



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**

**Evaluación histológica de tejido cardiaco**  
**de rata Wistar hembra ovariectomizada con terapia de reemplazo**  
**estrogénica temprana y tardía**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**Licenciado en Farmacia**

PRESENTA:

**Erik Pérez García**

**ASESORA: M en C. Diana Ramírez Hernández**

**COASESORA: Dra. Jazmín Flores Monroy**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2023



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**



**UNAM  
CUAUTITLÁN  
DEPARTAMENTO  
DE TITULACIÓN**

**ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO**  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

**Evaluación histológica de tejido cardiaco de rata Wistar hembra ovariectomizada con terapia de reemplazo estrogénica temprana y tardía.**

Que presenta el pasante: **Erik Pérez García**

Con número de cuenta: **315277074** para obtener el título de: **Licenciado en Farmacia**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**

**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Febrero de 2023.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	<b>NOMBRE</b>	<b>FIRMA</b>
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Julio César Botello Pozos	
<b>VOCAL</b>	QFB. Luis Alberto Parra Oaxaca	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Diana Ramírez Hernández	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en D. María Verónica Vázquez Cianca	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Da. Sofía Piña Olmos	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga\*

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por haberme abierto las puertas y brindarme muchas herramientas para poder desarrollarme en el área profesional.

A la Doctora Jazmín Flores Monroy por haber confiado en mí e invitarme a trabajar y formar parte del laboratorio de Farmacología del Miocardio, a mi asesora Diana por hacerme parte de su equipo de trabajo, confiar en mí e impulsarme a seguir adelante, así como al Doctor Diego Lezama Martínez por los consejos y la compañía brindada en todo este tiempo.

A mis amigas en especial a Adri, Gir y Anahí, por haberme brindado su amistad e incluso más que eso durante los años que estuvimos juntos en la carrera, jamás se olvidara todo el chismesito, las salidas a comer, el hacer las tareas de última hora, siempre ocuparan un lugar en mi corazón.

A Oscar y Mari, que son mis mejores amigos en toda la vida y por todos los momentos que hemos compartido, las pláticas y todo lo que hemos pasado juntos en estos 6 años

Al Shihan Germán Abasta Navarro, a Kyodai Ryu por formarme y enseñarme los valores, aptitudes y actitudes que me hacen la persona que soy el día de hoy, y que gracias a ellos me han permitido hacer más cosas de las que había pensado, y a mis amigos Osmar, Isis y Melina, por brindarme su amistad y hacer siempre un grandioso equipo.

A mi Mamá, mi Papá, por siempre apoyarme, brindarme su cariño y su confianza, siempre estar al pendiente de mí, porque nunca me faltó absolutamente tanto en la salud, como en lo material para poder llevar a cabo satisfactoriamente mis estudios profesionales y aquí el resultado de todo ese apoyo.

A Monse por siempre ser una hermana paciente y muy buena, por motivarme porque, a pesar de todo, tú siempre has podido superar las expectativas de todos y eres una inspiración para mí.

A mi babys, por toda la confianza que me has brindado y por qué siempre me escuchaste, me apoyaste, me ayudaste, estuviste al pendiente de mí, aun en mis peores días, me diste una mano, me levantaste y gracias a ello pude seguir adelante hasta llegar aquí. Y también por todo el amor y el cariño que me has dado a lo largo de la carrera.

## **DEDICATORIAS**

Para mis padres, este es el resultado de todo su apoyo, su cariño, su confianza y su amor.

Para Monse, siendo tu hermano mayor, espero que sea un ejemplo para seguir y te motives para seguir adelante, no es fácil, pero vale la pena siempre seguir.

Para mi babys, espero que esto te motive a seguir adelante y que podamos seguir este camino juntos, siempre hay obstáculos, pero continuar vale la pena.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	12
2. INTRODUCCIÓN.....	13
3. MARCO DE REFERENCIA .....	15
3.1. Estrógenos .....	15
3.1.1. Perspectiva histórica de los estrógenos.....	15
3.1.2. Estructura química.....	15
3.1.3. Biosíntesis .....	16
3.1.4. Metabolismo .....	18
3.1.5. Niveles en sangre.....	20
3.2. Receptores Estrogénicos.....	21
3.2.1. Características y Clasificación .....	21
3.2.2. Localización.....	22
3.2.3. Estructura .....	23
3.2.4. Vías de señalización.....	25
3.2.5. Expresión y acciones en tejido cardiovascular.....	27
3.3. Menopausia y Terapia de Reemplazo Hormonal .....	29
3.3.1. Definiciones y prevalencia .....	29
3.3.2. Fisiopatología .....	30
3.3.3. Fibrosis cardiaca .....	34
3.3.4. Hipertrofia cardiaca.....	38
3.3.5. Terapia de reemplazo hormonal .....	41
3.4. Anatomía, Fisiología e Histología del corazón .....	43
3.4.1. Anatomía e Histología macroscópica del corazón .....	44
3.4.2. Anatomía e Histología microscópica del corazón.....	51
3.4.3. Fisiología del corazón.....	54

3.5.	Técnicas Histológicas para el análisis del tejido cardiaco .....	58
3.5.1.	Tinción de Hematoxilina-eosina .....	58
3.5.2.	Tinción de Masson.....	61
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	64
5.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	64
6.	HIPÓTESIS .....	64
7.	OBJETIVO GENERAL .....	65
8.	OBJETIVOS PARTICULARES .....	65
9.	METODOLOGÍA .....	66
9.1.	Protocolo experimental .....	66
9.2.	Ovariectomía .....	66
9.3.	Terapia de reemplazo estrogénica .....	66
9.4.	Preparación de la muestra.....	67
9.5.	Análisis histológico .....	67
9.5.1.	Calibración del software de trabajo .....	67
9.5.2.	Análisis histológico cualitativo .....	68
9.5.3.	Análisis histológico cuantitativo .....	68
10.	RESULTADOS.....	74
11.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	81
12.	CONCLUSIONES .....	86
13.	REFERENCIAS.....	87
14.	ANEXOS .....	93

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura Química del estradiol .....	16
Figura 2. Biosíntesis general del 17 $\beta$ -Estradiol .....	18
Figura 3. Resumen del metabolismo de los estrógenos .....	20
Figura 4. Vías de señalización generales de los receptores nucleares y acoplados a proteínas G .....	22
Figura 5 Dominios estructurales de los receptores RE $\alpha$ y Re $\beta$ .....	24
Figura 6. Vías de señalización generales de los estrógenos.....	27
Figura 7. Edades promedio de la aparición de la menopausia en México, Estados Unidos y el Mundo. ....	30
Figura 8. Resumen de los síntomas generales de la menopausia. ....	34
Figura 9. Efecto de los estrógenos, sobre la señalización profibrotica .....	38
Figura 10. Vías de señalización intracelular que regulan la hipertrofia cardiaca.....	40
Figura 11 Capas del corazón .....	45
Figura 12 Esqueleto fibroso del corazón .....	45
Figura 13. Cámaras y Válvulas del corazón.....	48
Figura 14. Principales Venas y Arterias de la circulación coronaria .....	50
Figura 15. Composición del sarcómero de los miocitos cardiacos .....	52
Figura 16. Sistema de conducción del corazón.....	54
Figura 17. Potencial de acción de miocitos cardiacos normales y células marcapasos... 55	
Figura 18. Fases del ciclo cardiaco.....	57
Figura 19. Estructura química de la hematoxilina y su reacción de oxidación, así como la propuesta de mecanismo de unión al DNA .....	59
Figura 20. Estructuras químicas de la Eosina Y a diferentes valores de pH.....	60
Figura 21. Diagrama de la calibración del software.....	70
Figura 22. Diagrama de flujo para la medición de cardiomiocitos.....	71
Figura 23. Diagrama de la cuantificación de la deposición de colágeno.....	72
Figura 24 Diagrama de flujo de la metodología.....	73

## ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1 Elementos teñidos con la tinción de hematoxilina-eosina.....	61
Imagen 2. Elementos teñidos con la tinción de Masson (40x).....	63
Imagen 3. Deposición de colágeno en el tejido cardiaco de rata Wistar hembra ovariectomizada con terapia de remplazo estrogénica temprana y tardía. Tinción tricrómica de Masson (100x).....	75
Imagen 4. Cardiomiocitos en tejido cardiaco de rata Wistar hembra ovariectomizada con terapia de reemplazo estrogénica temprana y tardía. Tinción tricrómica de Masson (400x). .....	77
Imagen 5. Anormalidades morfológicas en los grupos sham vieja y sham joven. ....	78
Imagen 6. Anormalidades en los grupos OVX-10 semanas y OVX-TRTm.....	79
Imagen 7. Anormalidades en los grupos OVX-20 semanas y OVX-TRTd.....	80

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Deposición de colágeno (%) en el tejido cardiaco de rata Wistar hembra ovariectomizada con terapia de remplazo estrogénica temprana y tardía.....	74
Gráfica 2. Área de los cardiomiocitos ( $\mu\text{m}^2$ ) en el tejido cardiaco de rata Wistar hembra ovariectomizada con terapia de remplazo estrogénica temprana y tardía.....	76

## ABREVIATURAS

17 $\beta$ HSD1 → 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1

3 $\beta$ HSD2 → 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2

ADN → ácido desoxirribonucleico

AF-1 → función activadora 1

AF-2 → función activadora 2

AMPc → adenosín monofosfato cíclico

ANP → péptido natriurético atrial

AP-1 → proteína activadora 1

ARN → ácido ribonucleico

Atk → proteína cinasa B

Camk → proteína cinasa dependiente de calcio

Cam → calmodulina

Cn → calcineurina

DHEA → dehidroepiandrosterona

ECV → enfermedades cardiovasculares

EEC → estrógenos equinos conjugados

ELITE → ensayo de intervención temprana contra tardía con estradiol

eNOS → óxido nítrico sintasa endotelial

ERE → elemento de respuesta a estrógenos

ESR1 → gen de receptor de estrógenos 1

ESR2 → gen de receptor de estrógenos 2

ET-1 → endotelina 1

FDA → administración de alimentos y medicamentos

FSH → hormona folículo estimulante

GABA → ácido gamma aminobutírico

GPBR1 → receptor de estrógenos acoplado a proteína G

GPCR → receptor acoplado a proteína G

HDL → lipoproteína de alta densidad  
HE → hematoxilina y eosina  
HERS → corazón y estudio de reemplazo de estrógenos y progestina  
Hsp → proteína de choque térmico  
IMC → índice de masa corporal  
IP<sub>3</sub> → inositol 3-fosfato  
IL → interleucina  
JNK → cinasa N-terminal c-jun  
KEEPS → estudio de prevención temprana de estrógenos de Kronos  
KLF → factores de transcripción similares a Kruppel  
LDL → lipoproteína de baja densidad  
LH → hormona luteinizante  
MAPK → proteína-cinasa activada por mitógeno  
MEC → matriz extracelular  
MMP → metaloproteinasa de la matriz  
NICE → instituto nacional para la salud y el cuidado  
NIH → institutos nacionales de salud  
NFAT → factor nuclear de células T activadas  
NO → óxido nítrico  
OVX → ovariectomía  
p450scc → enzima de la escisión de la cadena lateral de colesterol  
PI3K → fosfoinositida 3-cinasa  
PKA → proteína cinasa A  
PKC → proteína cinasa C  
RE → receptor de estrógenos  
RE $\alpha$  → receptor de estrógenos  $\alpha$   
RE $\beta$  → receptor de estrógenos  $\beta$   
ROS → especies reactivas de oxígeno  
R y R → canal de rianodina

RTK → receptor tirocin-cinasa

SMAD → mothers against decantaplegic homolog

STARD1 → proteína reguladora de la esteroidogenesis aguda

STARW+10 → taller de etapas de envejecimiento reproductivo

SULT → Sulfoniltransferasa

TIMP → Inhibidor tisular de metaloproteinasas de la matriz

TGF  $\beta$ 1 → Factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1

TNF- $\alpha$  → Factor de necrosis tumoral alfa

TRH → Terapia de reemplazo hormonal

TRTd → Terapia de reemplazo estrogénica tardía

TRTm → Terapia de reemplazo estrogénica temprana

UGT → Glucursiltransferasa

VIVA → Salud Vaginal: perspectivas, puntos de vista y actitudes

WHI → Iniciativa de salud de la mujer

## 1. RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son actualmente la principal causa de muerte de las mujeres en México y en el mundo. El riesgo de padecer ECV en las mujeres aumenta con la edad, y uno de los principales factores de riesgo es la menopausia, siendo una de las estrategias para prevenir las ECV en mujeres posmenopáusicas, la terapia de reemplazo hormonal (TRH), aunque el uso de esta ha sido controversial, debido a que en algunos ensayos clínicos se presentaron eventos cardiacos adversos. Por ello surge el interés de evaluar los cambios morfológicos en tejido cardiaco de rata Wistar hembra ovariectomizada con terapia de reemplazo estrogénica temprana y tardía mediante un análisis histológico, para establecer los efectos que genera la terapia en el corazón. Se utilizaron 36 ratas Wistar hembra, distribuidas en 6 grupos: 1-Sham, 2-Sham joven (Sham-j), 3-Ovariectomía a 10 semanas (OVX-10 sem), 4-Ovariectomía con TRH temprana (OVX-TRTm), 5- Ovariectomía con TRH tardía (OVX-TRTd), 6- Ovariectomía a 20 semanas (OVX-20 sem). Se realizó la ovariectomía a los grupos correspondientes y se administró vía oral, una dosis de 5 µg/Kg/día de 17β-Estradiol, iniciando la terapia a los 3 días post-OVX, para el grupo OVX-TRTm, y en la semana 8 post-OVX, para el grupo OVX-TRTd. El miocardio se procesó para su análisis histológico con las tinciones de Hematoxilina-Eosina y Masson. Se cuantificó el % de colágeno y se midió el área de los cardiomiocitos. Se encontró un aumento significativo en la deposición de colágeno en el grupo OVX-10 semanas vs sham-joven, los demás grupos mostraron un aumento no significativo en la deposición de colágeno vs el grupo sham-j, resaltando el aumento entre el grupo sham-j y sham, lo cual puede sugerirnos un efecto del envejecimiento sobre el aumento de la deposición de colágeno. Con respecto al área de los cardiomiocitos no hubo diferencias significativas entre los grupos, encontrándose además algunas anormalidades histológicas, destacando miocarditis en el grupo Sham y el grupo OVX-TRTd, así como posibles áreas de infartos miocárdicos en los grupos OVX-TRTm y OVX-10 sem. Se concluye que la terapia de reemplazo estrogénica temprana o tardía parece no tener un efecto importante sobre los cambios morfológicos del miocardio asociados a la ovariectomía y el envejecimiento.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son actualmente la principal causa de muerte de las mujeres, tanto en México y en todo el mundo (Mehta et al., 2016), aunque tradicionalmente se asocia este tipo de enfermedades a los hombres, la conciencia de las enfermedades cardiovasculares como la principal causa de mortalidad en mujeres ha aumentado lentamente. En 1997, sólo el 30% de las mujeres estadounidenses encuestadas, sabían que las enfermedades cardiovasculares eran la principal causa de muerte en su género; esto aumento al 54% en el 2009 (Garcia et al., 2016).

El riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (ECV) en las mujeres aumenta con la edad, y uno de los principales factores de riesgo es la menopausia, las mujeres premenopáusicas están relativamente protegidas contra las ECV en comparación con hombres de la misma edad. Sin embargo, esta brecha se reduce después de la menopausia (Garcia et al., 2016), debido a que, en un estado posmenopáusico, la principal característica es el cese de la producción de estrógenos por los ovarios, a los cuales se les asocian características cardioprotectoras.

Una de las propuestas para combatir las enfermedades cardiovasculares en mujeres posmenopáusicas es la terapia de reemplazo hormonal (TRH), pero el uso de esta ha sido controversial, debido a que en los ensayos clínicos de Women's Health Initiative y Heart and Estrogen / Progestin Replacement Study se presentaron eventos cardiacos adversos, riesgo de padecer cáncer de mama o simplemente no hubo efectos (Iorga et al., 2017). Aunque el fracaso de ambos ensayos para respaldar el papel protector de la TRH en la reducción de las enfermedades cardiovasculares podría deberse, en parte a que esta se administró mucho después del inicio de la menopausia en la mayoría de las mujeres inscritas (Iorga et al., 2017), razón por la que más adelante se plantearía la hipótesis del tiempo, en la que los efectos benéficos sobre las enfermedades cardiovasculares por parte de la TRH pueden observarse, siempre y cuando la terapia se administre lo más pronto posible posterior al inicio de la menopausia, y en este sentido se ha encontrado que el riesgo de presentar un Infarto miocárdico disminuye hasta en un 36% si la TRH se administra dentro de los 10 primeros años posteriores al inicio de la menopausia (Pedram et al., 2010).

Es así como en este trabajo se propone mostrar los efectos de la TRH estrogénica temprana y tardía sobre la morfología del tejido cardiaco con el fin de poner a prueba la hipótesis del tiempo, pero también comparar si es que realmente existe una diferencia entre la

administración de una TRH poco tiempo después de la menopausia y una pasado un tiempo considerable, esto con ayuda de un modelo que represente lo que pasa durante la menopausia en las mujeres y de técnicas histológicas que nos ayuden a identificar estos cambios. Todo esto con el fin de aportar información a la investigación sobre una alternativa para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades cardiovasculares en mujeres posmenopáusicas.

### **3. MARCO DE REFERENCIA**

#### **3.1. Estrógenos**

Los estrógenos son las principales hormonas sexuales femeninas, secretadas en su mayoría por los ovarios. Tienen una naturaleza lipídica y provienen biosintéticamente de la molécula de colesterol, los 2 estrógenos más importantes en el organismo humano son el  $17\beta$ -Estradiol y la Estrona.

##### **3.1.1. *Perspectiva histórica de los estrógenos***

En el año 1900 se definió con toda certeza la naturaleza hormonal del control del aparato reproductor de la mujer por parte del ovario (Brunton et al., 2007) demostrándose que si se trasplantaban dichas glándulas había un desarrollo y funciones sexuales. Rumbo al año 1923, Edgar Allen, fisiólogo reproductivo, junto a Edward Doisy, bioquímico orgánico realizaron un trabajo en conjunto, en el que Allen proporcionaba líquido folicular proveniente de ovarios de cerdas y Doisy purificaba la actividad estrogénica (Santen & Simpson, 2019). Esta prueba más tarde se conoció como prueba de Allen-Doisy, la cual biocuantifica los extractos ováricos. Mas tarde Doisy cristalizó la estrona de orina de mujeres embarazadas y presentó su hallazgo en el 13<sup>er</sup> Congreso Internacional de Fisiología en Boston en 1929. Por otro lado, En Alemania Adolph Butenarndt había purificado y cristalizado estrona, simultáneamente cuando se enteró de la charla de Doisy de un colega que había asistido a la reunión en Boston. Llevando a Butenarndt a imprimir su investigación meses antes que se publicara el manuscrito de Doisy (Santen & Simpson, 2019). Un tiempo después, se aisló el estriol y estradiol.

##### **3.1.2. *Estructura química***

En los mamíferos hay 6 familias de hormonas esteroideas que pueden ser clasificados estructural y biológicamente en estrógenos, progestágenos, andrógenos, mineralocorticoides, glucocorticoides y vitamina D. Estas juegan un rol muy importante en el funcionamiento del cuerpo, porque son requeridas por muchos procesos fisiológicos críticos incluyendo la supervivencia al estrés, lesiones y enfermedades, metabolismo, inflamación, balance de agua y sal, funciones inmunológicas, y el desarrollo de características sexuales (Litwack, 2018).

Los estrógenos como ya se mencionó, forman parte de las hormonas esteroideas, las cuales provienen biosintéticamente del colesterol, químicamente están formados por una

estructura en común que consta de 1 anillo de fenol (A) con un grupo hidroxilo en el carbono 3; 2 anillos de ciclohexano (B y C), y un anillo de pentano (D), además en el carbono 13 tienen un metilo. El principal estrógeno secretado por la mujer es el estradiol el cual en el carbono 17 se encuentra unido a un grupo hidroxilo (Figura 1), lo que lo diferencia del estriol es que este soporta en el carbono 16 con otro grupo hidroxilo, y la estrona en el carbono 17 se encuentra soportando un grupo cetona.

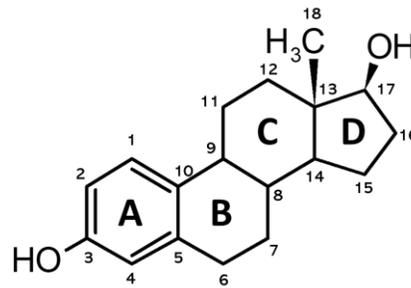


Figura 1. Estructura Química del estradiol

### 3.1.3. Biosíntesis

Como se mencionó anteriormente, el precursor de los estrógenos es el colesterol, la principal fuente de colesterol externo para la síntesis de hormonas esteroideas es el colesterol de alta densidad o HDL (Fuentes & Silveyra, 2019), aunque también es utilizado el colesterol sintetizado por la célula en el retículo endoplásmico. La biosíntesis de hormonas esteroideas a partir de colesterol es conocida como esteroidogénesis (más adelante se detallarán los pasos de este proceso). El principal órgano donde se sintetizan los estrógenos son los ovarios, más en específico en las células de la granulosa, y en las células de la teca donde se producen andrógenos, los cuales con ayuda de la enzima aromatasa en las células de la granulosa son transformados en estrógenos, además también son producidos por otros órganos, aunque en menor cantidad, como en las glándulas suprarrenales, cerebro, tejido adiposo, piel y el páncreas (Barakat et al., 2016).

#### 3.1.3.1. Ruta biosintética

El primer paso en la biosíntesis de los estrógenos es el paso del colesterol de la membrana externa de la mitocondria hacia la membrana interna mitocondrial, este proceso es regulado por la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda STARD1 o también conocida como StAR por sus siglas en inglés, siendo este el paso limitante de la esteroidogénesis en todos los tejidos (Fuentes & Silveyra, 2019). Una vez el colesterol se encuentra en la membrana

mitocondrial interna se activa la enzima p450scc (Cholesterol Side Chain Cleavage Enzyme), la cual transforma el colesterol en pregnenolona, esto lo realiza en 3 pasos, el primero es hidroxilar al carbono en la posición 22, posteriormente añade otro hidroxilo en el carbono 20 de la molécula de 22(R)-hidroxicolesterol y finalmente el último paso escindir el enlace entre el carbono 20 y el 22 del 20(R),22(R)-dihidroxicolesterol resultando como productos la pregnenolona y una molécula de isocaproaldehído. De estas 3 reacciones, la 22-hidroxilación es un limitante de la velocidad, ya que las eficiencias son más altas para las reacciones posteriores (Papadopoulos & Miller, 2012).

El siguiente paso en la biosíntesis es la transformación de la pregnenolona en 17- $\alpha$ -Hidroxi-pregnenolona, esto lo hace en el retículo endoplásmico con la ayuda de la enzima P450c17, la cual cataliza la hidroxilación de esteroides en 17hidroxi-pregnenolona, y además encargándose de escindir los enlaces carbono-carbono 17,20 (Do Rego et al., 2009), en un primer paso encargándose de hidroxilar específicamente la posición 17 de la molécula de pregnenolona, dando como resultado la 17- $\alpha$ -Hidroxi-pregnenolona y en un segundo paso, se encarga de escindir el enlace carbono-carbono entre el carbono 17 que se encuentra hidroxilado y el carbono 20, dando como producto al dehidroepiandrosterona (Schlinger et al.).

