



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**CAMBIOS EN LA ESTEROIDOGÉNESIS EN OVARIO DE RATÓN
DIABÉTICO INDUCIDO CON ESTREPTOZOTOCINA**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

BIOL. ROSA NURIA GALINDO SOLANO

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. TATIANA FIORDELISIO COLL, FC

COMITÉ TUTOR:

DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA, IIB

DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ, IB

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO

OCTUBRE 2018



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.

Contenido

Lista de figuras y anexos	IV
Abreviaturas y siglas	V
Resumen	VII
Abstract.....	VIII
1 Introducción.....	1
2 Revisión de literatura.....	3
2.1 Diabetes y alteraciones reproductivas asociadas	3
2.2 Fisiología del ovario	5
2.3 Esteroidogénesis	8
2.4 Esteroidogénesis en el ovario	10
3 Justificación	15
4 Hipótesis	16
5 Objetivo general	17
5.1 Objetivos particulares	17
6 Material y métodos	18
6.1 Inducción y caracterización del modelo de diabetes	18
6.2 Evaluación de la actividad cíclica del ovario	19
6.3 Eutanasia y obtención de muestras biológicas	20
6.4 Identificación de receptores a gonadotropinas, calcio dependientes de voltaje, enzimas esteroidogénicas mediante Dot Blot.....	21
6.5 Identificación de receptores a gonadotropinas, canales de calcio dependientes de voltaje y enzimas esteroidogénicas mediante inmunohistoquímica	23
6.6 Análisis de imágenes	24

6.7	Determinación de la concentración de hormonas en suero	24
6.8	Análisis estadístico	25
7	Resultados.....	26
7.1	Inducción del modelo de diabetes mediante la administración de STZ	26
7.2	Determinación de la presencia de factores esteroidogénicos mediante Dot-blot .	26
7.3	Caracterización de los cambios en la presencia de factores esteroidogénicos en la condición diabética.....	29
7.3.1	Presencia de los receptores a gonadotropinas en el ovario.....	29
7.3.2	Presencia de los canales de calcio dependientes de voltaje en el ovario.....	32
7.3.3	Presencia de las enzimas P450 _{scc} y P450 aromatasa.....	38
7.4	La producción de hormonas esteroides presenta cambios bajo la condición diabética.....	41
8	Discusión y conclusión.....	42
9	Referencias	48
10	Anexos.....	52
10.1	Evaluación de la actividad cíclica del ovario	52
10.2	Inmunohistoquímica de páncreas	53
10.3	Controles realizados para determinar la especificidad de los anticuerpos	53

Lista de figuras y anexos

Figura 1 Desarrollo de folículos y formación del cuerpo lúteo.....	6
Figura 2 Principales mecanismos en la formación de las hormonas esteroideas en ovario..	11
Figura 3 Diseño experimental.....	19
Figura 4 La administración de STZ induce un modelo dde diabetes.	27
Figura 5 Imagen representativa de Dot blot.	28
Figura 6 Presencia de FSHR en el ovario.....	30
Figura 7 Presencia de LHR en el ovario.....	31
Figura 8 Presencia del CCDV P/Q.	34
Figura 9 Presencia del CCDV N.....	35
Figura 10 Presencia del CCDV L.	36
Figura 11 Presencia del CCDV T.	37
Figura 12 Presencia de la enzima esteroideogénica P450scc.....	39
Figura 13 Presencia de la enzima esteroideogénica P450 aromatasasa.	40
Figura 14 Cambios en la producción de hormonas esteroideas.	41
Anexo 1 Seguimiento eel ciclo reproductivo..	52
Anexo 2 Controles negativos de los anticuerpos empleados.....	53

Abreviaturas y siglas

KSR	3-cetoesteroide reductasa
17-OH-pregnenolona	17-hidroxipregnenolona
17 β HSD1	17- β -deshidrogenasa hidroxiesteroide
HSD	6-hidroxiesteroide deshidrogenasa
cAMP	Adenosin monofosfato cíclico
PBS	Buffer de fosfatos-salina
TBS	Buffer tris-salina
Ca ²⁺	Calcio
CCDV	Canales de calcio dependientes de voltaje
CGs	Células de la granulosa
CT	Células de la teca
[Ca ²⁺] _i	Concentración de calcio intracelular
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
CLs	Cuerpos lúteos
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DAG	Diacilglicerol
3- β -HSD	Enzima 3- β -deshidrogenasa hidroxiesteroide
P450 aromatasa	Enzima P450 aromatasa
P450scc	Enzima de escisión de la cadena lateral de colesterol
STZ	Estreptozotocina
E ₁	Estrona
E ₂	Estradiol
SF-1	Factor esteroideogénico 1
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico I
IGF-2	Factor de crecimiento insulínico II
hCG	Hormona coriónica humana
FSH	Hormona folículo estimulante

GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
LH	Hormona luteinizante
IP ₃	Inositol trifosfato
IMF	Intensidad media de la fluorescencia
HLD	Lipoproteínas de alta densidad
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fostato
P ₄	Progesterona
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
SIP	Proteína inductora de la esteroidogénesis
StAR	Proteína de regulación aguda de esteroidogénesis
SR-BI	Receptor Scavenger clase B, tipo I
ER α	Receptor de esteroides α
ER β	Receptor de esteroides β
FSHR	Receptor de FSH
LHR	Receptor de LH
CYP's	Superfamilia citocromo P450
T	Testosterona
TIM	Translocador interno mitocondrial
TOM	Translocador de membrana externa mitocondrial
TTBS	Tris-salina-tween
HMG-CoA	β -hidroxi β -metilglutaril coenzima

Resumen

La diabetes es una enfermedad metabólica, crónica degenerativa de alta incidencia a nivel mundial. Esta enfermedad causa alteraciones en diferentes órganos y sistemas, entre los que se destaca el eje reproductivo femenino. Particularmente, se han observado cambios en la producción de hormonas esteroides que causan una disminución en la capacidad reproductiva femenina. En condiciones fisiológicas, la actividad esteroidogénica del ovario es regulada por la interacción de las gonadotropinas con sus receptores, lo cual desencadena cambios en la actividad de los canales dependientes de calcio dependientes del voltaje, que contribuyen a la señalización correcta del ovario para potenciar la actividad de las enzimas esteroidogénicas, lo cual conduce a la formación de progesterona y estradiol. Al considerar que bajo la condición diabética estas hormonas se encuentran desreguladas, es posible pensar que parte de los factores involucrados en la formación podrían estar modificados. Para evaluar esta posibilidad, utilizamos ratones hembra Balb/C hembra en las cuales se indujo un modelo de diabetes mediante la administración de estreptozotocina (STZ). Los niveles de glucosa en sangre e insulina, el peso corporal, el agua, así el consumo de agua y alimento se registraron semanalmente en ratones control y tratados con STZ. Después de tres semanas, se obtuvieron ovarios y sangre. Se evaluó la presencia de los receptores a gonadotropinas, los canales dependientes de calcio dependientes de voltaje (P/Q, N, L y T) y las enzimas esteroidogénicas (P450_{scc} y P450_{aromatasa}) mediante Dot blot e inmunofluorescencia. Además se determinó la concentración de hormonas esteroides. Encontramos que durante el diestro, la expresión de los receptores, los canales de calcio y las enzimas esteroidogénicas mostraron una presencia diferencial en folículos y cuerpos lúteos. La cual cambió de manera considerable en el grupo tratado con STZ. En conclusión, nuestros hallazgos apoyan la noción de que la condición diabética puede conducir a anomalías en los componentes de la vía de señalización que conduce a la esteroidogénesis en el ovario.

Palabras clave: diabetes, ovario, canales dependientes de calcio dependientes del voltaje, receptores de gonadotropinas y enzimas esteroidogénicas.

Abstract

Diabetes is a chronic-degenerative metabolic disease of high incidence worldwide. This disease causes alterations in different organs and systems, among which the female reproductive axis stands out. Particularly, changes have been observed in the production of steroid hormones which cause a decrease in female reproductive capacity. Under physiological conditions the steroidogenic activity of the ovary is regulated by the interaction of gonadotropins with their receptors, this triggers changes in the activity of voltage gated calcium dependent channels, which contribute to the correct signaling of the ovary to enhance the activity of the steroids enzymes that lead to the formation of progesterone and estradiol. Considering that under the diabetic condition these hormones are deregulated it is possible to think that part of the factors involved in the formation of steroids are modified. To begin evaluating this possibility, Balb/C female mice were rendered diabetic by treating them with a two doses of streptozotocin (STZ). Blood glucose and insulin levels, body weight, water and food consumption were all monitored weekly in control and STZ-treated mice. After three weeks ovaries and blood were obtained. In fixed ovaries LH and FSH receptors, voltage gated calcium-dependent channels (P/Q, N, L and T) and steroidogenic enzymes (P450_{scc} and P450_{aromatase}) presence was assessed by Dot blot and immunofluorescence. Blood serum was analyzed to determine steroid hormones concentrations. During diestrus, the expression of gonadotropin-receptors, voltage gated calcium dependent channels and steroidogenic enzymes showed differential expression in follicles and corpora lutea. These expression were less and differently distributed in STZ-treated mice. In conclusion, our findings thus support the notion that the diabetic condition may lead to abnormalities in the components of the signalling pathway that leads to steroidogenesis in the ovary.

Keywords: diabetes, ovary, voltage gated calcium-dependent channels, gonadotropin receptors and steroidogenic enzymes.

1 Introducción

La diabetes tipo I es una enfermedad metabólica, crónico-degenerativa que produce alteraciones en distintos órganos y sistemas. De forma particular, *Codner y colaboradores* (2012) propusieron que la deficiencia de insulina y la hiperglucemia combinadas conducen a una disfunción ovárica. Al respecto en mujeres diabéticas se ha reportado un incremento en la incidencia del síndrome del ovario poliquístico, alteraciones menstruales, anovulaciones, disminución en la concentración de hormonas esteroideas y en general, un decremento en la fertilidad (1-6). La integración de estas condiciones o signos de daño gonadal, sugieren una posible alteración de estructuras intraováricas: folículos y cuerpos lúteos (CLs).

Las estructuras intraováricas desempeñan un papel crucial en la fisiología reproductiva ya que en éstas se llevan a cabo procesos tales como la producción de gametos femeninos, la síntesis y secreción de hormonas esteroides, que regulan tanto el ciclo menstrual como el inicio y mantenimiento de las condiciones propicias para la gestación (7).

Particularmente, la esteroidogénesis producida en folículos y CLs resulta indispensable para mantener la capacidad reproductiva. Este proceso, depende de la interacción de las gonadotropinas (hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH)), con los receptores acoplados a proteínas G presentes en las células foliculares y luteales; lo cual resulta en la activación de dos vías de acción, la de la proteína cinasa A (PKA) y la de la proteína cinasa C (PKC). Dichas vías conllevan a la fosforilación a otras proteínas y factores de transcripción cruciales en la esteroidogénesis, tales como el factor esteroidogénico 1 (SF-1) y la proteína de regulación aguda de esteroidogénesis (StAR). Estos factores a su vez, regulan la síntesis de la enzima de escisión de la cadena lateral de colesterol (P450_{sc}) de la aromatasa (P450 aromatasa), las cuales resultan indispensables para la producción de progesterona (P₄) y estradiol (E₂), (8-10). Adicionalmente, se ha sugerido que el calcio juega un papel fundamental en este proceso. Al respecto, se ha documentado que cambios en la concentración

intracelular de calcio en células de la granulosa provocan modificaciones en la concentración plasmática de esteroides (11), y que el uso de inhibidores de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) disminuyen la producción de hormonas esteroides (12). Por otra parte, se ha descrito que la administración de FSH estimula la elevación de calcio intracelular en células de la granulosa (13) y, de forma general, que este segundo mensajero potencializa la producción de hormonas esteroides (14).

Con base en la información descrita anteriormente, proponemos que algunos de los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a la disfunción ovárica diabética resultan al menos en parte, de la alteración en la expresión de los receptores a gonadotropinas, canales de calcio dependientes de voltaje y de las enzimas P450_{scc} y P450 aromatasa.

2

Revisión de literatura

2.1 Diabetes y alteraciones reproductivas asociadas

La diabetes es una enfermedad metabólica, crónico-degenerativa de origen múltiple; la cual se caracteriza por el incremento de la concentración de glucosa en sangre, ocasionada fundamentalmente por un déficit en la producción, secreción y/o resistencia a la hormona insulina (6, 15).

La etiología de la diabetes es múltiple, puede desarrollarse en diversas condiciones como el embarazo, estados de toxicidad química, trastornos genéticos y alteraciones en el funcionamiento del páncreas. Con base en su etiología, la diabetes suele clasificarse generalmente en dos categorías: tipo I y tipo II. Sin embargo, sin importar cuál sea ésta, en ambas se presentan signos humorales y clínicos (4, 16).

El signo humoral de la diabetes es la hiperglucemia, es decir, el incremento anormal de la concentración de glucosa en sangre. Dicho estado se asocia al déficit en la producción, secreción o resistencia a la hormona insulina (15). Esta hormona, regula la incorporación de glucosa al citoplasma celular, donde es metabolizada o almacenada. El uso ineficiente de la glucosa produce el desarrollo de una triada sintomática clínica: polidipsia, poliuria y polifagia; las cuales son seguidas en su etapa final, por la pérdida de peso corporal (4, 16).

La diabetes provoca diversas alteraciones en la función de diferentes órganos y sistemas, dentro de los cuales destaca el eje reproductor femenino. Particularmente, se ha observado un decaimiento de la fertilidad (17, 18), atribuida a diversas alteraciones en el ovario. En este órgano se han observado modificaciones en la actividad cíclica, alteraciones foliculares y luteales hasta anovulación; eventos que sugieren un posible daño gonadal y particularmente de la producción y secreción de las hormonas esteroides (1-6).

Lo anterior puede ser resultado de la hiperinsulinemia, que contribuye a la elevación en la producción de esteroides en el ovario, pues se ha observado que en condiciones fisiológicas la insulina actúa en sinergia con las hormonas gonadotrópicas, en especial con la LH. Por ello, se produce un aumento importante de la síntesis de andrógenos y un descenso en la producción de P₄ debido a la disminución de la actividad de la enzima 17 α -hidroxilasa (5, 18, 19). En general, la alteración en las concentraciones fisiológicas de esteroides producen cambios en la actividad cíclica ovárica (1, 3). Por otra parte, la reducción de P₄ provoca la disminución del mantenimiento de la gestación debido a la inadecuada señalización y a la posible alteración durante la diferenciación endometrial necesaria para la formación de la placenta. Esta merma en la concentración de progesterona podría ser atribuida a la severidad de la hiperglicemia y sus posibles efectos en los CLs (20). Además, en esta condición, el metabolismo de colesterol se encuentra sumamente alterado, por lo que, al ser la molécula precursora y limitante de la esteroidogénesis, la síntesis de esteroides se ve de igual forma perturbada (2, 20).

Adicionalmente, se ha observado que en la condición diabética, el asa de retroalimentación que tienen las hormonas esteroideas sobre el eje hipotálamo-hipófisis se encuentra alterado. En este sentido, se presenta una reducción en la secreción de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y con ello en la secreción de gonadotropinas (1, 3). De la misma manera, se ha observado que la cantidad de receptores a estradiol, tanto en el hipotálamo como en la hipófisis, se reduce y esto produce una disminución en la sensibilidad y por tanto en la regulación de la secreción de gonadotropinas (17).

Así, la esteroidogénesis ovárica se encuentra, ya sea de manera directa o indirecta, afectada por la concentración de insulina y glucosa plasmática. Las alteraciones moleculares en el metabolismo ovárico y su relación con el eje hipófisis-hipotálamo que generan las disfunciones reproductivas comprometiendo la actividad fisiológica del eje reproductor femenino y particularmente, del ovario.

2.2 Fisiología del ovario

Las gónadas femeninas u ovarios son estructuras pareadas de forma amigdaloides que se encuentran en la cavidad pélvica superior. Dichas estructuras presentan dos regiones internas: médula interna y corteza externa (21).

La médula interna contiene tejido conectivo denso que alberga a las células del estroma, vasos sanguíneos y linfáticos. Por otra parte, la corteza se encuentra cubierta por un epitelio, contiene a la túnica albugínea y una zona interna que contiene a las estructuras intraovárias que mantienen la capacidad reproductiva mediante la producción de gametos y la síntesis de hormonas esteroideas (21).

Los folículos ováricos de todos vertebrados tienen prácticamente la misma organización y estructura. Ésta consiste en una sola célula germinal u oocito rodeado por una o más capas de células de la granulosa (CCs), las cuales confluyen y proliferan de forma proporcional al desarrollo del folículo. Las CGs están rodeadas y separadas a su vez de las células de la teca interna por una membrana basal (22-24). Estas células presentan en un momento determinado del desarrollo folicular y se distinguen por tener una buena vascularización. En la mayoría de las especies se presenta una capa conformada por células de músculo liso y tejido conectivo denominadas células de la teca externa, las cuales están en colindancia con el estroma ovárico (24). La producción de gametos funcionales es esencial para la propagación de todos los vertebrados (25), por ello la capacidad reproductiva femenina está condicionada a la adecuada regulación del desarrollo de los folículos y CLs (7, 23, 26, 27).

