



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CAMBIOS EN LA VASCULATURA HIPOFISIARIA EN
RATÓN HEMBRA CON SÍNDROME DIABÉTICO
INDUCIDO CON ESTREPTOZOTOCINA**

T E S I S

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

P R E S E N T A:

ITAYETZI ELIZABETH ROMERO MOTA



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. TATIANA FIOREDELISIO COLL**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2019



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
Romero
Mota
Itayetzi Elizabeth
55 4134 2829
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
311100013
2. Datos del tutor
Dra.
Tatiana
Fiordelisio
Coll
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Patricia
Rivas
Manzano
4. Datos del sinodal 2
M. en C.
Rosa Nuria
Galindo
Solano
5. Datos del sinodal 3
Dra.
Rosario
Ortiz
Hernández
6. Datos del sinodal 4
M. en Ing. E.
Erika Araceli
González
Villa
7. Datos del trabajo escrito
Cambios en la vasculatura hipofisiaria en ratón hembra con síndrome diabético inducido
con estreptozotocina
53 p
2019

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, particularmente, a la Facultad de Ciencias por la formación académica que recibí durante la licenciatura.

A los proyectos PAPIIT IN227416 y CONACyT-ANR 273513 por el financiamiento necesario para el desarrollo del presente trabajo.

Agradecimientos a título personal

A mi familia, porque a pesar de las circunstancias siempre me han apoyado y animado en todo.

A Angie, mi mejor amiga desde la prepa, por ser mi confidente y la mejor consejera en todo momento, por escuchar mis locuras y apoyarlas.

A todos aquellos excelentes profesores que me prepararon y me condujeron hasta este punto, especialmente a la profesora Mónica Martínez Ornelas, la responsable de que haya elegido este maravilloso camino del mal que es la Biología.

A los malotes del *lab*: Tat, José, Nuria, Codal, Paty, Ale, Juan, Yorgui, Midori, Vic, Ana, Alejandro, Pao y Diana por su amistad, apoyo y enseñanzas. Igualmente, a los otros malotes que llegaron después pero de quienes también he aprendido cosas importantes; Edgar, Nat, Keiko, Sonia y Patty. He sido la más afortunada por conocer a gente tan noble, inteligente y divertida como todos ustedes. Les agradezco infinitamente por todos los buenos momentos que me han hecho pasar.

A Tat, Nuria, José y Codal por regalarme tanto de su valioso tiempo y conocimiento durante el desarrollo de este trabajo, y por ayudarme y tolerarme en cada instante.

Finalmente, al mejor ejemplo de profesional y ser humano que he conocido y a quien admiro y respeto mucho, a la doctora Tatiana Fiordeliso Coll por el asesoramiento en este trabajo a pesar de las responsabilidades infinitas que tiene. Gracias doctora Tatiana por haberme recibido en su laboratorio, por la confianza, paciencia y dedicación que me ha brindado.

Tabla de contenido

1	INTRODUCCIÓN	8
1.1	Hipotálamo-hipófisis	8
1.1.1	Hipotálamo.....	8
1.1.2	Hipófisis.....	9
1.1.3	Sistema portal hipofisiario	9
1.1.3.1	Anatomía de los vasos sanguíneos y hemodinámica	12
1.2	Eje hipotálamo-hipófisis-ovario.....	14
1.2.1	Hipotálamo.....	14
1.2.2	Vasculatura y secreción pulsátil.....	16
1.2.3	Hipófisis.....	16
1.2.4	Ovario.....	18
1.3	Metabolismo y reproducción.....	19
1.4	Diabetes	21
1.4.1	Problemas asociados con la diabetes	22
2	Antecedentes	25
2.1	Hipotálamo y gonadotropinas.....	25
2.2	Ovario.....	25
2.3	Hipófisis y vasculatura.....	26
2.4	Modelos de síndrome diabético	26
3	Hipótesis.....	28
4	Objetivo.....	28
	Objetivos particulares.....	28

5	Método.....	29
5.1	Animales.....	29
5.2	Inducción y caracterización del modelo de síndrome diabético.....	29
5.3	Obtención de muestras biológicas: hipófisis.....	30
5.4	Adquisición y análisis de imágenes.....	31
5.5	Análisis estadístico.....	33
6	Resultados.....	34
6.1	Caracterización del modelo.....	34
6.2	Cobertura vascular.....	39
6.3	Ramificaciones vasculares.....	39
7	Discusión.....	41
8	Conclusión.....	45
9	Perspectivas.....	45
	Literatura citada.....	46

Abreviaciones

TRH	Tiroliberina u hormona liberadora de tirotropina
CRH	Corticoliberina u hormona liberadora de corticotropina
GnRH	Gonadoliberina u hormona liberadora de gonadotropinas
GHRH	Somatoliberina u hormona liberadora de somatotropina
HHO	Eje hipotálamo-hipófisis-ovario
LH	Hormona luteinizante
FSH	Hormona foliculoestimulante
NO	Óxido nítrico
GnRHR	Receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas
GDP/GTP	Guanosin difosfato/trifosfato
PLC	Fosfolipasa C
PIP2	Fosfatidilinositol bifosfato
IP3	Inositol trifosfato
DAG	Diacilglicerol
PKC	Proteína cinasa C
nNOS	óxido nítrico sintasa
ROS	especies reactivas de oxígeno
ACh	acetilcolina
SKCa	canales de potasio dependientes de calcio de conductancia pequeña
IKCa	canales de potasio dependientes de calcio de conductancia intermedia
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
STZ	estreptozotocina
SD	síndrome diabético

Resumen

La hipófisis es una glándula endocrina que, junto con el hipotálamo, regula una diversidad de procesos como el metabolismo, el desarrollo, la reproducción, etc., que en conjunto con las funciones del sistema nervioso permiten mantener la homeostasis del organismo. Para lograr lo anterior, estos dos componentes del sistema neuro-endocrino se comunican a través del sistema portal hipofisiario, el cual es un complejo de vasos sanguíneos que regula la propagación de las señales hipotalámicas y sistémicas hacia la hipófisis. Sin embargo, esta comunicación puede ser afectada por enfermedades como la diabetes.

Se ha reportado que en mujeres diabéticas existe un gran porcentaje de disfunciones reproductivas, por lo que, con el propósito de detectar cambios que posiblemente puedan influir en el funcionamiento del eje reproductor femenino (regulado por la comunicación neuro-endocrina) durante una condición diabética, en este trabajo se estudió una parte del sistema portal hipofisiario, la estructura vascular hipofisiaria, en ratones hembra con síndrome diabético y control.

Se examinaron la cobertura vascular y el número de ramificaciones primarias, secundarias y terciarias de la red vascular de la hipófisis. De acuerdo con los análisis efectuados, encontramos cambios en la estructura vascular hipofisiaria que afectan las ramificaciones secundarias en los ratones con síndrome diabético respecto a los control. Las ramificaciones secundarias en ratones con síndrome diabético son significativamente menores en número respecto a las que hay en los controles.

En cuanto a la cobertura vascular, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, se observaron diferencias en el tamaño de las glándulas y el calibre de los vasos sanguíneos de los ratones tratados respecto a los controles (diferencias no analizadas en este trabajo).

Abstract

Pituitary is an endocrine gland that works together with hypothalamus in the regulation of several processes as metabolism, development, reproduction, etc. These functions linking with the nervous system functions allow maintaining homeostasis. In order to achieve the above, these two organs of the neuro-endocrine system communicate through the pituitary portal system, which is a complex of blood vessels that regulate the hypothalamic and systemic signals propagation towards pituitary gland. Nevertheless, communication can be affected by diseases like diabetes.

It has been reported that a large percentage of reproductive dysfunctions exist in diabetic women, for the purpose of detecting changes that could possibly influence in the function of the female reproductive axis (regulated by neuro-endocrine communication) during a diabetic condition, in this work it was study a part of the pituitary portal system, the pituitary vascular structure, in control female mice and with diabetic syndrome.

The vascular coverage and the number of primary, secondary and tertiary branches of the vascular network were examined. According to the analysis carried out, there are changes in the vascular structure made by secondary branches in mice with diabetic syndrome respect to the controls. The number of secondary branches in mice with diabetic syndrome is significantly lower than what is in controls.

Regarding the vascular coverage, there are not significant differences between groups. However, differences in size of the glands and blood vessels caliber of the experimental mice compared with the controls were observed (differences not analyzed in this work).

1 INTRODUCCIÓN

1.1 HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS

El adecuado funcionamiento conjunto de los sistemas nervioso y endocrino permite mantener el equilibrio interno del cuerpo [1]. El hipotálamo y la hipófisis producen distintas hormonas que regulan a diversos órganos y tienen una gran influencia en el resto de las glándulas endocrinas, por consiguiente en la conservación de la homeostasis del organismo [2].

Por su estrecha relación anatómica y fisiológica, el hipotálamo y la hipófisis junto con sus órganos blanco forman ejes de comunicación, siendo la vasculatura un componente fundamental en dichos ejes, ya que los productos hormonales son transportados a través de ésta desde su sitio de origen hasta el órgano blanco y de este hacia el hipotálamo y la hipófisis, regulando así, a través de las asas de retroalimentación, diferentes procesos como el crecimiento, el desarrollo, el metabolismo, la reproducción y la lactancia [3].

1.1.1 HIPOTÁLAMO

El hipotálamo es una parte del encéfalo que forma el piso y las paredes del tercer ventrículo, y está constituido por diferentes núcleos formados por los somas de las neuronas hipotalámicas [4]. Estos núcleos están relacionados con una diversidad de funciones como la termorregulación, ingesta de comida y agua, ritmos circadianos, respuesta sexual, secreción hormonal, etc. El hipotálamo puede ser considerado como un transductor que en respuesta a las entradas de información de otras áreas del cerebro y mensajeros hormonales produce y secreta neurohormonas que pueden estimular o inhibir la actividad hipofisaria [1].

Particularmente, los núcleos involucrados en la comunicación con la hipófisis se localizan en el hipotálamo medio: núcleo arqueado, núcleo ventromediano, núcleo supraóptico y núcleo paraventricular [5], [6].

Las hormonas producidas en el hipotálamo y que estimulan la secreción de otras hormonas en la hipófisis son la tiro liberina (TRH), la corticoliberina (CRH), la gonadoliberina (GnRH), la somatoliberina (GHRH), la oxitocina (que proviene principalmente del núcleo paraventricular) y la vasopresina (que proviene sobre todo del núcleo supraóptico). Mientras

que las que inhiben la secreción hipofisiaria son la somatostatina y el neurotransmisor dopamina [7].

1.1.2 HIPÓFISIS

La hipófisis es una glándula que se localiza en la base del cerebro en una depresión del hueso esfenoideas denominada silla turca [8]. Está unida al piso del hipotálamo por medio de un tallo o infundíbulo y se compone de dos estructuras diferentes embriológica, anatómica y funcionalmente: la neurohipófisis y la adenohipófisis [9].

La neurohipófisis (o lóbulo posterior) está integrada por una parte de la base del hipotálamo llamada *tuber cinereum*, el infundíbulo y por las terminales axónicas de las neuronas de los núcleos supraóptico y paraventricular hipotalámicos. Estas terminales axónicas almacenan y secretan la vasopresina y oxitocina producidas en el hipotálamo [4], [9].

La adenohipófisis (o lóbulo anterior) constituye la mayor parte de la hipófisis y está compuesta por tres partes: 1) la intermedia, 2) la tuberal, que es una extensión de la adenohipófisis que rodea al infundíbulo, poblada por melanotropos que producen melatropina y 3) la distal, que constituye aproximadamente el 80% de la glándula. Esta última parte de la adenohipófisis se compone de cinco tipos celulares endocrinos distribuidos heterogéneamente que secretan diferentes hormonas peptídicas que regulan la función de diversos órganos (Figura 1) [10]. Además, se compone de células no productoras de hormonas como las células foliculoestrelladas, las células endoteliales y los pericitos [9].

A diferencia de la neurohipófisis, la adenohipófisis se comunica con el hipotálamo por medio de vasos sanguíneos, los cuales en este caso reciben el nombre de sistema portal hipofisiario.

1.1.3 SISTEMA PORTAL HIPOFISIARIO

El sistema portal hipofisiario es un complejo de vasos sanguíneos de gran importancia debido a su función, pues a través de éste las neurohormonas del hipotálamo son transportados hasta la adenohipófisis [11]. Además, trabaja en conjunto con las células hipofisiarias y las terminales de las neuronas hipotalámicas en la determinación del patrón de exposición neurohormonal [12], el cual en sí mismo es importante en la comunicación neuroendocrina.

Hígado, tejido adiposo	Glándulas mamarias	Tiroides	Ovario y testículos	Glándula adrenal
Crecimiento, control de lípidos, proteínas y metabolismo de carbohidratos	Producción de leche	Estimula la secreción hormonal de la tiroides	Producción de gametos	Estimula la secreción de glucocorticoides

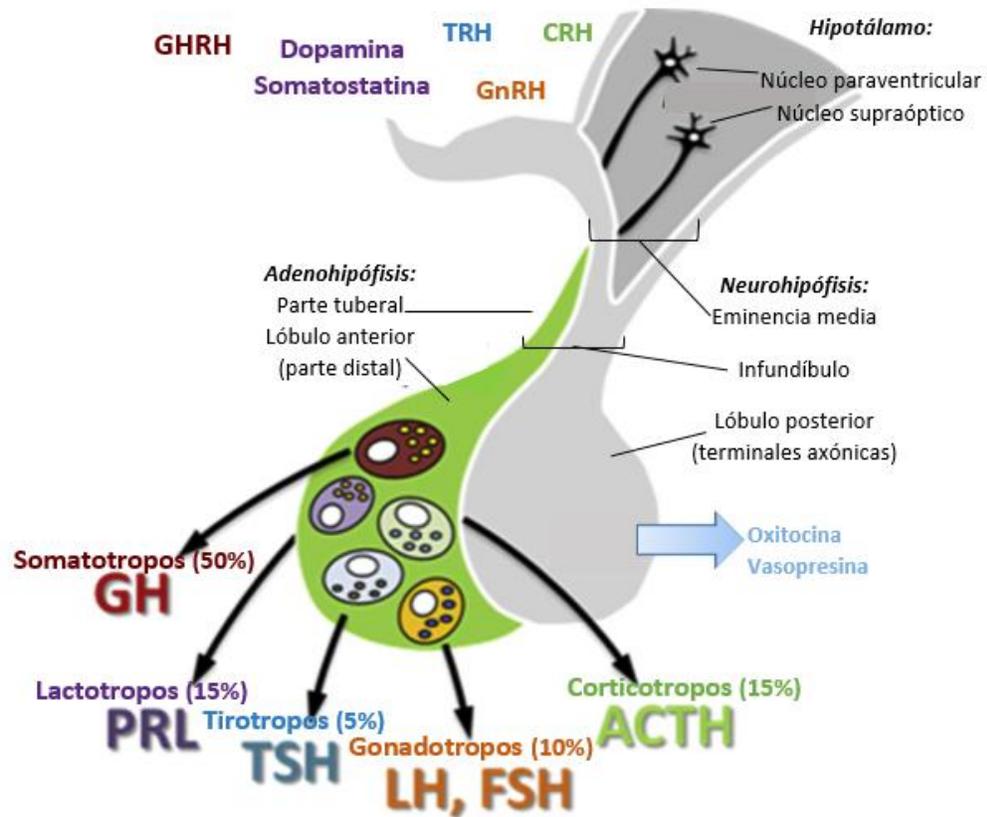


Figura 1. Hipotálamo e hipófisis. Modelo representativo de los cinco tipos celulares endocrinos de la hipófisis con sus respectivas proporciones, hormonas reguladoras hipotalámicas y las hormonas que producen (relacionados con el mismo color para cada eje hipotálamo-hipófisis-órganos blanco). En la parte superior se muestran los órganos blanco y las principales funciones de las hormonas producidas por la hipófisis (Adaptado de Saladin 2012; Vázquez-Borrego et al. 2017).