Una vez obtenido el DHEA, la biosíntesis toma dos rutas biosintéticas, la principal es la obtención de estrona y posteriormente la conversión en estradiol-17 $\beta$ , mientras que la ruta alternativa es la obtención de testosterona y su posterior conversión a estradiol-17 $\beta$  (Norman & Henry, 2015). En la primer ruta, el DHEA, es transformado por la enzima 3 $\beta$ HSD2 la cual es una enzima oxidasa, que se encarga de oxidar al hidroxilo ubicado en el carbono 3 del DHEA, para transformarlo en Androst-4-eno-3,17-diona, el penúltimo paso en la biosíntesis es la transformación de la molécula anteriormente formada en estrona, por acción de la enzima aromatasa, esto ocurre en el retículo endoplásmico de las células de la granulosa, esta se encargará de transformar el anillo de hexano de la molécula de Androst-4-eno-3,17-diona en un anillo aromático, el producto de esta reacción enzimática es la estrona, que en un último paso la enzima 17 $\beta$ HSD1, que es una enzima reductora, se encarga de reducir la cetona del carbono 17 en un hidroxilo, para formar el estradiol-17- $\beta$ .

Por su parte en la vía alternativa, se parte del DHEA, el cual por acción de la enzima 17 $\beta$ HSD1, se encarga de reducir la cetona del carbono 17 en un hidroxilo, formando así la Androst5-ene-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol, posteriormente, ejerce su acción la enzima 3 $\beta$ HSD2, esta se encarga de oxidar el hidroxilo del carbono 3 a una cetona, siendo el producto de esta reacción enzimática, la testosterona. Finalmente, en el retículo endoplásmico, por acción

de la P450 Aromatasa el anillo A, de la testosterona adquiere aromaticidad, por lo que se forma el Estradiol-17 $\beta$ , La biosíntesis resumida, puede ser observada en la figura 2.

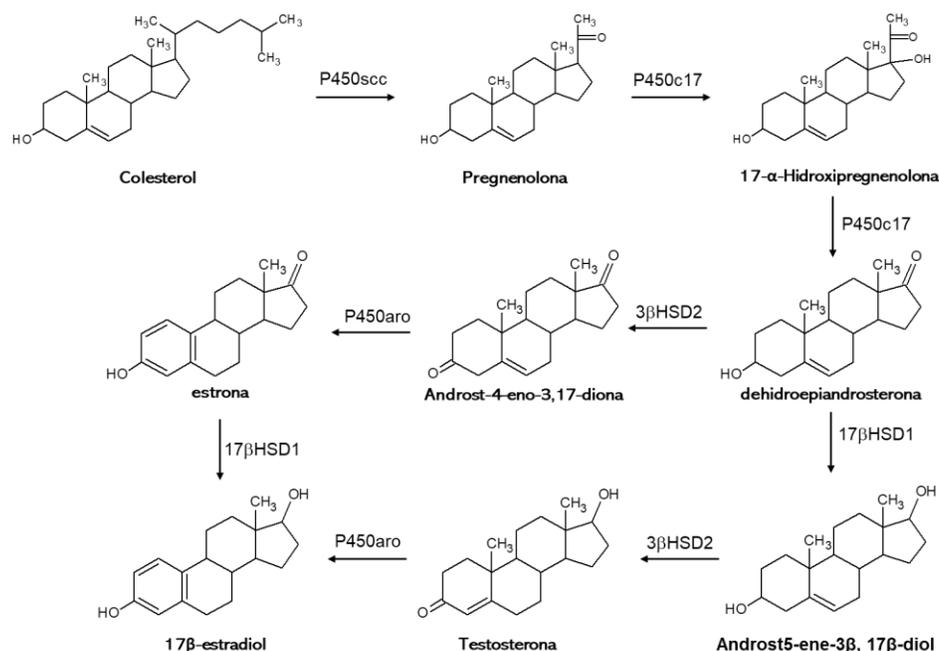


Figura 2. Biosíntesis general del 17 $\beta$ -Estradiol, basado en: (Norman & Henry, 2015) p.48.

### 3.1.4. Metabolismo

Una vez que el estradiol y la estrona cumplen sus funciones, son biotransformados para su posterior excreción del organismo, en la biotransformación de los estrógenos, estos son transformados a metabolitos inactivos o menos activos y solubles en agua para que sean excretado por la orina o heces. La principales vías de biotransformación de los estrógenos es la oxidación en la fase I de la biotransformación, y la conjugación por glucuronidación, sulfatación y/o O-metilación (Zhu & Conney, 1998).

En la fase I de la biotransformación de estrógenos, estos se hidroxilan en las posición C2, C4 y C16, y se convierten en estrógenos de catecol (Samavat & Kurzer, 2015). Los principales metabolitos que son formados por estas reacciones son el 2-Hidroxiestrona, 4-hidroxiestrona, 2-hidroxiestradiol y 4-hidroxiestradiol, además de la 16 $\alpha$ -hidroxiestrona. Las enzimas responsables de llevar a cabo estos procesos son del citocromo P450, dentro de las cuales, se incluyen la CYP1A1, CYP1B1 y CYP1A2, de acuerdo con (Samavat & Kurzer, 2015) la ruta de la 2-hidroxilación, es la principal ruta de biotransformación de los estrógenos, en comparación con la 4 y 16 $\alpha$ -hidroxilación, las enzimas involucradas en estas reacciones, se encuentran ubicadas principalmente en el hígado y la mama. Por su parte, la 4-hidroxilación es la ruta biosintética que menos se utiliza para la biotransformación de

los estrógenos en el hígado, Las enzimas principales que se encargan de esta reacción, son de la subfamilia 3<sup>a</sup>, del citocromo P450, y además se considera que esta ruta genera metabolitos que tienen un alto potencial carcinogénico. La ruta de la 16  $\alpha$ -hidroxilación tiene en la 16 $\alpha$ -hidroxiestróna a su metabolito más importante, y de acuerdo con (Zhu & Conney, 1998), la principal enzima que se encarga de catalizar esta reacción es la citocromo P450 3A4, al igual que el metabolito de la 4-hidroxilación, el metabolito de la 16 $\alpha$ -hidroxilación se considera como un potencial iniciador de tumores (Ver figura 3).

Los estrógenos, también sufren de reacciones de la fase II de biotransformación, una de ellas es la sulfatación, la cual es llevada a cabo por varios miembros de la familia de las sulfotransferasa citosólica (SULT) (Raftogianis et al., 2000), el sitio principal de la molécula donde ocurre esta reacción, es en el grupo fenol del anillo aromático del estradiol, y la principal actividad de estas enzimas se encuentra en órganos como el hígado, intestino delgado, riñón, útero, mama y glándula suprarrenal, además la sulfatación de estrógenos, es la principal reacción de fase II que se lleva a cabo. Por su parte, la reacción de glucuronidación, es llevada a cabo por miembros de la familia de enzimas UDP-glucursiltransferasa (UGT). La glucuronidación puede ocurrir en el grupo hidroxilo 3 o 17 $\beta$ , aparentemente la posición predominante es la 17 $\beta$ , para el 17 $\beta$ -estradiol (Raftogianis et al., 2000). La glucuronidación de los estrógenos produce moléculas más hidrofílicas y que se excreten más fácilmente en la orina o las heces.

Finalmente, la última reacción de biotransformación de fase II que sufren los estrógenos es la metilación, esta es llevada a cabo por la catecol-O-metiltransferasa, esta enzima tiene una actividad mayor en el hígado y los riñones, los metabolitos que se producen son la 2-metoxiestrona, 4-metoxiestrona, 2-metoxiestradiol y 4-metoxiestradiol, de todos ellos, el metabolito que se encuentra en mayor proporción es el 2-metoxiestrona. Estos metabolitos tienen una muy pequeña o nula afinidad por los receptores de estrógenos (Zhu & Conney, 1998). La figura 4 presenta un resumen del metabolismo de los estrógenos.

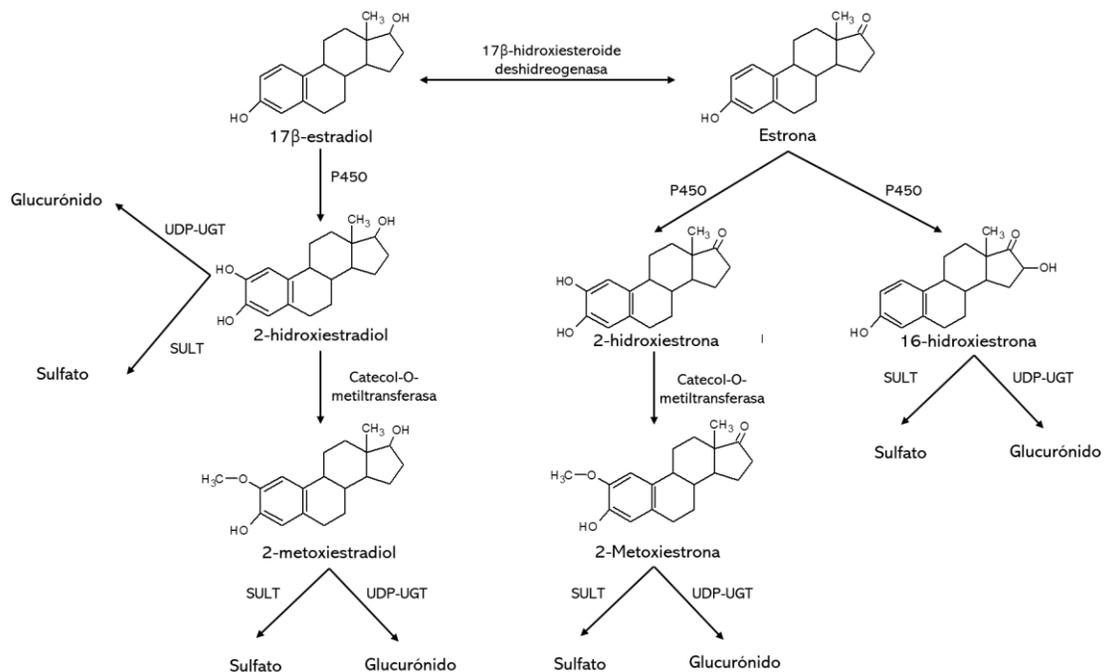


Figura 3. Resumen del metabolismo de los estrógenos, basado de: (Samavat & Kurzer, 2015) p.233.

SULT: Sulfotransferasa citosólica, UDP-UGT: UDP-Glucosiltransferasa, p450: Citocromo P-450.

### 3.1.5. Niveles en sangre

De acuerdo con (Norman & Henry, 2015), los niveles de los 2 estrógenos principales en las mujeres son los siguientes.

- Estradiol:
  - <20 pg/mL mujeres prepubertas
  - 60-600 pg/mL mujeres premenopáusicas
  - <30 pg/mL en mujeres postmenopáusicas
- Estrona
  - 40-300 pg/mL en mujeres premenopáusicas

En mujeres premenopáusicas los niveles de estradiol circulante durante la fase folicular rondan entre 19 a 140 pg/mL, en la fase preovulatoria de 110 a 410 pg/mL y en la fase lútea de 19 a 160 pg/mL (Cui et al., 2013).

## 3.2. Receptores Estrogénicos

### 3.2.1. Características y clasificación

Para poder llevar a cabo sus funciones en el organismo, los estrógenos tienen receptores específicos, los cuales son conocidos como receptores de estrógenos (RE), en la actualidad se han descubierto 3 receptores específicos para estas hormonas sexuales, RE $\alpha$ , RE $\beta$  y GPER. RE $\alpha$  fue descubierto en 1958 por Elwood Jensen, el RE $\beta$ , descubierto en 1996 por el equipo a cargo del Dr Jan-Ake Gustafsson en la próstata de rata y el último GPER1, el cual fue designado como receptor de estrógeno 1 acoplado a proteína G en el 2007, pero descubierto mucho tiempo antes, conocido como GPR30 el cual se consideraba un receptor huérfano, no fue hasta que en el año 2000, se informó que la activación rápida de quinasas reguladoras por señales extracelulares mediada por 17 $\beta$ -estradiol, dependía de este receptor GPR30 y en 2005 se descubrió la unión del estradiol a este receptor (Prossnitz & Barton, 2011).

De estos 3 receptores, RE $\alpha$  y RE $\beta$ , son receptores nucleares, los cuales comparten la misma estructura general la cual será descrita más adelante y son altamente homologables, aproximadamente un 95% en el dominio de unión al ADN, y un 55% en el dominio de unión al ligando. Estos se encuentran en forma soluble en el citoplasma y en el núcleo de la célula, aunque solo cerca del 5% se encuentran en el citoplasma, por lo que estos receptores son predominantemente nucleares (Prossnitz & Barton, 2011). Aunque como se mencionó, los receptores RE  $\alpha$  y  $\beta$  son nucleares, y ejercen una respuesta genómica (entra en el núcleo y formando complejos con otros factores de transcripción, promueve la transcripción de genes específicos), (Ver figura 4).

Además de su actividad genómica un aproximado de entre 5 y 10 % de receptores RE  $\alpha$  y  $\beta$  se encuentran unidos a la membrana celular (Klinge, 2020), donde llevan a cabo una respuesta que no genómica en la cual se interactúa con las proteínas de señalización para activar las cascadas de señalización intracelular, que a su vez altera respuestas intracelulares, mismo mecanismo mediante el cual trabaja el receptor GPER, aunque estructuralmente es completamente diferente, ya que este es un receptor que consta de 7 dominios transmembranales acoplado a una proteína G, siendo parte de la familia de los receptores acoplados a proteína G (GPCR por sus siglas en inglés), el cual también se ha detectado en varias localizaciones intracelulares desempeñando diferentes funciones (Ver figura 4).

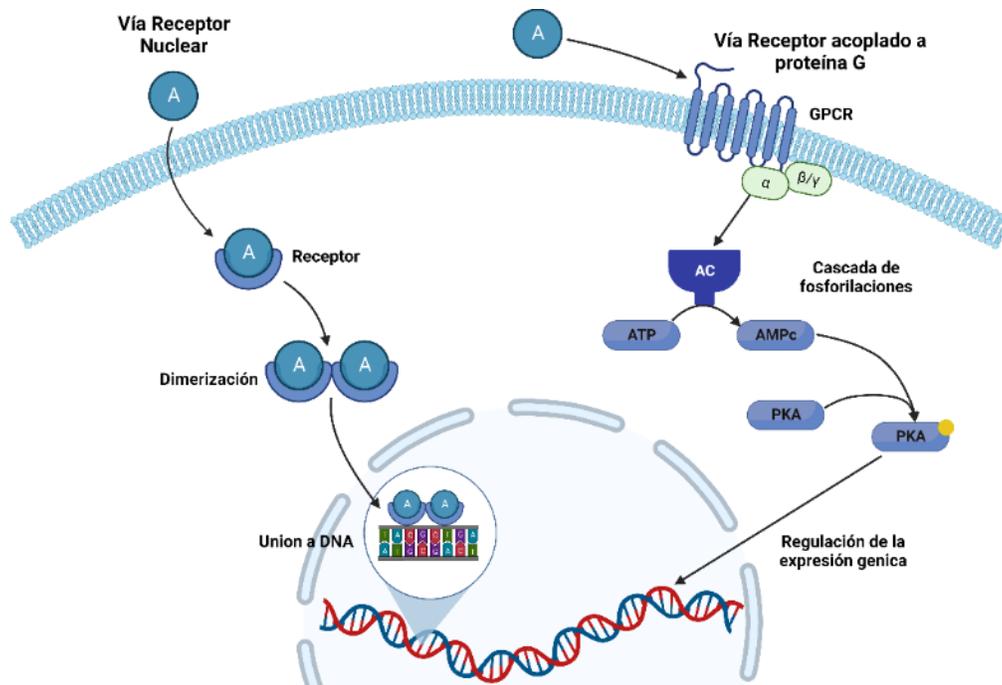


Figura 4. Vías de señalización generales de los receptores nucleares y acoplados a proteínas G, basado de (Fuentes & Silveyra, 2019) p. 148 y (Nilsson et al., 2011) p. 1132.

GPCR: Receptor acoplado a proteína G (siglas en inglés), DNA: Ácido desoxirribonucleico (siglas en inglés), AC: Adenilato ciclasa, ATP: Adenosín trifosfato (siglas en inglés), AMPc: Adenosín monofosfato cíclico, PKA: Proteína cinasa A.

### 3.2.2. Localización

El receptor RE  $\alpha$  está codificado por el gen ESR1, el cual está ubicado en el cromosoma 6, locus 6q25.1, se expresa principalmente en tejidos reproductivos, mama, riñón, hueso, tejido adiposo blanco e hígado, por su parte, el RE  $\beta$ , es codificado por el gen ESR2, que está ubicado en el cromosoma 14, locus 14q23.2, su expresión está principalmente en órganos como el ovario, pulmón, en el sistema nervioso central, cardiovascular e inmunológico (Jia et al., 2015). Como se mencionó anteriormente, los receptores RE se encuentran en su mayoría en el interior de la célula, predominantemente en el núcleo celular, mientras que aproximadamente un 5% se encuentra en el citoplasma; Además del total de receptores RE, entre un 5% y 10% también pueden encontrarse en la membrana celular.

El gen que codifica a GPER1 por su parte, se encuentra en el cromosoma 7, locus 7p22.3, de acuerdo con (Olde & Leeb-Lundberg, 2009) este receptor se expresa en tejidos como el corazón, cerebro, pulmones, hígado, riñones, páncreas y órganos reproductivos, dentro de

la célula se ha detectado en diferentes localizaciones diferentes a la membrana celular, como son el retículo endoplásmico, y el núcleo, donde se espera que GPER1 ejerza diferentes funciones moleculares dependiendo de su localización subcelular (Périan & Vanacker, 2020).

### **3.2.3. Estructura**

#### **3.2.3.1. Receptores RE $\alpha$ y $\beta$**

El RE  $\alpha$  tiene un total de 595 aminoácidos y un peso de 67 kDa, por su parte el RE  $\beta$  contiene 530 aminoácidos de longitud y 59 kDa de peso, de acuerdo con (Fuentes & Silveyra, 2019) se han encontrado diferentes isoformas del receptor RE  $\alpha$ , como lo son el RE  $\alpha$  62, 53, 46, 45 y 36, los cuales son nombrados así por su peso expresado en kDa, entre estas isoformas, algunas no contienen dominios de activación AF-1 y/o AF-2, por lo que estas isoformas no son capaces de activar la transcripción. Por su parte, del receptor RE  $\beta$  tiene 5 isoformas conocidas, las cuales son RE  $\beta$  59, 54, 49, 44 y 61, siendo la de 59 kDa el receptor de tamaño completo, las cuales tienen más corto su extremo carboxilo, donde se ubica el dominio de activación AF2, por lo que al igual que con los receptores RE  $\alpha$ , carecen de actividad transcripcional.

Los receptores de estrógenos RE  $\alpha$  y  $\beta$ , como se mencionó anteriormente son producto de los genes ESR1 y ESR2, estos genes comprenden 8 exones (regiones codificables), separados por siete intrones (regiones no codificables), estos 8 exones corresponden a 5 regiones por las cuales están compuestos los receptores de estrógenos, las cuales son marcadas de la letra "A" a la "F", en el sentido del extremo amino al carboxilo terminal y las forman dominios funcionales, estos dominios son el dominio de activación N-terminal AF-1 el cual tiene la capacidad de activar la transcripción independientemente de la unión del receptor con el ligando (17 $\beta$ -Estradiol), este dominio es conformado por las regiones A y B, la región C, contiene al dominio de unión al ADN, que en el caso de los estrógenos se unen a la región específica ERE (elemento de respuesta a estrógenos), el dominio de unión a estrógenos contiene 8 residuos de cisteína conservados en ambos receptores, los cuales se encuentran divididos en 2 grupos de 4 residuos, estos se encuentran unidos de forma coordinada a un átomo de zinc. Cada uno de los grupos formados, actúan de forma diferente, ya que el primer grupo o subdominio como suele tratarse, está involucrado en el reconocimiento del ADN, mientras que el segundo subdominio se encarga de la dimerización de los receptores (Ascenzi et al., 2006), (ver figura 5).

La región D, corresponde al dominio bisagra, que se encarga de conectar a los dominios de unión al DNA y de unión al ligando, además puede unirse a proteínas chaperonas. Finalmente, las regiones E y F dan lugar al dominio de unión al ligando, los cuales son casi idénticos en ambos receptores, cambiando únicamente 2 residuos Leucina/Metionina en el RE  $\alpha$  que corresponden a Metionina/Isoleucina en el RE  $\beta$ . En estas regiones también se encuentra el dominio de activación AF-2, el cual es dependiente del ligando y además esta región está involucrada en la unión de proteínas chaperonas como Hsp 70 y 90 (ver figura 5).

Dentro de las regiones de los RE, la región C es la que se encuentra más conservada, ya que tienen un 96% de similitud en los aminoácidos que contienen, esto hace que ambos receptores se unan a sitios similares, la región E/F también tiene un buen grado de similitud, siendo de 53%, lo que se ve reflejado en las constantes Kd, las cuales demuestran que hay muy ligeras diferencias en la afinidad por 17 $\beta$ -Estradiol; mientras que las regiones más variables son la A,B y D (Pearce & Jordan, 2004).

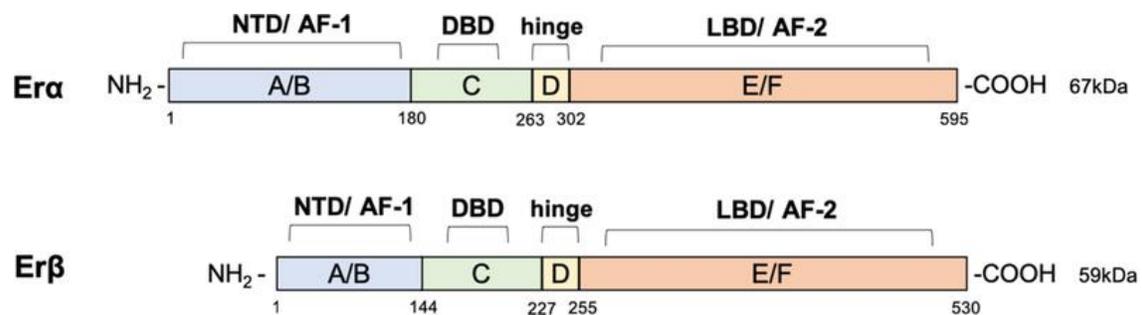


Figura 5 Dominios estructurales de los receptores RE $\alpha$  y RE $\beta$

AF-1 y AF-2: Dominio de activación 1 y 2, DBD: Dominio de unión a DNA (siglas en inglés), LBD: Dominio de unión a ligando, hinge: dominio bisagra. recuperado de (Fuentes & Silveyra, 2019).

### 3.2.3.2. Receptor GPER

El receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER1), anteriormente conocido como receptor acoplado a proteína G 30 (GPR30) es una proteína de 7 dominios transmembranales compuesta por 371 aminoácidos, con una masa molecular de aproximadamente 41 kDa. El gen que codifica este receptor se encuentra en el cromosoma 7, en el locus 7p22.3, y está compuesto por 3 exones. (Mizukami, 2010). La proteína tiene un dominio N-terminal, el cual está ubicado por fuera de la célula, el cual está conformado por un residuo de ácido aspártico. Se especula que los ligandos se asocian a este extremo

N-terminal para poder activar el receptor. Por su parte, la proteína G se encuentra ubicada en el 3er bucle transmembranal por dentro de la célula.