Los folículos siguen un proceso de maduración secuencial, conocido como foliculogénesis (Figura 1 **Desarrollo de folículos y formación del cuerpo lúteo**). Durante este proceso los folículos primordiales son reclutados y sus células son transformadas para convertirse en folículos primarios. Es en esta estructura que las células de la granulosa (CGs) proliferan progresivamente formando varias capas alrededor del ovocito formando un folículo secundario. El desarrollo de la estructura continúa hasta formar un folículo pre-antral, el cual se

caracteriza por la presencia de células de la teca que se encuentran separadas por una membrana basal de las CGs. Durante esta etapa ocurren cambios importantes a nivel hormonal; por una parte los folículos son dependientes de gonadotropinas y por otra, comienza la formación de estradiol. El desarrollo folicular continúa con la formación del folículo antral. Conforme continúa el crecimiento folicular, la producción de estradiol incrementa en forma gradual, hasta la formación del folículo preovulatorio. El desarrollo de esta estructura resulta ser clave en la regulación hormonal, pues a partir de este momento las células de la granulosa producen progesterona en bajas concentraciones. Seguido de esta estructura y debido a un pico de LH ocurre la ovulación. Proceso que permite la formación y desarrollo del cuerpo lúteo, el cual está formado por las CGs y las células de la teca que se luteinizan y proliferaron y se denominan, células luteales. Estas células son dependientes en gran medida, del aporte continuo de la LH que incrementa la producción de progesterona para el mantenimiento de la gestación. Por lo tanto la concentración de progesterona incrementa con el desarrollo de cuerpo lúteo y decae cuando éste termina su función o involuciona por ausencia de gestación. Modificada de *Georges et al, 2014,(30).*) que va desde un folículo primordial a uno primario, secundario o preantral, antral y preovulatorio; durante este proceso las CGs y CTI proliferan. Posteriormente se presenta el evento de ovulación, y luteogénesis, el cual consiste en una serie de cambios coordinados en el folículo postovulatorio que lo transforman en una estructura endocrina requerida para el establecimiento y mantenimiento de la gestación en los CLs (23, 24, 28, 29). En todas las especies euterias estudiadas a la fecha, inmediato a la ovulación se lleva a cabo la luteinización de las CGs y en menor medida de las células de la teca (CT), desaparece la membrana basal y las uniones gap entre CGs y las células endoteliales por angiogénesis invaden la masa de CGs luteinizadas inmiscuyendo a éstas en una densa red capilar (24). La metamorfosis de las CGs es tal que hay una hipertrofia celular, cambian su forma esférica a una semejante a un poliedro, y experimentan cambios profundos en diversos organelos (24, 29).

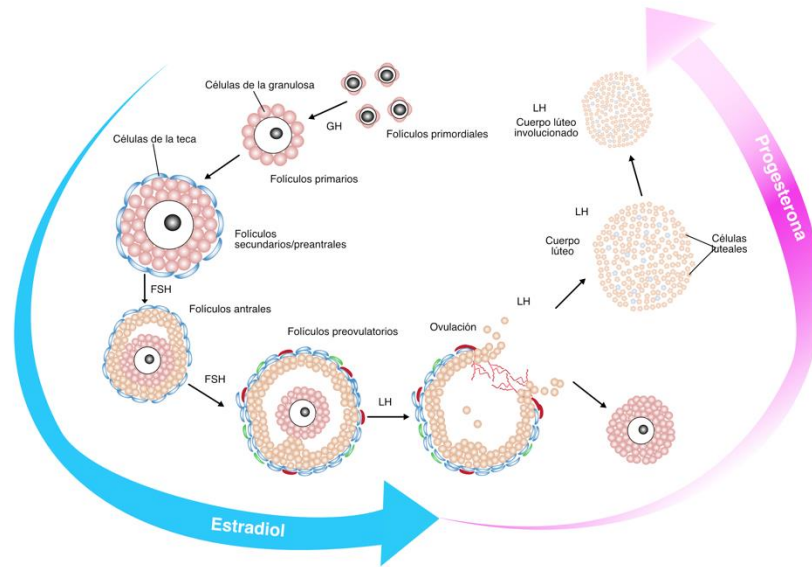


Figura 1 Desarrollo de folículos y formación del cuerpo lúteo. Durante este proceso los folículos primordiales son reclutados y sus células son transformadas para convertirse en folículos primarios. Es en esta estructura que las células de la granulosa (CGs) proliferan progresivamente formando varias capas alrededor del ovocito formando un folículo secundario. El desarrollo de la estructura continúa hasta formar un folículo pre-antral, el cual se caracteriza por la presencia de células de la teca que se encuentran separadas por una membrana basal de las CGs. Durante esta etapa ocurren cambios importantes a nivel hormonal; por una parte los folículos son dependientes de gonadotropinas y por otra, comienza la formación de estradiol. El desarrollo folicular continúa con la formación del folículo antral. Conforme continúa el crecimiento folicular, la producción de estradiol incrementa en forma gradual, hasta la formación del folículo preovulatorio. El desarrollo de esta estructura resulta ser clave en la regulación hormonal, pues a partir de este momento las células de la granulosa producen progesterona en bajas concentraciones. Seguido de esta estructura y debido a un pico de LH ocurre la ovulación. Proceso que permite la formación y desarrollo del cuerpo lúteo, el cual está formado por las CGs y las células de la teca que se luteinizan y proliferaron y se denominan, células luteales. Estas células son dependientes en gran medida, del aporte continuo de la LH que incrementa la producción de progesterona para el mantenimiento de la gestación. Por lo tanto la concentración de progesterona incrementa con el desarrollo de cuerpo lúteo y decae cuando éste termina su función o involucre por ausencia de gestación. Modificada de *Georges et al, 2014,(30)*.

La síntesis y regulación de hormonas esteroideas durante el ciclo reproductivo corresponde al desarrollo de las estructuras intraováricas, el cual depende del correcto aporte del GnRH por parte del hipotálamo a la hipófisis. Esta glándula por su parte, secreta las gonadotropinas LH y FSH, las cuales tienen receptores específicos en el ovario. Los receptores de la FSH (FSHR) se encuentran exclusivamente en los folículos, particularmente, en las CGs. La FSH es requerida para el desarrollo y reclutamiento folicular, así como para la síntesis de estradiol, la cual genera asas de retroalimentación sobre la propia FSH. La LH actúa sobre las CGs presentes en folículos maduros o preovulatorios, generando una serie de eventos que culminan en la ovulación, además la LH participa en la luteinización de las células en el cuerpo hemorrágico, e incrementa la producción de P₄ (1, 7, 22, 25, 26, 31, 32).

En los mamíferos, la participación de hormonas esteroideas durante el ciclo reproductivo sigue un patrón similar que consiste en un incremento de E_2 antes de la ovulación y un incremento de P_4 después de la ovulación, el cual es sostenido durante la fase lútea y preñez (28, 33). Además también se producen, aunque en menor cantidad, otras hormonas esteroideas sexuales como la estrona (E_1), androstendiona y testosterona (T), (7).

Las CGs secretan principalmente E_2 y P_4 . Los estrógenos, principalmente E_2 , promueven el desarrollo folicular al inhibir la apoptosis en las CGs, y estimular en estas células la expresión de receptores a gonadotropinas, formación de uniones gap y la propia esteroidogénesis y se requiere de estrógenos para la formación y mantenimiento del cuerpo lúteo (34). Además es el principal responsable de la manifestación de los caracteres secundarios femeninos y de la fisiología cardiovascular (27, 35). La acción de los estrógenos es ejercida a través de sus receptores: el receptor β ($ER\beta$) se encuentra en las células de la granulosa, permite su diferenciación y función, mientras que el receptor α ($ER\alpha$) se expresa en la teca, células intersticiales y es crucial para la esteroidogénesis (36).

Por otra parte, la P_4 también es requerida para el crecimiento folicular, ovulación, cambios asociados en la fase lútea, y principalmente para el establecimiento y mantenimiento de la gestación; de hecho, es conocida como la hormona de la gestación y comportamiento sexual. La P_4 también es secretada por el CL en las primeras etapas de la gestación, y posteriormente es producida por células de la placenta (27, 28).

Con respecto al resto de hormonas esteroideas producidas en el ovario, se sabe que la T es el precursor necesario para la producción de estrógenos (35). No obstante, el papel del resto de los andrógenos es controversial. Lo anterior debido a que la visión clásica indica que los estrógenos permiten el desarrollo folicular, mientras que los andrógenos promueven atresia en estas mismas estructuras. Sin embargo, algunos estudios sugieren el papel de los andrógenos en sinergia con la FSH para promover el crecimiento folicular y la producción de estradiol e inhibina (22). La actividad esteroidogénica de las diversas hormonas ováricas fluctúa a lo largo del ciclo reproductivo, correspondiendo al crecimiento y regresión de los folículos y CLs (31).

2.3 Esteroidogénesis

La síntesis de hormonas esteroideas, comienza con la disponibilidad de colesterol en las células y tejidos esteroideogénicos, por lo que su transporte y conversión a pregnenolona por la enzima P450_{scc} constituyen un paso limitante en la esteroidogénesis (8, 9). Todas las hormonas esteroideas tienen una estructura similar de 3 anillos de 6 carbonos y uno de 5 (ciclopentano-perhidrofenantreno); se dividen en tres grupos de acuerdo al número de carbonos que componen la molécula: corticosteroides y progestinas (21 carbonos), andrógenos (19 carbonos) y estrógenos (18 carbonos). En algunos casos, como en las células adrenales y ováricas, se puede dar la síntesis *de novo* a partir de acetato mediante la β -hidroxi β -metilglutaril coenzima (HMG-CoA), que se encuentra en grandes proporciones en el retículo (37), o por la hidrólisis de los ésteres de colesterol almacenados en forma de gotas lipídicas. Sin embargo, la mayor parte del colesterol, proviene de la formación de vesículas de clatrina, a través de la endocitosis mediada por receptor de lipoproteínas de baja (LDL) y alta densidad (HDL) y de la interiorización del colesterol que se encuentra en la membrana plasmática por la formación de caveolas a través de la vía del receptor Scavenger clase B, tipo I (SR-BI), (35).

El colesterol es transportado hacia la membrana externa de la mitocondria mediante mecanismos poco claros que incluyen el transporte vesicular y proteínas de transferencia lipídica. Una vez en esta membrana, es translocado por los translocadores de la membrana externa mitocondrial (TOM) en asociación con proteínas de transferencia lipídica StAR hacia la membrana interna mitocondrial en donde es translocado por el translocador interno mitocondrial (TIM); aproximadamente el 85-90% de la síntesis esteroidogénica depende del mecanismo de transporte vía StAR (10, 38). En la matriz mitocondrial, se lleva a cabo la conversión del colesterol a pregnenolona, evento que se regula por señales hormonales externas como la LH (38).

Las reacciones químicas que se producen en la síntesis de los esteroideas son catalizadas por la 6-hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD) y la 3-cetoesteroide reductasa (KSR), (9). Las

enzimas oxidativas, pertenecen a la superfamilia citocromo P450 (CYP's) denominadas así por la longitud de onda de luz que absorben en su forma reducida; 3 de ellas, se encuentran en la mitocondria (P450_{scc}, P450_{c11} y aldosterona sintetasa, codificadas por los genes CYP11A1, B1 y B2 respectivamente) y 3 en el retículo endoplasmático (P450_{c17}, P450_{c21} y P450aromatasa, codificadas por los genes CYP17A1, CYP19A1 y CYP21A2), (8, 9, 35).

Por lo general, los citocromos forman parte de las cadenas de transferencia de electrones con multicomponentes (39). La enzima P450_{scc}, utiliza los electores de la molécula de Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fostato (NADPH), a través de la flavoproteína Adrenodoxina reductasa (también conocida como ferredoxina reductasa) y una proteína de hierro / azufre conocida como ferredoxina (adrenodoxina) para realizar tres reacciones químicas la producción de pregnenolona e isocaproaldehído, la catalización de glucocorticoides y mineralocorticoides en el retículo endoplásmico por parte de la enzima P450_{c17}, y por último la aromatización por parte de la P450 aromatasa de los andrógenos y estrógenos (38).

Todas las reacciones mediadas por los citocromos P450, son bioquímica y fisiológicamente irreversibles (38), unidireccionales y la saturación de productos no revierte el flujo hacia las moléculas precursoras, por lo que la capacidad esteroidogénica es regulada por la expresión o inhibición de las propias enzimas (10, 33, 38). Así, la esteroidogénesis está regulada en su cantidad por la expresión de la citocromo P450_{scc} y en el tipo de esteroide producido por la P450_{c17}.

En el ovario, la esteroidogénesis resulta de suma importancia, pues se producen tres de los cinco tipos de hormonas esteroideas (estrógenos, progestágenos y andrógenos), y se mantiene el ciclo reproductivo (10, 35). La esteroidogénesis ovárica es más compleja debido a que se encuentra fraccionada. Los pasos enzimáticos se realizan en CGs y CT, el cual es la unidad básica de la actividad hormonal ovárica y mediante la cual el oocito alcanza la madurez en todos los vertebrados (24).

2.4 Esteroidogénesis en el ovario

La esteroidogénesis ovárica inicia en las células de la teca bajo la influencia de la LH, que mediante la activación de su receptor (LHR) acoplado a proteínas G, produce un aumento de Adenosin Monofosfato Cíclico (cAMP) y la activación de la PKA. Ésta a su vez, produce la fosforilación de proteínas y factores de transcripción como el factor esteroidogénico 1 (SIF-1), que regulan la síntesis de la enzima P450_{scc} y con ello la formación de pregnenolona a partir de colesterol (8). La activación de la PKA también conduce a la expresión de otras proteínas esteroidogénicas como StAR (9, 10). La sobreexpresión o estimulación del LHR, conduce a una hipersecreción de esteroides (38).

A partir de la formación de pregnenolona en las CT, se pueden llevar a cabo dos rutas esteroidogénicas, la D5 y D4 ($\Delta 5$ y $\Delta 4$, respectivamente). En el caso de D5 el citocromo P450_{c17} hidroliza a la pregnenolona y produce 17-hidroxipregnenolona (17-OH-pregnenolona). El grupo acetil de este compuesto es lisado por P450_{c17} generando dehidroepiandrosterona (DHEA); la cual es transformada a androstenediol mediante la enzima 17- β -deshidrogenasa hidroxiestreoides (17 β HSD1), y el androstenediol es transformado a testosterona por la acción de la enzima 3- β -deshidrogenasa hidroxiestreoides (3- β -HSD); por otra parte se puede formar androstenediona ($\Delta 4$ -diona) a partir de la acción de 3- β -HSD sobre DHEA y posteriormente T por acción de 17- β -HSD. La androstenediona pasa a las CGs donde, bajo la influencia de FSH, es convertida a E₁ y posteriormente a E₂ mediante la acción de P450aromatasa y 17- β -HSD1 respectivamente. La ruta D4, incluye la primera conversión a pregnenolona, seguida por la hidrólisis de P450_{c17} que forma 17-OH-pregnenolona y que mediante 3- β -HSD o bien, a partir de pregnenolona, 3- β -HSD forma P₄, y consecutivamente P450_{c17} produce 17-OH-pregnenolona, (8, 33, 38) (Figura 2 **Principales mecanismos en la formación de las hormonas esteroideas en ovario**). Las células de teca al ser estimuladas por LH promueven la conversión del colesterol a pregnenolona mediante P450_{scc}. A partir de este punto se puede seguir la vía D4 (línea roja punteada) o D5 (flechas azules sólidas) para producir P₄, T o E₂. La producción de estas hormonas es regulada por factores metabólicos como la insulina (flechas anaranjadas) por medio de IR o IGF-1R que estimula la actividad

de P450_{C17}; y la internalización de glucosa (flechas rosas) por la vía de las MAPK que estimula al SF-1 el cual incrementa la actividad de P450_{scs} y StAR.).

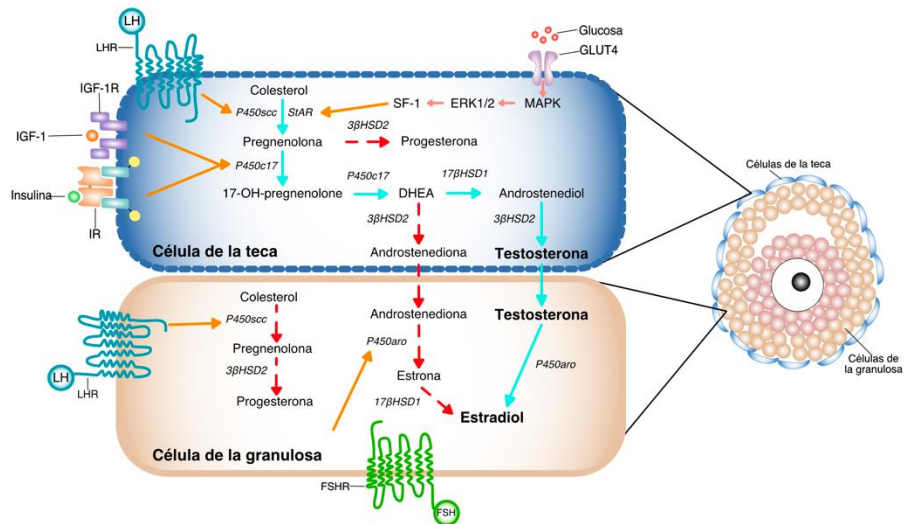


Figura 2 Principales mecanismos en la formación de las hormonas esteroideas en ovario. Las células de teca al ser estimuladas por LH promueven la conversión del colesterol a pregnenolona mediante P450_{scs}. A partir de este punto se puede seguir la vía D4 (línea roja punteada) o D5 (flechas azules sólidas) para producir P₄, T o E₂. La producción de estas hormonas es regulada por factores metabólicos como la insulina (flechas anaranjadas) por medio de IR o IGF-1R que estimula la actividad de P450_{C17}; y la internalización de glucosa (flechas rosas) por la vía de las MAPK que estimula al SF-1 el cual incrementa la actividad de P450_{scs} y StAR.