El sistema portal hipofisario se origina en la arteria hipofisaria superior, la cual se ramifica produciendo una red primaria de capilares que rodea a la porción inferior del hipotálamo y a la eminencia media [4], [13]. Estos capilares posteriormente se fusionan y forman las vénulas portales que viajan hacia abajo del infundíbulo, a través de las cuales las neurohormonas del hipotálamo (GH, PRL, TSH, LH, FSH, ACTH) captadas en el plexo primario son transportadas

hasta una red secundaria de capilares venosos en la adenohipófisis donde son liberadas [11] (Figura 2).

Es importante destacar que existen diferencias estructurales entre los vasos sanguíneos que conforman al sistema portal hipofisiario (arteria, vénula y capilar), ya que dichas diferencias están directamente relacionadas con la hemodinámica, es decir, con el flujo de sangre (cantidad de sangre que pasa por un punto en un tiempo determinado) a través de los vasos sanguíneos, el cual es particularmente relevante en los ejes de comunicación que forman el hipotálamo y la hipófisis como se verá más adelante [14].

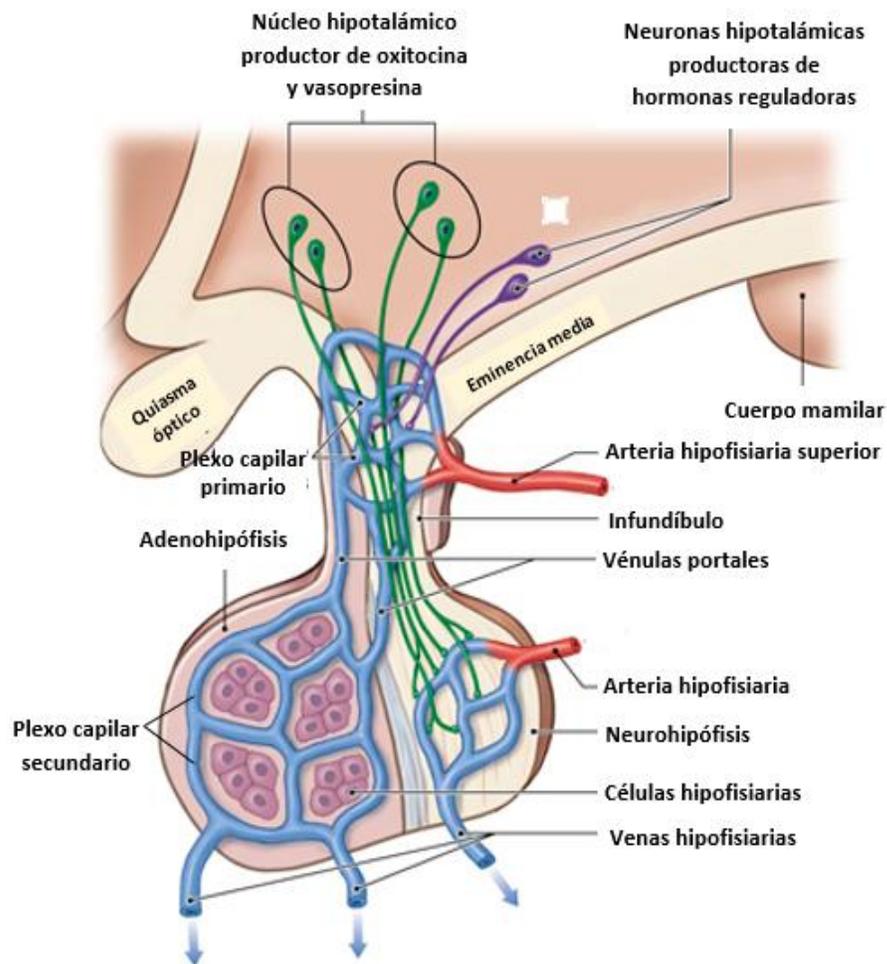


Figura 2. Sistema portal hipofisiario. Las terminales de las neuronas hipotalámicas liberan sus neurohormonas en el plexo capilar primario que rodea a la eminencia media y a la parte inferior del hipotálamo. Las neurohormonas son transportadas hacia el plexo capilar secundario en la adenohipófisis por medio de las vénulas portales que atraviesan el infundíbulo (Modificada de Schilling 2017).

1.1.3.1 ANATOMÍA DE LOS VASOS SANGUÍNEOS Y HEMODINÁMICA

En general, hay tres tipos de vasos sanguíneos: arterias, capilares y venas, los cuales se diferencian por la estructura de su pared vascular y por su función. Las arterias (eferentes al corazón) y venas (aferentes al corazón) tienen en común que están integradas por tres capas: la interna, compuesta por un endotelio (epitelio plano simple) rodeado por una membrana basal y tejido conjuntivo; la media, formada por músculo liso, colágeno y tejido elástico; la externa o adventicia, compuesta por tejido conjuntivo laxo. La capa media es especialmente importante por sus componentes que permiten la vasomotilidad (cambios en el diámetro) de las paredes de los vasos sanguíneos [7].

Cantidades variables de cada uno de los elementos de las tres capas confieren propiedades particulares a venas y arterias, así como a los subtipos de estos vasos sanguíneos (arteriolas y vénulas) que difieren en su diámetro. De acuerdo con esto, las arterias son más musculares que las venas, haciéndolas más resistentes a las grandes presiones ejercidas sobre sus paredes debido a que están más cerca del corazón que bombea la sangre. Así es como la sangre que pasa hacia los capilares por medio de conductos es regulada por las arteriolas. Por su parte, las delgadas paredes de las venas las hacen más distensibles que las arterias, lo cual les otorga la capacidad de contener una cantidad mayor de sangre que las arterias sin aumentar la presión [7], [13].

En cuanto a los capilares, son vasos sanguíneos cuyas paredes se componen solamente por un endotelio y una lámina basal, pues a través de estos es que ocurre el intercambio de nutrientes, gases y desechos. Las células endoteliales de estos vasos sanguíneos pueden estar rodeadas por pericitos, un tipo celular con proteínas contráctiles como las de células de músculo liso que les permiten regular la vasomotilidad y por lo tanto la hemodinámica en los capilares [7], [15].

De acuerdo con lo anterior, los principales factores que modifican la hemodinámica en general son la presión y la resistencia; a su vez, la resistencia depende de la viscosidad sanguínea, de la longitud vascular y sobre todo del radio vascular, pues de todos los factores este último es el que se puede modificar con mayor facilidad [7]. La presión arterial es la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes vasculares, y para que la sangre pueda fluir es necesario que haya una diferencia de presión entre dos puntos. Así, la relación entre la presión arterial y el flujo

sanguíneo es directamente proporcional. Por su parte, la resistencia, que resulta de la fricción entre el flujo sanguíneo y el endotelio, establece una relación inversamente proporcional con el flujo sanguíneo y el radio vascular [16].

Con todo lo anterior se tendría entonces que, el flujo sanguíneo en las arterias es más rápido por tratarse de vasos con diámetros grandes y cercanos al origen de la presión, el corazón. En las arteriolas, el flujo disminuye por un aumento en la resistencia por la disminución del diámetro vascular y porque la sangre se ha alejado del corazón, por lo tanto, al llegar a los capilares, el flujo disminuye aún más por las mismas razones. En cuanto a las vénulas, que reciben sangre de los capilares, el flujo aumenta respecto al flujo en los capilares porque hay un aumento en el diámetro y por tanto una disminución en la resistencia. Por otra parte, el flujo en los diferentes tipos de vasos sanguíneos puede ser modificado por cambios en sus diámetros dados por la contracción o dilatación del musculo de la capa intermedia de arterias y venas (así como de los subtipos de estos vasos sanguíneos), o bien, por la acción de los pericitos que rodean al endotelio en el caso de los capilares [7], [13].

Como se mencionó en el párrafo anterior a este apartado, es importante tener en mente las implicaciones que estas diferencias pueden tener en la hemodinámica del sistema portal hipofisiario, ya que de ello depende en gran parte que se lleve a cabo una adecuada comunicación neuroendocrina.

Retomando el trayecto que siguen las neurohormonas, una vez que llegan y estimulan a sus respectivas células blanco adenohipofisarias, éstas producen y secretan sus propias hormonas que son captadas a la vez por los capilares venosos de la adenohipófisis, y transportadas por medio de las venas hipofisarias hacia la circulación sistémica, a través de la cual son distribuidas hasta su respectivo órgano blanco [11].

La señalización hormonal en cadena descrita anteriormente ejemplifica de forma general la función de los ejes de comunicación que forman el hipotálamo y la hipófisis con otros órganos. Sin embargo, debido a que el eje hipotálamo-hipófisis-ovario resulta de particular interés en este trabajo, a continuación se explicará con más detalle.

1.2 EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO

El eje hipotálamo-hipófisis-ovario (HHO) es el componente neuroendocrino que controla la función reproductiva y la fertilidad en las hembras mediante la regulación hormonal [17].

Este eje está conformado por tres niveles, y cada uno tiene sus propios productos hormonales: 1) el hipotálamo produce la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH); 2) la hipófisis produce las hormonas luteinizante (LH) y foliculoestimulante (FSH) y 3) los ovarios producen esteroides sexuales (estrógenos y progesterona) [18]. Estos productos hormonales pueden ejercer una retroalimentación positiva o negativa en cualquier nivel mediante comunicación autocrina, paracrina o endocrina (Figura 3).

1.2.1 HIPOTÁLAMO

El primer nivel está representado por el hipotálamo que secreta a la GnRH, la cual es el factor que inicia los eventos de comunicación del eje reproductor [19]. Su producción y liberación están reguladas por otras hormonas y segundos mensajeros de diferentes orígenes, sin embargo, la kisspeptina y las neuronas productoras de kisspeptinas tienen un papel muy importante en la regulación de la transcripción genética de la GnRH y de su receptor [17], [18].

Las neuronas productoras de kisspeptina, aferentes a las neuronas GnRHérgicas, expresan receptores a progesterona y a estrógenos, mediando así los efectos de estas hormonas en las neuronas GnRHérgicas que no expresan dichos receptores [17]. Se ha visto que en mamíferos las neuronas productoras de kisspeptina se distribuyen en mayor proporción en el núcleo arqueado y en el área preóptica. Las neuronas del núcleo arqueado son inhibidas por los esteroides sexuales, impidiendo la secreción de kisspeptina y de GnRH. En cambio, las neuronas del área preóptica son estimuladas positivamente, favoreciendo la actividad de las células GnRHérgicas [20]. Sin embargo, la regulación del GnRH depende también de ciertos niveles hormonales, como se explicará más adelante.

Cuando la GnRH es producida se libera de manera pulsátil en el sistema portal hipofisiario, estimulando la síntesis y secreción de LH o FSH en la adenohipófisis (Figura 3) [17]. La síntesis de una u otra gonadotropina depende del patrón pulsátil de secreción de GnRH. Frecuencias altas con más de un pulso por hora inducen la síntesis y liberación de LH,

mientras que frecuencias bajas con menos de un pulso por 2-3 horas inducen preferentemente la síntesis y liberación de FSH [12].

Debido a que las demandas fisiológicas, en este caso reproductivas, cambian de acuerdo con la edad y a lo largo del ciclo estral o menstrual, la generación de un determinado patrón de secreción pulsátil es indispensable para producir una respuesta fisiológica específica, tanto en un estado fisiológico como en uno fisiopatológico [20], [21].

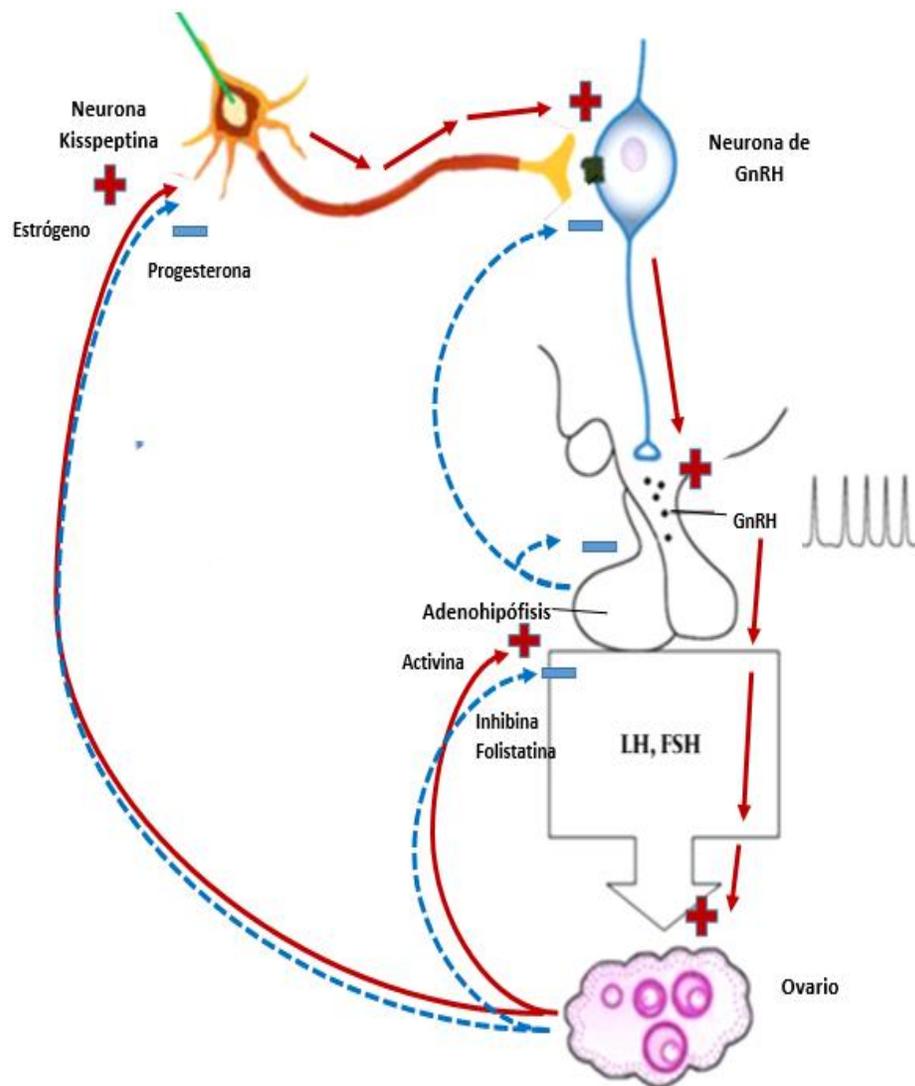


Figura 3. Regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Las neuronas de GnRH producen GnRH como respuesta a señales de determinadas áreas del cerebro. La GnRH estimula la síntesis y liberación de gonadotropinas (LH y FSH) en la adenohipófisis de manera pulsátil. Estas hormonas a su vez estimulan la producción de hormonas esteroides en el ovario. Los estrógenos y las gonadotropinas regulan negativamente el eje a nivel hipotalámico e hipofisiario (Modificada de Comninos, 2014).