#### **3.2.4. Vías de señalización**

Para llevar a cabo sus funciones, los estrógenos presentan diversas vías de señalización, en las cuales están involucrados sus receptores, los receptores de estrógenos (RE) los cuales son el  $\alpha$  y  $\beta$ , además de un tercero conocido como GPER1, los receptores  $\alpha$  y  $\beta$ , son principalmente nucleares, aunque hay una pequeña proporción que son de membrana, mientras que el GPER1, es un receptor acoplado a proteínas G. Los estrógenos presentan 2 principales vías de señalización, la vía genómica y la vía no genómica, y dentro de estas clasificaciones se pueden subdividir en la acción de los estrógenos dependiente de sus receptores e independientes de ellos, a continuación, se da una breve descripción de estas vías de señalización.

##### **3.2.4.1. Vía genómica**

La vía genómica de los estrógenos es aquella, mediante la cual los estrógenos se unen a los receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$ , y estos llevan a cabo sus acciones en el ADN, sin embargo, esta vía puede ser dividida en 2, la vía clásica y la vía no clásica. La vía clásica, es aquella en la que los estrógenos se unen a los receptores de estrógenos  $\alpha$  o  $\beta$ , posteriormente se produce un cambio conformacional que induce la dimerización del receptor (Fuentes & Silveyra, 2019). El complejo formado se transloca en el núcleo, y se une al ADN en secuencias específicas, las cuales son conocidas como ERE o elementos de respuesta a estrógenos, donde se activa la maquinaria de transcripción y se continúa este proceso (ver figura 6).

Por la vía genómica no clásica o independiente de ERE, es más compleja, de acuerdo con (Björnström & Sjöberg, 2005) los receptores de estrógenos forman interacciones proteína-proteína, y estos están atados a un complejo factor de transcripción que se pone en contacto con el ADN. Por lo regular, los genes donde actúan estas estructuras son genes que no contienen el ERE. Uno de estos ejemplos es cuando los receptores de estrógenos interactúan con una proteína llamada Fos y otra Jun, en sitios de unión a ADN conocidos como sitios de proteína activadora 1 o AP1, esto causa que se reprima el gen de la acetiltransferasa de colina, que lleva a cabo la síntesis de acetilcolina en las neuronas. Otra proteína importante que interactúa con los receptores de estrógenos es la proteína

estimulante 1 o SP1, la cual induce a los genes del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (O'Lone et al., 2004).

#### **3.2.4.2. Vía no genómica**

Dado que los estrógenos ejercen acciones demasiado rápidas, se ha propuesto que estas acciones pueden ser explicadas mediante la transcripción de ADN, por otro lado, se ha propuesto un mecanismo no genómico, el cual está dado por la activación de cascadas de proteína-cinasa. De acuerdo con (Björnström & Sjöberg, 2005) se ha informado que algunas acciones del 17 $\beta$ - estradiol incluyen la movilización de calcio intracelular, estimulación de la adenilato ciclasa para la producción de AMPc, la activación de la vía MAPK y la vía del inositol 3-fosfato. Se ha sugerido que los responsables de estas acciones sean una pequeña fracción de receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$ , los cuales se ha encontrado que se pueden encontrar en una pequeña proporción en la membrana celular, de acuerdo con (Cheskis et al., 2007) el receptor de estrógenos  $\alpha$  interactúa con caveolina 1 y 2, dependiente de estradiol, por lo que se propone que los receptores de estrógenos en la membrana celular se encuentran ubicados en las caveolas, principalmente de células endoteliales. Estas vías de señalización pueden llevar a la activación por ejemplo de la óxido nítrico sintasa endotelial o eNOS, la cual se encarga de la producción de óxido nítrico que es un potente vasodilatador a través de la activación de la señalización de tirosina cinasa- MAP cinasa y la perturbación del calcio, dependiente de calmodulina (Chambliss & Shaul, 2002).

Además de estos dos receptores, también se incluye al GPER1, o receptor de estrógenos acoplado a proteína G, este actúa como la gran mayoría de los receptores acoplados a proteína G, de acuerdo con (DeLeon et al., 2020), se ha demostrado que el GPER1 activa la fosforilación de ERK  $\frac{1}{2}$  o cinasa regulada por señales extracelulares a través de la transactivación dependiente de G $\beta,\gamma$  del receptor del factor de crecimiento epidérmico, también participa en la generación de AMPc, moviliza calcio y proteínas cinasas como la PKA. Las funciones fisiológicas que provocan estas cascadas de señalización son en la expresión de proteínas, apoptosis, proliferación celular, migración celular y crecimiento. Todas estas vías de señalización pueden verse de manera más simplificada en la figura 6.

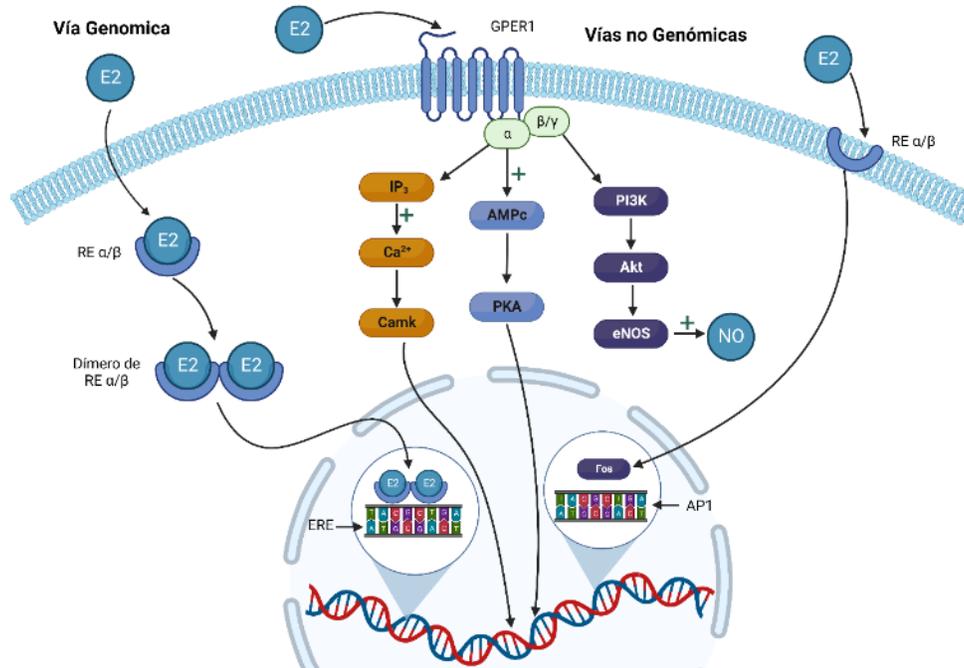


Figura 6. Vías de señalización generales de los estrógenos, basado en: (Fuentes & Silveyra, 2019) p.148.

E2: 17β-estradiol, RE α/β: Receptor de estrógenos α y β, ERE: Elementos de respuesta a estrógenos, GPER1: Receptor de estrógenos unido a proteína G 1, IP<sub>3</sub>: Inositol trifosfato, Camk: Proteína cinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>, AMPc: Adenosín monofosfato cíclico, PKA: Proteína cinasa A, PI3K: Fosfoinositida 3-cinasa, Akt: Proteína cinasa B, eNOS: Óxido Nítrico Sintetasa, NO: Óxido Nítrico, Fos: Proteína fos, AP1: Proteína activadora 1.

### 3.2.5. Expresión y acciones en tejido cardiovascular

En tejido cardiovascular se han encontrado receptores de estrógenos α y β, en el endotelio, específicamente en células endoteliales, y también se ha encontrado el receptor GPER1, de acuerdo con (Knowlton & Lee, 2012), una tercera parte de los receptores de estrógenos α se encontraban ancladas con caveolina-1 o cerca de la membrana plasmática, en contraste, el receptor β se encontraba predominantemente en el núcleo de las células endoteliales. Otro lugar donde también se han expresado los receptores, ha sido en las células musculares lisas vasculares, aunque la localización exacta, sigue en discusión aún, solo se han identificado los receptores de estrógenos α y β, En cuanto a los miocitos cardiacos, en un estudio realizado por (Pugach et al., 2016), se encontró ARN del receptor de estrógenos α, aunque no del β, y además en cuanto a su localización subcelular, estos encontraron que la isoforma del receptor α encontrado, la completa (REα 66) estaba localizada en el núcleo de los miocitos cardiacos, este estudio fue realizado utilizando

ratones hembra y macho. Con respecto a la expresión de los receptores de estrógenos (Knowlton & Lee, 2012), menciona que tanto el receptor de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$ , se encontraban presentes en miocitos cardiacos aislados de ratas Norway Brown adultas, ancianas y ovariectomizada con y sin terapia de reemplazo hormonal (TRH) de estrógenos. Algunas de las acciones fisiológicas de los estrógenos, que llevan a cabo por medio de los receptores de estrógenos en el sistema cardiovascular se describen a continuación. En vasos sanguíneos, el estradiol tiene un impacto positivo en la función vascular, ya que previene la oxidación de LDL, estimula la síntesis y liberación de óxido nítrico e inhibe la transición de fibroblastos a miofibroblastos, previniendo la fibrosis cardiaca (Barakat et al., 2016), además de acuerdo con (Knowlton & Lee, 2012) se menciona que reduce la hipertrofia cardiaca patológica, dicha acción es atribuida al receptor de estrógenos  $\beta$ .

### **3.3. Menopausia y Terapia de Reemplazo Hormonal**

#### **3.3.1. Definiciones y prevalencia**

La menopausia es definida como la ausencia de menstruación durante un periodo de 12 meses sin alguna causa patológica conocida, esta definición es muy similar a la de un padecimiento conocido como amenorrea, el cual también es la ausencia de la menstruación, aunque la diferencia radica en que el tiempo desde que fue el último periodo debe ser mayor a 3 meses (Klein et al., 2019), además la menopausia se presenta en mujeres mayores de 45 años, mientras que la amenorrea puede presentarse en mujeres jóvenes y adultas, finalmente la última diferencia radica en que la ausencia de la menstruación en la menopausia es sin causa patológica alguna, mientras que en la amenorrea si puede haber causas patológicas que la ocasionen. En el mundo, de acuerdo con (Takahashi & Johnson, 2015), la mayoría de las mujeres entran en menopausia entre los 49 y los 52 años, aunque esta cifra puede modificarse de acuerdo a algunos factores externos, como lo puede ser el tabaquismo, un IMC alto, malos hábitos alimenticios, además de relacionarse con el nivel socioeconómico y educativo bajo, lo que provoca que la menopausia sea prematura.

En los Estados Unidos, la edad promedio de la menopausia es de 51 años, y se estima que aproximadamente 6000 mujeres estadounidenses alcanzan la menopausia diariamente (Takahashi & Johnson, 2015), mientras que en México la edad promedio de la menopausia es ligeramente menor, siendo a los 49 años de edad aproximadamente, además en el año 2014, el censo poblacional de México registro 644,513 mujeres de 50 años de edad, y se estima que en el año 2050 la cifra ascienda hasta los 985,527, además que junto a estos datos, la esperanza de vida de las mujeres se estima que crecerá de los 77.5 años hasta los 81.6 años en el año 2050 (Martínez et al., 2014), esto ocasionara que en el país haya un crecimiento de las mujeres que presenten menopausia y a su vez tengan una mayor prevalencia en enfermedades crónico-degenerativas, en especial aquellas relacionadas con el sistema cardiovascular (Ver figura 7).



Figura 7. Edades promedio de la aparición de la menopausia en México, Estados Unidos y el Mundo.

### 3.3.2. Fisiopatología

#### 3.3.2.1. Causas

La menopausia es producto del envejecimiento, por lo que se considera un cambio o un proceso natural, aunque existen diversos factores que ocasionan que esta etapa pueda adelantarse, estos cambios incluyen: la raza o etnia, ya que las mujeres afroamericanas tienen una transición menopáusica más larga que las mujeres blancas, aunque no hay diferencia en la edad en la que inician el proceso de menopausia (Santoro et al., 2021), además del fumar, dicha actividad ocasiona una entrada más temprana a la transición menopáusica y una duración más corta de esta, también se ha encontrado que la obesidad y un IMC alto está relacionado con el inicio tardío de la menopausia, otros factores que también influyen en la presencia más temprana o tardía de la menopausia es la situación socioeconómica, ya que se ha visto que las mujeres con una posición socioeconómica más alta tardan más en llegar a la menopausia, debido a la calidad de vida y a la mejor atención médica que tienen, finalmente, el número de partos, y en específico el último parto, también aumenta la edad en la que se presenta la menopausia, el sustento a esto se basa en el aumento de la secreción de estrógenos y la progesterona, debido a un aumento mayor de la actividad uterina y ovárica, además de la lactancia (Namazi et al., 2019).

### **3.3.2.2. Diagnóstico**

Aunque la menopausia se estima que comienza entre los 49 y los 52 años en general, los síntomas asociados a ella, comienzan desde algunos años antes, este periodo donde comienzan estos cambios es conocido como transición a la menopausia y es caracterizado por el taller de etapas de envejecimiento reproductivo o STRAW+10 por sus siglas en inglés (Monteleone et al., 2018), aunque a este periodo a menudo también se le conoce como perimenopausia por lo que el resultado del diagnóstico puede dar como resultado que la paciente se encuentre en la fase posmenopáusica o en la transición a la menopausia. A continuación, se describen las pautas mediante las cuales se realiza este diagnóstico.

De acuerdo con (Potter et al., 2018) el diagnóstico para las mujeres mayores de 45 años se puede hacer sin pruebas clínicas, únicamente de acuerdo con su sintomatología, se considera que las mujeres en esta edad que presenten síntomas vasomotores, junto a menstruaciones irregulares se diagnostican como perimenopausicas o en la etapa de transición a la menopausia, mientras que aquellas mujeres que su última menstruación ocurrió 12 meses atrás se considera como menopáusica, aunado a esto, aquellas mujeres sin útero, el diagnóstico se basa únicamente en la sintomatología.

En el estudio realizado por (Davies et al., 2017) se menciona que las pruebas de FSH se consideran poco fiables como prueba diagnóstica en mujeres mayores de 45 años y en general de las determinaciones de hormona antimüllerina, inhibina A y B y estradiol, en especial en mujeres que ha utilizado anticonceptivos hormonales, estas recomendaciones también son dadas por el National Institute for Health and Care Excellence o NICE. Esta institución recomienda que la prueba de FSH se realice en mujeres con síntomas de menopausia en edades de entre 40 y 45 años y en mujeres menores de 40 años, en las cuales el diagnóstico será dado como insuficiencia ovárica prematura, en dichas pacientes una concentración por encima de 30 mUI/mL en dos muestras de sangre tomadas con 4 a 6 semanas de diferencia fueron útiles para identificar la insuficiencia ovárica prematura, aunque se sigue recomendando que el diagnóstico se base en los síntomas de la menopausia.

### **3.3.2.3. Síntomas**

El promedio de la transición a la menopausia es de aproximadamente 4 años (Santoro et al., 2021). Los síntomas de la menopausia son graduales, comienzan siendo leves, en la etapa de la transición temprana, y posteriormente se vuelven más fuertes a medida que avanza la transición a la menopausia y ocurre la pérdida de los estrógenos y de la menstruación (Ver figura 8).

#### **3.3.2.3.1. Relacionados con el sistema nervioso central**

Los síntomas que ocurren con mayor frecuencia son los llamados vasomotores, se estima que hasta el 75% de las mujeres los experimentan, tienen que ver principalmente con los sofocos y la sudoración (bochorno), a veces seguidos de temblores y/o sensación de frío, comienzan aproximadamente 2 años antes del último periodo menstrual y alcanzan su máximo, un año después de éste mismo (Monteleone et al., 2018), estos síntomas suelen alterar la calidad de vida de las mujeres que lo experimentan, ya que incluso se pueden presentar de manera nocturna, siendo más comunes durante las primeras 4 horas de sueño, de acuerdo con (Santoro et al., 2021), las mujeres afroamericanas son las que experimentan la carga más intensa y prolongada de estos síntomas.

Otros síntomas relacionados con el Sistema nervioso central es la irrupción del sueño, cuyo síntoma afecta entre el 40 y 60% de las mujeres menopaúsicas, algunas de las causas que lo ocasionan son los síntomas vasomotores nocturnos, sin embargo no explican completamente la irrupción del sueño, se ha visto que el punto máximo de esta es en la transición tardía a la menopausia; La depresión y la ansiedad también suelen ser síntomas de la menopausia, lo que trae consigo cambios de humor repentinos, en general, se tiene una mayor probabilidad de desarrollar depresión y ansiedad durante y después de la transición a la menopausia, de acuerdo con (Santoro et al., 2021), una posible causa es por el desequilibrio de la regulación de GABA, lo cual aumenta la vulnerabilidad a la depresión. Finalmente, también se ha informado de una disminución de la memoria y la cognición, aunque se sugiere que el efecto de la menopausia sobre la cognición es transitorio y afecta mayormente en la etapa de la transición a la menopausia (ver figura 8).

#### **3.3.2.3.2. Relacionados a cambios metabólicos**

Se proponía que el aumento de peso era relacionado a la menopausia, pero en el estudio de (Monteleone et al., 2018) se menciona que este hecho es más atribuido al envejecimiento, lo que sí es atribuible a la menopausia es la redistribución de grasa

corporal, ya que esta se acumula principalmente en el tronco, además se ha reportado un aumento de la grasa abdominal visceral, lo que supone un mayor riesgo para la salud y puede ser una causa independiente de la enfermedad cardiovascular (ver figura 8).

#### **3.3.2.3.3. *Relacionados al sistema cardiovascular***

Se aumenta considerablemente el riesgo de enfermedades cardiovasculares, como la aterosclerosis, debido a la mayor cantidad de volumen de grasa cardiaca con la que cuentan las mujeres perimenopausicas y posmenopáusicas, a comparación con mujeres premenopáusicas, además también hay una mayor prevalencia a la sensibilidad hacia la sal, por lo que aumenta el riesgo de desarrollar hipertensión (ver figura 8).

#### **3.3.2.3.4. *Relacionados a sistema urinario y aparato reproductor***

Dentro de estos síntomas se incluye la sequedad vaginal, prurito, ardor valvular, infecciones recurrentes en el tracto urinario inferior, atrofia de la vagina y de la vulva, estrechamiento y acortamiento vaginal, incontinencia urinaria, aumento del pH vaginal por cambio de microbiota vaginal, siendo el síntoma con mayor frecuencia, de acuerdo con estudio internacional “Vaginal Health: Insights, Views and Attitudes” o VIVA, la sequedad vaginal con un 83%.

Además también se presenta una disminución del deseo sexual, siendo más intenso este síntoma entre 1 año antes del último periodo y un año después de este, puede afectar hasta a un 10% de las mujeres, y tener una relación duradera con su pareja, parece preservar una vida sexual satisfactoria (Monteleone et al., 2018) (ver figura 8).

#### **3.3.2.3.5. *Relacionados a sistema musculoesquelético***

La pérdida de los estrógenos puede marcar un periodo de aumento de la resorción del hueso, por lo que aumenta la prevalencia de osteoporosis la cual afecta a la mitad de las mujeres mayores de 50 años. Se estima que la perdida ósea después del último periodo es del 1.8% al 2.3% en la columna, y de 1.0 al 1.4% en la cadera (Finkelstein et al., 2008). También se ha reportado de un aumento en la prevalencia de artrosis, principalmente en las articulaciones de los dedos (ver figura 8).

#### **3.3.2.3.6. *Relacionados a sistema tegumentario***

Finalmente, también se tienen síntomas producidos por la menopausia en la piel, la cual se reduce de grosor, capta menos agua, es menos elástica y esto provoca la presencia de arrugas (Monteleone et al., 2018), esto principalmente por la pérdida de fibroblastos en la

dermis, por lo cual ya no se produce suficiente colágeno ni se retiene el agua necesaria. Además, también la menopausia parece retrasar la curación de la mucosa y se aumenta la susceptibilidad a una lesión en esta (ver figura 8).

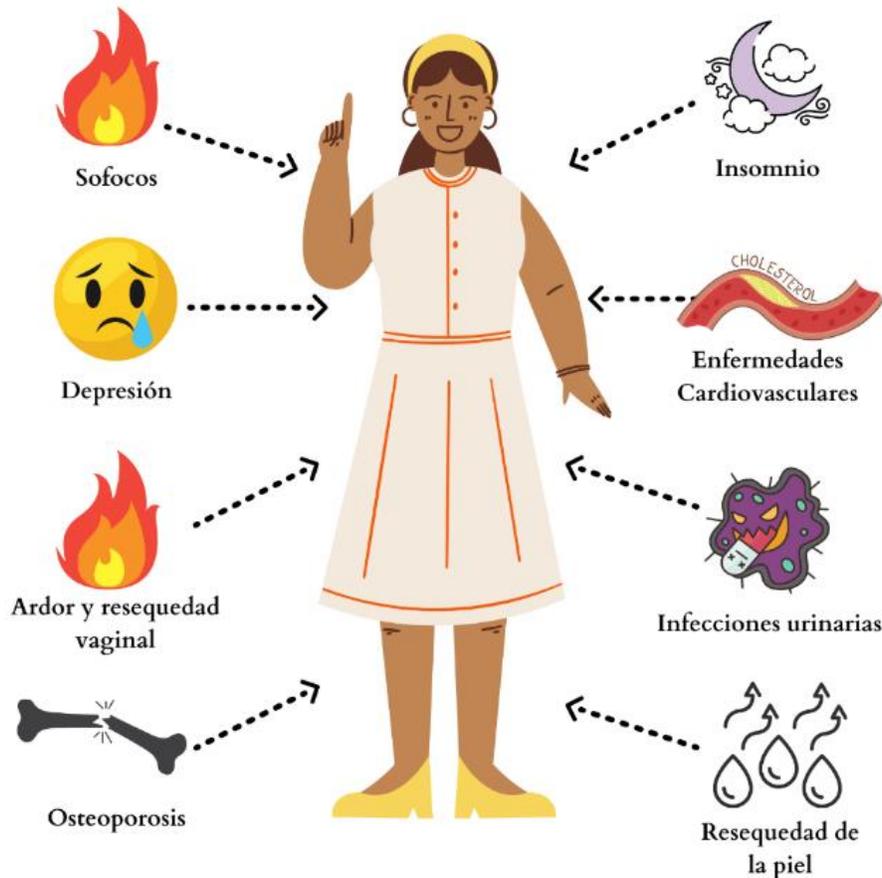


Figura 8. Resumen de los síntomas generales de la menopausia.

### 3.3.3. Fibrosis cardíaca

La fibrosis cardíaca es definida como un depósito excesivo de proteínas de la matriz extracelular en el corazón, de entre las cuales destaca el colágeno. La fibrosis cardíaca ocurre cuando el corazón está sometido a estrés, como en un infarto miocárdico o en el envejecimiento (Kurose, 2021), llegando a causar en algunos casos disfunción cardíaca por un aumento de la rigidez del miocardio. Aunque cabe mencionar, que la fibrosis no se debe considerar siempre como un evento adverso, ya que en algunos casos como en un infarto miocárdico, esta es reparadora, debido a que se encarga de sustituir la pérdida súbita de un gran número de cardiomiocitos mediante una cicatriz de matriz extracelular, lo que ayuda a mantener la integridad estructural del corazón.