Tanto las CT como las CGs expresan proteínas regulatorias esteroideogénicas, como la StAR, P450_{scs} y 3-β-HSD, por lo que ambos tipos celulares son capaces de formar pregnenolona y/o P₄ a partir del colesterol; sin embargo, la regulación de la expresión de las enzimas esteroideogénicas específicas dependiendo del estadio de desarrollo del folículo determina en gran medida la cantidad de esteroides sintetizados en cada tipo celular (8, 33, 38, 40). Es decir, en la fase folicular temprana, donde las CGs están avascularizadas, el aporte de oxígeno y colesterol es limitando, y por consecuencia hay una baja biosíntesis de esteroides; lo cual contrasta con las CGs en proceso de luteinización, las cuales son capaces de sintetizar grandes cantidades de pregnenolona y P₄ a partir del colesterol (40).

Los niveles de las enzimas P450_{C17} y P450_{scs}, se encuentran correlacionados con el estadio de desarrollo de los folículos y de CLs, observándose en folículos pequeños la síntesis de andrógenos, en folículos antrales estrógenos y en folículo preovulatorios P₄. Los cambios en la expresión enzimática sugieren una respuesta al gradiente de gonadotropinas en el folículo

(8). Existen otros factores como los de crecimiento, los derivados de macrófagos, la proteína inductora de la esteroidogénesis (SIP) y cadenas de segundos mensajeros que incluyen los iones de cloro y calcio, que no actúan a través de la producción de cAMP y que, al menos para el caso de SIP, pueden ser independientes de la translocación del colesterol a través de StAR (10, 38).

Por otra parte, algunos autores han sugerido que el papel del calcio como un segundo mensajero resulta imprescindible durante la esteroidogénesis (11-14, 41). En este sentido, se ha documentado que elevación de la concentración de calcio Ca^{2+} , ya sea intracelular o extracelular participa en la estimulación por gonadotropinas para la producción de hormonas esteroideas. De forma específica, se ha observado que la aplicación de la FSH eleva la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ en las CGs (13, 41) y que tanto el DAG como el inositol trifosfato desencadenan la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ en estas mismas células (42).

Aunado a lo anterior, se sabe que la elevación de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por la incubación con el ionóforo de Ca^{2+} A23187 aumentan cinco veces la liberación de progesterona en CGs cultivadas, mientras que la producción de basal de T y E_2 en CT y CG cocultivadas incrementan al menos al doble su producción (14).

Estudios más recientes muestran que los inhibidores de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje atenúan la producción de esteroides inducida por hCG y GC (12). En este sentido, la identificación electrofisiológica de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en células ováricas mediante *patch-clamp* en GC cultivadas aisladas, han registrado una corriente de Ca^{2+} activada de bajo umbral en el canal tipo L (43, 44). Mientras que la corriente predominante de Ca^{2+} , identificada por sus propiedades biofísicas y farmacológicas, es una corriente del canal tipo T (45, 46). La información antes descrita sugiere la posibilidad de que se produzca una afluencia pequeña y continua de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática al potencial de reposo de las CGs durante la formación y reclutamiento de los folículos (45).

En este aspecto, es importante destacar que adicional a la información anterior, se sabe que los folículos preovulatorios, el desarrollo folicular, el crecimiento ovárico y la formación de

quistes se han asociados con la insulina y los factores de crecimiento insulínicos I y II (IGF-1, IGF-2), (2, 8) . Estos factores, se unen a sus receptores ováricos en la teca, CGs y estroma, actuando principalmente a través de la vía de señalización de tirosinas cinasas, estimulando la síntesis de mRNA de los receptores de LH (LHR), StAR, P450_{scc}, P450_{c17}, 3-β-HSD, la secreción de andrógenos en las CT y la secreción esteroidea en las CGs (2, 33). Dado que en ambos casos, potencian el efecto de LH y FSH, se ha propuesto que funciona como una gonadotropina (3, 5). Esta gran cantidad de acciones de la insulina, son la base del gran impacto que tiene un cambio en su concentración plasmática (hiper o hipoinsulinemia) en el desarrollo y función ovárica (3, 8, 10).

Adicionalmente, la glucosa parece estar involucrada en una serie de caminos metabólicos que contribuyen a la esteroidogénesis ovárica y en la maduración folicular inducida por las hormonas hipofisarias, por lo que las alteraciones en la concentración de glucosa pueden afectar el proceso reproductivo particularmente asociado a la fosforilación de la vía enzimática MAPK ERK1/2 que regula la transcripción de SF-1 entre otros (2).

Está claro que en la regulación de la esteroidogénesis contribuye en distintas vías de señalización y que entre ellas, existe un “*cross-talk*” que modula la síntesis de esteroides, muchas veces a través de la inducción o inhibición de la expresión de enzimas y proteínas clave para su desarrollo, como las enzimas P450_{scc} y P450_{c17}, y la proteína StAR (2, 10, 40). Es por ello que se debe resaltar el papel de la insulina en la regulación de la esteroidogénesis, pues esta vía tiene un fuerte impacto en los actores involucrados en este proceso que repercuten en la capacidad reproductiva. Así pues, resulta pertinente y relevante abordar la esteroidogénesis en un contexto donde los niveles de la insulina y su relación con el metabolismo de la glucosa están alterados, y que comprometen la reproducción, como es el caso de la diabetes.

No obstante, hasta el momento, el conocimiento acerca del efecto que tiene la diabetes sobre la regulación y secreción hormonal ovárica es limitado. Lo anterior se debe principalmente a que la mayoría de los resultados provienen de estudios clínicos (3). En consecuencia, la búsqueda de mecanismos que permitan incrementar nuestra comprensión sobre el efecto negativo de la diabetes en este contexto es escasa.

Para superar dichas limitaciones, se han utilizado diversos modelos murinos de diabetes. Éstos, además de resultar especialmente útiles por su costo y accesibilidad, presentan un ciclo reproductivo estral, corto y de fácil observación, que incluye cuatro fases (proestro, estro, metaestro y diestro) asociadas a la presencia y actividad de las estructuras intraováricas. En este tipo de ciclo se facilita la caracterización de cambios reproductivos bajo distintas condiciones como la diabetes. Así pues, diversos grupos de investigación estudian la diabetes al inducir el modelo de forma rápida y eficiente mediante el uso de distintos fármacos como la estreptozotocina y el aloxano.

Es por ello que el presente trabajo propone el uso de un modelo murino de diabetes para estudiar el posible efecto negativo de la diabetes en la esteroidogénesis del ovario asociada a la disfunción reproductiva diabética.

3

Justificación

Evidencia clínica sugiere que parte de los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a la disfunción reproductiva diabética se asocia a cambios en la producción y/o secreción de las hormonas esteroides en el ovario. Sin embargo, hasta el momento la evidencia que demuestre dicha asociación es insuficiente y limitada. Debido a ello y a la necesidad de conocer más sobre los mecanismos asociados a la disfunción reproductiva diabética, resulta de particular importancia estudiar los elementos asociados a la esteroidogénesis utilizando un modelo experimental de ratón diabético.

4 Hipótesis

Los ratones diabéticos presentarán modificaciones en la expresión de componentes celulares asociados a la esteroidogénesis del ovario, las cuales serán reflejadas en cambios en la producción de estas hormonas.

5

Objetivo general

Caracterizar las alteraciones que la diabetes produce en las estructuras intraováricas asociadas a la esteroidogénesis en ovario de ratón; particularmente en los receptores a gonadotropinas, canales de calcio dependientes de voltaje, enzimas esteroidogénicas y en la concentración de hormonas esteroides.

5.1 Objetivos particulares

- Identificar y cuantificar la expresión de receptores a gonadotropinas, canales de calcio dependientes de voltaje, así como de las enzimas P450_{scc} y P450 aromatasa en las diferentes fases del ciclo estral en condiciones fisiológicas y de diabetes.
- Determinar las posibles diferencias en la producción de progesterona y estradiol en condiciones fisiológicas y de diabetes.

6

Material y métodos

6.1 Inducción y caracterización del modelo de diabetes

Se utilizaron 21 ratones hembra de la cepa Balb/C de 8 semanas de edad provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Las hembras se mantuvieron en condiciones controladas con ciclos de 12 horas luz/oscuridad (encendido de luz 07:00 h) a 21°C, además recibieron agua y alimento (*Nutri-cubos, Purina*) *ad libitum*. 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; así como con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE) del Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal (*MC-2017/2-5*).

Previo al estudio, los animales tuvieron un período de aclimatación de 4 días, posteriormente se dividieron en dos grupos: control y diabético (n=12 y n=9, respectivamente). Las hembras del grupo diabético recibieron dos dosis con diferencia de 24 horas de 120 mg/kg (p/v) de estreptozotocina (STZ) (*U-9889, Santa Cruz Biotechnology, USA*) disuelto en 5 µl/gr (p/v) de buffer de (Citrato de Sodio 50 mM, pH 4.5). El grupo control únicamente recibió el vehículo bajo las mismas condiciones que el grupo diabético.

A fin de caracterizar el modelo diabético, se realizó la medición de glucosa en sangre, peso corporal, así como del consumo de agua y alimento como se muestra en la (Figura 3 **Diseño experimental. Inducción del modelo** diabético con estreptozotocina en el día 0. Medición de glucosa y peso corporal en los días 0, 7, 14 y 21 post-tratamiento. Control de ingesta y monitoreo de la actividad cíclica ovárica durante 7 y 12 días previos respectivamente, así como durante el tiempo en que persistió el tratamiento.). La concentración de glucosa en

sangre se determinó mediante el uso de tiras reactivas (*Freestyle Optium, Abbot Laboratories, IL, USA*). Dicha medición se realizó con un ayuno previo de 8 h, antes de la inducción del modelo (día 0) y en los días 7, 14 y 21 post-tratamiento (Figura 3). Es importante mencionar que en este estudio y con base a lo descrito por *Jawerbaum and White, 2010 (47)*, se estableció como criterio de selección del grupo diabético a aquellos animales que presentaron una concentración ≥ 200 mg/dL de glucosa en sangre a partir el día 7-post tratamiento.

Por otra parte, a fin de caracterizar la pérdida de peso corporal, síntoma inherente a la condición diabética, se registró el peso corporal de los animales de ambos grupos en los mismos días 0, 7, 14 y 21 días post-tratamiento.

Finalmente, para identificar los síntomas clínicos polidipsia y polifagia, se registró el consumo de agua y de alimento en ambos grupos, durante 7 días previos a la inducción del modelo y durante el tiempo en que persistió el mismo.

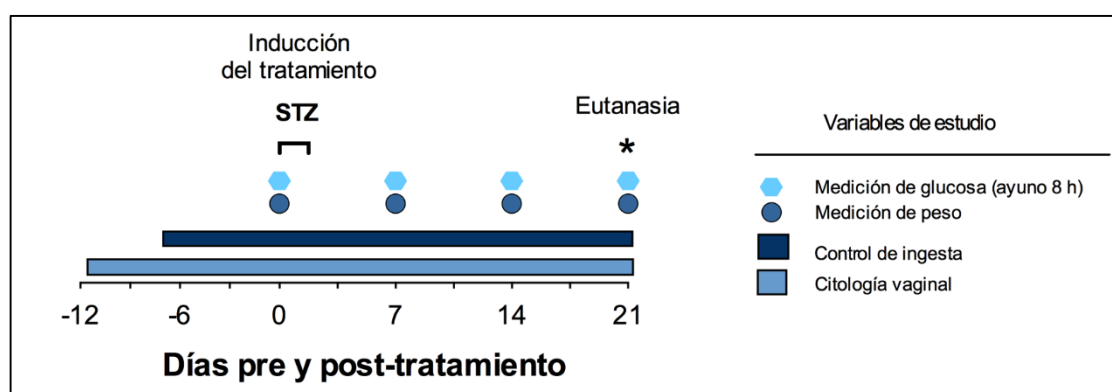


Figura 3 Diseño experimental. Inducción del modelo diabético con estreptozotocina en el día 0. Medición de glucosa y peso corporal en los días 0, 7, 14 y 21 post-tratamiento. Control de ingesta y monitoreo de la actividad cíclica ovárica durante 7 y 12 días previos respectivamente, así como durante el tiempo en que persistió el tratamiento.

6.2 Evaluación de la actividad cíclica del ovario

Para evaluar la actividad cíclica del ovario, se realizó el seguimiento del ciclo estral mediante el procedimiento de citología vaginal descrito por *Marcondes et al. 2002, (48)*. Dicho procedimiento se llevó a cabo en los animales de ambos grupos, de forma diaria y con horario

establecido (14:00-15:00 h), a partir del doceavo día previo a la inducción del modelo y durante el curso temporal del mismo (**Figura 3 Diseño experimental. Inducción del modelo** diabético con estreptozotocina en el día 0. Medición de glucosa y peso corporal en los días 0, 7, 14 y 21 post-tratamiento. Control de ingesta y monitoreo de la actividad cíclica ovárica durante 7 y 12 días previos respectivamente, así como durante el tiempo en que persistió el tratamiento.. Cabe destacar que para este trabajo, únicamente se incluyeron a aquellos animales que presentaron dos ciclos regulares de forma previa a la inducción del modelo.

6.3 Eutanasia y obtención de muestras biológicas

Transcurridos 21 post-tratamiento y previo a la eutanasia y obtención de muestras biológica se realizó el análisis de la actividad ovárica con el fin de establecer las fases comparables entre grupos. El análisis de la actividad ovárica en el grupo diabético presentó un diestro persistente desde el séptimo día postratamiento. En contraste el grupo control presentó ciclos regulares de cuatro a cinco días y sin diferencias significativas antes y durante el tratamiento (Anexo 10.1). Por tales evidencias en este estudio se decidió trabajar en etapa de diestro como parámetro de comparación entre grupos.

Los animales seleccionados se sacrificaron con una sobre-dosis de pentobarbital-sódico conforme a lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999. Una vez sedados los animales, se extrajeron 0.5 ml de sangre por punción cardiaca. Dichas muestras permanecieron en hielo hasta la obtención del suero. Simultáneamente, se extrajo el ovario derecho, se pesó y se congeló a -80°C.

Una vez que se realizó este procedimiento, cada animal se perfundió por vía intracardiaca. Para ello, se colocó una cánula en el ventrículo izquierdo del corazón y con una bomba peristáltica se administró un volumen de 50 mL de PBS seguidos de 50 mL de paraformaldehído (PFA) al 4% amortiguado con fosfatos salino (PBS, 0.1M, pH 7.4). Concluido el proceso, el páncreas y el ovario restante se disectaron mediante una incisión abdominal.

Seguido de ello, los órganos se colocaron en buffer de fosfatos-salina (0.1 M, pH 7.5), (PBS) y con ayuda de un microscopio estereoscópico (*Leica Microsystems GmbH, Germany, 23.5X*), a los ovarios se les retiró el tejido adiposo y conectivo que los rodeaba, para finalmente registrar las características macroscópicas y ser clasificados en tres grupos: control que incluyen los órganos obtenidos del grupo que no recibió STZ, atrofia e hipertrofia que correspondían a ovarios de animales diabéticos. Los ovarios atróficos, se caracterizaron por presentar un menor tamaño en comparación al grupo control y pocas estructuras intraováricas. De esta morfología únicamente se encontró únicamente en 2 animales, por lo que no se pudo realizar una comparación con los grupos restantes. Por otra parte, los ovarios clasificados como hipertrofia se presentaron un mayor tamaño mayor a los observados en el grupo control, así como la presencia de diversas estructuras, que en su mayoría fueron CLs. Esta morfología se encontró en 6 animales por lo que es con la que se realizaron las comparaciones con respecto al grupo control.

Finalmente, el páncreas (Anexo 10.2) y los ovarios se post-fijaron durante una noche en PFA al 4%. Posteriormente, los tejidos se procesaron en un gradiente de sacarosa al 10, 20 y 30%. Considerando 24 h para cada uno de los dos primeros gradientes y el resto del tiempo hasta su uso en el último porcentaje.

6.4 Identificación de receptores a gonadotropinas, calcio dependientes de voltaje, enzimas esteroideogénicas mediante Dot Blot

Previo al desarrollo de técnicas inmunológicas que permitan identificar la presencia de receptores a gonadotropinas, canales de calcio dependientes de voltaje (P/Q, N, L y T) y de las enzimas esteroideogénicas (P450_{scc} y P450 aromatasa) en el ovario, fue necesario la obtención del extracto de ovario y determinar la concentración de proteína total. Para ello, los ovarios del grupo control (n=6) y del grupo diabético (n=6) conservados a -80°C se descongelaron en hielo e inmediatamente se agruparon y se colocaron en el amortiguador de RIPA (Tris-HCL 25 mM, NaCl 150 mM, NP40 1%, Deoxicalato de sodio 1% y SDS 0.1%) que

contenía un cocktail de inhibidores enzimáticos (*Complet Mine, cat. 04693124001*) en una proporción 1:20 con respecto a su peso. Posteriormente cada grupo de ovarios se homogenizó con el empleo de un sonicador de punta (MARCA). El homogenado obtenido se centrifugó a 12000 rpm durante 30 minutos a 4°C, al término, el precipitado se descartó y al sobrenadante se le cuantificó el contenido de proteínas totales mediante un estuche comercial (*BCA Protein Assay Kit II*) tomando como referencia a la albúmina bovina (*Pierce™ BCA Protein Assay Kit, 23225*).