1.2.2 VASCULATURA Y SECRECIÓN PULSÁTIL

La generación y propagación de los pulsos que determinan la actividad gonadotrópica dependen de la liberación sincronizada de GnRH por parte de las neuronas y de características y mecanismos reguladores de los vasos sanguíneos que conforman al sistema portal hipofisiario, las cuales se describen a continuación [12]. Una característica de los capilares es que están fenestrados, lo cual permite que las hormonas difundan sin mayor complicación hacia el interior vascular y hacia sus células diana [21].

Los pericitos podrían tener un papel destacado en la secreción pulsátil, ya que por ser un tipo celular contráctil y rodear capilares pueden inducir la constricción de éstos, modificando su diámetro y regulando así el flujo sanguíneo [15]. Otro factor con un rol muy importante en la regulación del tono vascular es el óxido nítrico (NO), un vasodilatador producido por varios tipos celulares hipofisarios y por células endoteliales que por su acción puede modular la distribución pulsátil de la GnRH [21].

La formación de determinadas redes organizadas topológicamente de las células endocrinas con la vasculatura modifica la manera en la que las células responden a factores reguladores; los gonadotropos, por ejemplo, se conectan con los vasos sanguíneos mediante proyecciones, con lo cual se podría estar regulando también la señal hipotalámica en forma de pulsos de GnRH [12].

Debido a la estrecha relación de la vasculatura con las neuronas GnRHérgicas y con las células hipofisarias, el hipotálamo y la hipófisis junto con la vasculatura pueden considerarse como un sistema tripartita en el que cada componente es indispensable en el mantenimiento y coordinación de la función del eje reproductor [12].

1.2.3 HIPÓFISIS

El segundo nivel del eje reproductor lo conforman los gonadotropos, los cuales son irrigados por los capilares venosos del sistema portal hipofisiario con GnRH que se une a su receptor en la membrana celular de dichas células, induciendo la secreción de las gonadotropinas (LH y FSH) [22].

1.2.3.1 RECEPTOR DE LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS (GNRHR)

El GnRHR pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G triméricas, que se caracterizan por tener siete dominios transmembranales unidos por asas intra y extracelulares [23]. Actúa principalmente por la vía de la proteína $G\alpha_q$, en la que la unión de la GnRH con su receptor (GnRHR) induce un cambio conformacional del mismo, lo cual promueve un intercambio nucleotídico en la subunidad α de la proteína $G\alpha_q$; esta proteína en su estado inactivo se une a GDP (guanosin difosfato), el cual es liberado e intercambiado por GTP (guanosin trifosfato) cuando la proteína se activa [24]. La activación de la proteína lleva a la disociación de sus subunidades $\alpha\beta\gamma$ en α -GTP y $\beta\gamma$, de las cuales la α -GTP estimula a la fosfolipasa C (PLC) que hidroliza al fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2), generando inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol que promueven la liberación de calcio intracelular y la activación de la proteína cinasa C (PKC), respectivamente (Figura 4) [25]. El aumento de calcio en el citoplasma favorece la exocitosis de vesículas con gonadotropinas.

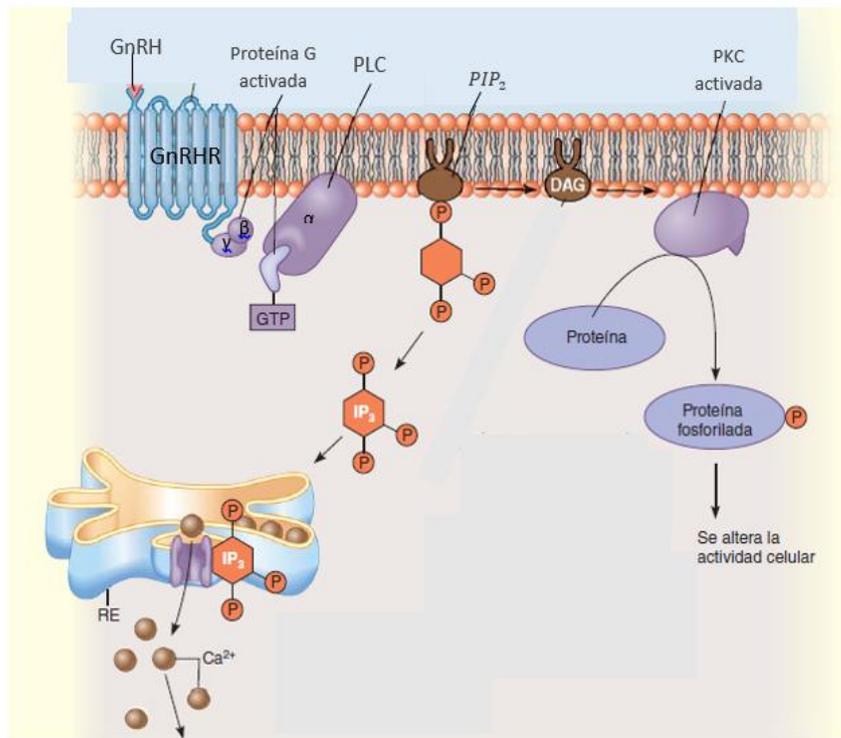


Figura 4. Vía de señalización de la secreción de gonadotropinas. El cambio conformacional del GnRHR activa a la proteína $G\alpha_q$, cuya subunidad α estimula a la PLC que produce PIP_2 y DAG. El PIP_2 se une a su receptor en el retículo endoplásmico, dando lugar a la liberación de Ca^{2+} de este reservorio y a la consecuente liberación de gonadotropinas (Modificado de Martin 2013).

1.2.3.2 GONADOTROPINAS

Las gonadotropinas LH y FSH son hormonas diméricas compuestas por una subunidad alfa, común para ambas gonadotropinas, y por una subunidad beta que difiere para cada una de estas hormonas, la cual determina su actividad biológica específica [26].

Después de ser transportadas a través de la circulación sistémica y llegar al ovario, estas gonadotropinas promueven el desarrollo de los folículos, la ovulación y el mantenimiento del cuerpo lúteo [19]. La FSH actúa en las células de la granulosa durante la fase folicular del ciclo estral y menstrual estimulando el desarrollo de los folículos, por lo que durante esta fase se observa un incremento en los niveles de FSH. Por su parte, una elevación abrupta en los niveles de LH hacia la mitad del ciclo menstrual promueve la ruptura folicular y con ello la ovulación. Además, estimula el desarrollo del cuerpo lúteo durante la fase lútea (Figura 5 a y b) [27]. Las gonadotropinas LH y FSH tienen un efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción de GnRH y sobre su propia secreción (Figura 3) [19].

1.2.4 OVARIO

En el tercer nivel del eje reproductor femenino, dentro de los diferentes tipos celulares del ovario se lleva a cabo el proceso de esteroidogénesis. En las células tecales, por estimulación de la LH, el colesterol es transformado en andrógenos, los cuales difunden a través de la lámina basal del folículo hacia las células de la granulosa en donde por estímulo de la FSH son transformados en estrógenos, por lo que los niveles de dichas hormonas muestran un aumento hacia el final de la fase folicular (Figura 5) [28]. Este incremento ejerce una retroalimentación negativa sobre las neuronas kisspeptina del núcleo arqueado, modificando la amplitud y frecuencia de los pulsos de GnRH; la amplitud disminuye y la frecuencia aumenta, así se produce específicamente LH, mientras que la producción de FSH decrece [29].

Los niveles de FSH también están bajo la regulación de las hormonas inhibina, activina y folistatina, producidas en los ovarios. La activina es un liberador específico de FSH, por lo que promueve su síntesis y secreción, mientras que la inhibina y la folistatina (antagonista del receptor de activina) impiden la producción de FSH [19], [28].

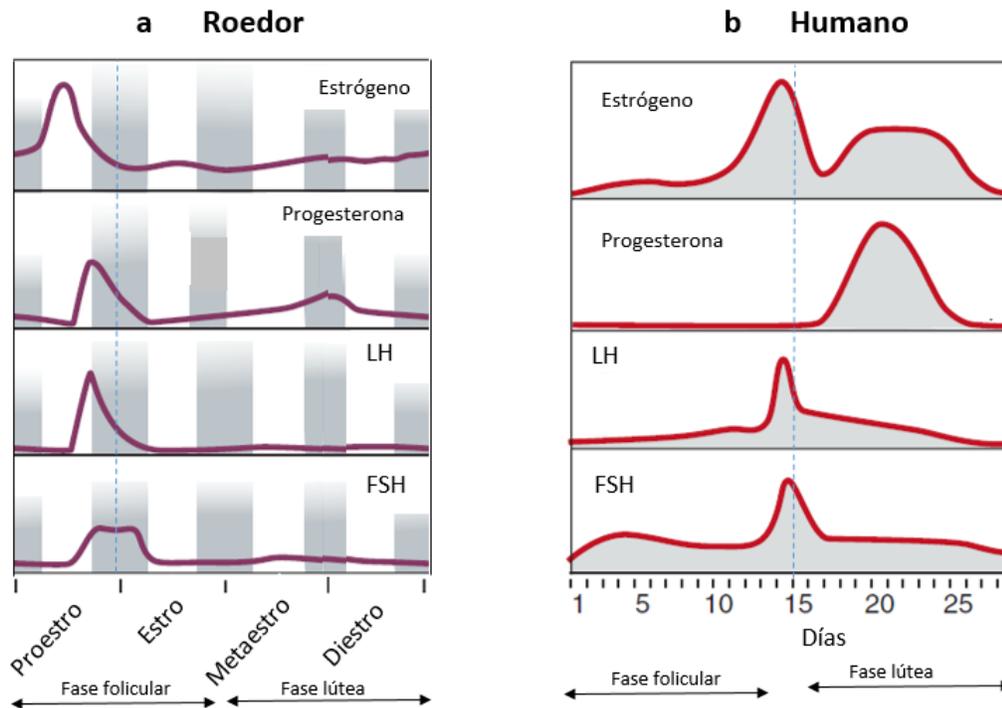


Figura 5. Niveles hormonales durante (a) el ciclo estral y (b) menstrual. Se observa un aumento de FSH durante la fase folicular, necesaria para el desarrollo de los folículos, mientras que un pico de LH es preciso para la ovulación y un aumento posterior para el desarrollo del cuerpo lúteo. Debido al desarrollo de los folículos, la producción de estrógeno aumenta hacia el final la fase folicular y se inhibe la producción de FSH. En la fase lútea, la producción de progesterona se eleva por parte del cuerpo lúteo y se inhibe la producción de LH. La línea azul punteada indica el momento en el que ocurre la ovulación (Modificado de Staley, 2005).

Por otro lado, en las neuronas del área preóptica los altos niveles de estrógenos inducen pulsos de GnRH de alta frecuencia que producen el pico de LH preovulatorio. Durante la fase lútea, el aumento en la producción de progesterona por parte del cuerpo lúteo ejerce retroalimentación negativa en el eje a nivel hipotalámico (Figura 3 y 5) [29].

Cuando no hay embarazo, los niveles de hormonas gonadales disminuyen, dejando de regular negativamente el eje y dando lugar al inicio de un nuevo ciclo.

1.3 METABOLISMO Y REPRODUCCIÓN

Como puede verse, el funcionamiento del eje reproductor es sumamente complejo y para su adecuado mantenimiento es preciso que haya suficiente energía disponible, ya que la deficiencia o el exceso de energía altera la función reproductiva [30]. Por lo anterior, no es

extraño que el eje reproductor esté estrechamente relacionado con señales que transmiten información sobre el estado metabólico del organismo [31].

La leptina, una hormona anorexigénica que es producida por los adipocitos en proporción con la masa de grasa corporal, ha mostrado un papel relevante como integrador del metabolismo y la reproducción, ya que la deficiencia o exceso de dicha hormona tiene un efecto negativo en la sincronización de la pubertad y la fertilidad [32], [33]. Además, recientemente se ha visto que participa en la regulación de la secreción de insulina y la sensibilidad de tejido periférico a esta hormona [34].

Por su parte, la insulina parece tener un efecto estimulatorio en el eje reproductor, ya que una disminución de gonadotropinas y defectos reproductivos se han observado en condiciones de deficiencia de insulina, como en la condición diabética. Además, la insulina promueve la producción de glucosa hepática a través de señalización hipotalámica y es la responsable de la activación de los receptores a través de los cuales la glucosa es transportada hacia el interior de las células (transporte dependiente de insulina), por lo que la disminución de insulina afecta negativamente los niveles de glucosa disponible para la actividad celular y por consiguiente a la demandante función reproductiva [33], [35].

Diversos estudios han demostrado que las neuronas GnRHérgicas carecen de receptores para señales metabólicas como la leptina e insulina, por lo cual, se ha propuesto que dichas hormonas tienen un modo de acción indirecto a través de las neuronas productoras de kisspeptina, ya que evidencia experimental muestra que estas neuronas sí expresan receptores para leptina e insulina y que existe una relación directamente proporcional entre los niveles de estas hormonas y la expresión de Kiss1 por parte de las neuronas productoras de kisspeptina que regulan la actividad de las neuronas GnRHérgicas [22], [32].