### **3.3.3.1. Matriz extracelular en el corazón**

Para comprender lo que sucede en la fibrosis cardíaca, debemos entender la composición de la matriz extracelular, la cual contiene principalmente de colágeno fibrilar, como lo son el colágeno de tipo I y III. La matriz extracelular cardíaca provee de un soporte y rigidez estructural al corazón, pero además también tiene la función de transmitir la fuerza contráctil.

Además del colágeno, la matriz extracelular cardíaca, también se encuentra compuesta por glucoproteínas, glicosaminoglucanos, proteoglucanos, proteasas como las metaloproteasas encargadas de la degradación de colágeno, y factores de crecimiento almacenados (Frangogiannis, 2021). Todos estos componentes anteriormente mencionados, son sintetizados y excretados por una serie de células que se encuentran en la matriz extracelular, como células endoteliales vasculares, células endoteliales, fibroblastos cardíacos, leucocitos como macrófagos, mastocitos, células dendríticas y linfocitos.

Los fibroblastos y las células del endotelio vascular se encargan de sintetizar fibronectina y colágeno de tipo I y III, las células endoteliales y los cardiomiocitos producen colágeno de tipo IV y laminina, también los cardiomiocitos producen colágeno de tipo VI y proteoglicanos, los fibroblastos también producen metaloproteasas de la matriz (MMP), periostina, factor de crecimiento transformante  $\beta$ , y algunas citocinas como la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (Bowers et al., 2010). Finalmente los leucocitos son encargados de la producción de proteasas y citocinas profibróticas, como la interleucina 4 y 13 (IL-4) e (IL-13) (Kurose, 2021).

### **3.3.3.2. Fibroblastos y miofibroblastos**

Ahora conoceremos a células encargadas de la regulación de la matriz extracelular, dichas células son los fibroblastos, estos desempeñan un papel esencial en la regulación de la estructura y función del corazón debido a que se encargan de producir proteínas de la matriz extracelular, como son la fibronectina y los colágenos de tipo I y III, estos representan aproximadamente el 13% de las células del corazón en el ratón, y además cuando el corazón se encuentra expuesto a una lesión, los fibroblastos son capaces de diferenciarse en una células conocidas como miofibroblastos, los cuales producen una mayor cantidad de proteínas de la matriz extracelular, ayudan a fagocitar células apoptóticas, secretan

citocinas que suprimen las respuestas inflamatorias y que además suelen presentar proteínas contráctiles, como la  $\alpha$ -actina de músculo liso (Kurose, 2021).

Estos miofibroblastos son activados por diversos mecanismos, y dependen del tipo de lesión en el miocardio. De entre los principales mecanismos que median la diferenciación entre fibroblastos a miofibroblastos se encuentran los siguientes: El sistema renina-angiotensina-aldosterona, la respuesta  $\beta$  adrenérgica, las citocinas proinflamatorias, la endotelina 1, respuestas mecanosensibles por estrés mecánico y finalmente el estrés oxidativo (Frangogiannis, 2021).

De estos mecanismos, uno de los mejores descritos, es el que involucra al sistema renina-angiotensina-aldosterona. En los cardiomiocitos, los leucocitos y los fibroblastos estresados se produce renina y enzima convertidora de angiotensina, lo que contribuye a la generación de angiotensina II. La angiotensina II por medio de su unión al receptor AT1 interactúa con la vía de señalización del factor de crecimiento transformante  $\beta$ , el cual es un fuerte inductor de la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, y además otra función de la angiotensina II, es la mejora de la secreción de colágeno, por parte del miofibroblasto (Kurose, 2021).

Una lesión cardíaca, como un infarto miocárdico o hipertensión puede activar de forma crónica al sistema renina-angiotensina-aldosterona, lo que conduce a una mayor producción de angiotensina II y esto a su vez induce a los fibroblastos que se diferencien en miofibroblastos, produciendo una mayor cantidad de colágeno. Al ser un evento crónico, se sigue estimulando un depósito excesivo de matriz extracelular, que conduce a un corazón fibrótico (Liu et al., 2021).

### **3.3.3.3. Metaloproteinasas de la matriz**

Finalmente conoceremos a las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) las cuales son una gran familia de endopeptidasas (enzimas proteolíticas) dependientes de Calcio y que contienen Zinc, las cuales son responsables de la remodelación y degradación de la matriz extracelular (Kapoor et al., 2016), incluyendo a los diferentes tipos de colágeno, actualmente se han descrito 26 tipos de metaloproteinasas en vertebrados, siendo las más relevantes para la remodelación cardíaca, las MMP 1, MMP 2, MMP3, MMP8, MMP9, MMP12, MMP13 y MMP28 (Fan et al., 2012), la actividad de poder escindir los enlaces de las fibras de colágeno, por parte las metaloproteinasas de la matriz es regulada a través de un inhibidor de las metaloproteinasas, conocido como Inhibidor tisular de metaloproteinasas de la matriz (TIMP), estos inhibidores indirectamente ayudan a mantener cantidades de

colágeno adecuadas en el corazón, inactivando a las MMPs y evitando que haya una degradación excesiva del tejido, aunque también la expresión de estas proteínas debe ser regulada estrictamente, ya que si se sintetizan de forma excesiva podría contribuir a la acumulación de colágeno y posteriormente a fibrosis. Sin embargo, de acuerdo a (Fan et al., 2012) las MMP2 y MMP9 liberan al TGF $\beta$  unido a la MEC, lo que desencadena una mayor producción de colágeno, que en algunos casos puede generar una fibrosis miocárdica severa.

#### **3.3.3.4. Efecto de los estrógenos y la menopausia sobre la fibrosis cardíaca**

Una vez conocido como se conforma la matriz extracelular cardíaca y los componentes más representativos que generan fibrosis cardíaca, a continuación, se muestran los principales mecanismos por los cuales los estrógenos tienen influencia sobre la remodelación de la matriz extracelular cardíaca.

Uno de estos mecanismos es a través de la vía del Factor de necrosis tumoral, de acuerdo con (Kessler et al., 2019) los estrógenos son capaces de inhibir la síntesis del Factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), el cual es una citocina proinflamatoria, y la interferencia en su síntesis provoca que los leucocitos tengan problemas al activarse, y además influencia en la activación de los fibroblastos, ya que en la vía del factor de necrosis tumoral hay una activación de la vía del factor de crecimiento transformante  $\beta$ , lo que sugiere que al interferir en la vía del factor de necrosis tumoral, también se afecta la síntesis del TGF-  $\beta$ , molécula crucial en la activación del fibroblasto a miofibroblasto.

Por otro lado, también se ha observado que los estrógenos, principalmente por medio del receptor RE $\beta$  es capaz de intervenir en la señalización del TGF-  $\beta_1$ , primero evita la formación de esta molécula, bloqueando la estimulación de angiotensina II, y posteriormente a través de la estimulación de AMPc y de la Proteína cinasa A, bloquea la señalización del TGF-  $\beta_1$ , interfiriendo directamente en la transición de fibroblasto a miofibroblasto (Pedram et al., 2010) (Ver figura 9).

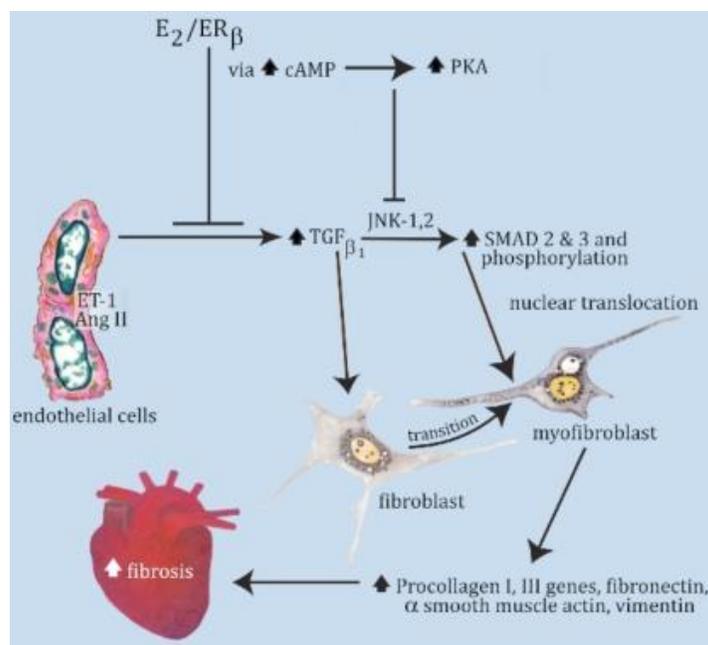


Figura 9. Efecto de los estrógenos, sobre la señalización profibrotica, recuperado de: (Pedram et al., 2010).

E<sub>2</sub>: estradiol, ER $\beta$ : receptor de estrógenos beta, cAMP: adenosín monofosfato cíclico, PKA: proteína cinasa A, TGF $\beta$ <sub>1</sub>: factor de crecimiento transformante beta 1, JNK-1,2: cinasa N-terminal c-jun, SMAD 2 y 3: mothers against decapentaplegic homolog.

También se ha observado que los estrógenos, en específico el 17  $\beta$ -estradiol, también impactan en la síntesis y actividad de las metaloproteinasas, en el estudio de (Xu et al., 2003), se demostró que los estrógenos lograron aumentar la actividad de la metaloproteinasas 2, y una deficiencia de estas condujo a una disminución de la actividad y producción de esta.

Finalmente cabe mencionar que, en modelos de menopausia simulada, como lo es la ovariectomía, se ha encontrado que la deficiencia de estrógenos exacerba la fibrosis cardíaca, como en el estudio de (Mori et al., 2011), por lo que se sugiere que en mujeres posmenopáusicas hay un aumento de la fibrosis cardíaca, por la pérdida de estrógenos, y que puede seguir los mecanismos anteriormente mencionados.

### 3.3.4. Hipertrofia cardíaca

La hipertrofia cardíaca es una respuesta adaptativa al estrés por presión o volumen, mutaciones de proteínas del sarcómero o pérdida de masa contráctil por un infarto miocárdico previo (Frey et al., 2004), a nivel celular de los cardiomiocitos, se caracteriza por un aumento en el tamaño celular, una mayor síntesis de proteínas y una mayor organización del sarcómero. Existen varias clasificaciones, una de ellas es por el fenotipo,

en donde existe la hipertrofia concéntrica debido a sobrecarga de presión en la que los cardiomiocitos crecen lateralmente; por el otro lado está la hipertrofia excéntrica debida a sobrecarga de volumen o infarto previo, en donde los cardiomiocitos crecen longitudinalmente.

Otra de las clasificaciones, y que toma especial relevancia en este trabajo es la clasificación como hipertrofia fisiológica y patológica. La hipertrofia fisiológica puede producirse como resultado del ejercicio o del embarazo, y se considera leve y/o reversible (Samak et al., 2016) en donde no hay acumulación de colágeno y los aumentos en el grosor de la pared, son modestos. Sin embargo, bajo condiciones crónicas como la hipertensión, se desarrolla la hipertrofia patológica, en la cual puede desarrollarse un disfunción miocárdica y fibrosis que pueden llevar a una insuficiencia cardiaca o incluso una muerte súbita (Samak et al., 2016).

#### **3.3.4.1. Mecanismos de generación de la hipertrofia cardiaca**

La hipertrofia cardiaca presenta una señalización muy compleja que involucra a múltiples vías de señalización molecular y a diferentes sistemas del organismo, pero a continuación se mencionan los más importantes los más importantes.

El primero de ellos involucra a los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), los cuales son activados por angiotensina II y endotelina-I, estas se unen a un Receptor acoplado a proteína G del subtipo  $\alpha_q$ , el cual a su vez por medio de la proteína cinasa C (PKC) ocasiona una mayor liberación de iones de calcio del retículo sarcoplásmico, cuando hay una elevación sostenida de calcio en el sarcoplasma la calmodulina se transporta hacia la calcineurina, la cual se activa y se encarga de desfosforilar al factor de transcripción NFAT, el cual se transloca en el núcleo y comienza la transcripción de genes hipertróficos (Samak et al., 2016).

Otro mecanismo muy importante en la hipertrofia cardiaca es la inflamación, se ha propuesto que esta exacerba la condición de la enfermedad, siendo sellos distintivos de un corazón hipertrofiado la presencia de linfocitos T, fibrosis, interleucinas 6, 1RA, 1 $\beta$  y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Hasta el momento se ha encontrado que la IL-6 induce hipertrofia directamente.

Finalmente se destaca el papel de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la hipertrofia es muy importante, ya que pueden mediar la respuesta inducida por angiotensina II , también eliminan la hipertrofia inducida por el TNF-  $\alpha$  y contribuyen a la pérdida de masa

miocárdica tras remodelación miocárdica al inducir apoptosis de los cardiomiocitos (Samak et al., 2016) (Ver figura 10).

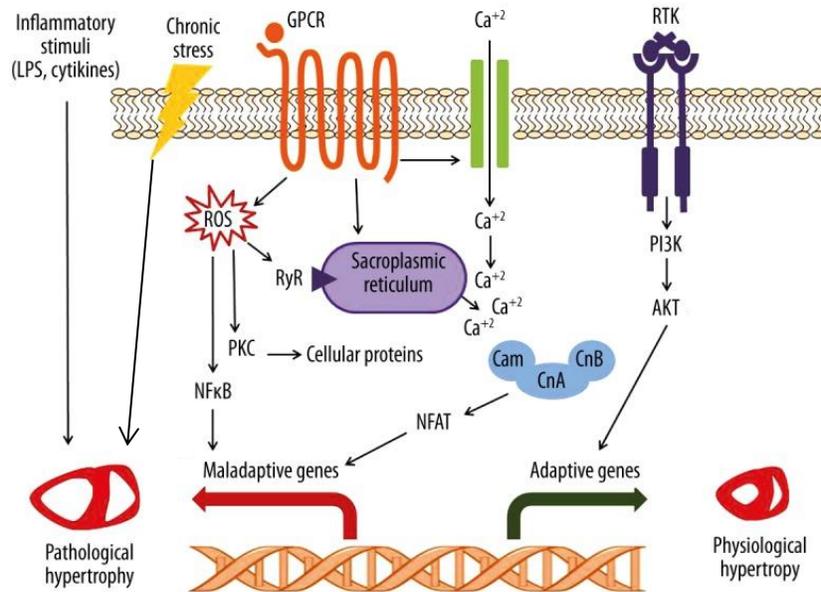


Figura 10. Vías de señalización intracelular que regulan la hipertrofia cardíaca. Recuperado de: (Samak et al., 2016).

GPCR: receptor acoplado a proteína G; RTK – receptor tirosina cinasa; ROS: especies reactivas de oxígeno; RyR: receptor de rianodina; PI3K: fosfoinositido-3 cinasa; NFkB: factor nuclear kappa B; PKC: proteína quinasa C; Cam: calmodulina; CnA: calcineurina A; CnB: calcineurina B; NFAT: factor nuclear de células T activadas; Akt: proteína quinasa B (PKB); LPS: lipopolisacárido.

### 3.3.4.2. Efecto de los estrógenos y la menopausia sobre la hipertrofia cardíaca

En estudios recientes se ha encontrado que los estrógenos aumentan la degradación de calcineurina, a través del receptor de estrógenos RE $\beta$ , donde al degradarla elimina la señalización posterior a través del factor de transcripción NFAT, de esta manera inhibiendo la hipertrofia (Knowlton & Lee, 2012), otro efecto que tienen los estrógenos es la reducción del estrés oxidativo, así como los niveles de endotelina-1, por lo que se sugiere que los estrógenos tienen efectos antihipertróficos principalmente por la vía de Calcio-calmodulina. Finalmente se ha demostrado en diversos estudios preclínicos, que la pérdida de estrógenos aumenta el progreso de la hipertrofia, bajo el modelo de sobrecarga de presión, mientras que, en estudios clínicos en mujeres, la administración de estrógenos contribuyó

a la reducción de masa del ventrículo izquierdo en mujeres posmenopáusicas (Wu et al., 2020), por lo que se sugiere que la menopausia acelera el proceso de hipertrofia, y la terapia con estrógenos sirve para que la hipertrofia se retrase o sea leve y no escale hasta la insuficiencia cardiaca.

### **3.3.5. Terapia de reemplazo hormonal**

La terapia de reemplazo hormonal se introdujo por vez primera en el año de 1940, desde entonces ha sufrido una serie de cambios sustanciales, perspectivas y su uso ha sido bien visto en algunas épocas y mal visto posteriormente por los resultados de diversos estudios hechos a lo largo del tiempo, siendo el más representativo de ellos, el estudio Women's Health Initiative (WHI) a principios del siglo XXI.

En 1940 se aprobó el uso de estrógenos equinos conjugados (EEC), y el uso de estrógenos después de la menopausia se popularizó en la década de los 60's, bajo el argumento "femeninas para siempre", posteriormente el uso de los estrógenos tuvo un aumento sustancial después de 1988 por la aprobación de la FDA para la prevención de la osteoporosis (Lobo, 2017), aunque en la década de 1970 diversos estudios propusieron un mayor riesgo de cáncer de endometrio por el uso de la terapia con EEC solos, aunque en décadas posteriores, se encontró que al administrar los estrógenos en combinación con algún progestágeno reducía este riesgo. Años más tarde, se llevó a cabo el primer estudio aleatorizado a gran escala el Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS), en el que se inscribieron 2736 mujeres posmenopáusicas, las cuales se trataron con una dosis de 0.625 mg de EEC en combinación con 2.5 mg de acetato de medroxiprogesterona en el grupo de terapia de reemplazo hormonal y placebos en el control. Después de 4 años de estudio, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Cagnacci & Venier, 2019).

Posterior a este estudio, en 1998 llegó el tan polémico WHI, patrocinado por el NIH de los Estados Unidos de América, en él se inscribieron a 16,608 mujeres con útero y 10,739 mujeres sin útero, el primer grupo se aleatorizó con una combinación igual a la del estudio HERS, con 0.625 mg de EEC en combinación con 2.5 mg de acetato de medroxiprogesterona y el segundo grupo, únicamente con la dosis de EEC de 0.625 mg, en 2002 se publicaron los primeros resultados de estudio, en el grupo con útero, y en dichos resultados los riesgos de la terapia eran mayores a los beneficios, por lo que estos datos ocasionaron pánico entre las pacientes que llevaban la terapia decidiendo en muchos casos suspenderla, aunque un error de estos resultados, es que no se tomó en cuenta la edad.

En años posteriores al estudio WHI se realizaron nuevos análisis y se realizaron nuevos estudios, donde se tomaba en cuenta la edad de las participantes, y es que en los resultados publicados en 2002, la mayoría de las participantes eran mayores de 60 años, por lo que los nuevos estudios y análisis se realizaban ahora en mujeres de entre 50 a 59 años.

En este grupo de mujeres la terapia resulto mucho más efectiva y segura, por ejemplo, la mortalidad disminuyo significativamente en un 30%, el riesgo por enfermedad cardiaca y muerte por esta misma disminuyo, además de tener efectos benéficos sobre el sistema cardiovascular y disminución de la osteoporosis, mientras que el deterioro cognitivo fue atribuido a la edad. Finalmente, en cuanto al riesgo de diferentes tipos de cáncer, se ha demostrado en múltiples estudios una disminución del riesgo de cáncer de colon del 20%, en caso del cáncer de mama, se ha observado que una terapia sola de estrógenos no ha aumentado el riesgo de este tipo de cáncer, mientras que en terapia combinada con medroxiprogesterona puede aumentar el riesgo, por lo que se recomienda el uso de estrógenos solos u otro tipo de progestágeno, como la progesterona natural, en cuestión del cáncer de útero, se ha asociado con la terapia de estrógenos solos, mientras que en combinación con progesterona se encontró una disminución estadística en este cáncer.

#### **3.3.5.1. Regímenes**

No se tiene una dosis efectiva precisa, y tampoco una vía de administración predilecta, aunque las más usadas son la oral y transdérmica, pero la dosis utilizada por diversos estudios, incluido el WHI eran 0.625 mg de CEE y 2.5 mg de progesterona, en estudios más recientes como el ELITE y KEEPS, donde se probó la hipótesis del tiempo, se utilizaron 0.45 mg de CEE oral, y parches de estradiol de 50 µg, en cuanto a la progesterona, se ha utilizado progesterona micronizada de 200 µg por 12 días al mes.(Paciuc, 2020).

### **3.4. Anatomía, Fisiología e Histología del corazón**

El corazón es el órgano encargado de bombear la sangre a través de las arterias a todo el organismo, por ello es conocido como la bomba del cuerpo humano, el corazón de un adulto es relativamente pequeño, de acuerdo con (Tortora & Derrickson, 2006), mide casi el mismo tamaño que un puño cerrado, midiendo alrededor de 12 cm de largo, 9 cm en su punto más ancho y 6 cm de espesor, con un peso promedio de unos 300 g.

Anatómicamente, el corazón se encuentra en la cavidad torácica, cerca de la línea media, en el área conocida como mediastino, el corazón se encuentra inclinado hacia la izquierda, de modo que dos tercios de él, se encuentra en el lado izquierdo del plano medio del cuerpo, en cuanto a su anatomía exterior, se destaca el ápice, el cual es el extremo inferior del corazón, la cual termina en punta y la cual se encuentra arriba del diafragma, en esta parte se encuentra el ventrículo izquierdo, también se destaca la base del corazón, en la cual se unen los grandes vasos sanguíneos que permiten la entrada y salida de la sangre del corazón, se encuentra en la parte superior del corazón (ver figura 11).

El corazón se encuentra rodeado por una capa externa, denominada pericardio, la cual es una membrana que consta de dos secciones, una parte externa, llamado saco pericárdico o pericardio fibroso, que está compuesto por tejido conectivo denso, el cual da rigidez y no permite que el corazón se estire excesivamente, el pericardio fibroso está anclado a los ligamentos de diafragma y al esternón, esta capa aísla al corazón de otros órganos torácicos (ver figura 11).

La sección interna del pericardio es conocida como pericardio seroso, el cual forma una doble capa, la externa, conocida como capa parietal externa que se fusiona con el pericardio fibroso y la interna conocida como la capa visceral interna, la cual también es conocida como epicardio y que se describirá más adelante. Entre ambas capas se tiene un espacio conocido como cavidad pericárdica, el cual contiene entre 5 a 30 mL de líquido pericárdico, exudado por la capa serosa del saco pericárdico (Saladin, 2013). Este líquido tiene la función de lubricar las membranas, para que cuando el corazón lata, la fricción entre las capas sea mínima.

### **3.4.1. Anatomía e histología macroscópica del corazón**

#### **3.4.1.1. Pared cardíaca**

La pared cardíaca del corazón consta de 3 capas, epicardio, miocardio y endocardio en orden de anterior a posterior. Comenzando por la capa más externa (epicardio), se conforma principalmente de dos “capas”, una externa, la cual es conocida como la capa visceral del pericardio seroso, formada por una sola capa de células mesoteliales, y debajo de esta única capa se tiene una cantidad variable de tejido fibroelástico y tejido adiposo, la cual se considera una segunda capa. La cantidad de tejido adiposo en esta capa varía entre individuos y entre diferentes lugares, por ejemplo, es más gruesa sobre la superficie de los ventrículos, además esta parte de la pared cardíaca contiene los vasos sanguíneos y los nervios que irrigan e inervan al miocardio, los cuales se encuentran rodeados por el tejido adiposo.