Se utilizaron 40 µg de proteína, del extracto de ovario de ratrón de cada grupo. Brevemente, el equipo HYBRI-SLOT™ (*Manifold, Brl*) se ensambló según las especificaciones del fabricante (*Watman Biometra*), empleando una membrana de PVDF (*Immun-Blot Low Fluorescence PVDF, 1620260*) sobre dos tiras de papel filtro (*Whatman # 54*). Previo a la aplicación de la muestra, la ranura o pozo del manifold se enjuagó con Buffer Tris-salina, (Tris 20 mM, NaCl 0.15M, pH 7.5), (TBS) y una vez colocada la muestra resuspendida en TBS, el HYBRI-SLOT se conectó a una fuente de vacío para incorporar el total de la muestra en la membrana de PVDF. Concluido este procedimiento, la membrana se retiró, se secó a temperatura ambiente y con el fin de bloquear los sitios inespecíficos, se humedeció en Buffer Tris-salina-Tween (TBS con 0.05% de Tween 20), (TTBS) con albúmina sérica bovina al 5% y suero de caballo al 3% durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Al término, la membrana se lavó tres veces con TTBS e inmediatamente se incubó a 4°C toda la noche en agitación constante con su correspondiente anticuerpo a una dilución 1:100: anti-rabbit Cav 2.1 ($\alpha 1A$), anti-rabbit Cav 2.2 ($\alpha 1B$), anti-rabbit Cav 1.2 y anti-rabbit Cav 1.3 ($\alpha 1C$, $\alpha 1D$ respectivamente), (*Alomone Labs, Jerusalem, Israel*); anti-goat Cav 3.1, Cav 3.2 y Cav 3.3), (*Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas, USA*); anti-rabbit P450sc Alexa 488 y anti-mouse P450 aromatasa Alexa 555 (*Biorbyt orb313871* y *Bioss Antibodies bs-0114M-A555, respectivamente*); así como anti-rabbit FSHr FITC y LHr Cy5 (*Bioss Antibodies bs-0895R-A488* y *bs-6431R-Cy5, respectivamente, respectivamente*).

Finalmente, la membrana se lavó e incubó en condiciones idénticas con el anticuerpo secundario acoplados (F(ab')₂Alexa 488 donkey anti-rabbit IgG (*Jackson ImmunoResearch*

Lab, West Grove, USA) y F(ab')₂Alexa 647 fraction of donkey anti-goat IgG (H+L) (*Jackson ImmunoResearch Lab, West Grove, USA*) durante 2 h a TA a una dilución 1: 500 en TBS. Transcurrido el tiempo, las membranas se lavaron y se dejaron secar. Finalmente se visualizó la unión antígeno-anticuerpo en las longitudes de onda antes indicadas en el equipo *Typhoon FLA 9500*.

6.5 Identificación de receptores a gonadotropinas, canales de calcio dependientes de voltaje y enzimas esteroidogénicas mediante inmunohistoquímica

Para caracterizar la presencia de los canales de calcio dependientes de voltaje y de las enzimas esteroidogénicas en las distintas estructuras intraováricas se realizaron inmunohistoquímicas. Para ello, los ovarios fijados se lavaron con PBS y se colocaron en un gradiente de sacarosa (10, 20 y 30% durante 24 h cada uno), para posteriormente ser incluido en medio de montaje Freeze-Mount (*HistoPerfect Embedding, BBC Biochemical*) y luego cortados a 40 µm en un criostato a -20 °C. Los cortes se recuperaron en cubreobjetos precubiertos con poli-L-lisina (*Fisher Scientific, USA*), se lavaron e incubaron en solución de permeabilización y bloqueo (PBS 0.1M, albúmina sérica bovina 2% y tritón 0.1%) durante 30 min a TA. Seguido de esto, los cortes se incubaron con los anticuerpos primarios antes mencionados en una concentración 1:100 diluidos en solución de permeabilización y bloqueo durante 1 noche en cámara húmeda a 4 °C. Al cabo de dicho tiempo, los cortes se lavaron y en caso de no haber sido incubados con anticuerpos acoplados, se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes, antes mencionados en una concentración 1:250 diluidos en PBS por 2 h a TA para finalmente ser lavados montados con Dako (*Dako Fluorescence Mounting Medium, S3023*) para su observación. Cabe destacar que para cada caso se realizó un control negativo a fin de corroborar la especificidad de los anticuerpos (Anexo 10.3).

Los líneas láser led de emisión y excitación de los cortes se visualizaron por microscopía confocal usando un microscopio (*Leica TCSP8 Microsystems, Wetzlar, Alemania*). Las imá-

genes se adquirieron utilizando las longitudes de onda de emisión y excitación de los fluoróforos Alexa 488, FITC, Alexa 555 y Cy5. Para la reconstrucción completa de los ovarios, las muestras se examinaron con un objetivo 20X. Los parámetros de exposición se ajustaron de acuerdo al rango de intensidad del grupo control. Los parámetros de imagen (ganancia, potencia del láser y pinhole) permanecieron fijos durante la para ambos grupos. Las imágenes digitales se almacenaron en formato de imagen TIF para su análisis.

6.6 Análisis de imágenes

En ambos grupos se utilizaron 6 cortes para estimar el porcentaje de área y la intensidad media de fluorescencia (IMF) por cada marca estudiada. Para ello, las imágenes se analizaron en el programa Fiji ImageJ (*NIH, USA*). En ellas se estableció la escala en micrómetros correspondiente, posteriormente se delimitó el contorno de cada ovario. Seguido de ello, las imágenes se filtraron con el algoritmo mediana a dos pixeles (*Make Binary*) para obtener la imagen binaria del marcaje fluorescente y en ella los datos mencionados.

6.7 Determinación de la concentración de hormonas en suero

La determinación de la concentración de hormonas esteroides se determinó mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Para ello, se utilizaron de 20 a 40 μL al cual se le adicionó un volumen equivalente de 20 - 40 μL de ácido perclórico La mezcla se agitó por 30 s y posteriormente se le añadieron entre 40-80 μL de acetonitrilo grado HPLC. Se agito por 30 s, se centrifugo por 10 min para separar el sobrenadante que se evaporó a sequedad por vacío en un SpeedVac. El concentrado, se resuspendió en 100 μL de fase móvil de disolución que consiste en metanol: ácido perclórico (9:1).

Finalmente se inyectaron 20 μL de la muestra en el equipo de cromatografía de alta eficiencia (HPLC) marca Waters. La separación se realizó en una columna Spherisorb ODS2, de 4.6mm x 150mm y 3 μm de diámetro de partícula marca Waters (No. PSS832113), el proceso se hizo a temperatura ambiente. La detección se realizó con un detector espectrofotométrico de UV (*Jasco, UV-2075*) a una longitud de onda de 280nm. La elución fue por gradiente,

utilizando como fase móvil acuosa H₂O y acetonitrilo (4:1) y como orgánica metanol grado HPLC. El gradiente fue lineal iniciando al 10% de fase acuosa y 90% de orgánica, de ahí se incrementó al 100% de fase orgánica, manteniéndolo 5 minutos y al minuto 20 se regresó a la condición basal estabilizando la columna por 10 minutos. El flujo de elución fue de 1.0ml/min. Los datos generados se procesaron con el software Empower.

Los estándares utilizados fueron progesterona (*Sigma, P0130*) y β -estradiol (*Sigma, E8515*) El factor de respuesta fue para la progesterona de 7.307×10^{-4} y para β -estradiol fue de 9.285×10^{-5} . Las concentraciones se determinaron por el método de estándares externo. El tiempo de elución para la progesterona es de 3.70 ± 0.1 y para el β estradiol 6.41 ± 0.1 .

6.8 Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados experimentales se utilizó estadística paramétrica de acuerdo a los resultados obtenidos de las pruebas distribución normal (prueba *Kolmogorov Smirnov*) y de homogeneidad de varianza (prueba de *F* para comparar varianzas) incluidos en el programa estadístico Prism 6.0 (*GraphPad, Software Inc., USA*).

Por otra parte, se utilizó la prueba de ANOVA de dos vías, seguida de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni para comparar los cambios semanales en la concentración de glucosa en sangre, peso corporal, consumo de agua y alimento; así como para la comparación entre el periodo pre y post-tratamiento en la actividad cíclica ovárica. Adicionalmente, se utilizó la prueba *t de student* para realizar la comparación entre el porcentaje de área y IMF en cada grupo con su respectiva marca; y en la concentración de hormonas esteroides. En cada caso, se consideró un valor de $p < 0.05$ como significativo.

7 Resultados

7.1 Inducción del modelo de diabetes mediante la administración de STZ

La administración de STZ indujo un modelo de diabetes con un efectividad del 88%. De manera particular se observó que los animales del grupo diabético mostraron un aumento progresivo de la concentración de glucosa en sangre (Figura 4 La **administración de STZ induce un modelo de diabetes**. A) Gráficas barras de los valores individuales de glucosa en sangre, B) y C) Inmunohistoquímicas representativas de la marca de insulina en células β pancreáticas en el grupo control y tratado respectivamente, D) Gráficas de puntos y líneas del cambio porcentual (Δ) del peso corporal con respecto al valor inicial normalizado al 100% y F) Gráficas de barras de la ingesta de alimento y G) agua en ratones control y tratadas con estreptozotocina (STZ) para inducir un modelo experimental de diabetes diabético. Las gráficas muestran los valores promedios (\pm EE). * Indica diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). Lo anterior, se asoció a la falta de células β pancreáticas en el grupo diabético con respecto al grupo control (Figura 4 La **administración de STZ induce un modelo de diabetes**. A) Gráficas barras de los valores individuales de glucosa en sangre, B) y C) Inmunohistoquímicas representativas de la marca de insulina en células β pancreáticas en el grupo control y tratado respectivamente, D) Gráficas de puntos y líneas del cambio porcentual (Δ) del peso corporal con respecto al valor inicial normalizado al 100% y F) Gráficas de barras de la ingesta de alimento y G) agua en ratones control y tratadas con estreptozotocina (STZ) para inducir un modelo experimental de diabetes diabético. Las gráficas muestran los valores promedios (\pm EE). * Indica diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). Adicionalmente, el modelo se caracterizó por la pérdida progresiva del peso corporal, mientras que el grupo control presentó un ligero aumento de peso con respecto a la evaluación inicial (Figura 4 La **administración de STZ induce un modelo de diabetes**. A) Gráficas

barras de los valores individuales de glucosa en sangre, B) y C) Inmunohistoquímicas representativas de la marca de insulina en células β pancreáticas en el grupo control y tratado respectivamente, D) Gráficas de puntos y líneas del cambio porcentual (Δ) del peso corporal con respecto al valor inicial normalizado al 100% y F) Gráficas de barras de la ingesta de alimento y G) agua en ratones control y tratadas con estreptozotocina (STZ) para inducir un modelo experimental de diabetes diabético. Las gráficas muestran los valores promedios (\pm EE). * Indica diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). Finalmente, los animales del grupo diabético presentaron de forma consistente polifagia y polidipsia a los 7 y 14 días post-tratamiento, respectivamente (Figura 4 **La administración de STZ induce un modelo de diabetes.** A) Gráficas barras de los valores individuales de glucosa en sangre, B) y C) Inmunohistoquímicas representativas de la marca de insulina en células β pancreáticas en el grupo control y tratado respectivamente, D) Gráficas de puntos y líneas del cambio porcentual (Δ) del peso corporal con respecto al valor inicial normalizado al 100% y F) Gráficas de barras de la ingesta de alimento y G) agua en ratones control y tratadas con estreptozotocina (STZ) para inducir un modelo experimental de diabetes diabético. Las gráficas muestran los valores promedios (\pm EE). * Indica diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$).

7.2 Determinación de la presencia de factores esteroideogénicos mediante Dot-blot

Para la primera parte del trabajo, se encontró que los receptores a gonadotropinas, los CCDV y las enzimas esteroideogénicas se encuentran sin cambios en ambos grupos durante la fase de diestro (**Figura 5 Imagen representativa de Dot blot.** Muestra la presencia de CCDV (P/Q, N, L y T), receptores a gonadotropinas (FSH y LHI, así como enzimas esteroideogénicas (P450scc y P450 aromatasa) en los grupos control y diabético.).

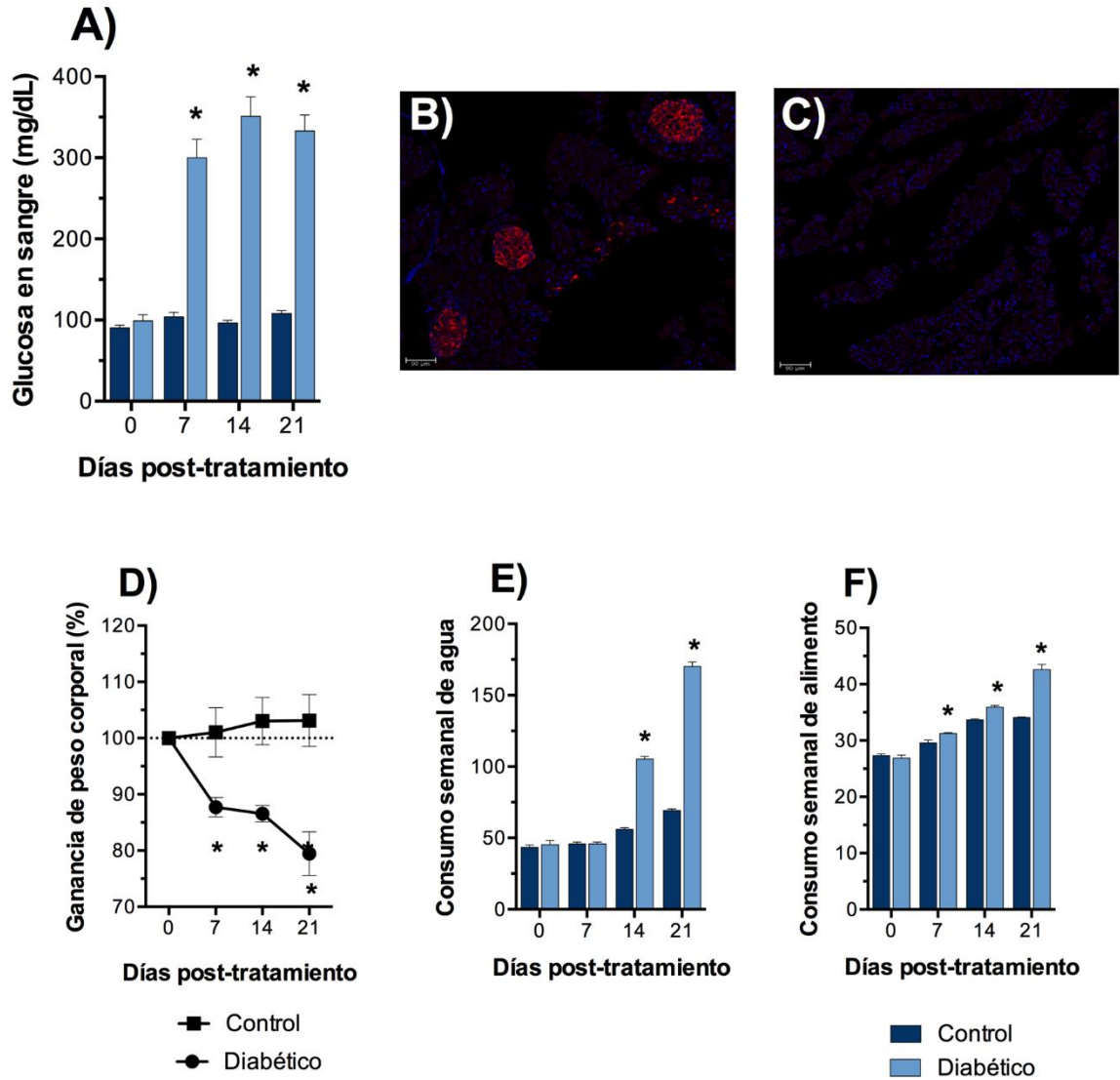


Figura 4 La administración de STZ induce un modelo de diabetes. A) Gráficas barras de los valores individuales de glucosa en sangre, B) y C) Inmunohistoquímicas representativas de la marca de insulina en células β pancreáticas en el grupo control y tratado respectivamente, D) Gráficas de puntos y líneas del cambio porcentual (Δ) del peso corporal con respecto al valor inicial normalizado al 100% y E) Gráficas de barras de la ingesta de alimento y F) agua en ratones control y tratados con estreptozotocina (STZ) para inducir un modelo experimental de diabetes diabético. Las gráficas muestran los valores promedios (\pm EE). * Indica diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$).