Otra señal aferente a las neuronas GnRHérgicas es el óxido nítrico (NO), un neurotransmisor gaseoso cuya actividad se asocia con la secreción de GnRH y a la oleada preovulatoria de LH. Su producción es inducida por la leptina, la cual promueve la fosforilación de la subunidad catalítica de la proteína óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) en las neuronas nNOS, las cuales regulan, entre otras funciones, la homeostasis de la glucosa, el gasto de energía y la reproducción [30], [36].

La información anterior sugiere que hay una estrecha relación entre las señales metabólicas y entre éstas y la función reproductiva. Sin embargo, también existe una relación entre dichas señales metabólicas y la vasculatura, pues se ha visto que en páncreas de roedores el flujo sanguíneo puede aumentar considerablemente por un efecto inductor de vasodilatación por parte de la glucosa a través del sistema nervioso central y por la síntesis local de NO. A la inversa, la insulina ha mostrado un efecto vasoconstrictor que reduce el flujo sanguíneo de los islotes pancreáticos a través de efectos directos en el tono vascular y por restablecer los niveles normales de glucosa en la sangre [21].

Así pues, dada la relación que se observa entre estas señales metabólicas, el eje reproductor y el sistema vascular, es de esperar que la alteración de alguna de estas partes afecte al resto, tal y como lo demuestra la evidencia respecto al aumento en el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y problemas reproductivos tras el padecimiento de diabetes [37].

1.4 DIABETES

La diabetes es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. A pesar de esto se presenta un incremento sostenido en su incidencia del 2-3% cada año; en 2014 el estimado de personas con diabetes a nivel mundial era de 387 millones, el cual se elevó a 425 millones en 2017 [34], [38], [39].

La diabetes es una enfermedad metabólica, crónico-degenerativa en la que la glucosa, nuestra principal fuente de energía, no puede ser utilizada por las células debido a un defecto en la secreción o acción de la insulina, la hormona responsable de activar a los transportadores de glucosa [40], [41].

Aunque se han descrito diferentes tipos de diabetes de acuerdo con las causas que la provocan, en general, presentan signos y síntomas que en conjunto se denominan síndrome diabético. El principal signo que conforma a este síndrome es la hiperglucemia (valor ≥ 200 mg/dl en ayuno) [40] a partir del cual se deriva una serie de síntomas clínicos como la poliuria, la polidipsia, la glucosuria, la polifagia y la pérdida de peso. La poliuria se presenta debido a que el exceso de glucosa en la sangre demanda una cantidad mayor de líquido de dilución, lo cual a la vez da paso a la polidipsia por la constante pérdida de agua. También,

debido a que los niveles de glucosa sobrepasan la capacidad renal de eliminación, la glucosa excedente es eliminada por la orina, lo cual se conoce como glucosuria. Por otro lado, dado que la glucosa no puede ser utilizada eficazmente por las células, es necesario recurrir a las reservas energéticas de proteínas y lípidos, lo cual provoca una pérdida de peso y por consiguiente la polifagia [40], [42].

1.4.1 PROBLEMAS ASOCIADOS CON LA DIABETES

El síndrome diabético es el reflejo de un trastorno metabólico de glúcidos principalmente, pero también de lípidos y prótidos que en conjunto afectan la estructura y función de diferentes órganos y sistemas [42]. Así, se ha visto una asociación entre la diabetes y el riesgo aumentado de padecer enfermedades respiratorias e infecciosas y ciertos tipos de cáncer, pero sobre todo patologías debidas a alteraciones del sistema vascular como las macrovasculopatías (cardiopatía isquémica, infarto al miocardio, enfermedad arterial periférica, insuficiencia cardíaca congestiva) y las microvasculopatías (neuropatía, nefropatía y retinopatía) [39], [43].

1.4.1.1 VASCULOPATÍAS

Entre las diversas funciones que cumple el endotelio se encuentran la sintética, secretora, metabólica, angiogénica e inmunológica, el control del tráfico celular, la regulación del tono vasomotor, etc.; sin embargo, su rol principal es el de mantener la fluidez de la sangre [44]. Esto hace evidente la importancia que tiene el endotelio en el mantenimiento de la homeostasis corporal, lo cual, aunado al hecho de que las vasculopatías son la causa más frecuente de mortalidad a nivel mundial y a que de todas las complicaciones que se desencadenan con la diabetes éstas son las más severas social y económicamente, destaca la relevancia que tiene el estudio de los efectos de la hiperglucemia crónica en la vasculatura, pues éste signo característico de la diabetes es el principal factor que promueve las respuestas bioquímicas que provocan el desarrollo de las vasculopatías [45]–[48].

A continuación se enumeran algunos efectos que se han descrito respecto al efecto que tiene la hiperglucemia sobre la vasculatura.

- 1) Aumento del estrés oxidativo. Durante la condición diabética se presenta un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que promueve la resistencia a la insulina a nivel endotelial específicamente [49].
- 2) Alteración en la biodisponibilidad de óxido nítrico. El óxido nítrico en el endotelio es sintetizado constitutivamente por la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) y es dependiente de la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$). El NO puede difundir hacia las células musculares lisas adyacentes al endotelio, activando la guanilato ciclasa y aumentando por lo tanto el cGMP que produce la relajación del músculo liso. Por otro lado, el NO endotelial disminuye la permeabilidad del endotelio a macromoléculas y lipoproteínas, y en el lumen de los vasos sanguíneos inhibe la adhesión de leucocitos y plaquetas sobre el endotelio [44]. En condición de hiperglucemia crónica estas funciones se ven afectadas porque los niveles de NO disminuyen debido a que puede reaccionar con las ROS que aumentan considerablemente bajo dicha condición, lo cual demuestra un papel antioxidante del NO. También se ha visto que los niveles de NO pueden decrecer debido a que la NOS es inhibida porque se produce una señalización anormal de Ca^{2+} y por la resistencia a la insulina, pues esta hormona en condiciones fisiológicas promueve la actividad de la NOS y por lo tanto la producción de NO [45].
- 3) Disfunción de células musculares lisas. Estas células juegan un rol fundamental en la regulación del tono vascular; la unión de vasodilatadores a sus respectivos receptores en las células endoteliales promueven la movilización de Ca^{2+} intracelular, el cual activa canales de potasio de conductancia pequeña e intermedia (SKCa, IKCa), llevando a una hiperpolarización por la salida de K^+ . Esta señal hiperpolarizante se esparce a células musculares lisas vecinas, cerrando canales de Ca^{2+} tipo L y llevando a la relajación del músculo liso que se traduce en el incremento del diámetro del vaso sanguíneo (Figura 6) [50]. Se ha visto que la hiperglucemia ejerce un efecto significativo sobre esta vía de señalización, pues la vasodilatación inducida por algunos vasodilatadores como ACh y la movilización de Ca^{2+} intracelular en las células endoteliales disminuyen en modelos diabéticos. También se ha visto que otros componentes como los SKCa están alterados en condición de hiperglucemia [51].

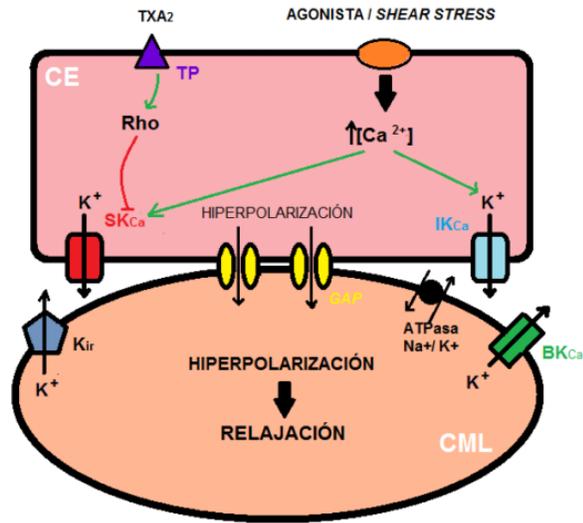


Figura 6. Vasodilatación dependiente de endotelio. CE: célula endotelial; CML: célula muscular lisa; GAP: unión mioendotelial; KCa: canales de K⁺ activados por Ca²⁺ (Tomado de Onetti 2016).

Otros efectos vasculares que se han descrito son sobreproducción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), inflamación crónica, desregulación hemodinámica, capacidad fibrinolítica dañada y aumento de la agregación de plaquetas que en conjunto llevan al desarrollo de vasculopatías [52].

1.4.1.2 DISFUNCIÓN REPRODUCTIVA

Las afecciones reproductivas son otras complicaciones que se han observado en muchas personas diabéticas [53]. La recopilación de datos clínicos muestra que junto con la diabetes se presenta un retraso en la menarquia, desregulación del ciclo menstrual, disminución de la tasa ovulatoria e incluso anovulación, menopausia precoz, abortos espontáneos y alteraciones en la foliculogénesis y luteogénesis, lo cual conlleva a una disfunción reproductiva diabética [37], [54].

2 Antecedentes

El control de la glucemia con terapia insulínica ha demostrado tener un efecto positivo en el tratamiento de la disfunción reproductiva, pues mejora las anormalidades menstruales y la tasa de fertilidad. Sin embargo, este tratamiento no es suficiente para la mayoría de las personas, ya que muchas de las irregularidades persisten [55].

Por lo anterior y debido a la incidencia de este padecimiento es importante comprender los mecanismos que relacionan a la diabetes con la disfunción reproductiva para poder mejorar e incluso solucionar el problema de la disfunción reproductiva diabética. Algunos investigadores han planteado que dicho problema podría originarse en un mal funcionamiento del eje reproductor durante la condición diabética, por lo cual se han realizado estudios al respecto [56].

2.1 HIPOTÁLAMO Y GONADOTROPINAS

Tanto en humanos diabéticos como en animales diabéticos experimentales se han reportado niveles basales de gonadotropinas bajos. Los estudios en animales sugieren que lo anterior puede deberse a una disminución en la liberación de GnRH y/o a una reducción en la sensibilidad de la hipófisis a dicha hormona, pues aún con una liberación normal de GnRH se presentan bajos niveles de LH y FSH [19]. Otros estudios indican que la reducción de gonadotropinas podría deberse a que los núcleos hipotalámicos que regulan la actividad de las neuronas GnRHérgicas disminuyen su estimulación, sin embargo, nada de esto ha sido comprobado por completo [57].

2.2 OVARIO

Los resultados de los estudios realizados en ovarios de modelos animales diabéticos muestran una disminución en la producción de las hormonas esteroideas progesterona y estrógeno. Esto podría deberse en parte a una reducción en la afinidad o en el número de receptores a gonadotropinas o a una estimulación disminuida por los bajos niveles de gonadotropinas [19].

La administración de insulina en los animales experimentales no mostró una mejora en los niveles de gonadotropinas pero sí en los de estrógenos [19], [57]. Esto demuestra el efecto estimulador que se ha descrito para la insulina sobre la biosíntesis de esteroides [58], y a la vez podría explicar la recuperación parcial de la función reproductiva observada luego del tratamiento con insulina.

2.3 HIPÓFISIS Y VASCULATURA

Es escaso lo que se ha estudiado sobre los efectos de la diabetes en la hipófisis, tan sólo se ha sugerido que su función podría estar disminuida bajo dicha condición [59].

Por otro lado, a pesar de que se conocen los efectos de la hiperglucemia sobre la vasculatura y el rol que tiene la hipófisis en el eje reproductor, hasta ahora no hay investigaciones dirigidas al estudio de la vasculatura hipofisaria, lo cual sería muy relevante, pues como se explicó previamente, el sistema portal hipofisario juega un rol muy importante en la liberación, el transporte, la colecta y los patrones de secreción hormonal que determinan las diferentes respuestas del eje reproductor. Así pues, el estudio de posibles alteraciones en la vasculatura hipofisaria como parte de los mecanismos implicados en la disfunción reproductiva diabética es pertinente y sobresaliente, ya que es probable que la disfunción reproductiva diabética se deba a alteraciones en el sistema portal hipofisario.

2.4 MODELOS DE SÍNDROME DIABÉTICO

Los modelos animales son de gran importancia y utilidad para estudiar el desarrollo, tratamiento y prevención de enfermedades [60]. Tal es el caso de la diabetes mellitus, para cuyo estudio se han desarrollado modelos experimentales aplicados a diferentes niveles de organización; desde el subcelular (componentes celulares) hasta en individuos completos [61]. Los modelos en individuos completos pueden desarrollarse por manipulación genética, quirúrgica o nutricional, o por la aplicación de fármacos como el aloxano y la estreptozotocina (STZ). Los modelos con fármacos desarrollados en individuos completos como los roedores resultan ser de los más óptimos por su corto tiempo generacional, por la facilidad y bajo costo de mantenimiento relativos y por ser de los más completos en cuanto a la información que aportan [61]-[63].

Por lo anterior y debido a que la STZ ha demostrado una gran eficacia (80%) [64] y selectividad por las células β pancreáticas, en este trabajo se ha elegido dicho fármaco para producir un modelo murino con diabetes a fin de caracterizar posibles cambios en la estructura vascular hipofisiaria; específicamente, en la cobertura y número de ramificaciones capilares, lo cual podría repercutir en la comunicación del eje reproductor.

3 Hipótesis

Los ratones hembra con síndrome diabético presentarán cambios anatómicos en la vasculatura capilar hipofisaria.

4 Objetivo

Identificar los posibles cambios anatómicos en la vasculatura hipofisaria de ratones hembra con síndrome diabético.

OBJETIVOS PARTICULARES

Inducir un modelo de síndrome diabético en ratones hembra Balb-C a través de la administración de estreptozotocina.

Determinar los posibles cambios en la cobertura de los capilares adenohipofisarios de ratones hembra control y con síndrome diabético.

Comparar el número de ramificaciones capilares adenohipofisarias de ratones hembra control y con síndrome diabético.

5 Método

5.1 ANIMALES

Se utilizaron 14 ratones hembra Balb-C en edad reproductiva (entre ocho y diez semanas de edad). Estos animales se mantuvieron en el Bioterio de la Facultad de Ciencias, con alimento y agua *ad libitum* y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Norma oficial mexicana NOM-062-zoo-1999 de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

5.2 INDUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE SÍNDROME DIABÉTICO

Para la inducción del modelo se formaron dos grupos aleatoriamente: control (n=6) y síndrome diabético (SD) (n=8). El grupo de síndrome diabético contó con una cantidad de ratones mayor debido a la efectividad del tratamiento con estreptozotocina reportado en la literatura (80%) [64]. El grupo experimental recibió, por dos días consecutivos, dos dosis intraperitoneales de estreptozotocina (120 mg/kg) (Santa Cruz Biotechnology, U-9889) diluida en buffer de citratos (5 µL/kg), mientras que al grupo control sólo se le administró el vehículo.