El miocardio es la capa intermedia del corazón y consta de músculo cardíaco, es la capa más gruesa y se considera que “representa hasta el 95% de la pared cardíaca” (Tortora & Derrickson, 2006), el grosor de esta capa es proporcional a la carga de trabajo de cada una de las cámaras, por lo que se espera que sea más grueso en los ventrículos que en las aurículas, el miocardio está formado por fibras musculares de células llamadas cardiomiocitos, estas fibras musculares están organizadas en haces que se dirigen en un sentido diagonal alrededor del corazón, y tienen la función de generar la acción de bombeo de la sangre. El músculo del miocardio es estriado como el músculo esquelético, pero es involuntario como el músculo liso.

Finalmente, la capa más interna del corazón es el endocardio está conformada por una fina capa de endotelio interna y tejido subendotelial, una capa media de tejido conjuntivo y células de músculo liso, y una capa profunda de tejido conjuntivo, la cual es el “límite” con el miocardio, encontrándose además ahí, las fibras del sistema de conducción del corazón. Este tejido forma una pared lisa y recubre las válvulas y las cámaras, su función es disminuir la fricción de la sangre cuando esta atraviesa el corazón (ver figura 11).

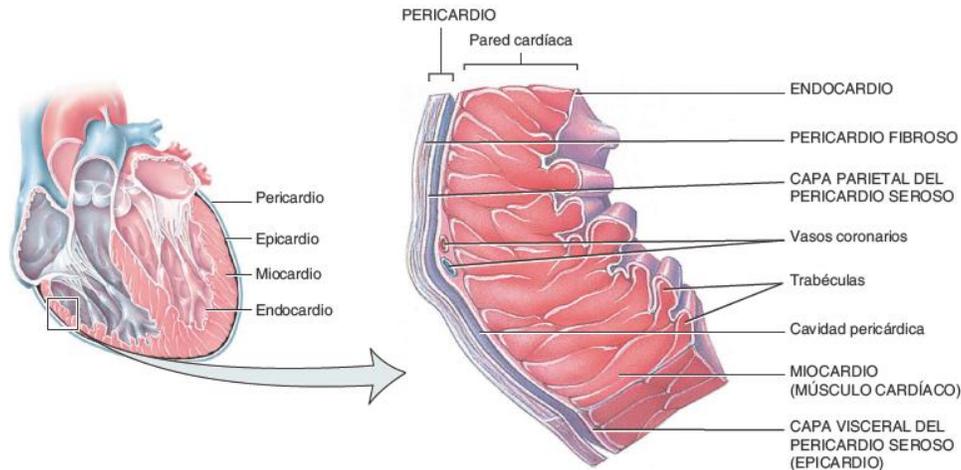


Figura 11 Capas del corazón. Recuperado de (Tortora & Derrickson, 2006) p.760

### 3.4.1.2. Esqueleto fibroso

Además del músculo que contiene la pared cardíaca, se tiene una estructura conformada de tejido conectivo denso, se describe como 4 anillos, los cuales rodean a las válvulas cardíacas, sirviendo de soporte para las mismas y también cuenta con dos trígonos fibrosos que conectan los anillos y una porción membranosa que pertenece a los tabiques interauricular e interventricular. Histológicamente, esta estructura, está formada por tejido conectivo denso, y en la porción membranosa del tabique interventricular consiste en un tejido conectivo denso que contiene un segmento corto del haz auriculoventricular del sistema de conducción cardíaca (Pawlina & Ross, 2020). El esqueleto fibroso actúa principalmente como un aislante eléctrico y contribuye a que todas las fibras cardíacas contraigan de forma sincronizada (ver figura 12).

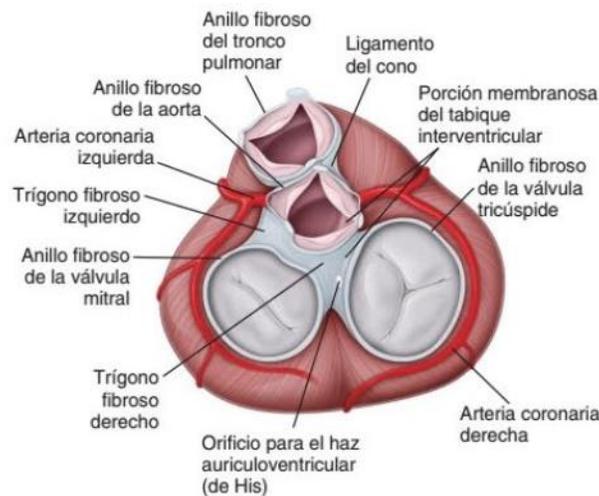


Figura 12 Esqueleto fibroso del corazón. Recuperado de (Pawlina & Ross, 2020) p. 434.

### **3.4.1.3. Cámaras cardíacas**

El corazón está conformado por 4 cámaras, 2 superiores conocidas como aurículas y 2 inferiores conocidas como ventrículos, las aurículas son las encargadas de recibir la sangre proveniente de la circulación mayor y la circulación menor y bombearla hacia los ventrículos por este motivo es que las aurículas tienen paredes delgadas. La aurícula derecha recibe la sangre proveniente de la circulación general, tiene una pared posterior lisa una pared anterior diferente, debido a la presencia de músculos pectíneos, los cuales se extienden a través de una estructura conocida como orejuela, esta estructura se encuentra en la cara anterior de cada aurícula y permite aumentar ligeramente el volumen que recibe cada aurícula, por su parte, la aurícula izquierda forma la mayor parte de la base del corazón y recibe la sangre proveniente de los pulmones, las paredes tanto anterior como posterior son lisas, y contiene músculos pectíneos, los cuales únicamente se encuentran en la orejuela. Ambas cámaras se encuentran separadas entre sí por una pared, conocida como tabique interauricular.

Los ventrículos por su parte son los encargados de bombear la sangre que pasa a través de las aurículas hacia los pulmones en el caso del ventrículo derecho y hacia la circulación general en el caso del ventrículo izquierdo, por tanto, presentan diferencias entre el grosor de sus paredes, siendo más gruesa la pared del ventrículo izquierdo que la del derecho, de acuerdo con (Gersh et al., 2011), se considera normal el grosor de la pared del ventrículo izquierdo hasta de 12 mm, mientras que del ventrículo derecho el grosor se estima en 4 o 5 mm, en el interior del ventrículo derecho están las trabéculas carnosas, los cuales son haces de fibras musculares que se observan en forma de relieves, estos forman parte del sistema de conducción del corazón, y los músculos papilares, los cuales están conectados a las cuerdas tendinosas, que a su vez se encargan de controlar la abertura o cierre de la válvula tricúspide. El ventrículo izquierdo, al igual que el derecho contiene las trabéculas carnosas y dos músculos papilares, los cuales están conectados a la válvula bicúspide, y este por su parte forma el vértice del corazón. Ambos ventrículos, se encuentran separados por el septum o tabique interventricular (ver figura 13).

### **3.4.1.4. Válvulas cardíacas**

El corazón tiene 4 válvulas, las cuales son estructuras que se encargan de controlar el flujo de sangre, éstas se abren o cierran en respuesta a cambios de presión, los cuales suceden cada que hay una contracción o relajación en el corazón. Las válvulas que controlan el flujo de sangre que pasa de la aurícula al ventrículo son conocidas como válvulas

auriculoventriculares, la ubicada entre la aurícula y el ventrículo derecho es conocida como tricúspide, debido a que contiene 3 valvas (similares en forma a una hoja y actúan como compuertas), y la ubicada entre la aurícula y ventrículo izquierdo es conocida como bicúspide o mitral, esta contiene 2 valvas. Por su parte, las válvulas ubicadas entre los ventrículos y las arterias y que controlan el flujo sanguíneo en esta porción son conocidas como válvulas semilunares, debido a que están conformadas por 3 valvas con una forma de semiluna. La ubicada entre el ventrículo derecho y la arteria pulmonar, es conocida como válvula pulmonar, y la ubicada entre el ventrículo izquierdo y la aorta es conocida como válvula aortica.

Para que las válvulas auriculoventriculares puedan funcionar correctamente, tienen unidas a ellas unas estructuras conocidas como cuerdas tendinosas, las cuales se unen a las valvas, y estas a su vez, conectan con los músculos papilares ubicados en los ventrículos, esta forma en la que se estructuran las válvulas es porque, cuando los ventrículos están relajados, también se encuentran relajados los músculos papilares ocasionando que las cuerdas tendinosas estén flojas, esto aunado a que la presión del ventrículo relajado es mucho menor que la de la aurícula, permite el flujo libre de la sangre desde la aurícula, introduciéndose las valvas hacia el interior del ventrículo. Pero cuando ocurre la contracción de los ventrículos, la sangre en el interior del ventrículo ejerce una presión suficiente para que las valvas se junten y cierren el orificio. Al mismo tiempo los músculos papilares se contraen, estirando las cuerdas tendinosas. Esto evita que las cúspides valvulares (valvas) se reviertan y se abran a la cavidad auricular por acción de la elevada presión ventricular (Tortora & Derrickson, 2006).

Por su parte, las válvulas semilunares, no cuentan con la misma estructura que las auriculoventriculares, por lo que no cuentan con cuerdas tendinosas, ni músculos papilares, estas válvulas se abren cuando la presión del ventrículo en la contracción supera a la tensión arterial, lo que las “forza” a abrirse y permite la eyección de la sangre del corazón, cuando los ventrículos se relajan las valvas regresan a su posición anterior a la contracción ocluyendo así la comunicación entre los ventrículos y las arterias.

Histológicamente, las válvulas cardiacas están compuestas por 3 capas, la fibrosa, la esponjosa y la ventricular (en las válvulas semilunares) o auricular (en las auriculoventriculares). La capa fibrosa se encuentra en la superficie del ventrículo en la válvulas auriculoventriculares y en la superficie de la arteria en las semilunares, esta capa contiene fibras de colágeno, las cuales son en su mayoría del tipo fibrilar, esto le proporciona una alta resistencia y rigidez a la válvula, cabe mencionar, que esta capa se

extiende hasta unas prolongaciones conocidas como cuerdas tendinosas, que unen la valva con los músculos papilares. La capa esponjosa se encuentra a la mitad de la fibrosa y la ventricular/auricular, está compuesta principalmente de proteoglicanos que le proporcionan compresibilidad a las valvas (O'Donnell & Yutzey, 2020), y además de glucosaminoglicanos, que de acuerdo con (Pawlina & Ross, 2020), conforman la llamada sustancia fundamental, junto a unas fibras elásticas y de colágeno (en minoría), le proporcionan flexibilidad, y esta capa funciona como un amortiguador. Finalmente, la capa ventricular/auricular, se encuentra formada por elastina (O'Donnell & Yutzey, 2020), y fibras de colágeno, lo cual favorece el movimiento de las valvas.

Las válvulas cardíacas, también están compuestas por una parte celular intercalada con las 3 capas anteriormente mencionadas, forman parte de esta 2 tipos de células, una capa de células endoteliales, las cuales revisten a las valvas, y las células intersticiales de la válvula, las cuales son en la microscopía semejantes a los fibroblastos, y se encargan de mantener la homeostasis valvular a lo largo de la vida (Pawlina & Ross, 2020) (Ver figura 13).

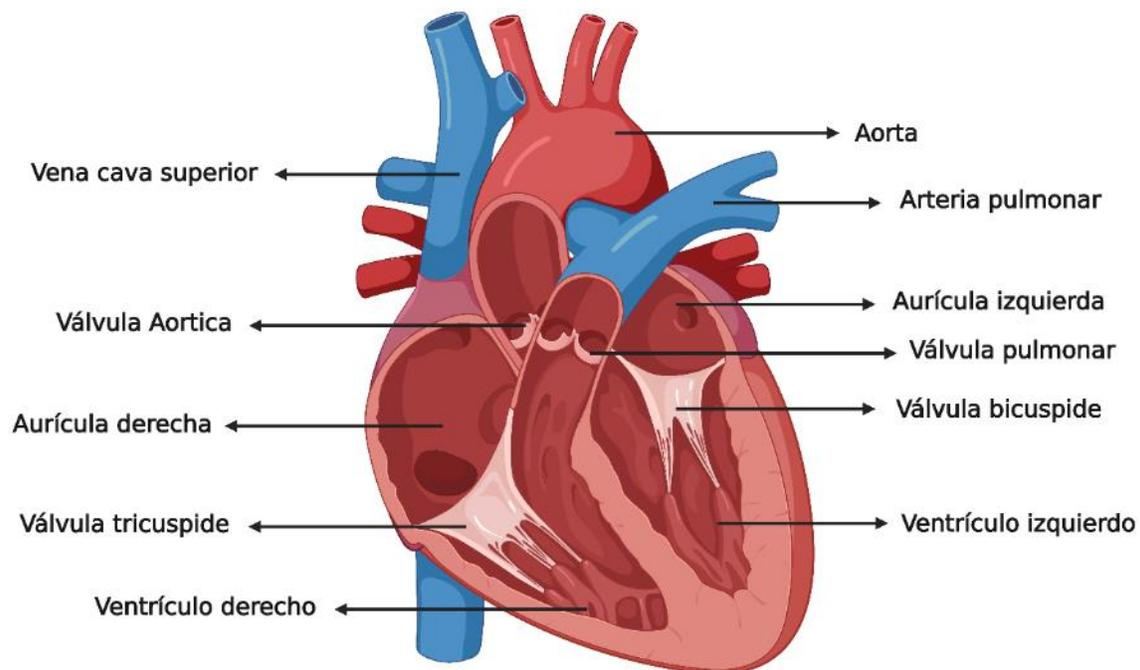


Figura 13. Cámaras y Válvulas del corazón. Basado en (Tortora & Derrickson, 2006) p.763.

#### **3.4.1.5. Vasos sanguíneos del corazón**

Dada la alta carga de trabajo a la cual está sometido el corazón, sus células y demás componentes, requieren de un suministro rápido y abundante de nutrientes y oxígeno, por ello es por lo que no se puede depender de la difusión de la sangre desde las cámaras

cardiacas, ya que este sería un proceso muy tardado y no suministraría a todas las células por igual. Por ello, es que el corazón tiene una red de arterias, venas y capilares que se encargan de esta función. De acuerdo con (Saladin, 2013), menciona que en descanso los vasos sanguíneos coronarios irrigan al miocardio casi 250 mL de sangre por minuto. Constituyendo casi el 5% de la sangre circulante, la circulación del corazón recibe el nombre de circulación coronaria, y a continuación, se revisará la anatomía de este sistema.

#### **3.4.1.5.1. Arterias y capilares**

Las arterias que irrigan al corazón nacen desde la aorta ascendente y se dividen en dos grandes arterias, La arteria coronaria izquierda y derecha.

La arteria coronaria izquierda viaja por el surco coronario, debajo de la aurícula izquierda y se divide en dos ramas, la rama interventricular anterior y la rama circunfleja. La rama interventricular anterior viaja desde la parte superior del corazón, hasta el ápice, distribuyendo sangre a los ventrículos izquierdo y derecho, esta arteria además rodea el corazón y se dirige hacia la parte posterior, donde se une con la arteria coronaria derecha, en su rama interventricular posterior. La rama circunfleja recorre el surco coronario hasta la parte posterior del corazón, se encarga de suministrar sangre al ventrículo izquierdo y a la aurícula izquierda (Tortora & Derrickson, 2006) (ver figura 14).

Por su parte, la arteria coronaria derecha viaja por el surco coronario, del lado derecho, irrigando la aurícula derecha y el nódulo sinoauricular, por debajo de la orejuela derecha, se divide en 2 ramas, la rama marginal derecha y la interventricular posterior. La rama marginal derecha se dirige hasta el ápice del corazón y transporta la sangre al ventrículo derecho. Por su parte la rama interventricular posterior fluye por la parte posterior del tabique interventricular suministrando sangre a ambos ventrículos (ver figura 14).

Mas a profundidad de lo que llegan las grandes arterias se encuentra la red de arteriolas y capilares del corazón, la cual es extremadamente densa. De acuerdo con (Goodwill et al., 2017) se menciona que la red de capilares tiene una densidad de entre 3000 – 4000 capilares/ mm<sup>2</sup>, en la que las distancias entre capilares son inferiores a los 20 µm, comparándolos con otras estructuras altamente irrigadas como los músculos esqueléticos que muestran densidades de aproximadamente 600 capilares/mm<sup>2</sup>.

#### **3.4.1.5.2. Venas**

Una vez que la sangre ha pasado por el sistema arterial coronario, esta es devuelta a través de un sistema de venas, se destaca que cerca de un 10% de la sangre retorna directamente

al ventrículo derecho, a través de las conocidas como venas de Tebesio (Goodwill et al., 2017), el resto de la sangre pasa por las venas que a continuación se describen.

La vena cardiaca mayor o magna, recorre desde el ápice hasta el seno coronario, ubicado en el surco coronario de la cara posterior del corazón, transporta la sangre de ambos ventrículos y la aurícula izquierda. La vena interventricular posterior o media se ubica en la parte posterior del tabique interventricular, parte desde el ápice y llega hasta el seno coronario y drena la sangre de los ventrículos izquierdo y derecho. La vena marginal izquierda, la cual recorre desde la parte izquierda del ápice y se drena en el seno coronario. Una vez que estas venas se drenan en el seno coronario, este vacía toda la sangre recibida en la aurícula derecha. (Goodwill et al., 2017) menciona que el 55% de la sangre arteria coronaria se devuelve al seno coronario por estas venas. El 35% restante regresa directamente a la aurícula derecha por medio de las venas cardiacas anteriores, las cuales drenan el ventrículo derecho y desembocan en la aurícula derecha (ver figura 14).

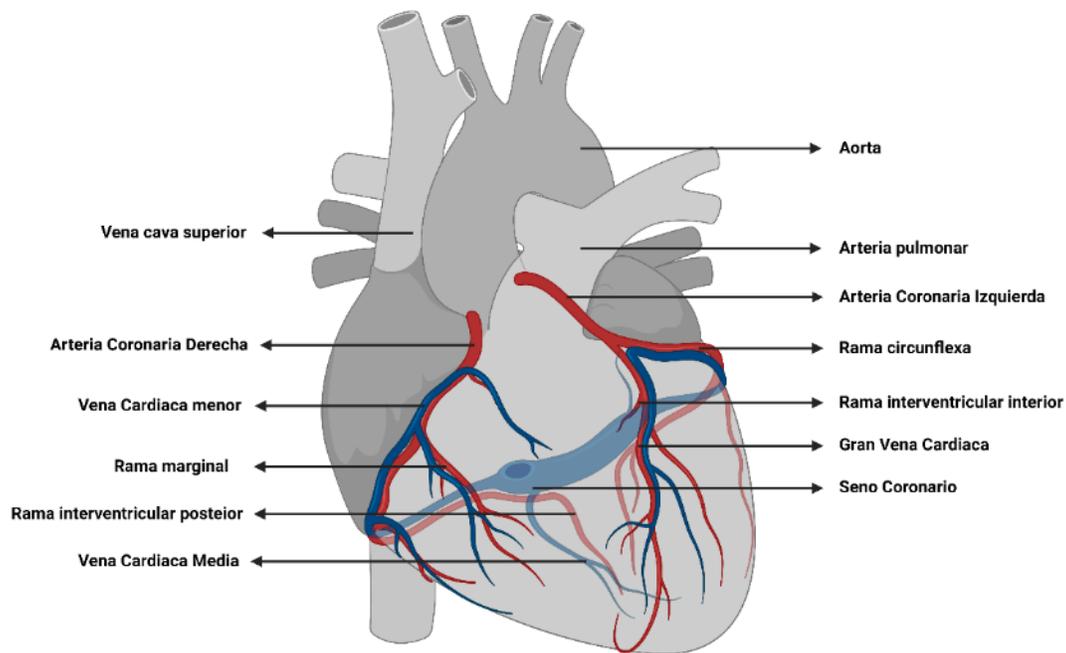


Figura 14. Principales Venas y Arterias de la circulación coronaria. Basada en (Tortora & Derrickson, 2006) p.770.

Un aspecto importante de la anatomía de la circulación coronaria es que presenta lo que se conoce como la circulación colateral, la cual está compuesto por vías alternas por las cuales la sangre pueda circular en caso de que algunas de las vías principales, se encuentren bloqueadas, estas vías alternas están dadas por la unión de dos arterias, por ejemplo la rama ventricular anterior de la arteria coronaria izquierda y la rama interventricular posterior,

de la arteria coronaria derecha, las cuales se unen y esta unión es conocida como anastomosis arterial (Saladin, 2013), y merece ser resaltado ya que puede proporcionar al corazón una protección ante un infarto al miocardio.

### **3.4.2. Anatomía e histología microscópica del corazón**

#### **3.4.2.1. Cardiomiocitos**

El músculo cardíaco del cual está compuesto la mayor parte de las paredes de corazón, está compuesto por fibras musculares, estas fibras son distintas a las del músculo esquelético, y se conocen como cardiomiocitos o miocitos cardíacos, a continuación, se describirán sus diferencias.

Los cardiomiocitos son células que aproximadamente miden unos 50 a 100  $\mu\text{m}$  de largo, y unos 10 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro, presentan la misma disposición de las estructuras que componen el sarcómero de las células del músculo esquelético (Figura 13). Las diferencias comienzan cuando se compara el tamaño de las mitocondrias, ya que los cardiomiocitos presentan mitocondrias mucho más grandes, de acuerdo con (Tortora & Derrickson, 2006) en una fibra muscular cardíaca ocupan cerca del 25% del sarcoplasma, mientras que en una fibra muscular esquelética solo conforman el 2% del sarcoplasma; los cardiomiocitos tienen un retículo sarcoplásmico más pequeño, pero lo que hace diferentes a las fibras del músculo esquelético son unas estructuras conocidas como discos intercalares. Estas estructuras son el sitio de unión entre los miocitos cardíacos, formando fibras largas de varios miocitos que abarquen toda una cámara cardíaca. Estos discos intercalares están formados por 3 estructuras características que los diferencian del músculo esquelético según (Pawlina & Ross, 2020).

- Fascia adherente (Unión adherente): Es el ancla principal de las miofibrillas, sirve de soporte estructural a las células del músculo cardíaco, en ella, los filamentos de actina se fijan al sarcolema, de esta manera permite la unión entre ambos miocitos, la Fascia adherente está formada de una sustancia llamada N-Cadherina, la cual es una glicoproteína transmembranal que media en la adhesión célula-célula dependiente de calcio y forma homodímeros con otras N-Cadherina de células adyacentes en el espacio extracelular, actuando como el cierre de un pantalón, además también contribuyen otras moléculas como las cateninas que ayudan a unir la N-Cadherina al filamento de actina (Zhao et al., 2019).
- Máculas adherentes (desmosomas): son estructuras encargadas de unir a los miocitos entre sí, evitan que se separen, producto de la tensión originada por las

fuerzas de contracción, en su núcleo, está compuesta por dos moléculas conocidas como desmogleína y desmocolina, las cuales se unen al citoesqueleto de los miocitos cardiacos, a través de proteínas adaptadoras.

- Uniones comunicantes (Uniones gap): Se encuentran sobre las superficies laterales de los discos intercalares, son aglomeraciones de múltiples canales, ayudan al intercambio de iones, agua, microARN y algunos metabolitos, lo que garantiza una comunicación eléctrica entre las células, y permiten que los cardiomiocitos, se comporten de forma sincronizada (Saladin, 2013).