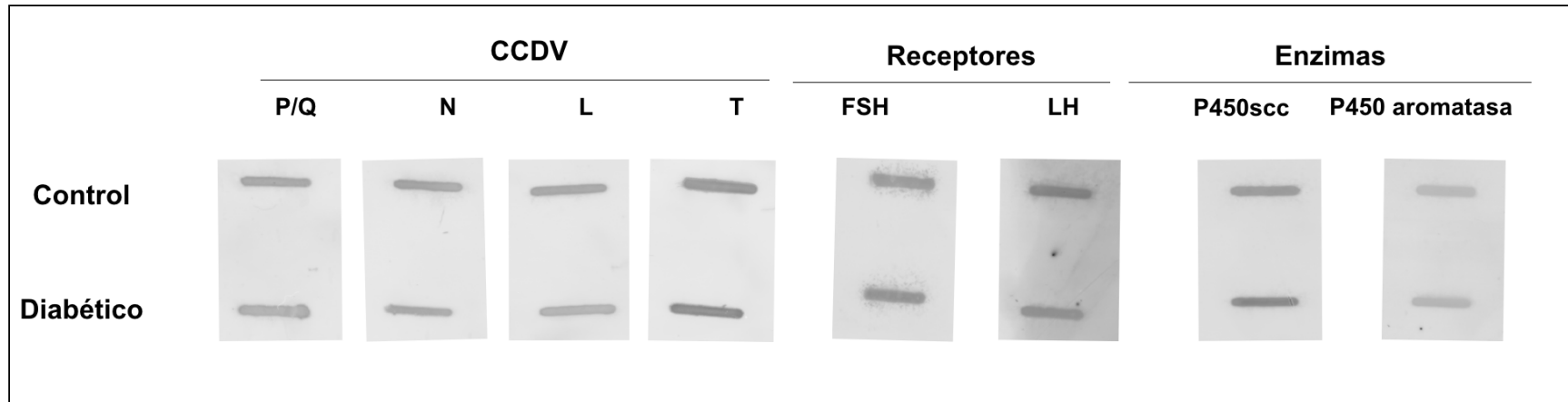


Figura 5 Imagen representativa de Dot blot. Muestra la presencia de CCDV (P/Q, N, L y T), receptores a gonadotropinas (FSH y LHI, así como enzimas esteroideogénicas (P450scc y P450 aromatasa) en los grupos control y diabético.

7.3 Caracterización de los cambios en la presencia de factores esteroideogénicos en la condición diabética

7.3.1 Presencia de los receptores a gonadotropinas en el ovario

Durante la caracterización de la presencia de receptores a gonadotropinas, se observó que el FHR se encuentra en folículos en diferentes fases de desarrollo, específicamente en las CGs de los folículos antrales (**Figura 6 Presencia de FSHRA, B**). Dicha marca se localizó en las mismas células de los folículos en el grupo diabético (**Figura 6 Presencia de FSHRC, D**). Sin embargo, se observó que esta proteína inmunorreactiva tuvo una notable disminución en cuanto a al porcentaje de área y la intensidad de la fluorescencia (**Figura 6 Presencia de FSHR E, F**).

En cuanto al LHR se obtuvo que en el grupo control presentó en menor proporción en las células luteales de los CLs y en mayor proporción en las CGs y CT de los folículos, antrales (**Figura 7 Presencia de LHR en el ovarioA, B**). Lo anterior se encontró de manera similar en el grupo diabético (**Figura 7 Presencia de LHR en el ovarioC, D**). En este receptor, interesantemente, ni el porcentaje de área que ocupa la marca, ni la intensidad de la fluorescencia presentaron diferencias significativas entre los grupos (**Figura 7 Presencia de LHR en el ovarioE, F**).

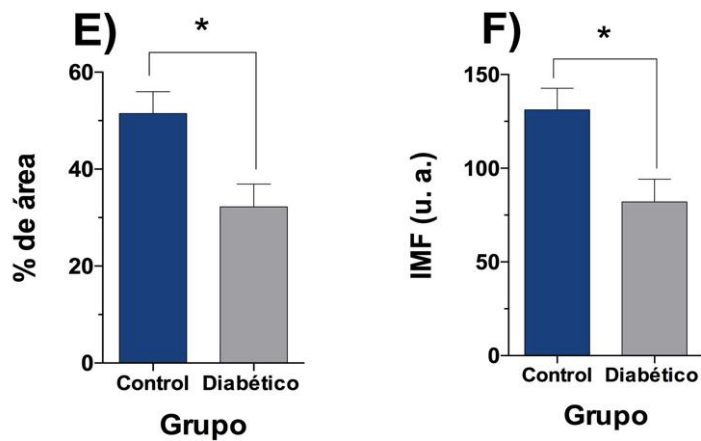
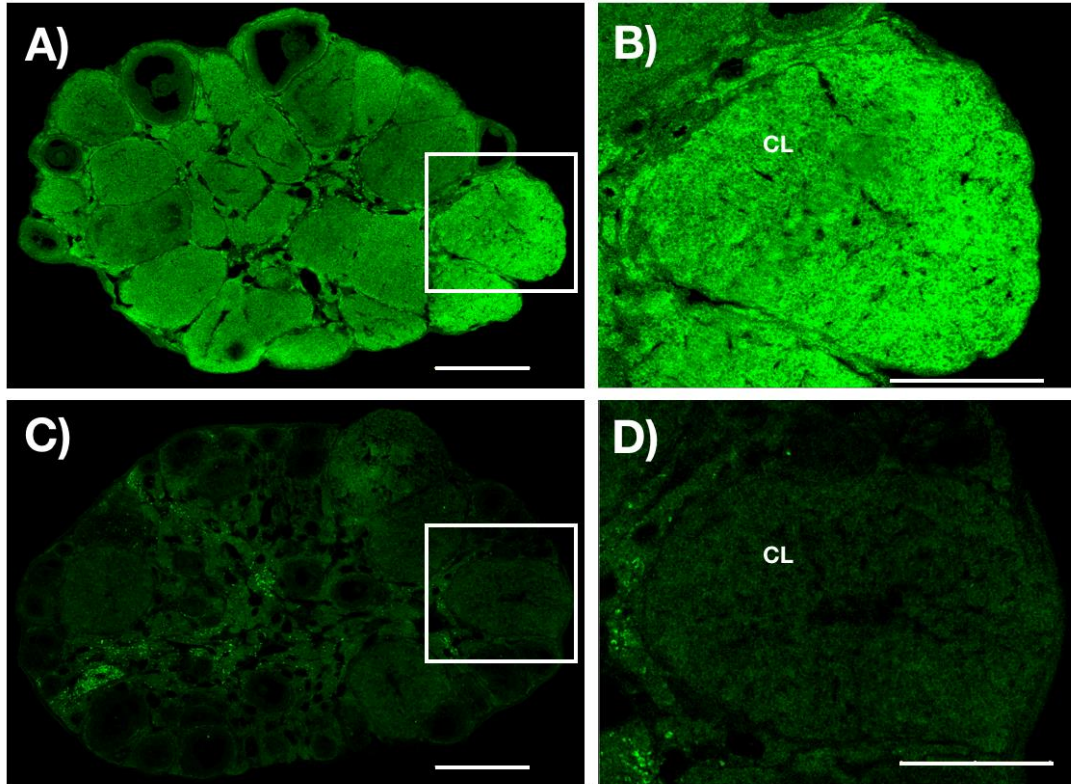


Figura 6 Presencia de FSHR en el ovario. Microfotografías representativas de secciones de ovarios de ratón control (A) y diabético (C). En los acercamientos de las zonas seleccionadas (B) y (D) se presenta un folículo antral. Nótese que en el grupo control la marca es uniforme, mientras que en el grupo experimental la marca es difusa. CG= células de la granulosa, CT= células de la teca y OO=ovocito. Barras de escala: A y C= 500 μ m, B y D= 250 μ m. Comparación en el porcentaje de área de la marca (E) y en la IMF (F) en los dos grupos. En ambos casos se muestra una gráfica de barras y el análisis estadístico corresponde a una *t de student* considerando una $p < 0.05$ como significativa, * indica diferencias significativas.

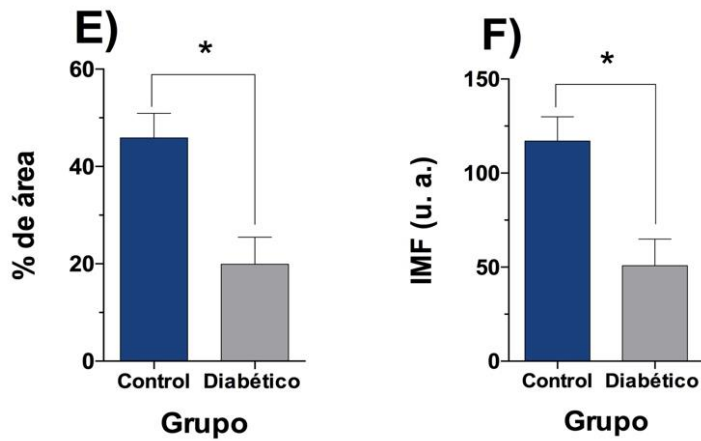
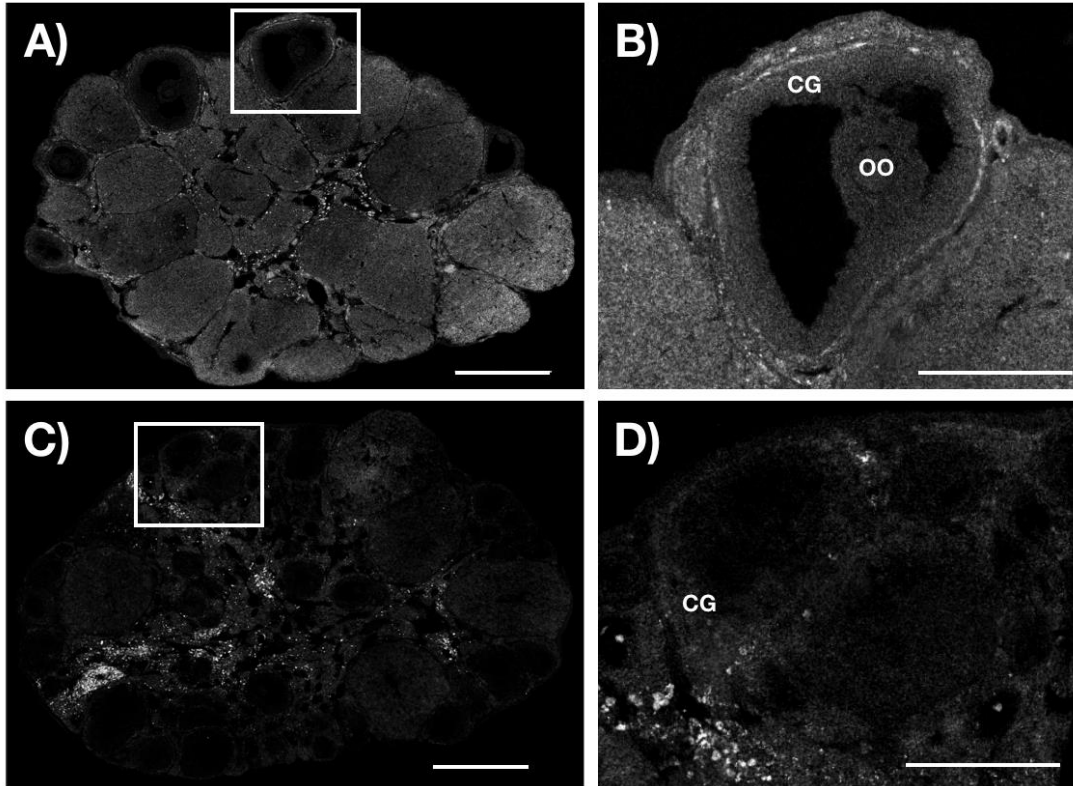


Figura 7 Presencia de LHR en el ovario. Microfotografías representativas de secciones de ovarios de ratón control (A) y diabético (C). En los acercamientos de las zonas seleccionadas (B) y (D) se presenta un folículo antral. En este caso se observa que la marca es semejante en ambos casos. CG= células de la granulosa, CT= células de la teca y OO=ovocito. Barras de escala: A y C= 500 μ m, B y D= 250 μ m. Comparación en el porcentaje de área de la marca (E) y en la IMF (F) en los dos grupos. En ambos casos se muestra una gráfica de barras y el análisis estadístico corresponde a una *t de student* considerando una $p < 0.05$ como significativa.

7.3.2 Presencia de los canales de calcio dependientes de voltaje en el ovario

Con respecto a la presencia de los CCDV, se encontró que el grupo control presentó una expresión diferencial en las estructuras intraováricas. Por otra parte, también se observó que dicha expresión mostró cambios en condiciones experimentales.

De manera específica se observó que el canal P/Q se presentó en folículos preovulatorios y en los CLs. En este sentido, no se observó diferencia entre la marca en los diferentes estadios de desarrollo de la estructura (**Figura 8 Presencia del CCDV P/Q, B**). En cuanto al grupo diabético, la marca fue escasa en folículos, mientras que en los CLs se presentó fue poco consistente (**Figura 8 Presencia del CCDV P/Q A, D**). Lo anterior aunado a una notable disminución en cuanto al porcentaje de área y la intensidad de fluorescencia para esta proteína (**Figura 8 Presencia del CCDV P/Q, F**).

La distribución del canal N en el grupo control fue principalmente en el estroma, particularmente en el músculo liso que rodea a las estructuras intraováricas, en los ovocitos y en menor medida en las células de la granulosa (**Figura 9 Presencia del CCDV NA, B**). De manera semejante, se observó la expresión del canal en el grupo diabético (**Figura 9 Presencia del CCDV NC, D**). En este caso, la marca presentó mayor área e intensidad de la fluorescencia pero no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control (**Figura 9 Presencia del CCDV NE, F**).

En cuanto al canal L, que se encuentra ampliamente distribuido en distintos tipos celulares de los vertebrados, se observó en mayor proporción con respecto al resto de los canales. De forma peculiar se encontró que este canal se presenta tanto en ovocitos, así como en folículos y CLs. Sin embargo, en este caso se encontró que la marca con mayor proporción se presenta en folículos de estadios avanzados de desarrollo, como los preovulatorios y en los CLs maduros (**Figura 10 Presencia del CCDV LA, B**). De forma similar, en el grupo diabético esta marca se presentó en estructuras semejantes pero en menor proporción que en el grupo control (**Figura 10 Presencia del CCDV LC, D**). Lo anterior sobre todo al considerar que el porcentaje de área y la intensidad de la fluorescencia en los ovarios del grupo tratado mostró

una disminución significativa con respecto al grupo control (**Figura 10 Presencia del CCDV LE, F**).

Por último en cuanto a la expresión de CCDV, se encontró que el canal T se distribuye de manera diferencial en CLs y folículos (**Figura 11 Presencia del CCDV T A**). En los primeros se encontró en mayor proporción en estructuras maduras (**Figura 11 Presencia del CCDV TB**). Con respecto a la expresión en folículos, se encontró que este canal se encuentra en los ovocitos y en las células de la teca. Por otra parte, en el grupo tratado, se observó que la marca se presentó en mayor proporción en el ovario. Particularmente, se obtuvo que este canal se presentó en el estroma, ovocitos, folículos en diferentes estadios de desarrollo y en CLs (**Figura 11 Presencia del CCDV TC, D**). Además, la marca del canal T mostró diferencias significativas en el porcentaje de área que ocupa dentro del tejido. En especial se encontró un mayor porcentaje de área y la intensidad e fluorescencia (**Figura 11 Presencia del CCDV TE, F**).

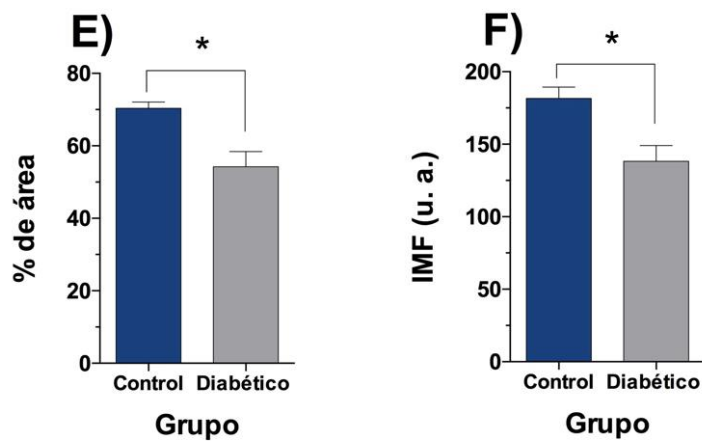
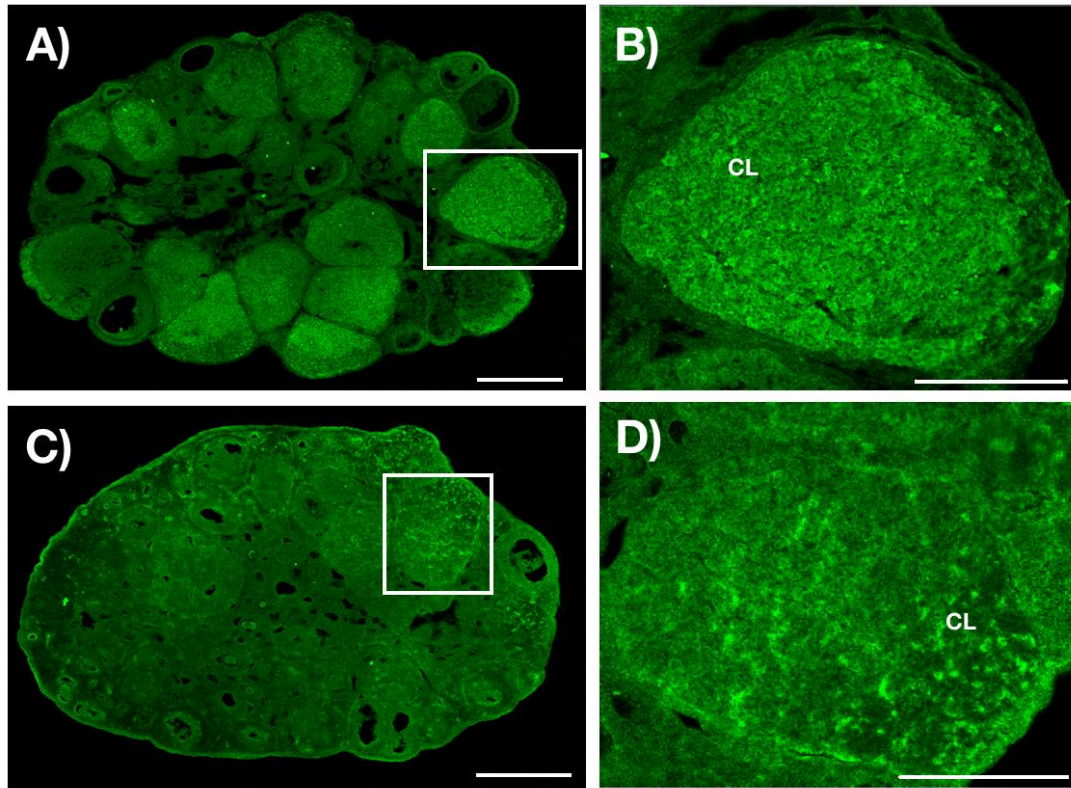


Figura 8 Presencia del CCDV P/Q. Microfotografías representativas de secciones de ovarios de ratón control (A) y diabético (C). En los acercamientos de las zonas seleccionadas (B) y (D) se presenta un cuerpo lúteo. Nótese que en el grupo control la marca es uniforme, mientras que en el grupo diabético no lo es. Además se observa que la expresión de este canal se encuentra en menos estructuras en el grupo control. CL= células luteales. Barras de escala: A y C= 500 μ m, B y D= 250 μ m. Comparación en el porcentaje de área de la marca (E) y en la IMF (F) en los dos grupos. En ambos casos se muestra una gráfica de barras y el análisis estadístico corresponde a una *t de student* considerando una $p < 0.05$ como significativa, * indica diferencias significativas.