Con la finalidad de caracterizar los síntomas humorales y clínicos del síndrome diabético (hiperglucemia, pérdida de peso corporal, polidipsia y polifagia) se realizó la medición de glucemia con un ayuno de 8 h (con un glucómetro Free Style Optium Neo), se registró el peso corporal, el consumo de agua y alimento previo a la inducción del modelo y en los días 7, 14 y 21 post-tratamiento.

Debido a que la literatura señala que la mayor parte de los animales con síndrome diabético presenta diestro persistente, se utilizó dicha fase del ciclo estral para obtener resultados comparables entre el grupo experimental con el control. Para conocer la fase del ciclo estral se realizaron citologías vaginales a cada uno de los ratones diariamente desde una semana antes de la inducción del modelo y hasta el final del experimento. Con el microscopio invertido (Nikon Diaphot 300) se identificaron las poblaciones celulares de acuerdo con el criterio de clasificación de Marcondes et al

2002 [65] para determinar las fases del ciclo estral, en el cual, el diestro se caracteriza por tener una población celular en la que predominan los leucocitos.

5.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS: HIPÓFISIS

Después de 21 días del inicio del tratamiento, los animales fueron perfundidos intracardiamente con paraformaldehído (PFA) 4% y tinta china para fijar y pintar los capilares de la hipófisis.

Para ello, los ratones se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (20 mg/kg), y una vez sedados se realizó la operación para canular el corazón. Previamente a la introducción de la cánula se inyectaron 100 µl de heparina para evitar la formación de coágulos de sangre y con ello la obstrucción de la vasculatura durante la perfusión. Después, con ayuda de una bomba peristáltica se hizo pasar solución salina 0.9% durante 10 min y tinta china diluida en PFA 4% (1:30) por otros 10 min a una velocidad de (1.6 ml/min). Concluida la perfusión se extrajo la hipófisis, la cual se postfijó por inmersión en PFA 4% durante 4 h y se conservó posteriormente en un “buffer” de fosfatos salino (PBS 1X) hasta su uso.

Una vez fijada, la hipófisis se embebió en agar al 3% (Invitrogen; Eugene Or, USA) disuelto en PBS 1X. Después de solidificar, el agar con la hipófisis se pegó en la platina de un vibratomo (Leica VT1000S) para obtener una serie de rebanadas hipofisiarias de 130 µm de grosor, las cuales se montaron desde la más dorsal hasta la más ventral (Figura 7) sobre un portaobjetos tratado previamente con poly-L-lisina al 30% (Sigma, St Louis MO, USA). Finalmente, se colocó medio de montaje y un cubreobjetos sobre las rebanadas para conservar en buen estado el tejido.

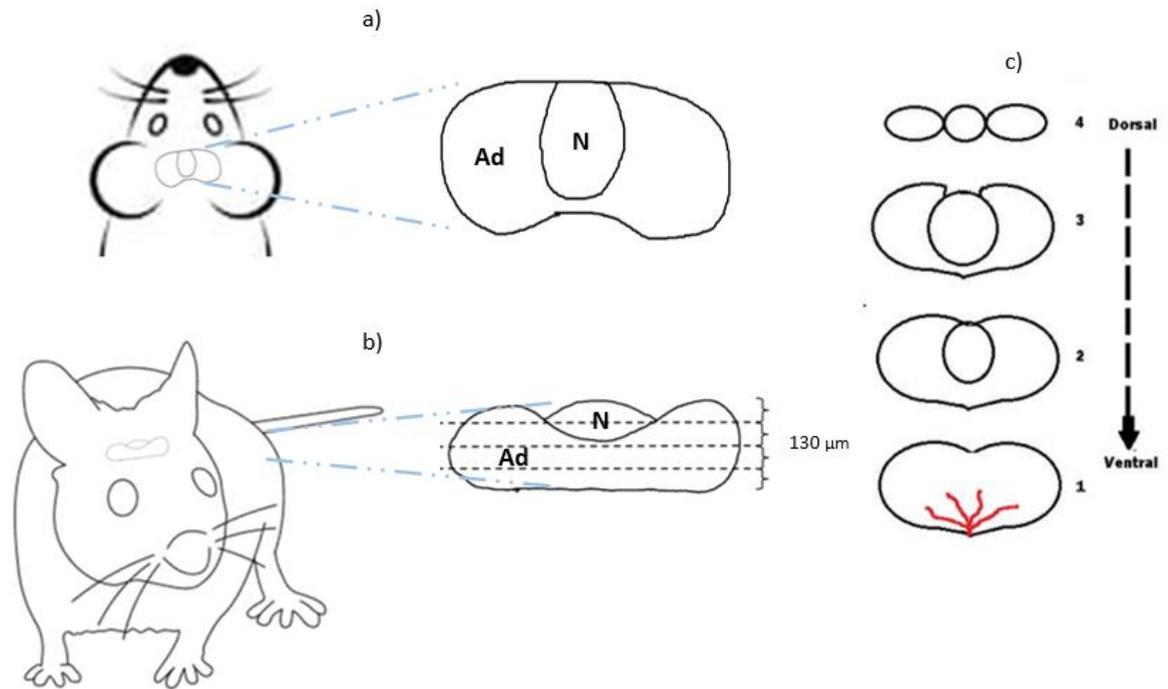


Figura 7. Obtención de rebanadas hipofisarias. a) Ejemplificación de cómo se ve la hipófisis sobre el hueso esfenoides, observando a un ratón desde su mitad dorsal. Se distingue la adenohipófisis de la neurohipófisis. b) Ejemplifica cómo se ve la hipófisis, observando a un ratón desde su porción frontal o anterior. Se distingue la adenohipófisis de la neurohipófisis. Las líneas punteadas representan la manera en la que se realizaron los cortes de 130 µm para obtener las rebanadas hipofisarias. c) Representación de las rebanadas hipofisarias que resultaron de los cortes en el vibratomo; nótese que en las rebanas más dorsales hay tanto neurohipófisis como adenohipófisis, mientras que en las rebanas más ventrales la neurohipófisis está prácticamente ausente, habiendo solamente tejido adenohipofisiario. Adenohipófisis (Ad) y neurohipófisis (N).

5.4 ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES

La adquisición de imágenes se realizó con un microscopio confocal (Leica TCS SP8). Se tomaron fotos en campo claro con un objetivo de aumento 20X y se hizo una reconstrucción xy de cada una de las rebanadas de todas las hipófisis.

Posteriormente, con ayuda del programa Image J se midió la cobertura vascular (Figura 8). Los valores obtenidos de todas las rebanadas de cada hipófisis se sumaron para obtener la cobertura vascular total de la hipófisis. Esto se hizo para todas las glándulas hipofisarias.

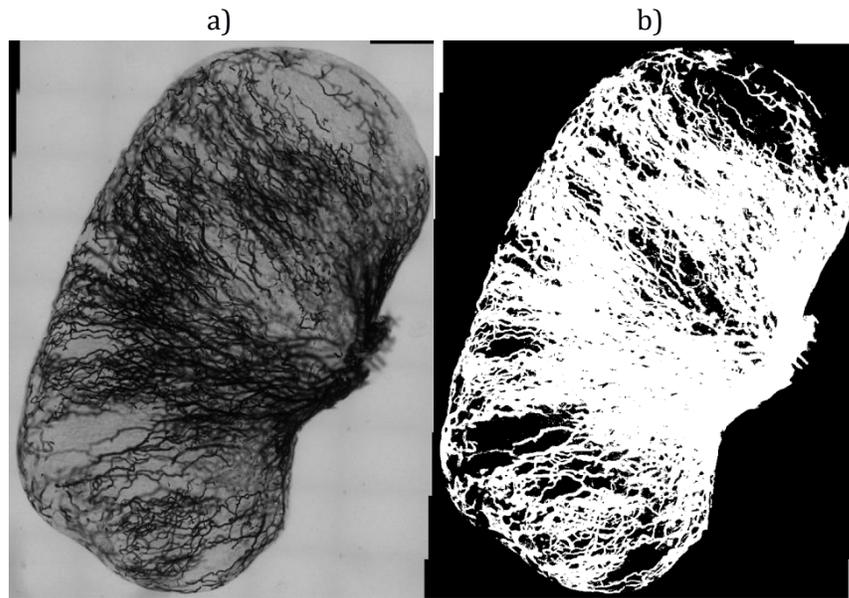


Figura 8. Obtención de la cobertura vascular. a) Se muestra una imagen original adquirida con el microscopio después de la reconstrucción xy . b) Imagen binaria obtenida, a partir de la imagen original, con una herramienta del software Image J. El área de color blanco es reconocida por el software como el área ocupada por los capilares sanguíneos de la adenohipófisis, a partir de la cual se obtiene el área de la cobertura vascular respecto al área total de la imagen delimitada por la adenohipófisis.

En cuanto a las ramificaciones capilares, con el mismo programa Image J se marcaron y contabilizaron las ramificaciones capilares primarias, secundarias y terciarias (Figura 9) de cada una de las rebanadas de todas las hipófisis. Para contar las ramificaciones vasculares se seleccionaron cuatro cuadrantes al azar en cada rebanada (Figura 10), y al final se sumaron los resultados de todos los cuadrantes para cada hipófisis.

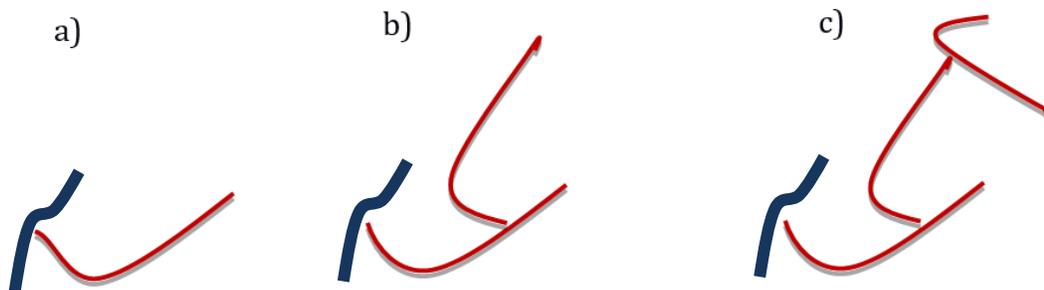


Figura 9. Ejemplificación de los diferentes tipos de ramificaciones capilares. a) La ramificación capilar primaria (representada en color rojo) corresponde a un capilar que se deriva directamente de una vénula portal hipofisiaria (representada en color azul). b) La ramificación capilar secundaria brota del capilar principal o ramificación capilar primaria y c) el capilar que brota de la ramificación capilar secundaria es una ramificación capilar terciaria

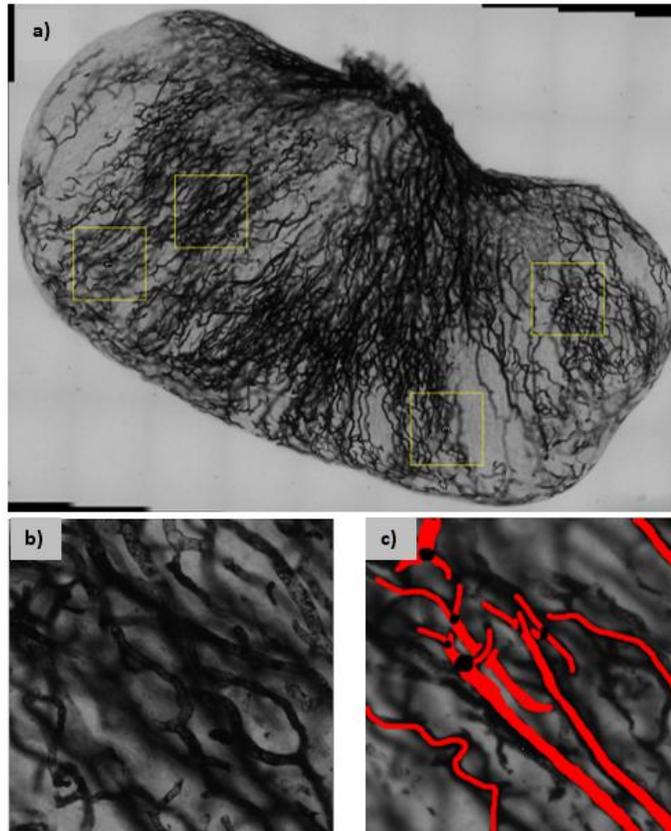


Figura 10. Contabilización de ramificaciones capilares. a) Con las herramientas del software Image J, se marcaron cuatro cuadrantes en diferentes regiones de cada rebanada hipofisiaria. b) Cada cuadrante se duplicó, obteniendo una imagen ampliada de las regiones correspondientes. c) En las imágenes ampliadas, con las herramientas del software Image J, se marcaron y contabilizaron las ramificaciones capilares primarias, secundarias y terciarias de acuerdo con lo descrito en la imagen 9.

5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos obtenidos se analizaron con el software GraphPad Prism 6, los cuales inicialmente se sometieron a una prueba de normalidad y homogeneidad de varianzas. Posteriormente, los datos obtenidos de la caracterización del modelo (consumo de agua y alimento, peso corporal y glucemia) se analizaron con un ANOVA de dos vías y una prueba de comparación múltiple para comparar los cambios entre los dos grupos (control y con síndrome diabético) y a lo largo del tiempo.

A los datos obtenidos con Image J respecto a la cobertura capilar y al número de ramificaciones capilares primarias, secundarias y terciarias, luego de probar normalidad y homogeneidad de varianzas, se les aplicó un ANOVA de una vía para comparar de esta manera la estructura vascular entre el grupo tratado y el grupo control.

6 Resultados

6.1 CARACTERIZACIÓN DEL MODELO

La inducción de síndrome diabético por la administración de estreptozotocina (STZ) tuvo una eficiencia del 73%. Los animales tratados con dicho fármaco presentaron un aumento en la glucemia a partir de 7 días después de la inducción y hasta el final del experimento, cuyo valor >200 mg/dl valida la hiperglucemia que caracteriza a la diabetes (Figura 11a). En cambio, el grupo control tuvo valores <100 mg/dl a lo largo de todo el experimento. Respecto al peso corporal, se observó una pérdida progresiva en el grupo experimental (SD) a partir de los siete días post-tratamiento y hasta los 21 días cuando terminó el experimento, mientras que en el grupo control el peso se mantuvo prácticamente como en el estado inicial (Figura 11b). En cuanto al consumo de agua puede verse (Figura 11c) que, en efecto, el grupo experimental (SD) presentó el signo clínico de polidipsia característico del síndrome diabético 14 días después del tratamiento con STZ, el cual fue aún más notable a los 21 días post-tratamiento. En la gráfica (Figura 11d) se puede ver que hay una diferencia en el consumo de alimento entre el grupo control y el experimental. Aunque no es muy notable la diferencia entre los grupos, se puede apreciar que en el transcurso del experimento hubo un aumento en el consumo de alimento. Además, dentro del grupo control se puede observar que el consumo se mantuvo relativamente constante, mientras que dentro del grupo experimental aumentó a lo largo del experimento.