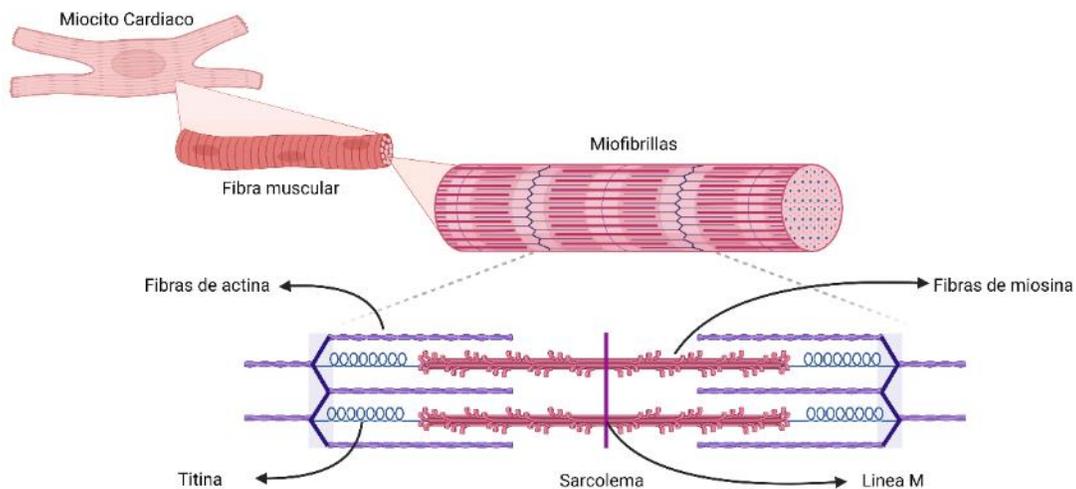


Figura 15. Composición del sarcómero de los miocitos cardiacos. Basado de (Pawlina & Ross, 2020) p. 339.

### 3.4.2.2. Sistema de conducción

En el músculo cardíaco, además de los cardiomiocitos regulares, existen un tipo de células cardiacas especializadas, las cuales se encargan de que el corazón lata de una manera propia y espontánea. Este tipo de células son conocidas como células marcapasos, o fibras autónomas, y forman parte de lo que se conoce como el sistema de conducción cardíaco, el cual se mencionará más adelante. Sólo el 1% de las fibras musculares cardiacas se diferencian en fibras automáticas, durante el desarrollo embrionario, La principal característica que las diferencia del resto de los cardiomiocitos es que son autoexcitables e inician su potencial de acción aproximadamente cada 0.6 segundos. Anatómicamente, estas células se cuentan distribuidas en grupos de células, que son conocidos como nódulos, siendo el que inicia los latidos el nódulo sinoauricular ubicado en la aurícula derecha, el resto se describirán más adelante (Tortora & Derrickson, 2006).

Además, existe otro tipo de células especializadas, las cuales se conocen como células cardíacas de conducción, estas componen el resto del sistema de conducción, son células más grandes que los miocitos cardíacos ventriculares y sus miofibrillas se encuentran distribuidas en la periferia de la célula, estas tienen como función principal el proporcionar una vía para que los impulsos eléctricos lleguen a todas las cámaras. (Pawlina & Ross, 2020)

Como se mencionó anteriormente, las células marcapasos o fibras automáticas y las células cardíacas de conducción, forman parte del sistema de conducción, este sistema se compone de las siguientes estructuras:

- Nódulo Sinoauricular: ubicado en la unión de la vena cava superior y la aurícula derecha, se encarga de generar el ritmo del latido cardíaco (Kennedy et al., 2016).
- Nódulo Auriculoventricular: está ubicado en el tabique interauricular, cerca de la válvula auriculoventricular, estos nódulos están compuestos de células marcapasos.
- Haz de His: es una ruta mediante la cual los impulsos eléctricos viajan, para llegar al resto del organismo, se encuentra en el tabique interventricular o septum y se separa en las ramas izquierda y derecha del haz de His, las cuales descienden hasta el ápice y se desvían hacia las paredes de los ventrículos izquierdo y derecho.
- Fibras de Purkinje: Son extensiones del haz de His, como si fueran ramas surgiendo de un tronco (haz de His) (Saladin, 2013), de esta manera logran que el estímulo eléctrico llegue a todo el miocardio. Tanto haz de His y las fibras de Purkinje, están compuestas de células cardíacas de conducción.

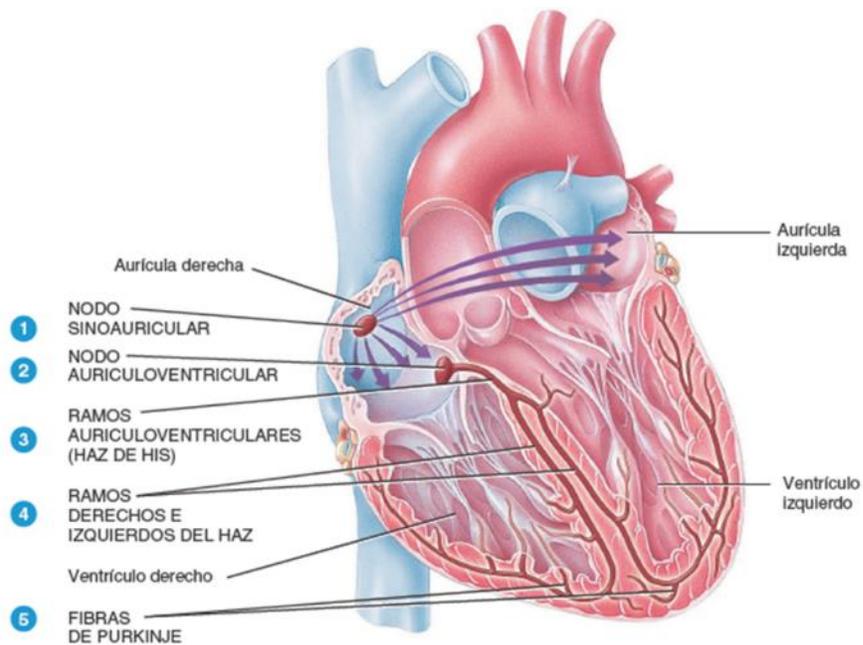


Figura 16. Sistema de conducción del corazón. Recuperado de (Tortora & Derrickson, 2006) p.774

### 3.4.3. Fisiología del corazón

Como se mencionó anteriormente el corazón funciona como una bomba que distribuye la sangre a todos los rincones del organismo, dada la composición del corazón, la cual es principalmente músculo, estos se contraen y relajan periódicamente y producen lo que se conoce como un latido, de esta manera es que el corazón logra bombear la sangre a todo el organismo, A continuación, se describirá brevemente como ocurre este proceso.

#### 3.4.3.1. Potencial de acción

Para poder comprender como se contrae y relaja el músculo cardiaco se tiene que conocer el potencial de acción de las células cardiacas, cabe mencionar, que las células cardiacas no tienen un solo potencial de acción, si no que el de las células marcapasos es distinto al de los miocitos normales y a continuación se describen ambos potenciales de acción.

En un miocito cardiaco normal, el potencial de acción tiene 5 fases, como se muestra en la figura 15-a. Se parte de un estado de reposo, que es de aproximadamente  $-90\text{mV}$ , iniciando este proceso cuando el miocito es estimulado por la corriente eléctrica de un miocito adyacente, en la primera fase (fase 0), comienza la despolarización, se abren los canales de  $\text{Na}^+$  rápidos aumentando velozmente el potencial, hasta  $+20\text{mV}$ , en la fase 1 se cierran rápidamente los canales de sodio y se abren los canales de calcio, esto ocasiona una ligera caída hasta un valor de  $+10\text{mV}$ , en la fase 2 se mantiene el potencial de acción formando

la meseta, debido a que se además de los canales de calcio que permiten su ingreso desde el intersticio, también se libera el calcio del retículo sarcoplasmático, esta acción puede prolongar la meseta hasta 200 ms, ocurriendo aquí, la contracción, en la fase 3 los canales de calcio se cierran, y se abren los canales de potasio, repolarizando la célula y regresando a su estado de reposo, esta es conocida como la fase 4 (Kennedy et al., 2016).

En cuanto a las células marcapasos, tienen un potencial de acción diferente al de los miocitos cardiacos normales, como se observa en la figura 15-b. Este tipo de células carece de un potencial de acción estable, al terminar la repolarización llega hasta un valor de -60 mV e inicia una polarización dada por el flujo lento de iones de sodio hasta llegar a un umbral de -40 mV, conocido como potencial de marcapasos, cuando se alcanza el umbral, los canales de calcio dependientes del voltaje se abren y ocurre una despolarización, llegando un poco por encima de los 0 mV (Saladin, 2013), una vez alcanza su máximo, se abren los canales de potasio, y comienza la repolarización, se cierran los canales de potasio e inicia de nuevo el proceso.

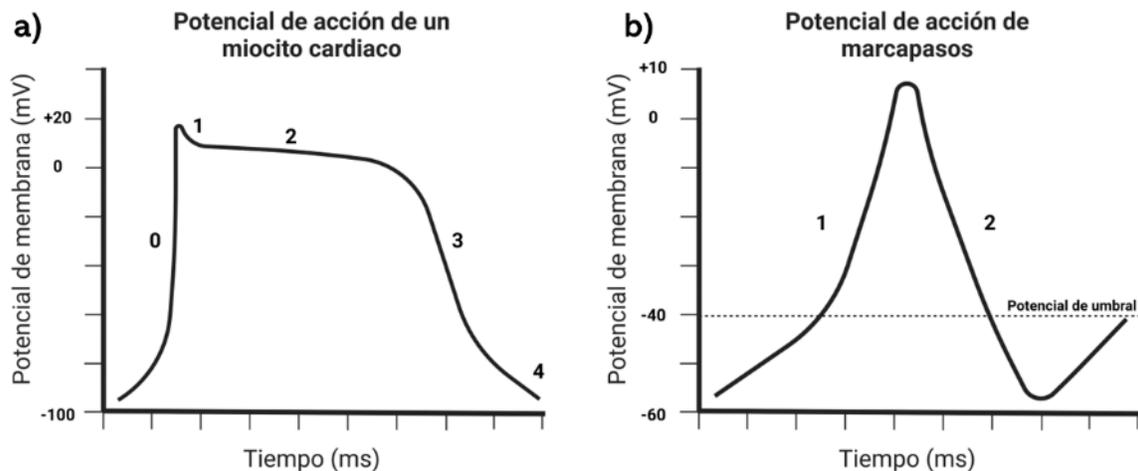


Figura 17. Potencial de acción de miocitos cardiacos normales y células marcapasos. Basado de (Saladin, 2013) p. 729 y 730. Creado con BioRender

### 3.4.3.2. Sistema de conducción

El sistema de conducción del corazón es una serie de estructuras que permiten que un impulso eléctrico pueda viajar de forma efectiva a través del miocardio y de esta manera la contracción del corazón sea oportuna y regular. A continuación, se describe el recorrido de un impulso eléctrico:

Primero, este comienza generándose por las células marcapasos en el nódulo sinoauricular, este impulso eléctrico recorre libremente la aurícula, lo que causa la

contracción de las aurículas derecha e izquierda. Posteriormente el impulso llega al nodo auriculoventricular. Aquí cabe resaltar la importancia del esqueleto fibroso, ya que marca una especie de “frontera”, y dado que actúa como un aislante eléctrico, no permite que los cardiomiocitos de los ventrículos continúen con este estímulo. Una vez en el nódulo auriculoventricular, el impulso se dirige hacia el haz de His, atravesando toda la longitud de esta estructura y hasta llegar hasta las fibras de Purkinje, que sigue conduciendo el impulso. De acuerdo con (Kennedy et al., 2016), el nódulo auriculoventricular, retrasa el impulso eléctrico en 120 ms, y este retraso es vital, ya que da tiempo para que las aurículas se llenen y posteriormente bombeen la sangre hacia los ventrículos, antes que estos se contraigan y expulsen la sangre de su cavidad.

#### **3.4.3.3. Ciclo cardiaco**

El ciclo cardiaco es la descripción de los fenómenos que ocurren cuando el corazón late, una vez que ya se comprende como ocurre la contracción a nivel celular, como se generan y distribuyen los impulsos cardiacos, se puede entender como ocurre la contracción y relajación a nivel del órgano completo. El ciclo cardiaco está dividido por dos sucesos principales, la contracción (Sístole) y la relajación (Diástole), además estas se subdividen en sístole ventricular y auricular y diástole ventricular y auricular, de esta manera es que se explicara el ciclo cardiaco.

Dado que este es un ciclo, es indistinto el orden de donde se comience la explicación, pero la secuencia de pasos no se debe alterar, en esta explicación se comenzará desde la sístole ventricular.

Al inicio de la sístole ventricular, el ventrículo ya se encuentra lleno de sangre, producto de la sístole auricular previa, entonces comienza la despolarización ventricular, aumenta la presión del ventrículo por encima de la auricular, entonces la sangre es empujada hacia la aurícula y esto ocasiona que las válvulas auriculoventriculares se cierren, en este momento, tanto estas válvulas, como las semilunares se encuentran cerradas, y al mismo tiempo comienza la contracción, aunque sin cambio de volumen, lo que se conoce como isovolumétrica, una vez que la presión supera a la arterial, que en el caso de la aorta es de 80 mmHg y la pulmonar es de 20 mmHg se abren las válvulas semilunares y comienza la eyección ventricular. Este evento ocurre mientras que en los miocitos el potencial de acción se encuentra en la fase de la meseta, y la presión de los ventrículos llega hasta 120 mmHg en el izquierdo, y 25 en el derecho. Una vez que comienza la repolarización de los miocitos ventriculares, la presión disminuye, y de acuerdo con (Tortora & Derrickson, 2006), la

válvula aortica se cierra cuando la presión de los ventrículos cae por debajo de los 100 mmHg, antes de cerrarse, al disminuir la presión, la sangre intenta regresar al ventrículo y esto ocasiona el cierre de las válvulas semilunares, es aquí donde también ocurre la irrigación de las arterias coronarias (Ver figura 18).

Una vez que ha terminado la sístole ventricular, comienza la diástole ventricular, cuando las válvulas semilunares se cierran, hay un periodo de tiempo muy corto, donde también las auriculoventriculares están cerradas, entonces comienza a disminuir la presión de los ventrículos en un fenómeno que se conoce como relajación isovolumétrica. Cuando la presión de los ventrículos disminuye por debajo de la presión de las aurículas, se abren las válvulas auriculoventriculares, y comienza la fase de llenado rápido de los ventrículos, al final de este periodo de relajación del corazón que dura aproximadamente 400 ms, ocurre un nuevo impulso eléctrico en el nódulo sinoauricular, el cual causa la despolarización de las aurículas, y la posterior contracción de las mismas, y este evento causa que los ventrículos se llenen de sangre de nueva cuenta y estén listos para la sístole ventricular, mientras que las aurículas se encuentran en estado de relajación hasta un nuevo impulso (ver figura 18).

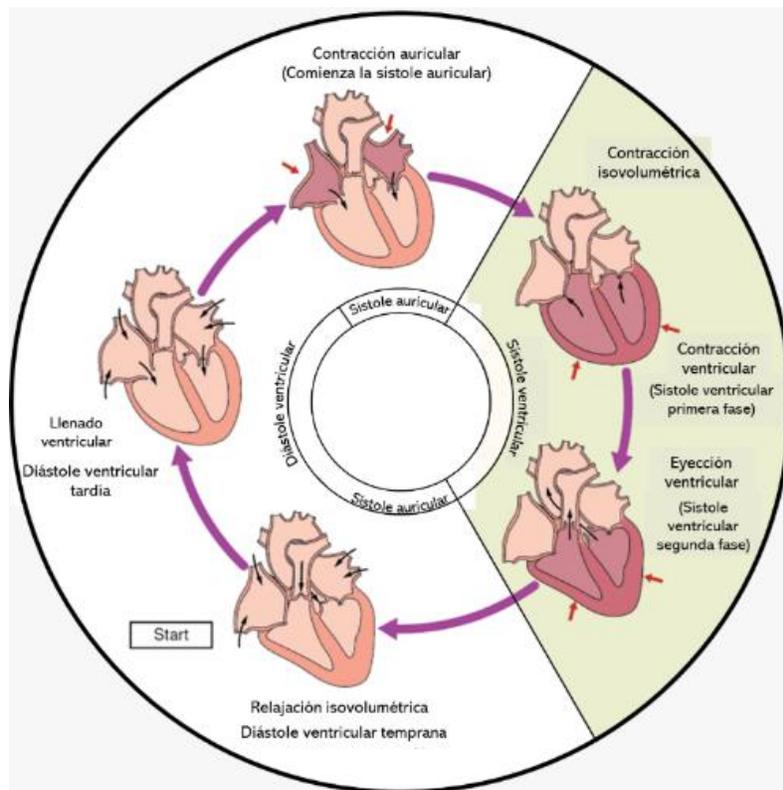


Figura 18. Fases del ciclo cardíaco. traducida de: <https://app.lecturio.com/#!/article/3694>.

## **3.5. Técnicas Histológicas para el Análisis del Tejido Cardíaco**

### **3.5.1. Tinción de hematoxilina-eosina**

#### **3.5.1.1. Fundamento**

Esta tinción hace uso de 2 colorantes, la hematoxilina y la eosina. La hematoxilina es obtenida mediante una extracción del árbol *Haematoxylon campechianum*, la sustancia que se obtiene de esta extracción debe ser oxidada ya sea por métodos naturales (exposición al ambiente) o por métodos químicos, como son el tratamiento con yodato de sodio, óxido de mercurio o permanganato de potasio (Carson & Hladik, 2009). El producto de esta reacción de oxidación es la hemateína, que es una molécula cargada negativamente y tiene una pequeña afinidad por el núcleo celular, así que para que la hemateína aumente su afinidad por el núcleo se utiliza un mordiente (metal), el cual suele ser de carga positiva, siendo el más común el Aluminio.

Clásicamente se ha sugerido que el complejo entre el Aluminio y la hemateína es un catión y forma enlaces con 2 grupos fosfato del ADN, pero de acuerdo con (Meloan & Puchtler, 1987), el complejo entre el metal y la hemateína tiene carga negativa, y además dadas las distancias entre cada grupo fosfato, considera muy complicado la formación del complejo entre dos grupos fosfato, el metal y la hemateína, aunque no se descarta la unión de estas sustancias al ADN, por lo que el mecanismo de unión al núcleo por parte de la hemateína y el aluminio es muy complicado y no ha sido comprendido en su totalidad (ver figura 19).

En cuanto a la coloración, en un principio el núcleo se puede observar de una tonalidad rojiza en medio ácido, pero cuando la muestra es enjuagada con una solución débilmente básica o neutra, la cual puede ser agua de la llave, esta adquiere una coloración azul.

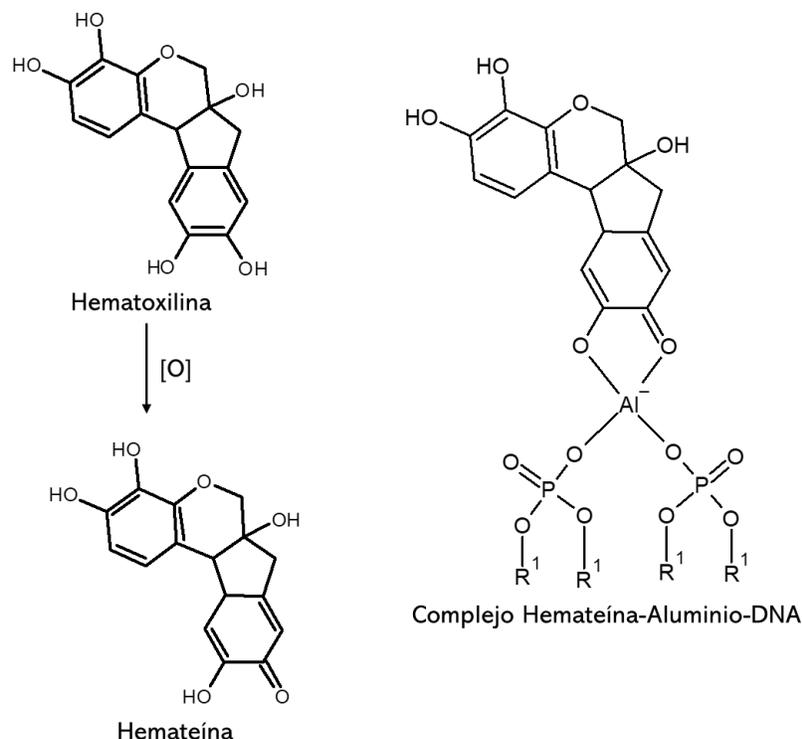


Figura 19. Estructura química de la hematoxilina y su reacción de oxidación, así como la propuesta de mecanismo de unión al DNA. Basada en (PUCHTLER & ISLER, 1958) p.269.

Por otro lado, la eosina es un colorante ácido perteneciente al grupo de los xantenos utilizada como una contratinción, la forma isomérica más utilizada de la eosina para teñir tejidos biológicos es la eosina Y (Derayea & Nagy, 2018). La eosina es una molécula poliprotica, que cuenta con 3 formas que presentan diferentes cargas ( $HE_2$ ,  $HE^-$  y  $E^{2-}$ ) y 2 valores de pKa, que de acuerdo con (Batistela et al., 2011) son de 2.02 y 3.80 (ver figura 20), por lo que la molécula de eosina se encuentra totalmente cargada a un pH superior a 6.0 y es donde presenta su máxima acción como colorante, debido a que el grupo cromóforo de la eosina se encuentra en la parte aniónica de la molécula.

Debido a que el punto isoeléctrico de la mayoría de los aminoácidos que componen las proteínas se encuentra en un pH cercano a 6 (salvo los aminoácidos básicos), al pH de 6 casi todos los aminoácidos se encontrarían en su punto isoeléctrico, por lo que la eosina no podría ser utilizada como colorante para tejidos biológicos, mientras que a valores de pH menores de 4.0, la cantidad de moléculas de eosina que está cargada completamente ( $E^{2-}$ ) disminuye considerablemente, por lo que se encuentra en su forma ácida y en caso de valores de pH muy bajos, se encuentra en su forma diádica y por lo que su capacidad como colorante será pobre o muy pobre y además puede que se una de forma inespecífica a moléculas diferentes por medio de puentes de hidrogeno. Por lo que se recomienda usar la

eosina a un pH entre 4.6 y 5.0 (Carson & Hladik, 2009), para que la eosina se encuentre en un mayor % cargada negativamente, pero también una gran parte de los aminoácidos se encuentren cargados positivamente y de esta manera se pueda unir la eosina y colorearlos.

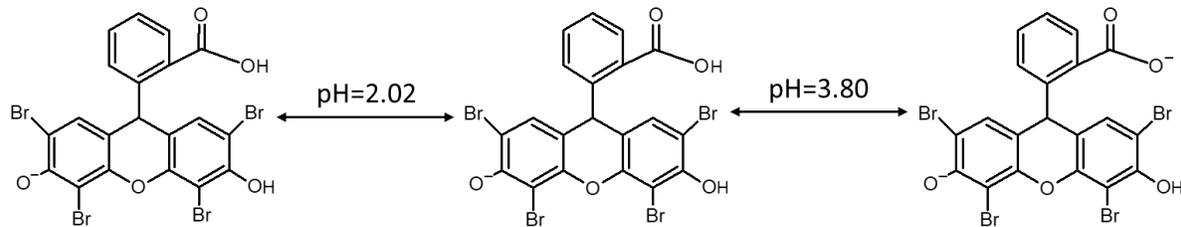


Figura 20. Estructuras químicas de la Eosina Y a diferentes valores de pH. Basado de (Carson & Hladik, 2009) p.113.