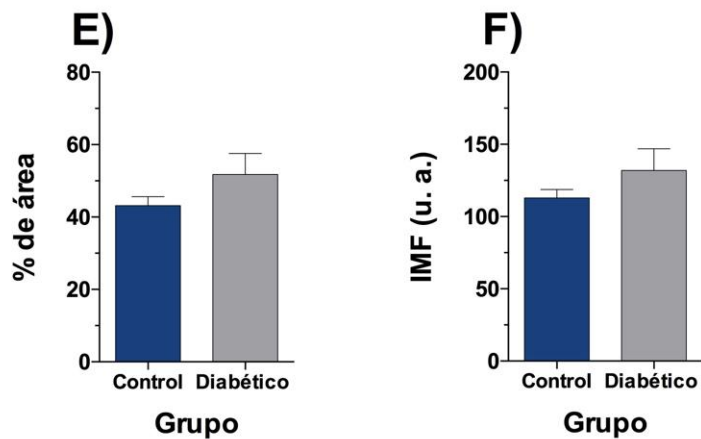
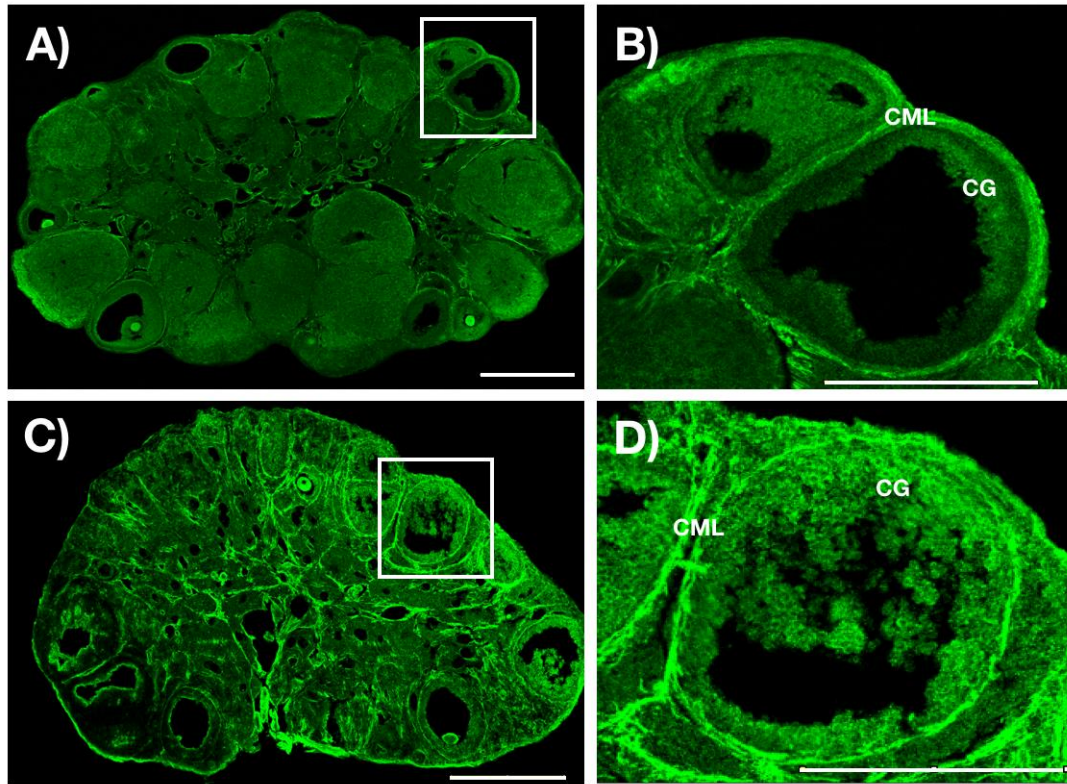


Figura 9 Presencia del CCDV N. Microfotografías representativas de secciones de ovarios de ratón control (A) y diabético (C). En los acercamientos de las zonas seleccionadas (B) y (D) se presenta un folículo antral. Nótese que en ambos grupos, la principal marca se localiza en las células del estroma que rodean a las estructuras intraováricas. CG= células de la granulosa, CML= células del músculo liso. Barras de escala: A y C= 500 μ m, B y D= 250 μ m. Comparación en el porcentaje de área de la marca (E) y en la IMF (F) en los dos grupos. En ambos casos se muestra una gráfica de barras y el análisis estadístico corresponde a una *t de student* considerando una $p < 0.05$ como significativa.

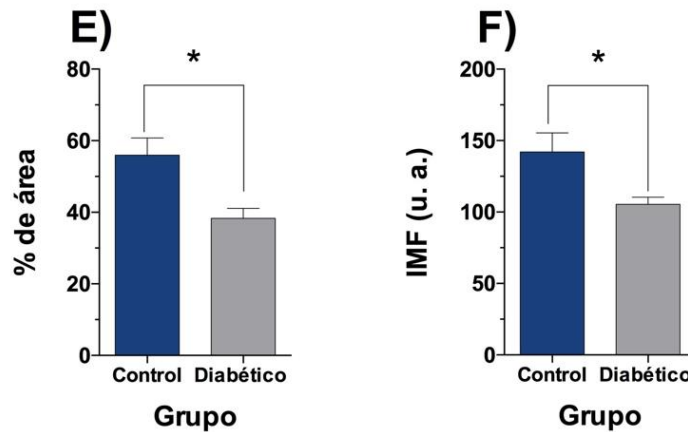
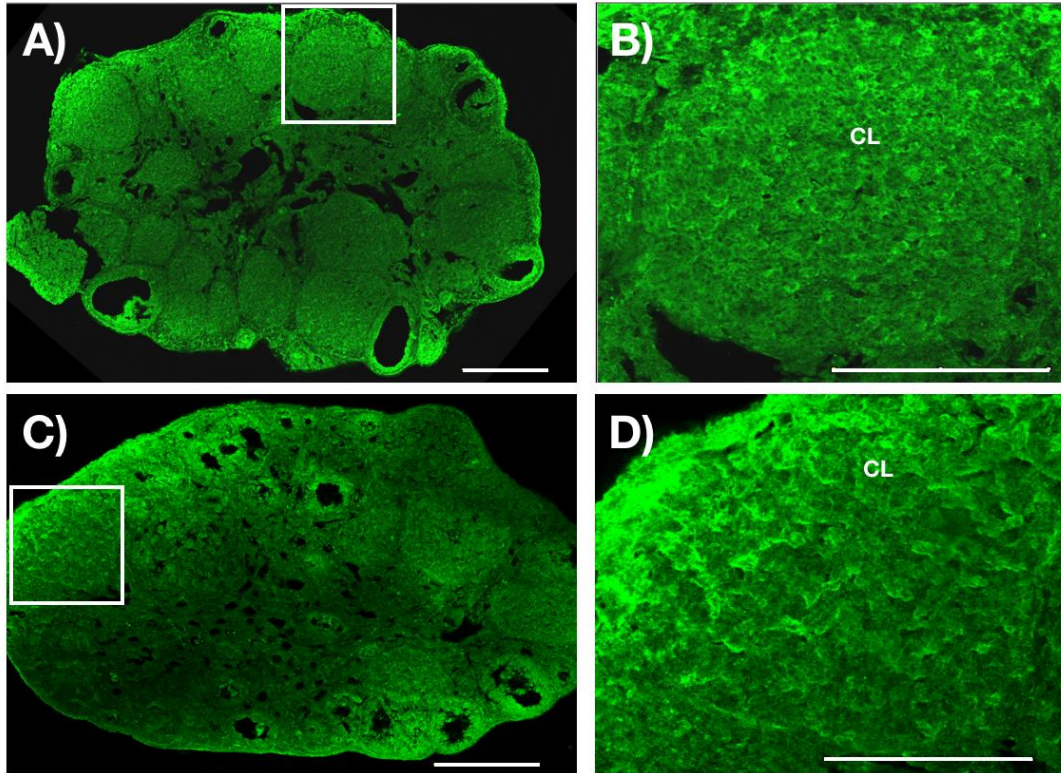


Figura 10 Presencia del CCDV L. Microfotografías representativas de secciones de ovarios de ratón control (A) y diabético (C). En los acercamientos de las zonas seleccionadas (B) y (D) se presenta un cuerpo lúteo. Nótese que en el grupo control la marca es uniforme, mientras que en el grupo diabético no lo es. Además se observa que la expresión de este canal se encuentra en menos estructuras en el grupo control. CL= células luteales. Barras de escala: A y C= 500 μ m, B y D= 250 μ m. Comparación en el porcentaje de área de la marca (E) y en la IMF (F) en los dos grupos. En ambos casos se muestra una gráfica de barras y el análisis estadístico corresponde a una *t de student* considerando una $p < 0.05$ como significativa, * indica diferencias significativas.

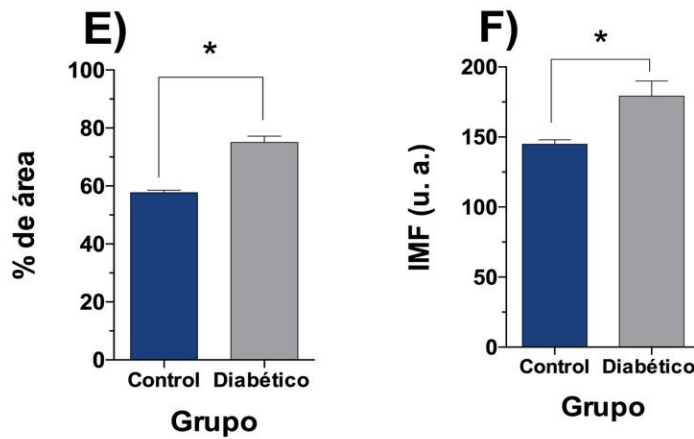
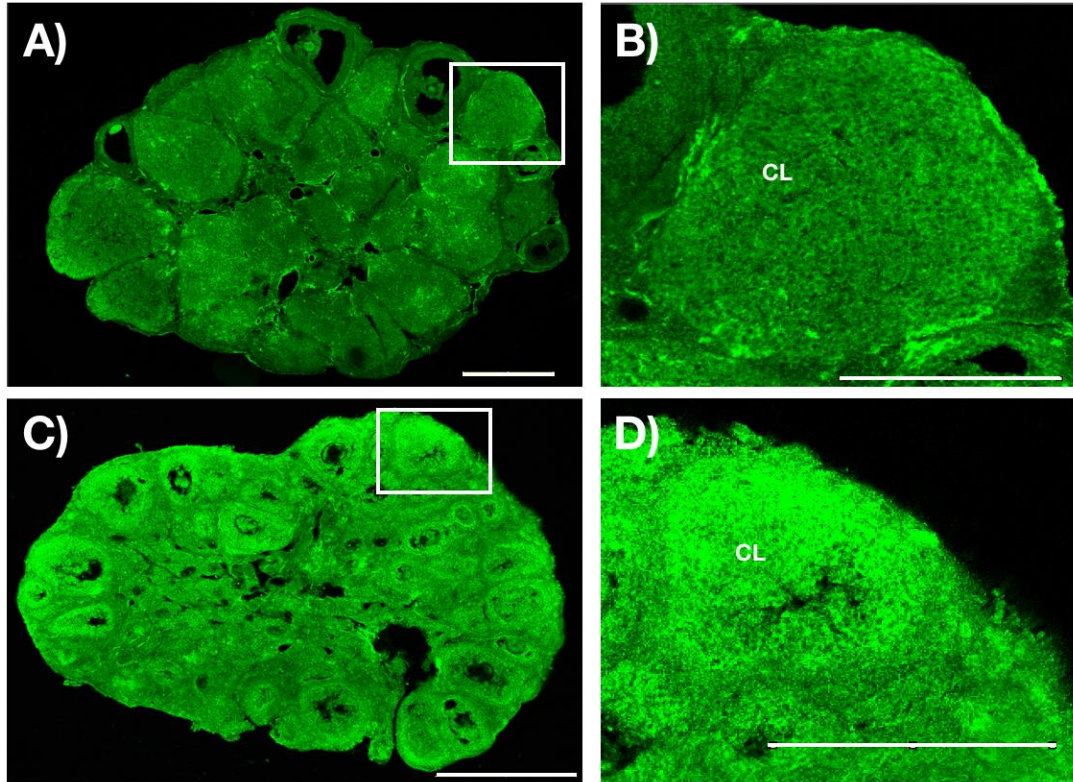


Figura 11 Presencia del CCDV T. Microfotografías representativas de secciones de ovarios de ratón control (A) y diabético (C). En los acercamientos de las zonas seleccionadas (B) y (D) se presenta un cuerpo lúteo. En este caso se observó que la marca se encuentra mayormente distribuida en el grupo tratado. CL= células luteales. Barras de escala: A y C= 500 μ m, B y D= 250 μ m. Comparación en el porcentaje de área de la marca (E) y en la IMF (F) en los dos grupos. En ambos casos se muestra una gráfica de barras y el análisis estadístico corresponde a una *t de student* considerando una $p < 0.05$ como significativa, * indica diferencias significativas.

7.3.3 Presencia de las enzimas P450_{scc} y P450 aromatasa

Por último, en cuanto a la expresión de las enzimas esteroidogénicas, se observó que éstas se encontraron de manera general en menor proporción en el grupo diabético. De manera particular se observó que la enzima P450_{scc} necesaria para comenzar la esteroidogénesis se distribuye en folículos y CLs (**Figura 12 A**). Sin embargo, de manera especial se observó en CLs maduros (**Figura 12 B**). Por otra parte, pese a que la marca se encontró en las mismas estructuras que en el grupo control, en el grupo diabético se presentó en menor proporción (**Figura 12 C, D**). En este sentido, se encontró que el porcentaje de área y la intensidad de la fluorescencia que ocupó esta marca en el grupo diabético presentó diferencias significativas (**Figura 12 E, F**).

Con respecto a la expresión de la enzima P450 aromatasa, se observó que en el grupo control la marca se distribuye en principalmente en folículos (**Figura 13A, B**). Mientras que en el grupo diabético aunque también se encontró la marca, ésta fue menor (**Figura 13 C, D**). Y al igual que la enzima antes mencionada, presentó diferencias significativas con respecto al grupo control (**Figura 13 E, F**).

