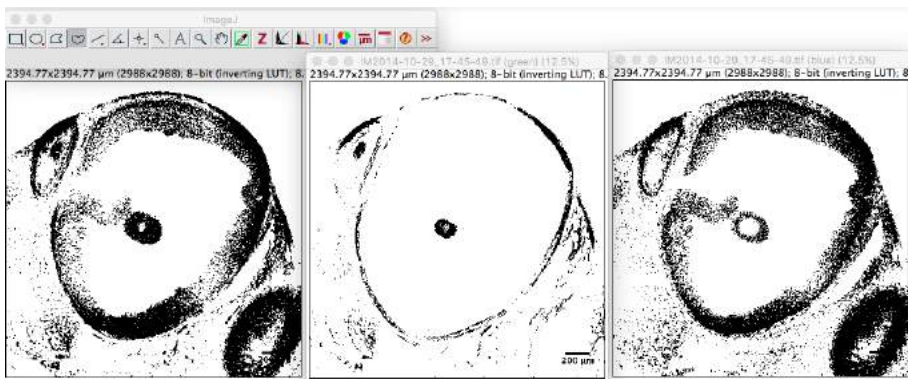


Figura 3. Imagen binaria.

Finalmente, se determina el % de área que ocupa la marca dentro del contorno previamente definido [49].

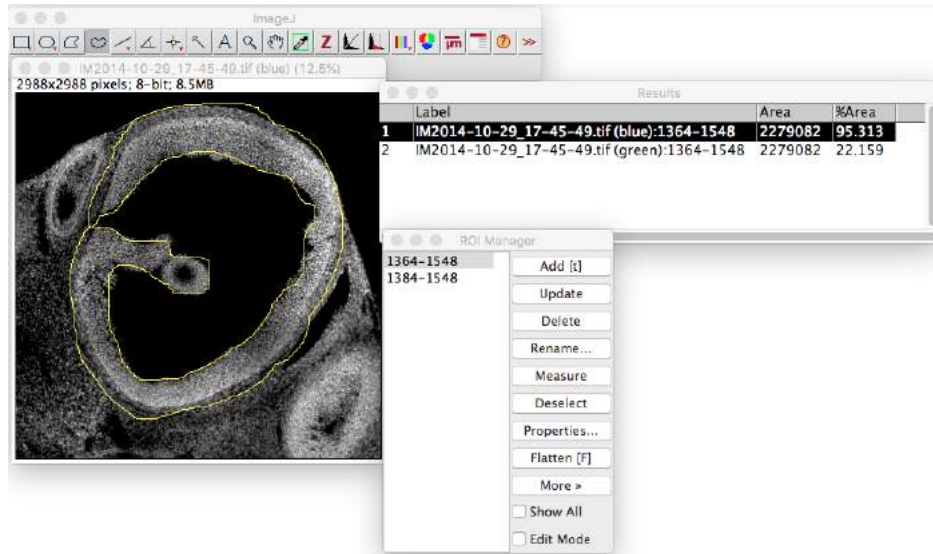
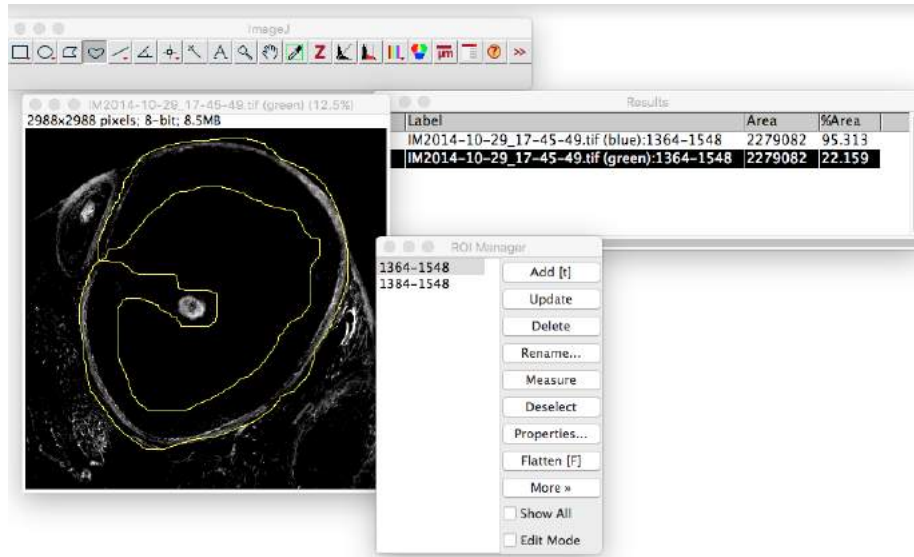


Figura 4. Cálculo de porcentaje de área.