### 3.5.1.2. Utilidad

Dado que las células y las matrices extracelulares no poseen color propio, no se puede realizar su observación al microscopio óptico de forma directa, para ello se requiere de algún colorante, en este sentido la tinción de hematoxilina y eosina es ampliamente utilizada en la histología, la hematoxilina es utilizada para teñir los núcleos de las células. Como se mencionó antes, para potenciar la acción de la tinción la hemateína se acompleja con un metal como puede ser aluminio o hierro, en un medio ácido la coloración es roja, mientras que en un medio básico o neutro la coloración es azul, esto se logra mediante los lavados con agua de la llave, ya que esta puede contener minerales que pueden hacerla lo suficientemente alcalina para que se lleve el cambio de coloración de rojo a azul (Sampias & Rolls, 2022). Por otro lado, la eosina sirve para teñir el citoplasma celular, los eritrocitos y la matriz extracelular, la coloración obtenida es rosada, y dependiendo del pH o sustancias que se agregue, la tonalidad de rosado puede variar o también depender del tejido o parte de la célula que se observe, incluso se puede llegar a una tonalidad rojiza. Los eritrocitos por lo general tienen una tonalidad más fuerte de rosado e incluso puede llegar a rojo, mientras que la matriz extracelular o el músculo tienen una intensidad menor del tono rosado.

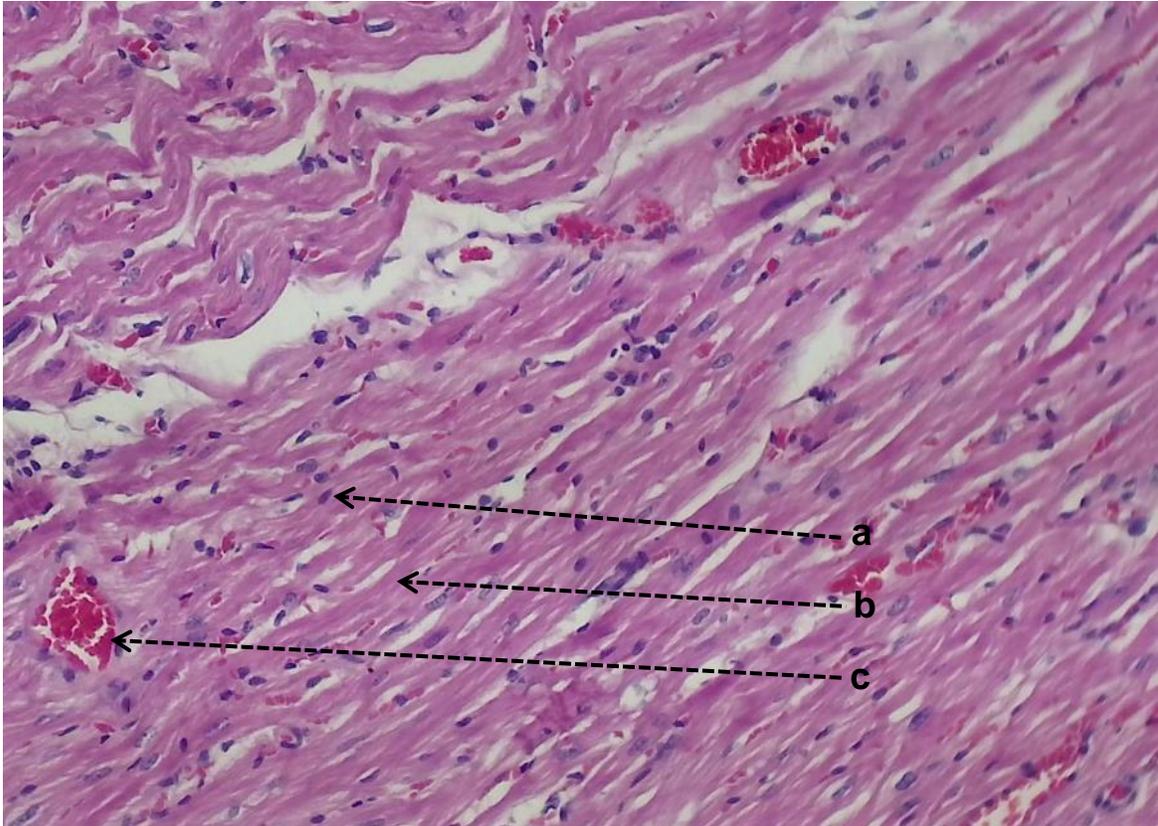


Imagen 1. Elementos teñidos con la tinción de hematoxilina-eosina

En la figura se muestran los elementos teñidos con la tinción de hematoxilina eosina en un corte de tejido cardíaco, se observa con la letra **a**) el núcleo celular, el cual muestra una coloración violeta, **b**) representa la fibra muscular cardíaca, con una tonalidad rosada, finalmente con **c**) se observan eritrocitos teñidos de color rojo que se encuentran dentro de un vaso sanguíneo.

### **3.5.2. Tinción de masson**

#### **3.5.2.1. Fundamento**

La tinción de Masson es un tipo de tinción perteneciente a las tinciones tricromicas, ya que en estas se utilizan 3 colorantes diferentes para teñir diferentes estructuras de los organismos vivos, principalmente la tinción de Masson se utiliza para diferenciar entre el colágeno y el musculo. Como se mencionó anteriormente, la tinción de Masson utiliza 3 colorantes, uno de ellos es un colorante ácido, el cual, se encarga de teñir el colágeno, musculo y el citoplasma, normalmente se utiliza el escarlata de Biebrich (Carson & Hladik, 2009), posteriormente, se utiliza ácido fosfotungstico/ fosfomolibdico, el cual por su naturaleza de ácido fuerte desplaza al escarlata de Biebrich del colágeno, pero no del citoplasma, porque la célula no es permeable a los ácidos, por lo tanto el ácido desplaza al escarlata de Biebrich del colágeno. Posteriormente se agrega el colorante azul de anilina,

el cual es un colorante con una naturaleza química anfótera, de acuerdo con (PUCHTLER & ISLER, 1958), el colorante azul de anilina, actúa como una base y se extiende en las mismas regiones en las que lo hace el ácido fosfomolibdico, por lo que se propone que este colorante, interactúa con el ácido, el cual está unido directamente con las fibras de colágeno o sustancias básicas, formando una especie de polímero, debido a la capacidad del ácido fosfomolibdico de formar estas estructuras.

Adicionalmente a estos dos colorantes, se puede utilizar un tercero que tiñe el núcleo, dado que ni el ácido fosfomolibdico ni el escarlata de Biebrich se unen al núcleo el cual normalmente es la hematoxilina, de la cual fundamento ya fue descrito anteriormente.

#### **3.5.2.2. Utilidad**

La tinción de Masson forma parte de las llamadas tinciones tricromicas, las cuales usualmente son usadas para visualizar tejido conectivo, en particular, la de Masson, para la observación de colágeno, el cual se tiñe de color azul y además se pueden teñir diferentes estructuras como el núcleo celular, el cual se tiñe de negro o marrón oscuro, el citoplasma de las células se vuelve rosado, y las fibras musculares se tiñen de rojo (Leonard et al., 2018).

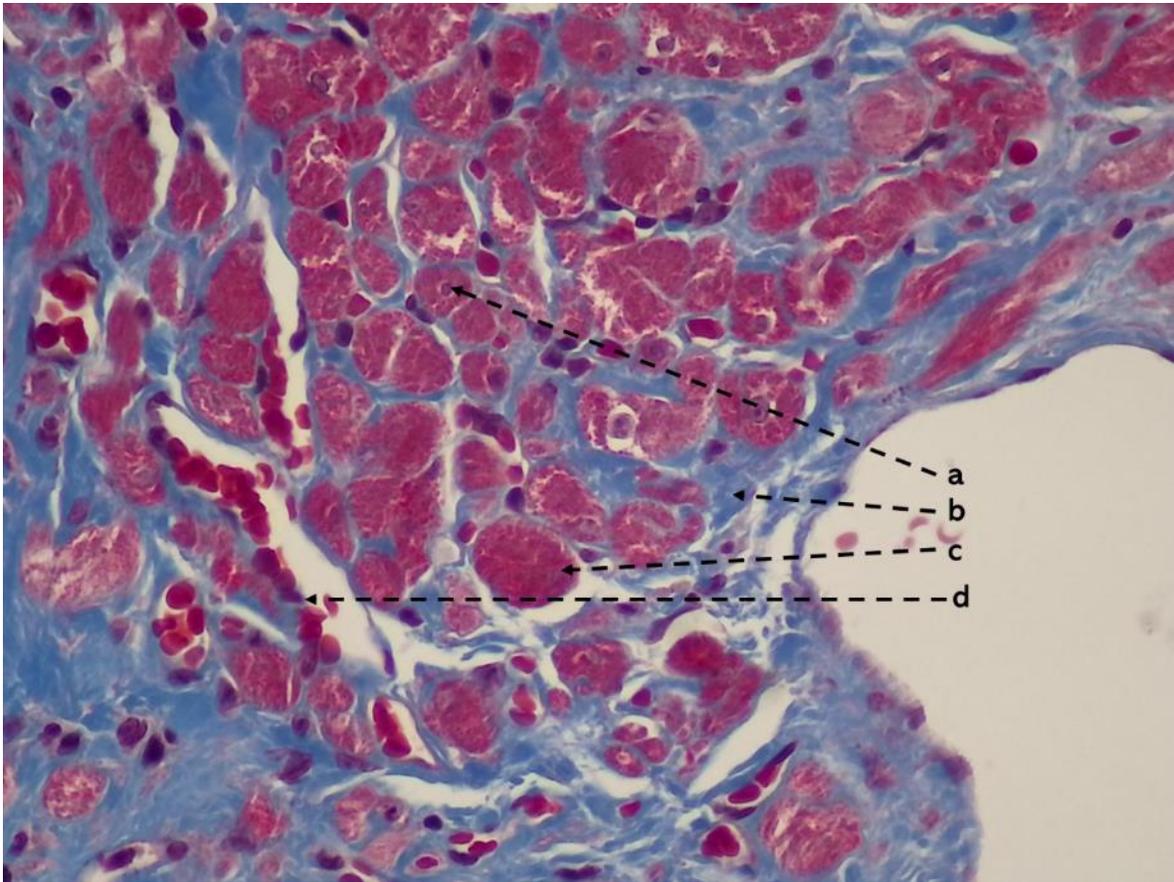


Imagen 2. Elementos teñidos con la tinción de Masson (40x).

En la imagen 2, se observan los elementos teñidos con la tinción de Masson, el corte histológico proviene de una muestra de miocardio de rata Wistar hembra con Ovariectomía a 20 semanas, con **a)** se observa el núcleo celular de un miocito cardiaco de un tono oscuro, con **b)** se observa el colágeno, el cual se destaca por su coloración azul, con **c)** se observa el citoplasma de un miocito cardiaco, el cual presenta una coloración rosa, finalmente con **d)** se observan eritrocitos.

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La principal causa de muerte de las mujeres en México durante el 2020 fueron las enfermedades del corazón, superando en proporción a los hombres y en cantidad considerable a enfermedades como la diabetes mellitus y la COVID-19.

Las mujeres premenopáusicas están relativamente protegidas contra las enfermedades cardiovasculares, en comparación con hombres de la misma edad. Sin embargo, esta brecha sexual se reduce después de la menopausia donde hay una disminución de la producción de estrógenos por los ovarios, los cuales son cardioprotectores, provocando una disfunción endotelial, inflamación y disfunción inmunitaria, lo que se asocia a enfermedades caracterizadas por la relajación del corazón.

Una de las propuestas para combatir las enfermedades cardiovasculares en mujeres posmenopáusicas es la terapia de reemplazo hormonal (TRH), aunque, a pesar de las investigaciones clínicas, aún se desconoce la influencia de la terapia estrogénica temprana y tardía en la morfología cardíaca y en la deposición de colágeno.

Por lo que en el siguiente trabajo se propone mostrar los efectos de la TRH temprana y tardía sobre la morfología del tejido cardíaco con ayuda de técnicas histológicas, aportando información a la investigación sobre una alternativa para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades cardiovasculares en mujeres posmenopáusicas.

#### **5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La morfología del tejido cardíaco y la deposición de colágeno será alterada después de la terapia de reemplazo estrogénica temprana y tardía?

#### **6. HIPÓTESIS**

La terapia de reemplazo estrogénica evitará cambios en la morfología del tejido cardíaco y el aumento en la deposición de colágeno en ratas Wistar hembras ovariectomizada.

## **7. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los cambios morfológicos del tejido cardiaco de ratas Wistar hembra ovariectomizada con terapia de reemplazo hormonal estrogénica temprana y tardía por medio de un análisis histológico cuantitativo y cualitativo para establecer los efectos que tiene la terapia en el corazón.

## **8. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Realizar la cirugía de ovariectomía bilateral en rata Wistar hembra, para simular el estado posmenopáusico.
- Administrar  $17\beta$ -Estradiol, por vía oral a rata Wistar hembra a 3 días post-ovariectomía y a 10 semanas post-ovariectomía.
- Obtener muestras de tejido cardiaco de todos los grupos experimentales, para realizar el análisis histológico cualitativo y cuantitativo de cada muestra.
- Realizar análisis histológico cualitativo a las muestras de miocardio de todos los grupos experimentales con ayuda de las tinciones de hematoxilina-eosina y Masson.
- Cuantificar el porcentaje de deposición de colágeno, midiendo el área ocupada por el colágeno en cada muestra, con ayuda del software Motic Images Plus 3.0
- Medir el área de los miocitos cardíacos con ayuda del software Motic Images Plus 3.0.

## **9. METODOLOGÍA**

### **9.1. Protocolo experimental**

Se contó con ratas Wistar hembra de 18 meses de edad, distribuidas aleatoriamente en 6 grupos; Grupo 1) Sham joven (Sham-j), grupo 2) Sham, 3) Ovariectomía a 10 semanas (OVX-10 sem), grupo 4) OVX con Terapia de reemplazo hormonal temprana (OVX-TRTm), grupos 5) OVX con terapia de reemplazo hormonal tardía (OVX-TRTd) y grupo 6 Ovariectomía a 20 semanas (OVX-20 sem) n= 6 para cada grupo experimental. 3 días posteriores a la cirugía de ovariectomía comenzó la terapia de reemplazo con 17 $\beta$ -Estradiol a una dosis de 5  $\mu$ g/Kg diario durante 10 semanas (sólo para el grupo OVX-TRTm), mientras que para el grupo OVX-TRTd la Terapia de reemplazo hormonal comenzó 8 semanas posteriores al comienzo de la cirugía de ovariectomía. Al final de las 10 semanas se obtuvieron muestras de tejido cardíaco en todos los grupos experimentales, que finalmente fueron procesadas y analizarlas histológicamente, como se menciona en los puntos 9.4 y 9.5.

### **9.2. Ovariectomía**

Para la ovariectomía, se inició anestesiando a las ratas mediante la administración de pentobarbital vía intraperitoneal en una dosis de 55 mg/Kg. Una vez anestesiadas, se realizaron 2 incisiones longitudinales (8 mm) en el lomo de las ratas, a 2 cm de la línea media a través de la piel y la pared muscular. Una vez localizados los ovarios, se ató firmemente una sutura de seda alrededor del oviducto y los vasos sanguíneos ováricos, seccionando después el oviducto distalmente a la sutura y extrayendo los ovarios. A continuación, se suturó la pared muscular y piel. Todos los animales recibieron analgesia postoperatoria mediante 6 mg/Kg de tramadol (Chung et al., 2010).

### **9.3. Terapia de Reemplazo Estrogénica**

La terapia de reemplazo estrogénica inició 3 días después a la ovariectomía (grupo OVX-TRTm) y 8 semanas post-ovariectomía (grupo OVX-TRTd), para ello se preparó una solución de 17 $\beta$ -Estradiol (Sigma Aldrich) de 372  $\mu$ g/mL, posteriormente se disolvieron 20  $\mu$ L de esta solución en 0.3 g de Nutella® por cada 350 g de peso corporal, estos fueron administrados por vía oral cada 24h, con una dosis diaria de 5  $\mu$ g/Kg/día de 17 $\beta$ -Estradiol,

durante un periodo de 10 semanas, finalmente se tomaron la muestra del tejido cardiaco, para realizar el análisis histológico.

#### **9.4. Preparación de la Muestra**

Las muestras de tejido cardiaco se fijaron en parafina y posteriormente se cortaron en secciones de 10  $\mu\text{m}$ . Para la tinción de hematoxilina-eosina se llevó a cabo el siguiente procedimiento; se desparafinaron e hidrataron las muestras, colocando en diferentes soluciones de etanol de mayor a menor concentración hasta que finalmente se hidrató en agua destilada, después se colocaron en Hematoxilina de Mayer durante 5 minutos, se retiraron y diferenciaron por 5 minutos con agua de la llave y posteriormente en agua destilada por 1 minuto. A continuación, se colocaron en Eosina al 0.2% en agua destilada por 1 minuto para enjuagar el colorante, se deshidrató con etanol de 70°, 96° y 100° consecutivamente por 1 minuto en cada concentración, y finalmente se colocaron en xileno y se montaron en el portaobjetos (Megías et al., 2018).

Para la tinción de Masson, se desparafinaron e hidrataron las muestras, colocando en diferentes soluciones de etanol de mayor a menor concentración hasta que finalmente se hidrataron en agua destilada, después se mordentaron las muestras en Bouin a temperatura ambiente por toda la noche, posteriormente se lavaron en agua de la llave hasta quitar el color amarillo. Las muestras se colocaron en hematoxilina de Weigert por 10 minutos, transcurrido el tiempo, se lavaron con agua de la llave por 10 minutos y después se enjuagaron con agua destilada, a continuación, las muestras fueron teñidas con el colorante escarlata de Biebrich por 10 minutos, transcurrido ese tiempo se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en solución de ácidos por 10 minutos, se tiñeron con azul de anilina por 5 minutos y se filtró el azul de anilina. Finalmente, se enjuagaron en agua destilada, se colocaron en ácido acético al 1% por 5 minutos y al finalizar el tiempo se deshidrataron, aclararon y montaron en el portaobjetos.

#### **9.5. Análisis Histológico**

##### **9.5.1. Calibración del software de trabajo**

Antes de realizar el análisis histológico cuantitativo se calibró el software de trabajo, con los objetivos del microscopio óptico, primero se colocaron los portaobjetos de calibración el cual posee círculos marcados con diferentes diámetros, estos portaobjetos eran específicos para el microscopio óptico Motic, una vez colocados en el microscopio, se enfocó con un

objetivo de 10x a cada uno de los círculos, y posteriormente se enfocó con el objetivo de 40x, se capturaron las imágenes de cada círculo con cada diferente objetivo y se etiquetaron correctamente, después se cargaron las imágenes en el software Motic Images Plus 3.0 y con ayuda del asistente de calibración del software, se procedió a calibrar el programa, ver figura 21.

### **9.5.2. Análisis histológico cualitativo**

Para el análisis cualitativo se inició con la observación de las muestras de tejido miocárdico previamente procesado con un microscopio estereoscópico Leica a un aumento de 2x, se observó el ventrículo izquierdo y se realizan las anotaciones, posteriormente se observó la muestra en el microscopio óptico Motic, realizando un barrido con el objetivo de 4x, centrando la atención en las áreas que presentaron anomalías, posteriormente, se realizó un aumento con el objetivo de 10x y finalmente con el objetivo de 40x, se capturaron las imágenes con ayuda del software AmScope 4.11.20131.20220108 y se realizaron anotaciones de lo observado.

### **9.5.3. Análisis histológico cuantitativo**

Para el análisis cuantitativo, se midió el área de los miocitos cardiacos y el % de deposición de colágeno, para la medición del área de los cardiomiocitos se inició capturándolos con ayuda del software AmScope 4.11.20131.20220108, el cual controla la cámara del microscopio óptico Motic, que posee una resolución de 5 megapíxeles, se realizó un barrido a las muestras de miocardio con el objetivo de 4x sobre las regiones del septum y el ventrículo izquierdo, una vez localizado el campo de interés, se observó con el objetivo de 40x y se capturaron las imágenes, y se almacenó en la computadora, realizándose este proceso por triplicado para cada muestra. Posteriormente se realizó la medición del área de 5 miocitos cardiacos por cada campo capturado, con ayuda del software Motic Images Plus 3.0. Finalmente se almacenaron los datos en el software Microsoft Excel, se realizó el análisis estadístico correspondiente con el software SigmaPlot 12.0 y se graficaron los datos con el software GraphPad Prism 8, ver figura 23.

Para la cuantificación del % de deposición de colágeno primeramente se realizó un barrido microscópico con un objetivo de 4x para identificar las áreas con mayor cantidad de colágeno en el septum y la pared libre del ventrículo izquierdo, una vez identificadas, se observaron con el objetivo de 10x y se capturaron las imágenes con el software AmScope 4.11.20131.20220108, este procedimiento se realizó midiendo en 3 diferentes campos para

la misma muestra, posteriormente se midió la cantidad de colágeno presente en cada imagen con ayuda del software Motic Images Plus 3.0. Finalmente se obtuvo el % de deposición de colágeno con ayuda del software Microsoft Excel, se realizó el análisis estadístico correspondiente con el software SigmaPlot 12.0 y se graficaron los datos con el software GraphPad Prim 8, ver figura 24.