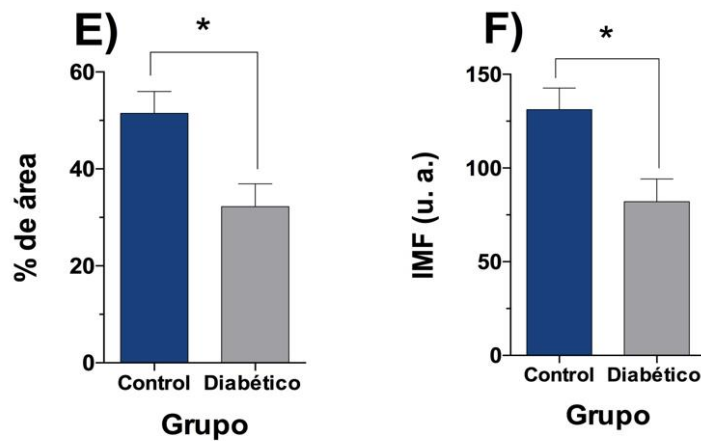
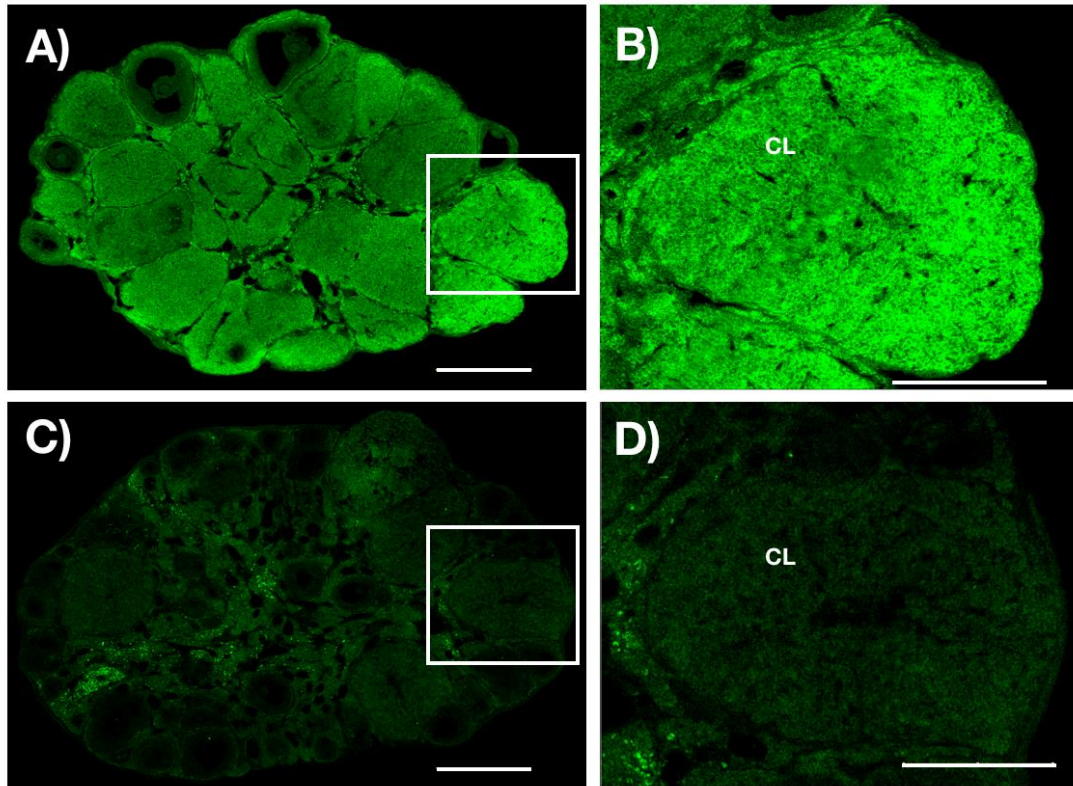


Figura 12 Presencia de la enzima esteroideogéncia P450sc. Microfotografías representativas de secciones de ovarios de ratón control (A) y diabético (C). En los acercamientos de las zonas seleccionadas (B) y (D) se presenta un cuerpo lúteo. Nótese que aunque la marca se encuentra distribuida de manera semejante en ambos grupos, la marca es mucho menor en el grupo diabético. CL= células luteales. Barras de escala: A y C= 500 μ m, B y D= 250 μ m. Comparación en el porcentaje de área de la marca (E) y en la IMF (F) en los dos grupos. En ambos casos se muestra una gráfica de barras y el análisis estadístico corresponde a una *t de student* considerando una $p < 0.05$ como significativa, * indica diferencias significativas.

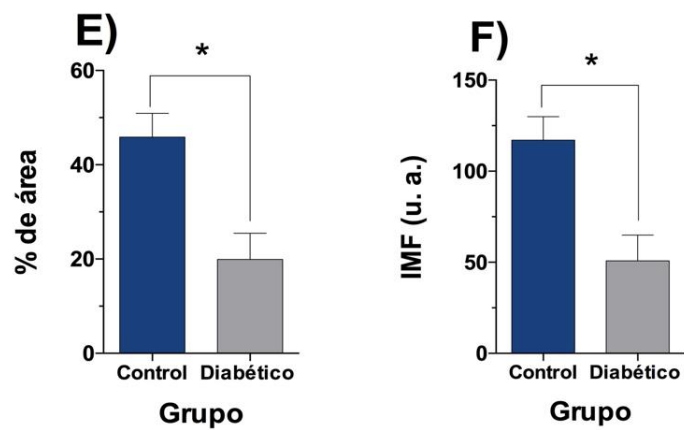
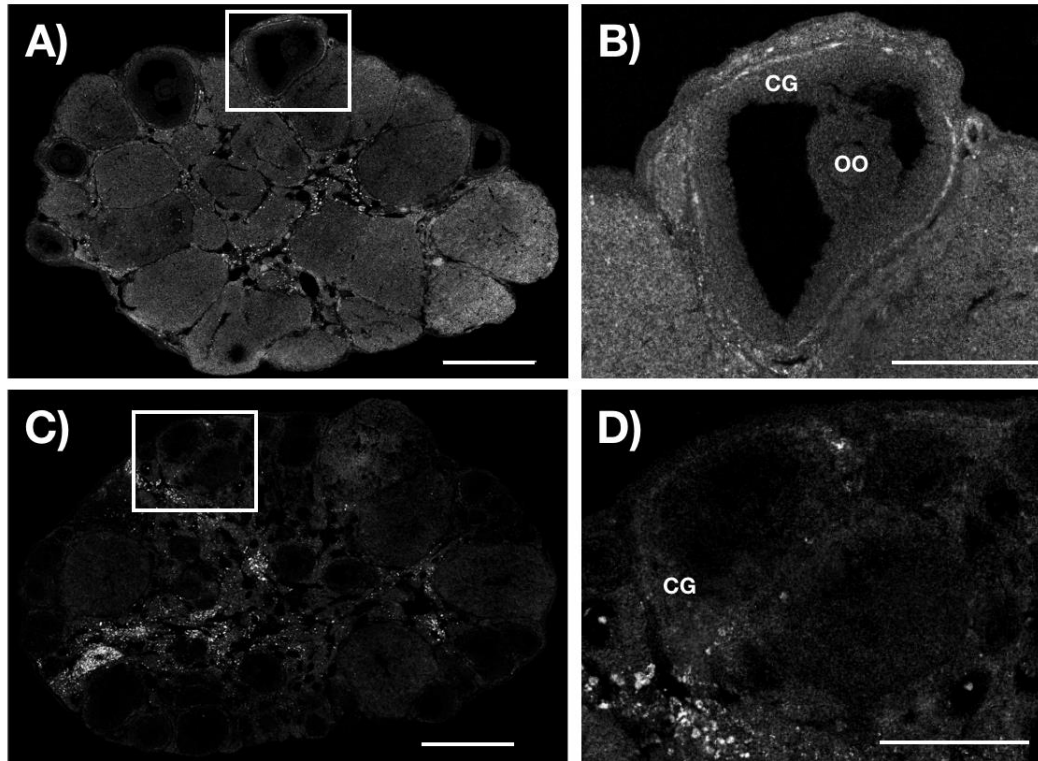


Figura 13 Presencia de la enzima esteroidogéncia P450 aromatasa. Microfotografías representativas de secciones de ovarios de ratón control (A) y diabético (C). En los acercamientos de las zonas seleccionadas (B) y (D) se presenta un cuerpo lúteo. Nótese que aunque la marca se encuentra distribuida de manera semejante en ambos grupos, la marca es mucho menor en el grupo diabético. CL= células luteales. Barras de escala: A y C= 500 μ m, B y D= 250 μ m. Comparación en el porcentaje de área de la marca (E) y en la IMF (F) en los dos grupos. En ambos casos se muestra una gráfica de barras y el análisis estadístico corresponde a una *t de student* considerando una $p < 0.05$ como significativa, * indica diferencias significativas.

7.4 La producción de hormonas esteroides presenta cambios bajo la condición diabética

Durante el diestro la producción de P_4 es mostró un incremento significativo, esto debido a que los CLs se encuentran en la fase secretora. Así mismo, se observó que la producción de E_2 muestra un incremento en respuesta al desarrollo folicular. Por el contrario, los niveles de ambas hormonas presentaron disminución significativa en el grupo diabético con respecto al grupo control (Figura 14).

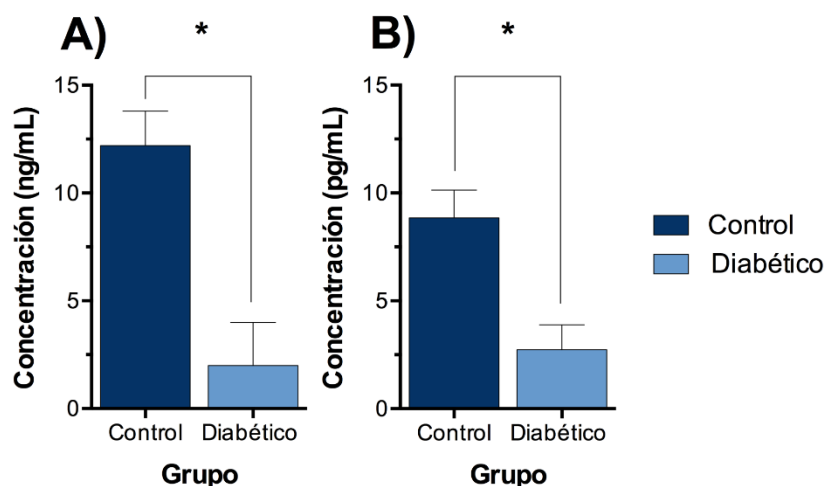


Figura 14 Cambios en la producción de hormonas esteroides. Gráficas de barras, en A) Concentración de Progesterona y B) Concentración de Estradiol en sangre. En cada caso se presentan los valores promedios (\pm EE). *Indica diferencias significativas con $p < 0.05$.

8

Discusión y conclusión

La evidencia clínica sugiere que parte de los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a la disfunción reproductiva diabética se asocian a cambios en la producción y/o secreción de las hormonas esteroides por el ovario (3). Sin embargo, las evidencias actuales asociadas a estos mecanismos son insuficiente. En el presente estudio se demostró con el modelo de diabetes inducido con estreptozotocina en roedores es adecuado, al permitir evidenciar cambios en la concentración de hormonas esteroides (P_4 y E_2), en los receptores a gonadotropinas (FSHR y LHR), en los CCDV (P/Q, N, L y T), así como en las enzimas esteroideas (P450scc y 450 aromatasas) durante la fase de diestro.

En este trabajo se consideró la intensidad de la inmunofluorescencia como un parámetro semicuantitativo de la presencia de las proteínas a evaluar. Se sabe que durante la etapa de diestro el número de receptores a gonadotropinas se distribuyen de manera desigual en las diferentes estructuras ováricas con el fin de modular la capacidad reproductiva (49). En el grupo control se presentó un patrón de inmunofluorescencia para el FSHR predominante en las células de la granulosa, mientras que el patrón de inmunofluorescencia para LHR se observó en células intersticiales, en células de la teca, en células de la granulosa de folículos preovulatorios y sobre todo en células luteas, lo cual es consistente con lo descrito previamente *Camp y colaboradores, 1991 (50)*. En contraste, en los animales que recibieron STZ disminuyó la intensidad de la inmunofluorescencia para el FSHR en folículos, mientras que para el LHR no se observaron cambios en la intensidad de fluorescencia. Estos resultados sugieren que el tratamiento de STZ probablemente reduce la síntesis del receptor (1). De ser este el caso, se puede proponer que el cambio en el número de los FSHR en esta condición fisiopatológica se encuentra asociado a las distintas vías de señalización que ocurren dentro del ovario y que conllevan a la producción de hormonas esteroides.

Al respecto está bien documentada la participación de la vía dependiente de AMPc (8), sin embargo, la vía de fosfatidil-inositol aún no se ha descrito claramente. En este estudio se exploró esta última vía en la que participa el Ca^{2+} como segundo mensajero, y que según los resultados obtenidos podría jugar un papel importante en la producción de P_4 y E_2 como se ha descrito para la vía de señalización del diacilglicerol (DAG), (4, 11, 12, 41). Por ejemplo, *Veldhuis y Klase, 1982 (11)*; demostraron que los cambios en la concentración de Ca^{2+} extracelular alteran la esteroidogénesis estimulada por LH en CGs luteinizadas, al alterar la entrada de Ca^{2+} por la membrana plasmática de la célula. Estudios recientes confirmaron que los inhibidores de los CCDV disminuyen la producción de esteroides inducida por hormona coriónica humana (hCG) en las células de la teca y de la granulosa de peces en co-cultivo (12). Por otro lado, se ha reportado que en presencia de FSH las células de la granulosa del cerdo incrementan la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y tanto el DAG como el inositol trifosfato (IP_3) desencadenan la movilización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de pozas internas como el retículo endoplásmico en estas (13, 41, 42).

En la presente investigación, los resultados obtenidos muestran que los CCDV se localizan en las diferentes en las estructuras del ovario; desde la médula a la corteza, e interesante-mente la distribución de cada canal presenta un patrón perfectamente localizado. En el grupo control se encontró específicamente que los CCDV P/Q, L y T se distribuyen uniformemente en los folículos preovulatorios y el cuerpo lúteo, estructuras ováricas con mayor actividad durante el diestro. Estos resultados se apoyan en el trabajo de *Chen y colaboradores, 2003(14)* quienes confirmaron que se induce el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por la incubación con el ionóforo de Ca^{2+} A23187 potencia significativamente la producción de hormonas esteroides estimuladas por hCG. Esto sugiere que la mayor actividad del CL y los folículos preovulato-rios durante el diestro, se asociación a la presencia de los canales antes mencionados.

Un hallazgo interesante en este estudio, correspondió a la presencia de los canales P/Q y N en el cuerpo lúteo y el estroma del ovario. Al respecto, la información descrita a la fecha muestra que estos canales se localizan principalmente en cerebro e hipófisis, donde participan en la vía de señalización de fosfatidil-inositol durante la liberación de neurotransmisores,

neurosecreción, excitación neuronal, supervivencia de neuronas y regulación de expresión de genes o bien en la en el desarrollo de enfermedades neurológicas como la epilepsia (51).

Así mismo, se encontró que los canales P/Q se distribuyen de manera diferencial en el ovario, posiblemente asociados a las distintas actividades que realizan los diferentes tipos celulares del ovario. Particularmente, el canal P/Q se presentó en cuerpo lúteo del grupo control, contrariamente este canal fue escaso y poco uniforme en el grupo diabético en las diferentes estructuras del ovario. El canal N se encontró en las células intersticiales del tejido ovárico del grupo control, pero en mayor proporción en las células del grupo diabético. Estos resultados sugieren que la actividad de los CCDV es desigual y que responden de manera específica de acuerdo a las demandas fisiológicas del ovario, como ocurre en otros órganos (50).

Con respecto al canal L, que ha sido descrito su amplia distribuido, biología molecular y electrofisiología en las CGs del ovario de mamífero (45, 46), al igual que el canal P/Q en el grupo control están asociados a las células secretoras del CLs y de folículos antrales durante el diestro. Mientras que en el grupo tratado con STZ, la marca de ambos canales se encuentran con menor intensidad, lo que sugiere la participación concertada de estos canales dentro del ovario.

Adicionalmente, y aunque se ha descrito la presencia del canal T en CG de diferentes especies (43, 44, 52, 53), en nuestro estudio también se confirmó la presencia y amplia distribución del canal T en el cuerpo lúteo del grupo control, mientras que en el grupo tratado con estroptozotocina se encontró mayor intensidad en de la inmunofluorescencia en las mismas estructuras (54). Por lo tanto, creemos que de existir una sobreexpresión de este canal en el cuerpo lúteo, sería de gran interés un estudio dirigido para conocer cuáles son sus funciones, así como su participación en la diabetes.

En resumen, al igual que este trabajo, varios reportes sugieren una función importante de los CCDV, y proponen que el aumento en las concentraciones de $[Ca^{2+}]$ intra- o extracelular, participan en coordinadamente con las gonadotropinas en estructuras ováricas para la producción de hormonas esteroides.

De modo que las alteraciones mencionadas, pueden ser indicio de la necesidad de comprender los efectos metabólicos en la reproducción, sin descartar el proceso de la esteroidogénesis, sobre todo en la modificación de la expresión de las enzimas esteroidogénicas, implicadas en diferentes patologías del ovario (55) y que resultaron estar estrechamente relacionadas con nuestros resultados.

Lo anterior, al considerar que los estudios realizados en el ovario del ratón en diestro del grupo control la enzima P450_{scc}, se distribuyó a los largo de folículos preovulatorios y del CLs, debido a que su actividad es indispensable para el inicio de la producción de hormonas esteroideas en ambas estructuras (8). A diferencia del grupo diabético en el que se observó una disminución en el marcaje de la enzima con inmunofluorescencia en ambas estructuras ováricas. Estos resultados sugieren la asociación de los cambios metabólicos dentro del ovario inducidos por la condición diabética, que se refleja en modificaciones en la vía esteroidogénica comprometiendo con ello el éxito reproductivo (3).