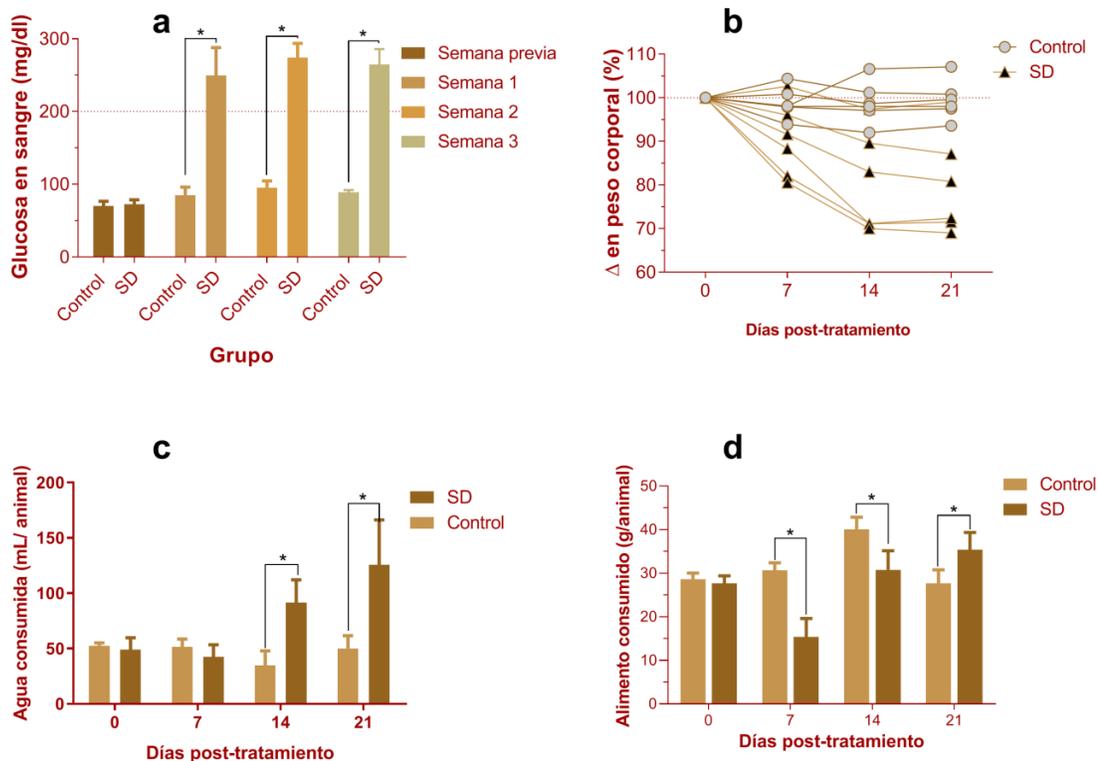


Figura 11. Caracterización del modelo. a) Niveles de glucosa en sangre. La línea punteada en indica el valor utilizado como parámetro de inclusión para el grupo con SD. b) Cambio en el peso corporal (delta) respecto al valor inicial normalizado. Se puede ver que el peso corporal en el grupo control se redujo hasta en un 20% al final del experimento. c) Consumo de agua. d) Consumo de alimento. Los asteriscos en todas las gráficas indican la existencia de diferencias significativas.

En la figura 12 se muestra el seguimiento del ciclo estral en ambos grupos antes y después de la inducción del modelo. Cada color representa las diferentes fases del ciclo estral, los carriles enumerados del 1-6 representan a cada uno de los animales y las filas corresponden a los días en los que transcurrió el experimento. Se puede observar que antes de la inducción del modelo en ambos grupos había ciclicidad, pues se forma un mosaico de cuadros de diferente color que se traduce en el cambio consecutivo de una fase del ciclo estral a otra. Sin embargo, después de que los ratones del grupo experimental fueron tratados con STZ (después de la franja blanca con rombos) ya no se observa el mosaico multicolor sino uno predominantemente rojo, color que representa la fase del diestro del ciclo estral. Esto se traduce a una pérdida de la ciclicidad. Por otro lado, el mosaico multicolor de los días post-tratamiento que se ve en el gráfico del grupo control muestra que en este grupo sí se presentaron ciclos consistentes hasta el final del experimento.

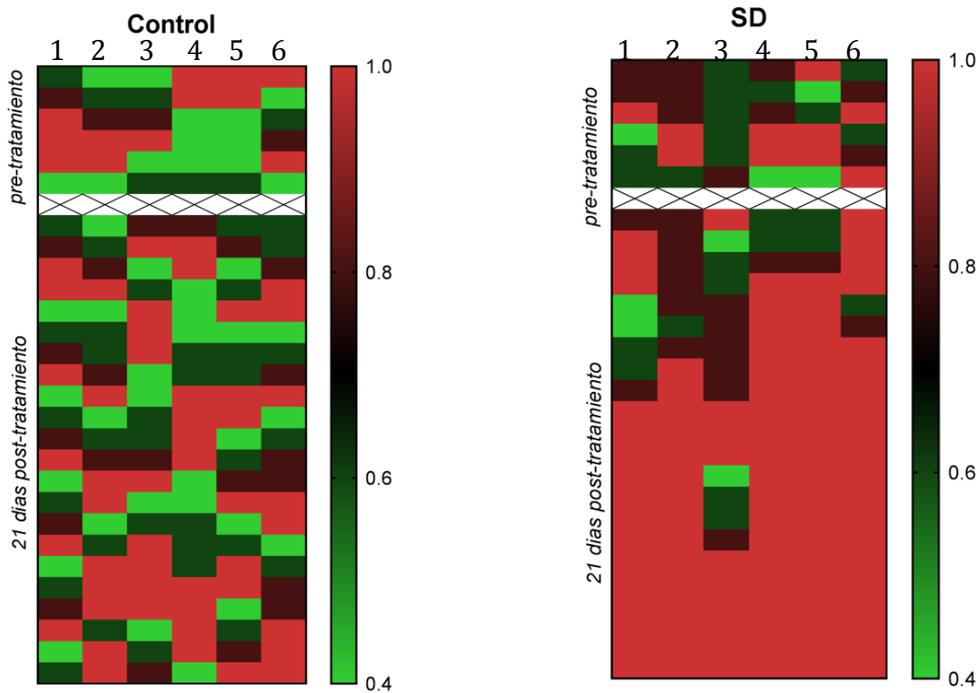


Figura 12. Rastreo del ciclo estral del grupo control y con SD antes y después del tratamiento. Cada color representa las diferentes fases del ciclo estral; 0.4=proestro, 0.6=estro, 0.8=metaestro, 1.0=diestro. Los carriles enumerados del 1-6 representan a cada uno de los ratones, y cada fila corresponde a los días en los que transcurrió el experimento. La franja blanca con rombos separa a los días pre-tratamiento de los post-tratamiento.

En la figura 13 se puede ver cómo se pintó la vasculatura capilar hipofisaria después de la perfusión. Las imágenes superiores corresponden a hipófisis del grupo control y las inferiores al grupo con SD. Si bien no se llevó a cabo alguna medición, se pudieron apreciar ciertas diferencias en el tamaño y consistencia de las glándulas de los diferentes grupos; las glándulas de ratones con SD parecían más blandas y pequeñas que las del grupo control.

Por otra parte, en la figura 14 se muestran acercamientos de regiones análogas en una rebanada hipofisaria perteneciente a un ratón control y otra que es de un ratón con SD. Igualmente, aunque no se realizó alguna medición para determinar diferencias en el diámetro vascular, se observó cierta disminución en el calibre de los capilares hipofisarios de los ratones del grupo con SD respecto a los capilares de los ratones del grupo control.

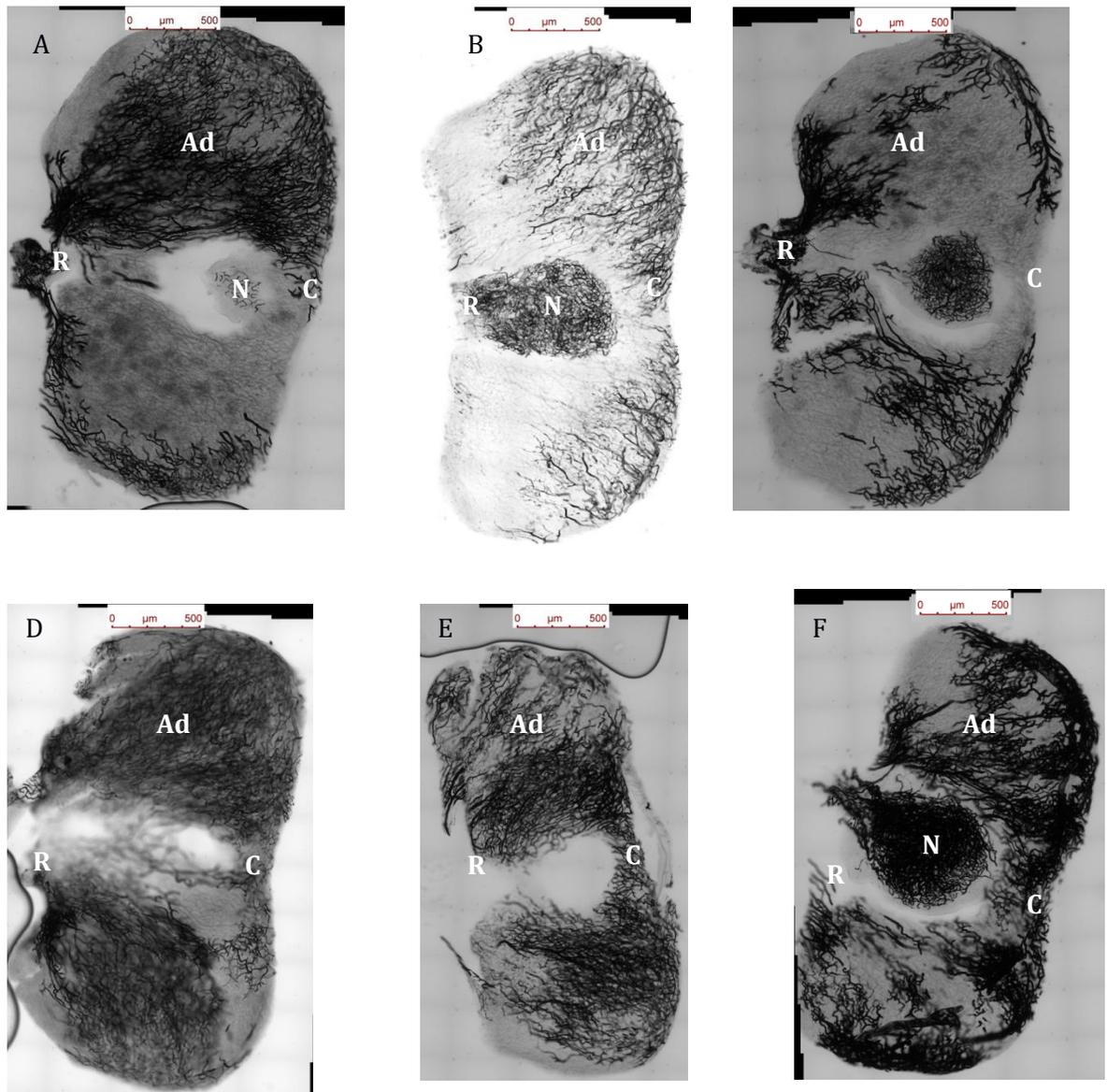


Figura 13. Rebanadas hipofisarias de ratones control (A-C) y con SD (D-F). Cada una corresponde a la rebanada número 3 (de la más dorsal a la más ventral), y observando cada imagen se puede diferenciar la parte rostral de la hipófisis (R) y la parte caudal (C). Todas fueron adquiridas con un objetivo de aumento 20X. Adenohipófisis (Ad) y neurohipófisis (N).

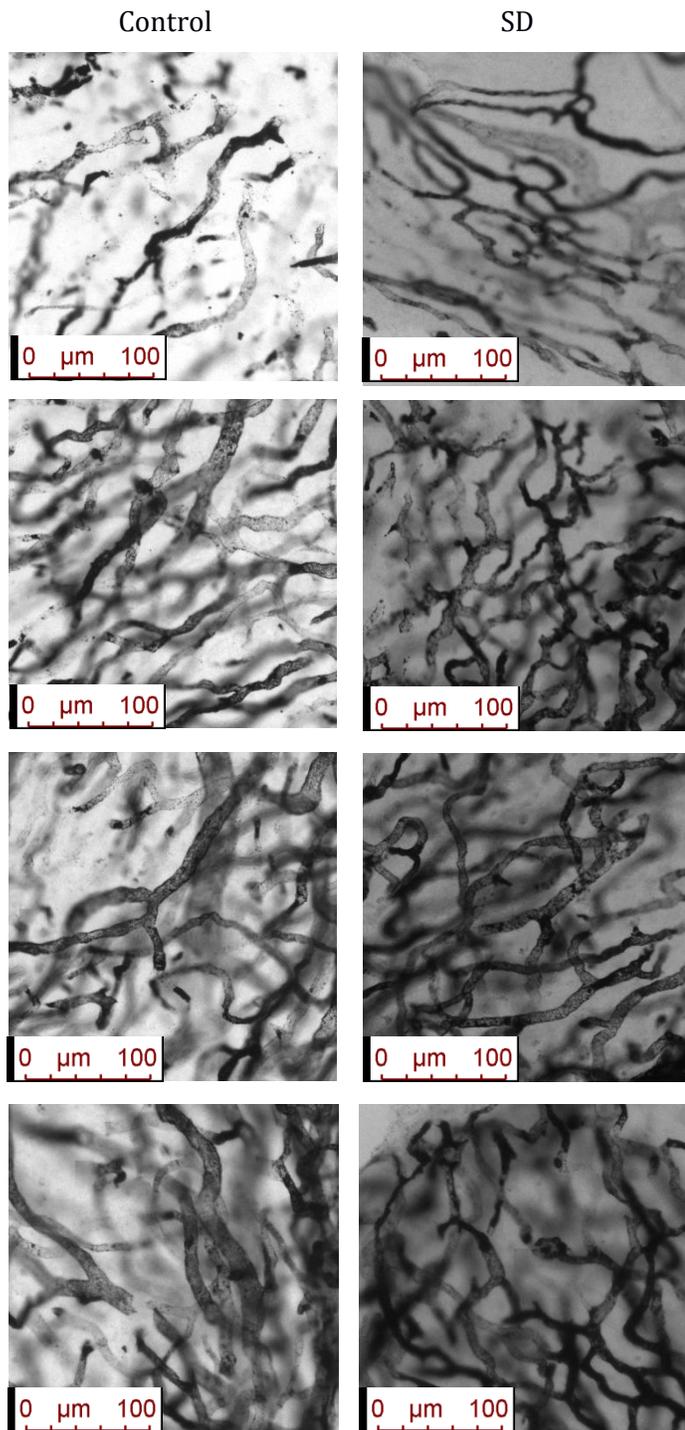


Figura 14. Acercamientos de regiones análogas en una rebanada hipofisiaria de ratón control (lado izquierdo) y con SD (lado derecho). Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo de aumento 20X.

6.2 COBERTURA VASCULAR

En la figura 15 se puede ver que el grupo control tiene una cobertura vascular mayor que el grupo con síndrome diabético. Sin embargo, de acuerdo con el análisis estadístico esta diferencia no es significativa, es decir, no hubo cambios en la cobertura vascular hipofisiaria de los ratones hembra con síndrome diabético comparada con la de los ratones del grupo control.

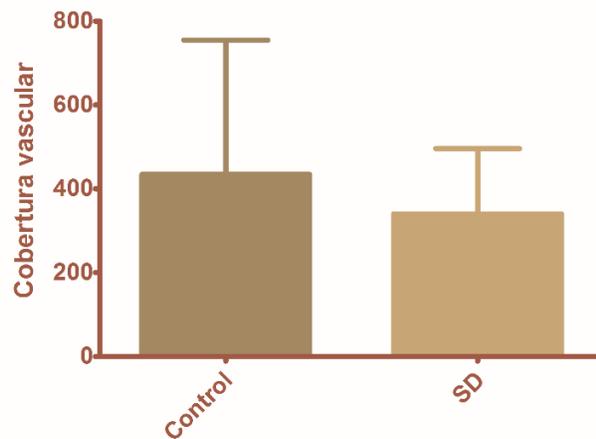


Figura 15. Gráfica de barras muestra la cobertura vascular en el grupo control y con síndrome diabético.

6.3 RAMIFICACIONES VASCULARES

En la figura 16 puede observarse que de todos los tipos de ramificaciones capilares (primarias, secundarias y terciarias) hay un número mayor en el grupo control que en el experimental, sin embargo, las únicas con diferencias significativas entre grupos fueron las secundarias. Es decir, el grupo control presentó una cantidad significativamente mayor de ramificaciones secundarias comparado con el grupo con SD. Además, las ramificaciones secundarias fueron significativamente mayores en número respecto a las primarias y a las terciarias para ambos grupos.

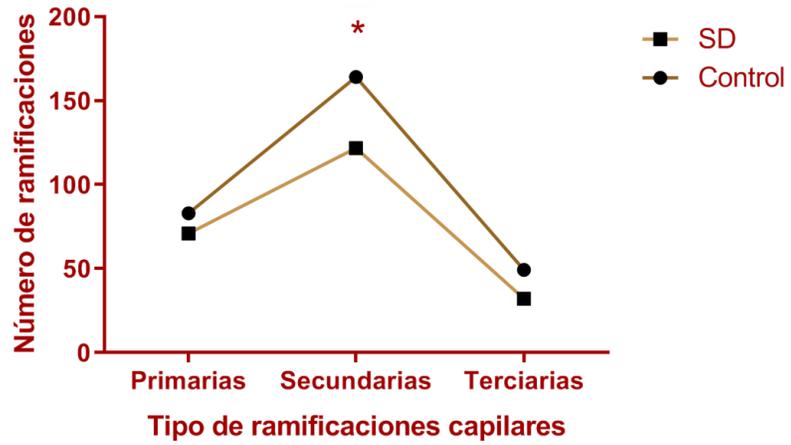


Figura 16. Grafica de puntos conectados por líneas que muestra las ramificaciones capilares de la adenohipófisis. Número de ramificaciones primarias, secundarias y terciarias en el grupo control y con síndrome diabético.

7 Discusión

Debido a que la diabetes se relaciona con alteraciones del sistema vascular y por la importancia que tiene este en el mantenimiento de la función reproductiva, así como la asociación que se ha visto entre el padecimiento de diabetes y de la disfunción o pérdida de la reproducción [39], [43] en este trabajo se buscó incursionar en los posibles efectos que tiene el síndrome diabético en la estructura vascular hipofisiaria.

Para conseguir lo anterior, se utilizó un modelo murino con síndrome diabético inducido con estreptozotocina. La eficacia obtenida en el tratamiento fue del 73%, y se determinó tomando como parámetro de inclusión la obtención de un valor mayor o igual a 200 mg/dl de glucemia a partir de los siete días posteriores al tratamiento con STZ, valor que define al principal signo humoral del síndrome diabético, la hiperglucemia [40].

La medición semanal de la glucemia junto con la de otros signos clínicos como la pérdida de peso, la polidipsia, la polifagia y la pérdida de la ciclicidad reproductiva permitió caracterizar el modelo. La concentración de glucosa en sangre del grupo con SD, que fue tratado con STZ diluida en “buffer” de citratos, incrementó a un valor mayor de 200 mg/dl a partir de una semana después del tratamiento, mientras que la glucemia en el grupo control, que fue tratado sólo con el vehículo (“buffer” de citratos), se mantuvo en niveles normales (100 mg/dl en promedio) durante todo el experimento. El peso corporal, a la inversa de la glucemia, disminuyó en el grupo con SD, mientras que en el grupo control se mantuvo prácticamente estable.

En cuanto al consumo de agua, en la figura 11c se puede ver que el signo de polidipsia se presentó en el grupo con SD a los 14 días de la inducción del modelo, duplicándose en este punto la cantidad de agua consumida antes del tratamiento con STZ y triplicándose a los 21 días post-tratamiento. Lo anterior no ocurrió en el grupo control, en el cual se observa un consumo de agua constante a lo largo del experimento. Por otro lado, en la figura 11d puede notarse la manifestación de la polifagia, ya que el consumo de alimento en el grupo con SD también aumentó, aunque no tan radicalmente como el consumo de agua. A pesar de la

disminución que se observa en la segunda semana, la tendencia en el consumo de alimento en este grupo es creciente, mientras que en el grupo control es relativamente constante.

Finalmente, en cuanto a la caracterización del modelo, el seguimiento diario del ciclo estral en ambos grupos demostró que en los ratones con SD dicho ciclo se desreguló después de la inducción del modelo, perdiendo la ciclicidad y presentando un diestro persistente. Por su parte, el grupo control tuvo ciclos regulares antes y después del tratamiento.

Como puede verse, los resultados obtenidos de la caracterización del modelo coinciden con lo que se ha descrito en la literatura; aumento en los niveles de glucosa, en el consumo de agua y de alimento, y pérdida de peso y de la ciclicidad reproductiva [42], [54]. De esta manera se pudo afianzar la funcionalidad del modelo y realizar los otros procedimientos para identificar posibles cambios anatómicos en la vasculatura hipofisiaria de los ratones con SD.

Es bien sabido que en gente diabética los ojos y los riñones son de los órganos más gravemente afectados debido a que los capilares sanguíneos son dañados por la hiperglucemia persistente, perjudicando la función y estructura de dichos órganos [43], [66]. Acorde con lo anterior y durante el desarrollo de este trabajo, la estructura general de la hipófisis, que es una glándula altamente vascularizada, se vio afectada también en los animales con SD. Si bien las glándulas no fueron medidas ni pesadas, se pudieron observar ciertas diferencias en las glándulas provenientes de animales con SD respecto a las control; las primeras eran más pequeñas y blandas comparadas con las que pertenecían a los animales control (Figura 13).

Lo anterior puede deberse igualmente a los cambios observados en la estructura vascular hipofisiaria, pues como se mencionó anteriormente la vasculatura está involucrada en diversos procesos que permiten mantener la homeostásis [44], por lo que modificaciones en su estructura pueden alterar el adecuado funcionamiento de dichos procesos, afectando a la vez la función y estructura de órganos y tejidos que dependen del suministro de los factores transportados por la vasculatura. Por un lado, y aunque no se hizo un análisis para determinar el diámetro vascular, se pudieron percibir ciertas diferencias en el calibre de los vasos sanguíneos. Los capilares de los ratones diabéticos se veían más alargados y delgados que los de los ratones control (Figura 14).

Por otra parte se observó que había un número mayor de ramificaciones capilares primarias, secundarias y terciarias en el grupo control que en el grupo con SD y que la única diferencia significativa entre grupos se presentó sólo en las ramificaciones secundarias. Las diferencias también fueron significativas entre las ramificaciones secundarias respecto a las primarias y las secundarias respecto a las terciarias dentro de cada grupo, habiendo en ambos casos una mayor cantidad de ramificaciones secundarias, lo cual indicaría que gran parte de la estructura vascular hipofisiaria está conformada por ramificaciones capilares secundarias. Es posible que esto se relacione con una función óptima de los vasos de acuerdo con su calibre. Es decir, que el diámetro que alcanzan los vasos correspondientes a las ramificaciones secundarias es el más eficiente para llevar a cabo el transporte de gases, nutrientes y desechos a través de toda la adenohipófisis.

Lo anterior explicaría, al menos en parte, la disminución en la cantidad de ramificaciones secundarias observada en el grupo con SD. Debido a que los vasos sanguíneos conforme se ramifican disminuyen su diámetro [67] y a que bajo la condición diabética se observó que en la adenohipófisis el calibre vascular aparentemente disminuye aún más, se podría pensar que producir más ramificaciones secundarias en este caso comprometería un adecuado transporte por la disminución del diámetro *óptimo*, pues esto aumentaría la resistencia y en consecuencia disminuiría el flujo sanguíneo [13], [66], [68].

Así, el que los vasos sanguíneos del grupo con SD se perciban más alargados que los observados en el grupo control puede considerarse como una manera de compensar la superficie de intercambio perdida por la disminución en la cantidad de ramificaciones secundarias. Esta idea puede ser igualmente sustentada por el hecho de que no hubo diferencias significativas en cuanto a la cobertura vascular. Asimismo, el que no haya habido cambios en la cobertura vascular quizá se deba a que el nicho vascular en la glándula es lo suficientemente grande que sería difícil notar cambios a menos que estos fueran muy drásticos, lo cual arriesgaría enormemente la función endocrina.

Desde otra perspectiva, la disminución en la cantidad de capilares adenohipofisiarios, así como el adelgazamiento y el alargamiento de estos percibidos en el grupo con SD también puede ser la expresión de un daño endotelial como el que se ha observado en otras anomalías asociadas con la condición diabética, tales como la retinopatía, en las cuales alteraciones en la

angiogénesis, sobreproducción de vasoconstrictores y ROS, así como apoptosis acelerada de pericitos y células endoteliales, etc. perturban la estructura y función endotelial [21], [45], [69].

Así, todo lo anterior aunado a otro hecho como el que la viscosidad sanguínea aumenta bajo la condición diabética [70] y por lo tanto aumenta también la resistencia del flujo sanguíneo, permite ver que en efecto existen cambios estructurales en la vasculatura hipofisaria que podrían relacionarse con la disfunción reproductiva diabética, ya que dichos cambios, como se explicó, pueden afectar el flujo sanguíneo, y con ello la propagación de los diferentes pulsos hormonales que determinan la secreción de LH o FSH.

Finalmente, otra diferencia observada durante el desarrollo de este trabajo fue que las glándulas de ratones con SD se pintaron más homogéneamente que las de los ratones del grupo control, en la mayoría de las cuales hubo regiones que no se pintaron. Esto probablemente se deba a una diferencia en la perfusión del PFA con la tinta china relacionada con la resistencia al flujo. Es posible pensar que, como se mencionó anteriormente, por la disminución observada en el calibre vascular de los capilares hipofisarios de ratones con SD la perfusión de PFA con tinta china fuera más lenta por el aumento en la resistencia, dando relativamente más tiempo para que los capilares se pintaran. Por su parte, la perfusión en hipófisis del grupo control, al no enfrentar una resistencia mayor, se llevaba a cabo más rápidamente, sin oportunidad de pintar adecuadamente los capilares.

8 Conclusión

Aunque se había previsto un cambio estructural de la vasculatura en cuanto a la cobertura, y visualmente llegó a percibirse una disminución de la misma en el grupo con SD, estadísticamente la cobertura vascular no se vio afectada por el SD como se pensó al inicio.

Por el contrario, considerando a las ramificaciones vasculares, sí hubo cambios en la estructura vascular hipofisiaria de los ratones con SD. Las ramificaciones primarias, secundarias y terciarias en general disminuyeron en el grupo con SD, siendo los cambios más sobresalientes los de las ramificaciones secundarias.

Lo anterior aunado a las observaciones acerca del diámetro vascular permitió determinar que sí hay cambios anatómicos en la vasculatura hipofisiaria de ratones hembra con SD que podrían ser asociados a la disfunción reproductiva diabética.

9 Perspectivas

A pesar de que con los resultados obtenidos en este trabajo se pudieron dilucidar diferencias en la estructura vascular hipofisiaria de ratones hembra con SD, el empleo de algún método más sensible como el de inmunohistoquímica podría ayudar a obtener resultados y análisis más precisos en cuanto a la cobertura vascular y a las ramificaciones vasculares, ya que con dicho método se podrían adquirir imágenes 3D sobre las cuales se pueden aplicar métodos de análisis automatizados de gran precisión. Aunado a esto, sería importante medir el calibre de los vasos sanguíneos para asegurar que existe una diferencia significativa que podría influir en el flujo sanguíneo como se explicó en la discusión. También sería relevante averiguar si se producen cambios en la relación entre la vasculatura y las células gonadotrópicas, ya que como se describió en un principio, la vasculatura forma redes con los gonadotropos que junto con los mecanismos de vasoconstricción y vasodilatación son una parte importante para la regulación de la secreción pulsátil [12].