Otro de los factores metabólicos involucrados con el correcto funcionamiento de la gónada femenina, y que no es posible aislar, es la participación de la insulina y la glucosa séricas. Aunque en este estudio no se cuantificaron las concentraciones circulantes de insulina en los animales tratados con STZ, la concentración de glucosa asociada a insulina fue significativamente más alta. En este sentido, se sabe que ambos factores (insulina-glucosa) en conjunto regulan la actividad esteroidogénica dentro del ovario (2, 3), por lo tanto, las hormonas esteroides producidas por el ovario bajo el esquema diabético, también desregulan la producción del resto de hormonas del eje reproductivo. Por ello no es sorprendente encontrar que alteraciones en diversos elementos el eje reproductor femenino, se asocien con cambios en la producción de hormonas esteroides en patologías como la diabetes.

De manera particular, el presente estudio se centró en el análisis durante la fase de diestro, etapa del ciclo reproductivo en los roedores en la que existen cambios importantes en el ovario. En donde de inicio se presenta el establecimiento de los CLs, como glándula productora de P₄ y mientras los niveles circulantes de estradiol se encuentra relativamente disminuidos,

debido al poco desarrollo folicular del ovario. A pesar de estos contrastes en las concentraciones de hormonas esteroides endógenas, esta fase es sumamente dinámica, ya que puede modificarse de acuerdo a las condiciones fisiológicas de la hembra, se sabe que la concentración de P_4 se incrementan si la hembra queda gestante y el estradiol disminuye, de manera similar a lo que ocurre en la fase de diestro. Sin embargo, en ausencia de gestación, el cuerpo lúteo se destruye y los niveles de P_4 disminuyen mientras las concentraciones de E_2 se incrementan, evento asociados al desarrollo folicular e inicio de la fase del ciclo estral. Este patrón fue consistente con los resultados reportados para el grupo control, no siendo así para el grupo diabético, el cual mostró una notable disminución en las concentraciones circulantes de P_4 y E_2 . Estos resultados son consistentes con la literatura y podrían relacionarse con las anomalías que se observan en mujeres diabéticas, en quienes la disminución de progesterona se ha vinculado al bajo índice de implantación del embrión y a la incapacidad en el mantenimiento de la gestación (20).

Finalmente, a modo de conclusiones temas que:

- 1.- El presente estudio sugiere una asociación entre la presencia de los receptores a gonadotropinas, los CCDV y las enzimas esteroideogénicas, como factores asociados con la producción de hormonas esteroides, cuya disminución puede ser provocada por la condición diabética inducida por estreptozotocina. La integración de estos cambios permitirá aportar un conocimiento más extenso sobre como la disfunción reproductiva diabética que afecta la capacidad reproductiva femenina.
- 2.- Este estudio muestra por primera vez la presencia de los CCDV en rebanadas de ovario de roedores y que se distribuyen de manera desigual a los largo de las diferentes estructuras, lo que sugiere que desempeñan funciones diferentes dentro de la gónada femenina.
- 3.- Así mismo, el desarrollo del modelo diabético del ratón con el tratamiento con STZ nos permitió identificar notables diferencias entre los grupos experimentales, cuya diferencias metabólicas modifican el entorno y la producción de hormonas esteroides e incluso la presencia del canal T, que se encuentra en mayor proporción con respecto al grupo control,

podría coadyuvar en la producción de hormonas, aun cuando se encuentren en muy baja proporción.

4.- Si bien este estudio es descriptivo, sus evidencias nos permiten ampliar el conocimiento sobre la fisiopatología ovárica y su relación con cambios metabólicos asociados a la glucosa e insulina. Por este motivo es indispensable proponer una futura investigación que nos permita analizar la participación del $[Ca^{2+}]_i$ en análisis cuantitativos de los CCDV y un estudio detallado de las vías de señalización en las que participan como segundos mensajeros el AMPc y el Ca^{2+} .

9

Referencias

1. Arrais RF, Dib SA. The hypothalamus-pituitary-ovary axis and type 1 diabetes mellitus: a mini review. *Human reproduction*. 2006;21(2):327-37.
2. Chabrolle C, Jeanpierre E, Tosca L, Rame C, Dupont J. Effects of high levels of glucose on the steroidogenesis and the expression of adiponectin receptors in rat ovarian cells. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2008;6:11.
3. Codner E, Merino PM, Tena-Sempere M. Female reproduction and type 1 diabetes: from mechanisms to clinical findings. *Human reproduction update*. 2012;18(5):568-85.
4. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiological reviews*. 2013;93(1):137-88.
5. Fulghesu AM, Villa P, Pavone V, Guido M, Apa R, Caruso A, et al. The impact of insulin secretion on the ovarian response to exogenous gonadotropins in polycystic ovary syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1997;82(2):644-8.
6. Group IDFDA. Update of mortality attributable to diabetes for the IDF Diabetes Atlas: Estimates for the year 2013. *Diabetes research and clinical practice*. 2015;109(3):461-5.
7. Findlay J, Kerr, J., Britt, K., Liew, S., Simpson, E., Rosairo, D., & Drummond, A. . Ovarian physiology: follicle development, oocyte and hormone relationships. . *Animal Reproduction* 2009;6(1):16-9.
8. Andersen CY, Ezcurra D. Human steroidogenesis: implications for controlled ovarian stimulation with exogenous gonadotropins. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2014;12:128.
9. Midzak A, Papadopoulos V. Binding domain-driven intracellular trafficking of sterols for synthesis of steroid hormones, bile acids and oxysterols. *Traffic*. 2014;15(9):895-914.
10. Stocco DM, Wang X, Jo Y, Manna PR. Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Molecular endocrinology*. 2005;19(11):2647-59.
11. Veldhuis JD. KP. Mechanisms by which calcium ions regulate the steroidogenic actions of luteinizing hormone in isolated ovarian cells in vitro. *Endocrinology*. 1982;111(1).
12. Paul S. KS, Pramanick K., Bandyopadhyay A., Mukherjee DJ. . Regulation of ovarian steroidogenesis in-vitro by gonadotropin in common carp *Cyprinus carpio*: interaction between calcium- and adenylate cyclase-dependent pathways and involvement of ERK signaling cascade. . *Molecular Endocrinology*. 2010;45(4):207-18.

13. Flores JA, Veldhuis JD, Leong DA. Follicle-stimulating hormone evokes an increase in intracellular free calcium ion concentrations in single ovarian (granulosa) cells. *Endocrinology*. 1990;127(6):3172-9.
14. Chen JJ, Wang SW, Chien EJ, Wang PS. Direct effect of propylthiouracil on progesterone release in rat granulosa cells. *British journal of pharmacology*. 2003;139(8):1564-70.
15. Mathis D, Vence L, Benoist C. beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature*. 2001;414(6865):792-8.
16. Rocca F. PJ. Diabetes mellitus: bases fisiológicas y fisiopatológicas para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la diabetes. . Departamento de Publicaciones del Sindicato Médico del Uruguay 1963.
17. Blades RA, Bryant KR, Whitehead SA. Feedback effects of steroids and gonadotrophin control in adult rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1985;28(6):348-54.
18. Vomachka MS, Johnson DC. 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). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine*. 1982;171(2):207-13.
19. van Houten EL, Visser JA. Mouse models to study polycystic ovary syndrome: a possible link between metabolism and ovarian function? *Reproductive biology*. 2014;14(1):32-43.
20. Garris DR. Effects of diabetes on uterine condition, decidualization, vascularization, and corpus luteum function in the pseudopregnant rat. *Endocrinology*. 1988;122(2):665-72.
21. Leung P AE. *The ovary* 2003.
22. Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal reproduction science*. 2003;78(3-4):135-63.
23. Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(4):963-72.
24. Rothchild I. The yolless egg and the evolution of eutherian viviparity. *Biology of reproduction*. 2003;68(2):337-57.
25. Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science*. 2002;296(5576):2178-80.
26. Gougeon A. Ovarian follicular growth in humans: ovarian ageing and population of growing follicles. *Maturitas*. 1998;30(2):137-42.
27. Jeon SY, Hwang KA, Choi KC. Effect of steroid hormones, estrogen and progesterone, on epithelial mesenchymal transition in ovarian cancer development. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2016;158:1-8.
28. Kuokkanen S PA, Chosich J, Bradford AP, Jasinska A, Phang T, Santoro N, Appt SE. Corpus luteum as a novel target of weight changes that contribute to impaired female

reproductive physiology and function. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2016;62(4):227-42.

29. Stouffer RL, Bishop CV, Bogan RL, Xu F, Hennebold JD. Endocrine and local control of the primate corpus luteum. *Reproductive biology*. 2013;13(4):259-71.

30. Georges A, Auguste A, Bessiere L, Vanet A, Todeschini AL, Veitia RA. FOXL2: a central transcription factor of the ovary. *Journal of molecular endocrinology*. 2014;52(1):R17-33.

31. Baird DT. The endocrinology of ovarian steroid secretion. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 1974;4(1):31-9.

32. Franchimont P. [Control of the secretion of gonadotropins in humans]. *Les Cahiers de medecine*. 1971;12(3):179-90.

33. Hanukoglu I. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1992;43(8):779-804.

34. Rosenfeld CS, Wagner JS, Roberts RM, Lubahn DB. Intraovarian actions of oestrogen. *Reproduction*. 2001;122(2):215-26.

35. Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Azhar S. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition & metabolism*. 2010;7:47.

36. Mani SK, Mermelstein PG, Tetel MJ, Anesetti G. Convergence of multiple mechanisms of steroid hormone action. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2012;44(8):569-76.

37. Vance JE. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1841(4):595-609.

38. Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine reviews*. 2011;32(1):81-151.

39. Danielson PB. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Current drug metabolism*. 2002;3(6):561-97.

40. Jamnongjit M, Hammes SR. Ovarian steroids: the good, the bad, and the signals that raise them. *Cell cycle*. 2006;5(11):1178-83.

41. Flores JA, LD, Veldhuis JD. . Is the calcium signal induced by follicle-stimulating hormone in swine granulosa cells mediated by adenosine cyclic 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase? . *Endocrinology*. 1992;130:1862-6.

42. Sadighian JJ, Kearns WG, Waddell BJ, Dimino MJ. Effects of diacylglycerol and inositol trisphosphate on steroidogenesis by ovarian granulosa from pigs. *Biology of reproduction*. 1989;40(2):294-9.

43. Kusaka M, Tohse N, Nakaya H, Tanaka T, Kanno M, Fujimoto S. Membrane currents of porcine granulosa cells in primary culture: characterization and effects of luteinizing hormone. *Biology of reproduction*. 1993;49(1):95-103.

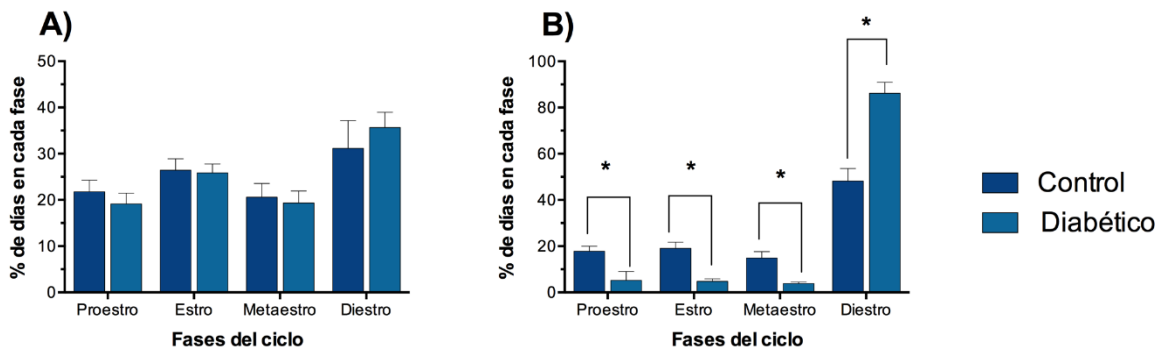
44. Mattioli M, Barboni B, Bacci ML, Seren E. Maturation of pig oocytes: observations on membrane potential. *Biology of reproduction*. 1990;43(2):318-22.

45. Agoston A, Kunz L, Krieger A, Mayerhofer A. Two types of calcium channels in human ovarian endocrine cells: involvement in steroidogenesis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(9):4503-12.
46. Platano D, Magli MC, Ferraretti AP, Gianaroli L, Aicardi G. L- and T-type voltage-gated Ca²⁺ channels in human granulosa cells: functional characterization and cholinergic regulation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(4):2192-7.
47. Jawerbaum A, White V. Animal models in diabetes and pregnancy. *Endocrine reviews*. 2010;31(5):680-701.
48. Marcondes FK. BF, Tanno AP. . Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. . *Brazilian Journal of Biology*. 202;62:609-14.
49. Camp TA, Rahal JO, Mayo KE. Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Molecular endocrinology*. 1991;5(10):1405-17.
50. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell*. 2007;131(6):1047-58.
51. Medel Matus JS, Ramos Morales, F. R., Correa Basurto, J., Cruz Sánchez, J. S., Saavedra Vélez, M. V., & Velásquez Melgarejo, V. Participación de los canales de calcio dependientes de voltaje en el desarrollo de la epilepsia. *eActa bioquímica clínica latinoamericana*. 2010;44(3):329-35.
52. Asem EK QW, Rane SG. . Effect of basal lamina of ovarian follicle on T- and L- type Ca²⁺ currents in differentiated granulosa cells. . *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2005;282:184-96.
53. Schwartz JL, Asem EK, Mealing GA, Tsang BK, Rousseau EC, Whitfield JF, et al. T- and L-calcium channels in steroid-producing chicken granulosa cells in primary culture. *Endocrinology*. 1989;125(4):1973-82.
54. Stojilkovic SS. A novel view of the function of pituitary folliculo-stellate cell network. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2001;12(9):378-80.
55. Burul-Bozkurt N, Pekiner C, Kelicen P. Diabetes alters aromatase enzyme levels in gonadal tissues of rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2010;382(1):33-41.

10 Anexos

10.1 Evaluación de la actividad cíclica del ovario

La evaluación de la actividad cíclica del ovario durante el periodo pre-tratamiento en ambos grupos no mostró diferencias significativas en ninguna de las fases (**Anexo 1 A**). Sin embargo, durante el periodo post-tratamiento se puede apreciar que existen diferencias significativas durante las distintas fases del ciclo al realizar la comparación entre grupo. Particularmente, se observa que el porcentaje de días que el grupo diabético disminuyó de manera considerable durante proestro, estro y metaestro. No obstante, durante la fase de diestro, el porcentaje de días incrementó (**Anexo 1 B**). Esto se debe a que los animales del grupo diabético presentaron un diestro persistente, es decir, estuvieron al menos tres días consecutivos en esta fase.



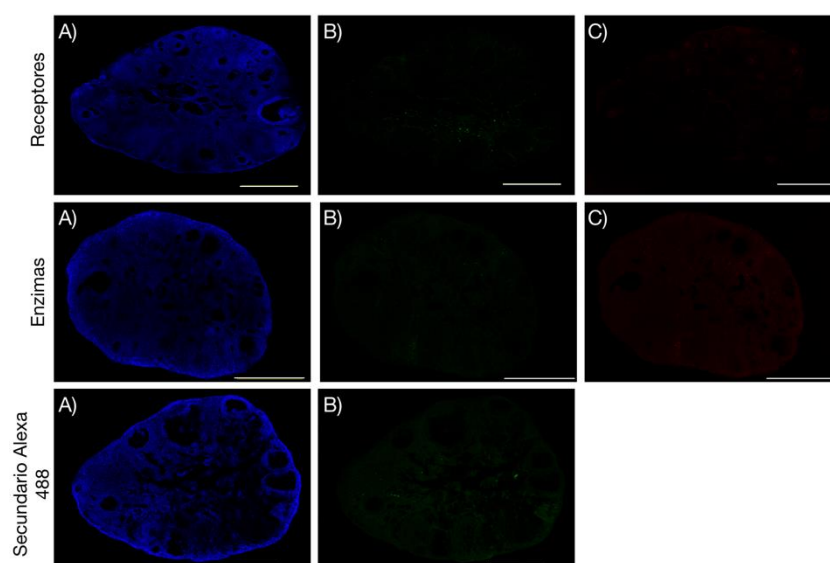
Anexo 1 Seguimiento el ciclo reproductivo. Gráficas de barra que indica porcentaje de días en cada fase del ciclo estral durante el periodo A) pretratamiento y B) postratamiento para ambos grupos. En cada caso se presentan los valores promedios (\pm EE). *Indica diferencias significativas con $p < 0.05$.

10.2 Inmunohistoquímica de páncreas

Para determinar la presencia de insulina e identificar a las células B-pancreáticas se utilizó la técnica histológica antes descrita. En este caso se utilizó el anticuerpo primario anti-rabbit insulina (abcam, ab63820) y el secundario a un F(ab)² Alexa 647 Donkey anti-rabbit IgG (*Jackson ImmunoResearch Lab, West Grove, USA*).

10.3 Controles realizados para determinar la especificidad de los anticuerpos

El control negativo de los anticuerpos se realizó con la incubación de los anticuerpos secundarios, sin la presencia de los primarios. Mientras que para los anticuerpos acoplados se realizó la desnaturalización mecánica y por temperatura para su posterior incubación. En este caso se encontró que la fluorescencia de los anticuerpos es prácticamente nula (Anexo 2).



Anexo 2 Controles negativos de los anticuerpos empleados. Microfotografías representativas de secciones de ovarios de los controles realizados. En todos los casos utilizó DAPI como referente. Se observan receptores de FSH (B) y LH (C), de enzimas esteroidogénicas P450scc (B) y P450 aromatasa (C), así como del anticuerpo secundario Alexa 488, Donkey anti-rabbit IgG control (B). La barra de escala corresponde a 500 μ m.