Literatura citada

- [1] Martin, S, (2013), "Comunicación celular", en *Biología*, México: CENGAGE.
- [2] C. Cocco, C. Brancia, G. Corda, y G. L. Ferri, "The hypothalamic-pituitary axis and autoantibody related disorders", *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, núm. 11, 2017.
- [3] G. T. Ooi, N. Tawadros, y R. M. Escalona, "Pituitary cell lines and their endocrine applications", *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 228, núm. 1-2, pp. 1-21, 2004.
- [4] S. Melmed, *The pituitary*, Tercera ed. 2011.
- [5] Y. Xie y R. I. Dorsky, "Development of the hypothalamus: conservation, modification and innovation", *Development*, vol. 144, núm. 9, pp. 1588-1599, 2017.
- [6] S. Miyata, "Advances in understanding of structural reorganization in the hypothalamic neurosecretory system", *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 8, núm. OCT, pp. 1-18, 2017.
- [7] Saladin, K. (2013). "El aparato circulatorio: vasos sanguíneos y circulación" y "Sistema endocrino", en *Anatomía y fisiología*, México: McGrawHill.
- [8] M. C. Vázquez-Borrego *et al.*, "Multiple signaling pathways convey central and peripheral signals to regulate pituitary function: Lessons from human and non-human primate models", *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2017.
- [9] S. S. Stojilkovic, J. Tabak, y R. Bertram, "Ion channels and signaling in the pituitary gland", *Endocr. Rev.*, vol. 31, núm. 6, pp. 845-915, 2010.
- [10] M. Dorton, "The pituitary gland: embryology, physiology, and pathophysiology.", *Neonatal Netw.*, vol. 19, núm. 2, pp. 9-17, 2000.
- [11] W. F. Boron y E. L. Boulpaep, "Organization of Endocrine Control", en *Medical Physiology*, Segunda ed., 2012, pp. 1016, 1017.
- [12] P. Le Tissier, P. Campos, C. Lafont, N. Romanò, D. J. Hodson, y P. Mollard, "An updated view of hypothalamic-vascular-pituitary unit function and plasticity", *Nature Reviews*

Endocrinology. 2017.

- [13] Guyton, A. (2016). "Visión general de la circulación; biofísica de la presión, el flujo y la resistencia" y "Hormonas hipofisarias y su control por el hipotálamo", en *Tratado de Fisiología Médica*, España: Elsevier.
- [14] S. autor (Universidad A. del E. de México), "Sistema porta hipotálamo hipofisario", 2016. [En línea]. Disponible en: <https://www.studocu.com/es-mx/document/universidad-autonoma-del-estado-de-mexico/anatomia/ejercicios-obligatorios/sistema-porta-hipotalamo-hipofisario/2962312/view>.
- [15] C. G. M. Van Dijk *et al.*, "The complex mural cell: Pericyte function in health and disease", *Int. J. Cardiol.*, vol. 190, pp. 75–89, 2015.
- [16] S. Autor, "Hemodinámica del sistema vascular", 2013. [En línea]. Disponible en: <http://esthernajeraw.blogspot.com/2013/02/hemodinamia-del-sistema-vascular.html>.
- [17] A. Kaprara y I. T. Huhtaniemi, "The hypothalamus-pituitary-gonad axis: tales of mice and men", *Metabolism*, pp. 1–15, 2017.
- [18] J. M. Jin y W. X. Yang, "Molecular regulation of hypothalamus-pituitary-gonads axis in males", *Gene*, vol. 551, núm. 1, pp. 15–25, 2014.
- [19] R. F. Arrais y S. A. Dib, "The hypothalamus-pituitary-ovary axis and type 1 diabetes mellitus: A mini review", *Hum. Reprod.*, vol. 21, núm. 2, pp. 327–337, 2006.
- [20] A. Comninos, "The Role of Kisspeptin in Reproduction", vol. 15, núm. 3, pp. 1–11, 2014.
- [21] M. Schaeffer, D. J. Hodson, C. Lafont, y P. Mollard, "Endocrine cells and blood vessels work in tandem to generate hormone pulses", *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 47, núm. 2, 2011.
- [22] C. Cao *et al.*, "Reproductive role of miRNA in the hypothalamic-pituitary axis", *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 88, núm. September 2017, pp. 130–137, 2018.
- [23] G. A. Stamatiades y U. B. Kaiser, "Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression", *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2017.

- [24] K. P. Hsieh y T. F. Martin, "Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins Gq and G11", *Mol Endocrinol*, vol. 6, núm. 10, pp. 1673–1681, 1992.
- [25] N. Mizuno y H. Itoh, "Functions and regulatory mechanisms of Gq-signaling pathways", *NeuroSignals*, vol. 17, núm. 1, pp. 42–54, 2009.
- [26] D. J. Haisenleder, A. C. Dalkin, G. A. Ortolano, J. C. Marshall, y M. A. Shupnik, "A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: Evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo", *Endocrinology*, vol. 128, núm. 1, pp. 509–517, 1991.
- [27] J. Botella Llusia, "El ovario, fisiología y patología", 1995. [En línea]. Disponible en: [https://books.google.com.mx/books?id=gGtGhq-f28UC&pg=PA91&lpg=PA91&dq=fisiologia+de+las+gonadotropinas&source=bl&ots=iPWRI-7CaL&sig=3gz8AaMynDJ-dzpTo2yQDf7Iv-M&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiLx_bGurLZAhXIyVMKHagkDEM6AEITTAD#v=onepage&q=fisiologia de las gonadotr.](https://books.google.com.mx/books?id=gGtGhq-f28UC&pg=PA91&lpg=PA91&dq=fisiologia+de+las+gonadotropinas&source=bl&ots=iPWRI-7CaL&sig=3gz8AaMynDJ-dzpTo2yQDf7Iv-M&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiLx_bGurLZAhXIyVMKHagkDEM6AEITTAD#v=onepage&q=fisiologia%20de%20las%20gonadotr.)
- [28] J. Tresguerres, "Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico (Capítulo 79)", *Fisiol. del Sist. Endocrino*, pp. 1007–1023, 2009.
- [29] B. Lunenfeld y K. Bühler, "The neuro control of the ovarian cycle – a hypothesis", *Gynecol. Endocrinol.*, vol. 0, núm. 0, pp. 1–5, 2017.
- [30] N. Bellefontaine *et al.*, "Leptin-dependent neuronal signaling in the preoptic hypothalamus facilitates reproduction", *J. Clin. Invest.*, vol. 124, núm. 6, pp. 2550–2559, 2014.
- [31] I. J. Clarke y L. Arbabi, "New concepts of the central control of reproduction, integrating influence of stress, metabolic state, and season", *Domest. Anim. Endocrinol.*, vol. 56, pp. S165–S179, 2016.
- [32] M. Manfredi-Lozano, J. Roa, y M. Tena-Sempere, "Connecting metabolism and gonadal function: Novel central neuropeptide pathways involved in the metabolic control of

- puberty and fertility”, *Front. Neuroendocrinol.*, vol. 48, núm. May 2017, pp. 37–49, 2017.
- [33] J. W. Hill *et al.*, “NIH Public Access”, vol. 11, núm. 4, pp. 286–297, 2011.
- [34] K. R. Thiyagarajan Manjuladevi Moonishaa, Sunil Kumar Nanda, Muthukrishnan Shamraj, Rajendran Sivaa, Periyasamy Sivakumar, “Evaluation of Leptin as a Marker of Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Mellitus”, *Eval. Leptin as a Marker Insul. Resist. Type 2 Diabetes Mellit.*, vol. 7, núm. 3, pp. 176–180, 2017.
- [35] Arèvalo Josè, “Fisiologia De Pancreas”, *Asoc. Colomb. Endocrinol.*, vol. 23, núm. 3, pp. 7–11, 2007.
- [36] K. Chachlaki, J. Garthwaite, y V. Prevot, “The gentle art of saying NO: How nitric oxide gets things done in the hypothalamus”, *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 13, núm. 9, pp. 521–535, 2017.
- [37] C. Chabrolle, E. Jeanpierre, L. Tosca, C. Ramé, y J. Dupont, “Effects of high levels of glucose on the steroidogenesis and the expression of adiponectin receptors in rat ovarian cells.”, *Reprod. Biol. Endocrinol.*, vol. 6, p. 11, 2008.
- [38] E. Codner, P. M. Merino, y M. Tena-Sempere, “Female reproduction and type 1 diabetes: From mechanisms to clinical findings”, *Hum. Reprod. Update*, vol. 18, núm. 5, pp. 568–585, 2012.
- [39] S. A. E. Peters y M. Woodward, “Sex Differences in the Burden and Complications of Diabetes”, *Curr. Diab. Rep.*, vol. 18, núm. 6, p. 33, 2018.
- [40] P. Sesma y S. López, “Qué es la Diabetes”, *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 53, p. 160, 1989.
- [41] A. H. Skelly, “Type 2 Diabetes Mellitus”, *Nurs. Clin. North Am.*, vol. 41, núm. 4, pp. 531–547, 2006.
- [42] F. Rocca y J. Plá, “Síndrome diabético”, *Diabetes Mellit.*, pp. 77–93, 1963.
- [43] La FID, *Atlas de Diabetes*. 2013.
- [44] E. Vascular, E. P. Nobel, y P. Nobel, “Endotelio vascular”, pp. 1–3, 1998.
- [45] I. A., Rodrigo Julio; Galleguillos, “Diabetes y enfermedad vascular periférica”, *Rev. Med.*

Clin. Condes, vol. 20, núm. 5, pp. 687–697, 2009.

- [46] R. Muc, A. Saracen, y I. Grabska-Liberek, “Associations of diabetic retinopathy with retinal neurodegeneration on the background of diabetes mellitus. Overview of recent medical studies with an assessment of the impact on healthcare systems”, *Open Med.*, vol. 13, núm. 1, pp. 130–136, 2018.
- [47] A. Lorenzo-Almorós, J. Tuñón, M. Orejas, M. Cortés, J. Egido, y Lorenzo, “Diagnostic approaches for diabetic cardiomyopathy”, *Cardiovasc. Diabetol.*, vol. 16, núm. 1, pp. 1–14, 2017.
- [48] E. L. Zhang y Y. J. Wu, “Metabolic memory: Mechanisms and implications for diabetic vasculopathies”, *Sci. China Life Sci.*, vol. 57, núm. 8, pp. 845–851, 2014.
- [49] G. B. Stefano, “Vascular Dysfunction Associated with Type 2 Diabetes and Alzheimer’s Disease: A Potential Etiological Linkage”, *Med. Sci. Monit. Basic Res.*, vol. 20, pp. 118–129, 2014.
- [50] I. Del, P. En, V. Observados, T. La, I. Cerebral, y F. En, “TESIS DOCTORAL 2016 Yara Onetti Vilalta”.
- [51] H. A. L. Lemmey, X. Ye, H. C. Ding, C. R. Triggle, C. J. Garland, y K. A. Dora, “Hyperglycaemia disrupts conducted vasodilation in the resistance vasculature of db/db mice”, *Vascul. Pharmacol.*, núm. November 2017, pp. 1–7, 2018.
- [52] C. Maric-Bilkan, “Sex differences in micro- and macro-vascular complications of diabetes mellitus”, *Clin. Sci.*, vol. 131, núm. 9, pp. 833–846, 2017.
- [53] A. Giraldi y E. Kristensen, “Sexual dysfunction in women with diabetes mellitus”, *J. Sex Res.*, vol. 47, núm. 2–3, pp. 199–211, 2010.
- [54] W. Zarzycki y M. Zieniewicz, “Reproductive disturbances in type 1 diabetic women.”, *Neuro Endocrinol. Lett.*, vol. 26, núm. 6, pp. 733–738, dic. 2005.
- [55] A. Livshits y D. S. Seidman, “Fertility issues in women with diabetes.”, *Womens. Health (Lond. Engl.)*, vol. 5, núm. 6, pp. 701–707, 2009.

- [56] M. Spindler-Vomachka y D. C. Johnson, "Altered hypothalamic-pituitary function in the adult female rat with streptozotocin-induced diabetes.", *Diabetologia*, vol. 28, núm. 1, pp. 38-44, ene. 1985.
- [57] E. Codner y F. Cassorla, "Puberty and ovarian function in girls with type 1 diabetes mellitus", *Horm. Res.*, vol. 71, núm. 1, pp. 12-21, 2009.
- [58] P. Stein, "Acción de la insulina en la regulación de la actividad esteroidogénica en células luteales", [Http://Digital.Bi.Fcen.Uba.Ar](http://Digital.Bi.Fcen.Uba.Ar), 1994.
- [59] M. L. Griffin *et al.*, "Insulin-dependent diabetes mellitus and menstrual dysfunction.", *Ann. Med.*, vol. 26, núm. 5, pp. 331-340, oct. 1994.
- [60] A. S. Fleitas Estévez, L. Rafael Simón Carballo, D. Gisela Almeida, L. M. Ana Quintela Pena, y D. María Antonia Alfonso, "Modelo Experimental De Diabetes En Conejos", *Rev Cuba. Angiol y Cir Vasc*, vol. 1, núm. 1, pp. 10-4, 2000.
- [61] F. S. Gabriela, J. D. Ángel, y J. L. Figueroa-Hernández, "Modelos experimentales utilizados para el estudio e investigación de la diabetes mellitus", *Rev. Salud Pública y Nutr.*, vol. 2, núm. departamento de farmacología, p. 4, 2006.
- [62] D. Chen y M.-W. Wang, "Development and application of rodent models for type 2 diabetes", *Diabetes, Obes. Metab.*, vol. 7, núm. 4, pp. 307-317, 2005.
- [63] T. Szkudelski, "The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas", *Physiol. Res.*, vol. 50, núm. 6, pp. 537-546, 2001.
- [64] B. L. Furman, "Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats", *Curr. Protoc. Pharmacol.*, vol. 70, núm. September, p. 5.47.1-5.47.20, 2015.
- [65] F. K. Marcondes, F. J. Bianchi, y A. P. Tanno, "Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations.", *Braz. J. Biol.*, vol. 62, núm. 4A, pp. 609-614, nov. 2002.
- [66] C. Y. Cheung, M. K. Ikram, R. Klein, y T. Y. Wong, "The clinical implications of recent studies on the structure and function of the retinal microvasculature in diabetes", *Diabetologia*, vol. 58, núm. 5, pp. 871-885, 2015.

- [67] U. de M. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Ed., “1º de Enfermería – Curso 2012/13.”, en *El sistema cardiovascular*, España, 2013.
- [68] Z. Burgansky-Eliash, D. A. Nelson, O. P. Bar-Tal, A. Lowenstein, A. Grinvald, y A. Barak, “Reduced retinal blood flow velocity in diabetic retinopathy”, *Retina*, vol. 30, núm. 5, pp. 765–773, 2010.
- [69] A. S. Al-Kharashi, “Role of oxidative stress, inflammation, hypoxia and angiogenesis in the development of diabetic retinopathy”, *Saudi J. Ophthalmol.*, vol. 32, núm. 4, pp. 318–323, 2018.
- [70] A. N. Morales, L. Alberto, y D. Castillo, “Rincipales alteraciones de homeostasis en diabetes mellitus la”, pp. 159–165, 2005.