# Calibración del software

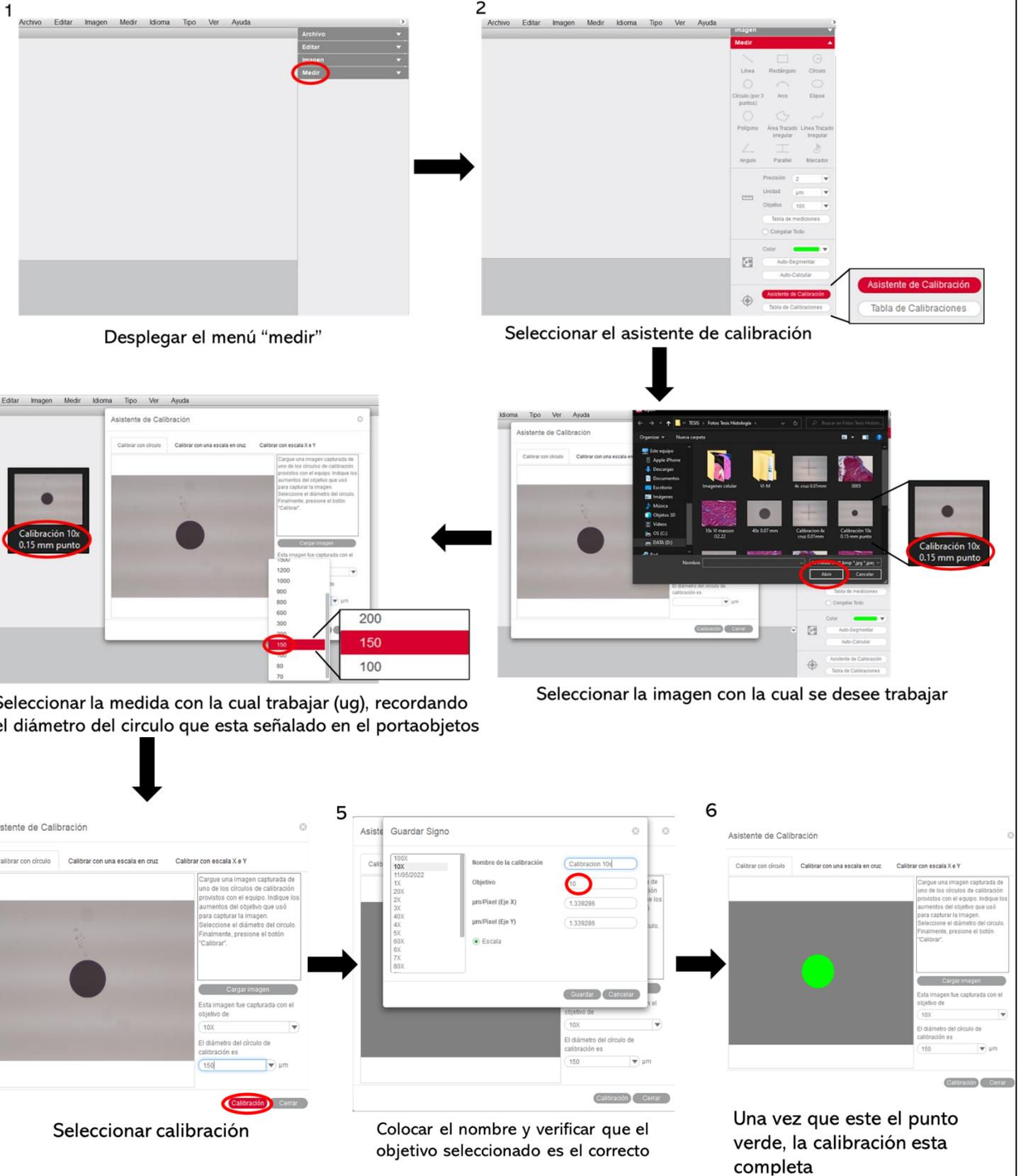


Figura 21. Diagrama de la calibración del software

# Medición de cardiomiocitos

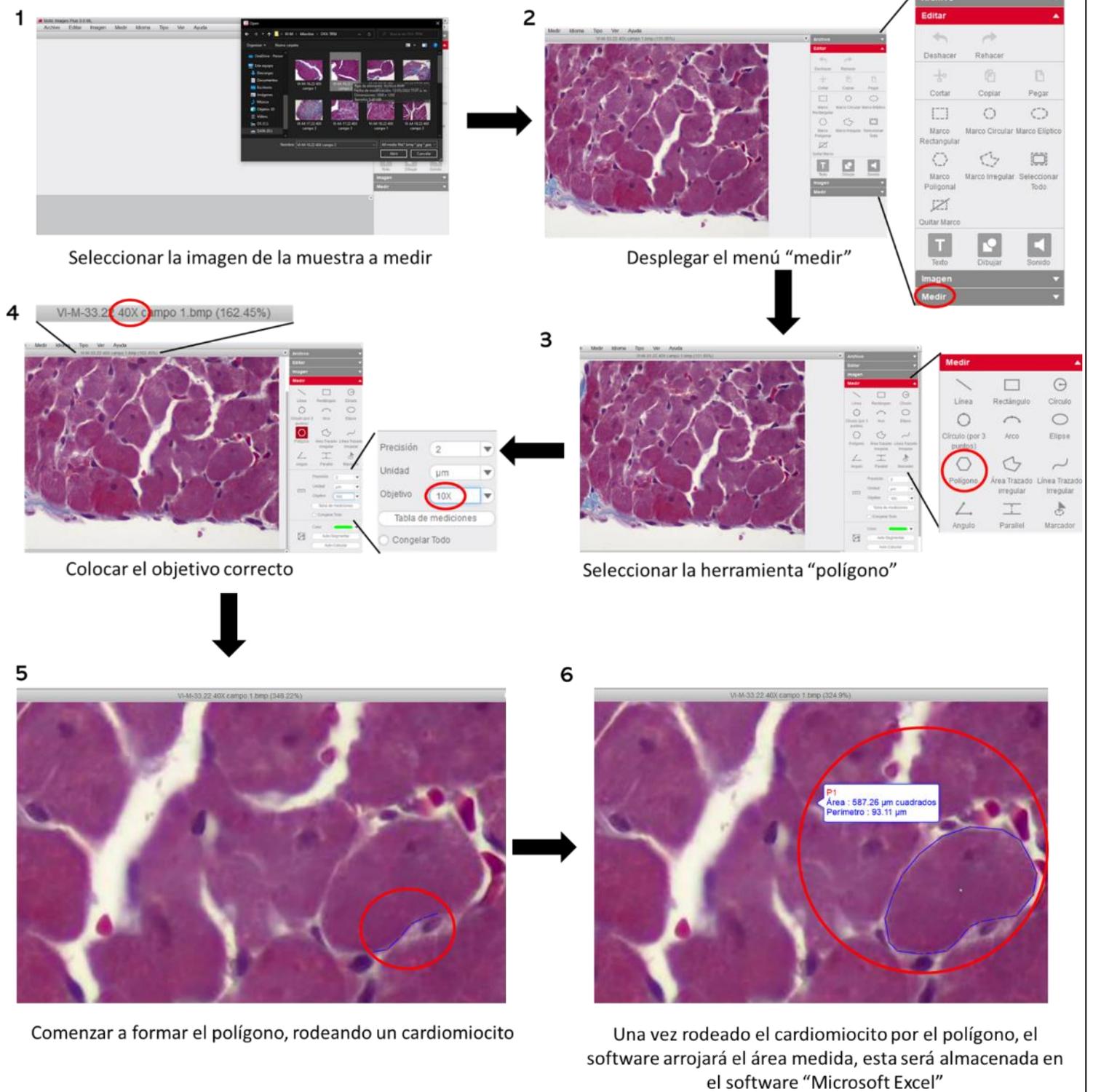


Figura 22. Diagrama de flujo para la medición de cardiomiocitos

# Deposición de colágeno

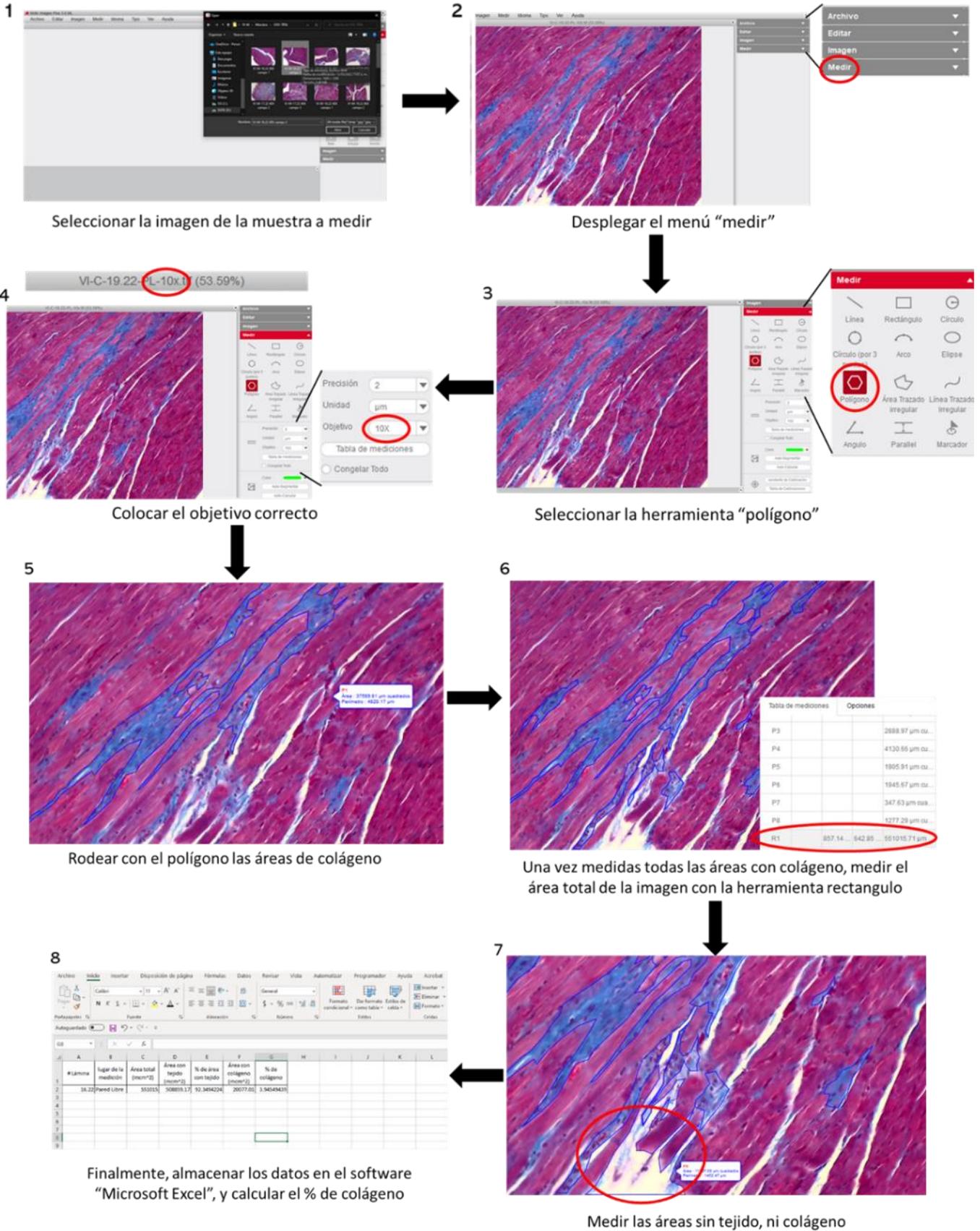


Figura 23. Diagrama de la cuantificación de la deposición de colágeno

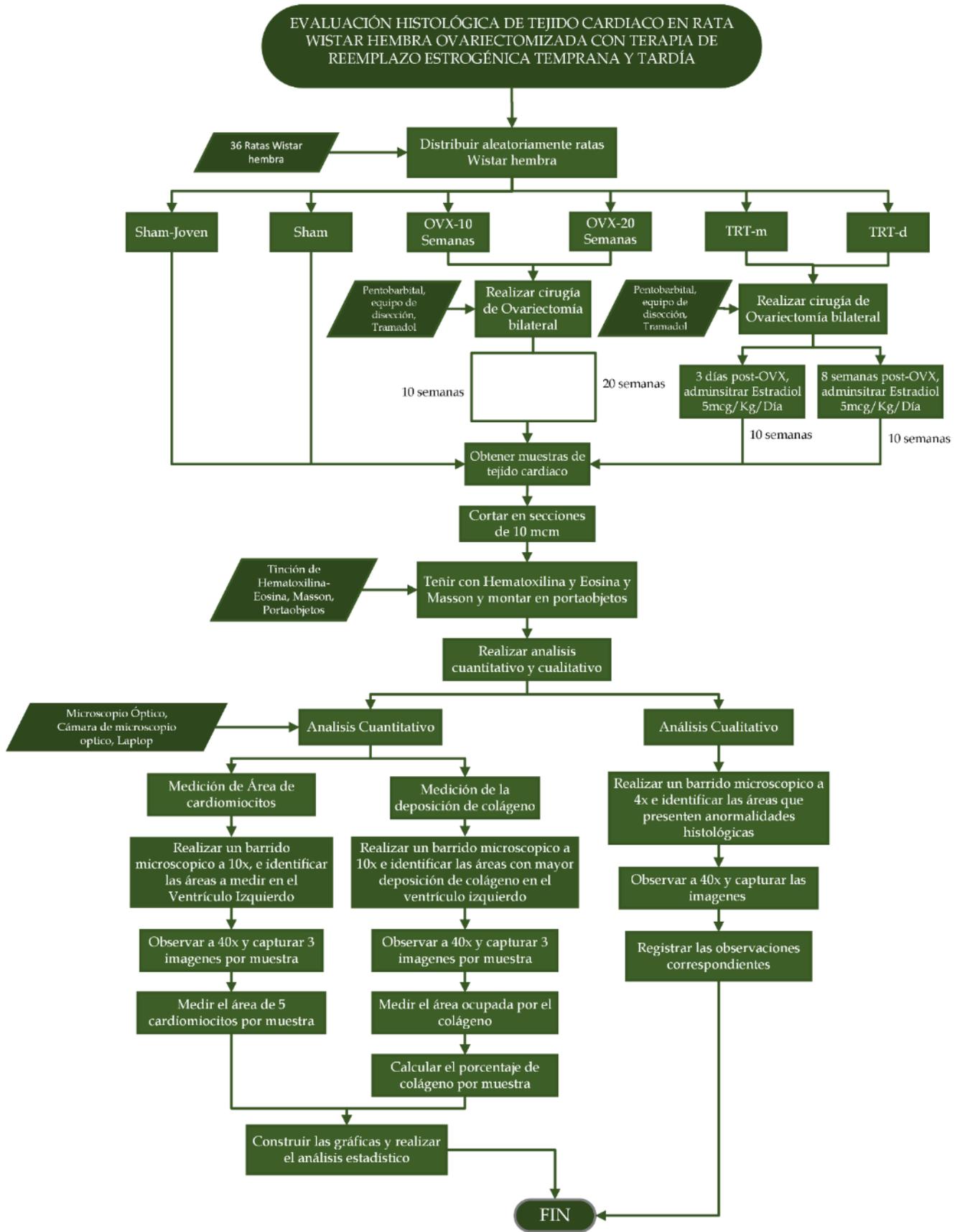
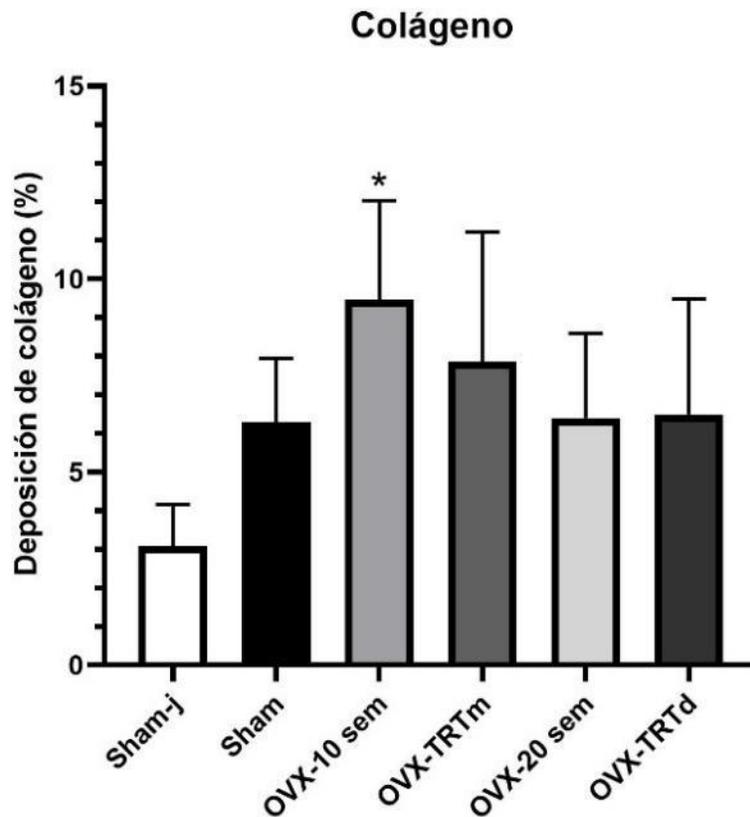


Figura 24 Diagrama de flujo de la metodología

## 10. RESULTADOS



Gráfica 1. Deposición de colágeno (%) en el tejido cardíaco de rata Wistar hembra ovariectomizada con terapia de reemplazo estrogénica temprana y tardía.

Se presentan la media ( $n=6$ )  $\pm$  error estándar. El análisis estadístico se realizó con una ANOVA de una vía, seguida de la prueba post hoc de Holm-sidak. \* $P<0.05$  vs Sham joven. Sham-joven representa un control joven, mientras que el grupo sham es el control de la misma edad que el resto de los grupos experimentales.

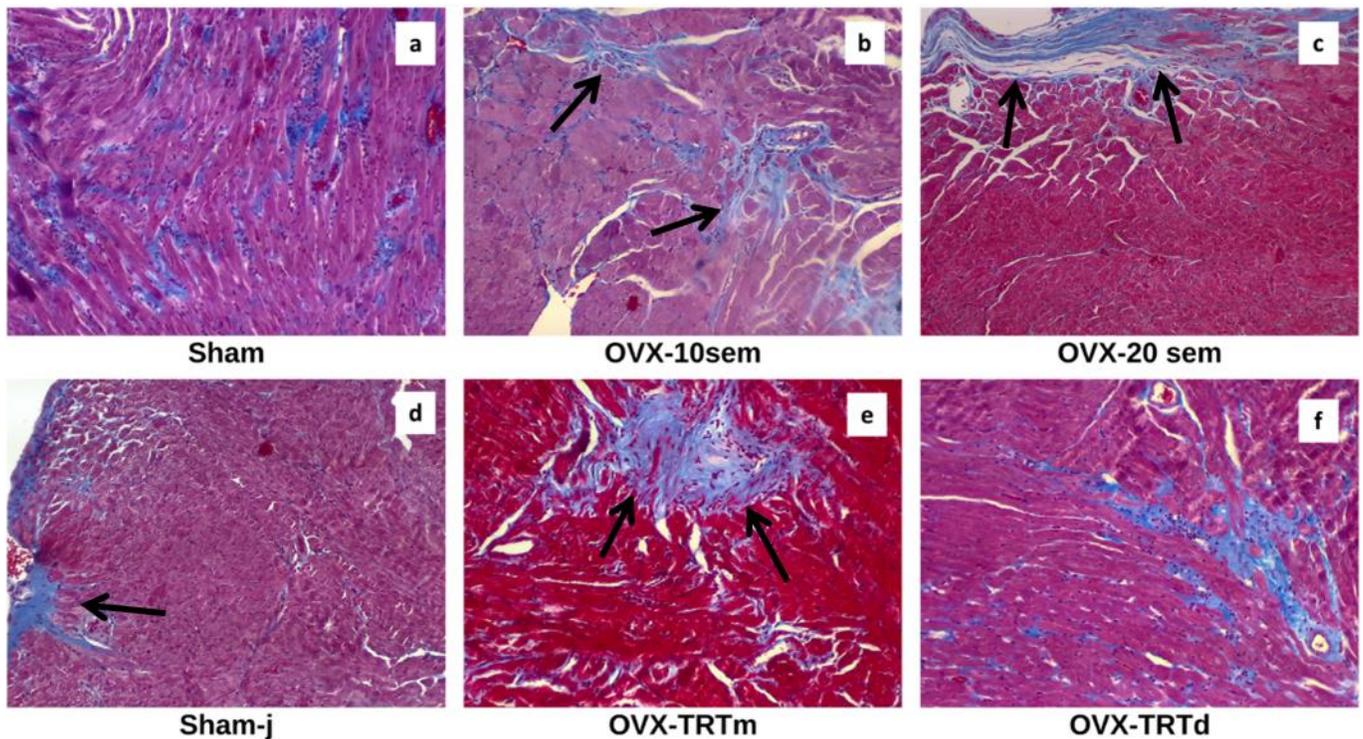
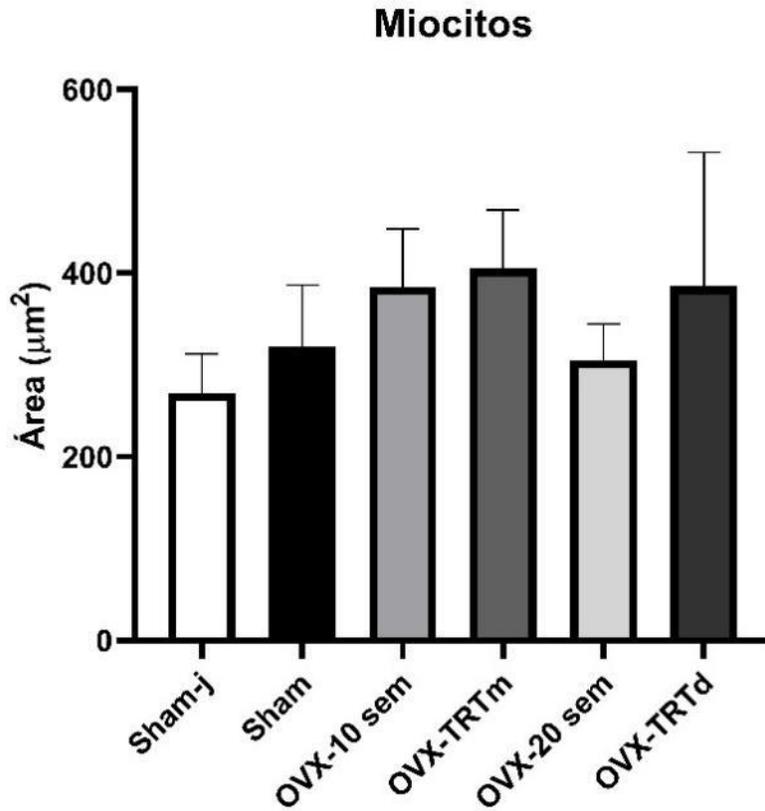


Imagen 3. Deposición de colágeno en el tejido cardiaco de rata Wistar hembra ovariectomizada con terapia de remplazo estrogénica temprana y tardía. Tinción tricrómica de Masson (100x).

En la gráfica 1 se muestra un aumento significativo ( $P>0.05$ ) de deposición de colágeno de OVX-10 sem con respecto de sham-j, esto puede ser observado en la imagen 3-b (OVX-10 sem), donde el colágeno se encuentra distribuido ampliamente, mientras que en la imagen 3-d (Sham-joven) se observa una pequeña región de colágeno en la parte inferior izquierda de la imagen, mientras que, podemos observar una tendencia al aumento de la deposición de colágeno en el resto de los grupos. En cuanto al grupo sham-vieja, la deposición de colágeno tiende a aumentar comparado con sham-joven, la cual puede ser observada en la imagen 3-a (Sham-vieja) que muestra el colágeno distribuido en toda la imagen mientras que la imagen 3-d (Sham-joven) como se describió anteriormente, presenta una pequeña área de deposición de colágeno. En cuanto a OVX-TRTm en la gráfica 1 la deposición de colágeno tiende a disminuir con respecto a OVX-10 sem, pero tiende a aumentar comparándola con OVX-20 sem, OVX-TRTd y Sham, esto se observa en la imagen 3-b (OVX-10 sem). Por otra parte, en la imagen 3-e (OVX-TRTm) muestra una gran área de colágeno en la parte superior de la imagen, comparada con la imagen 3-c (OVX-20 sem) que tiene una región extendida de colágeno en la parte superior y la imagen 3-f (OVX-TRTd) donde el colágeno se encuentra distribuido en varias áreas de la imagen, observándose una mayor deposición en la zona inferior derecha. Finalmente, en la gráfica 1, se observa que los grupos sham, OVX-20 sem y OVX-TRTd tienen una deposición de colágeno muy similar y que pueden ser observadas en la imagen 3-a (Sham-vieja), imagen 3-c (OVX-20 sem) e imagen 3-f (OVX-TRTd) descritas anteriormente.



Gráfica 2. Área de los cardiomiocitos ( $\mu\text{m}^2$ ) en el tejido cardiaco de rata Wistar hembra ovariectomizada con terapia de remplazo estrogénica temprana y tardía.

Se presentan la media ( $n=6$ )  $\pm$  error estándar. El análisis estadístico se realizó con una ANOVA de una vía, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

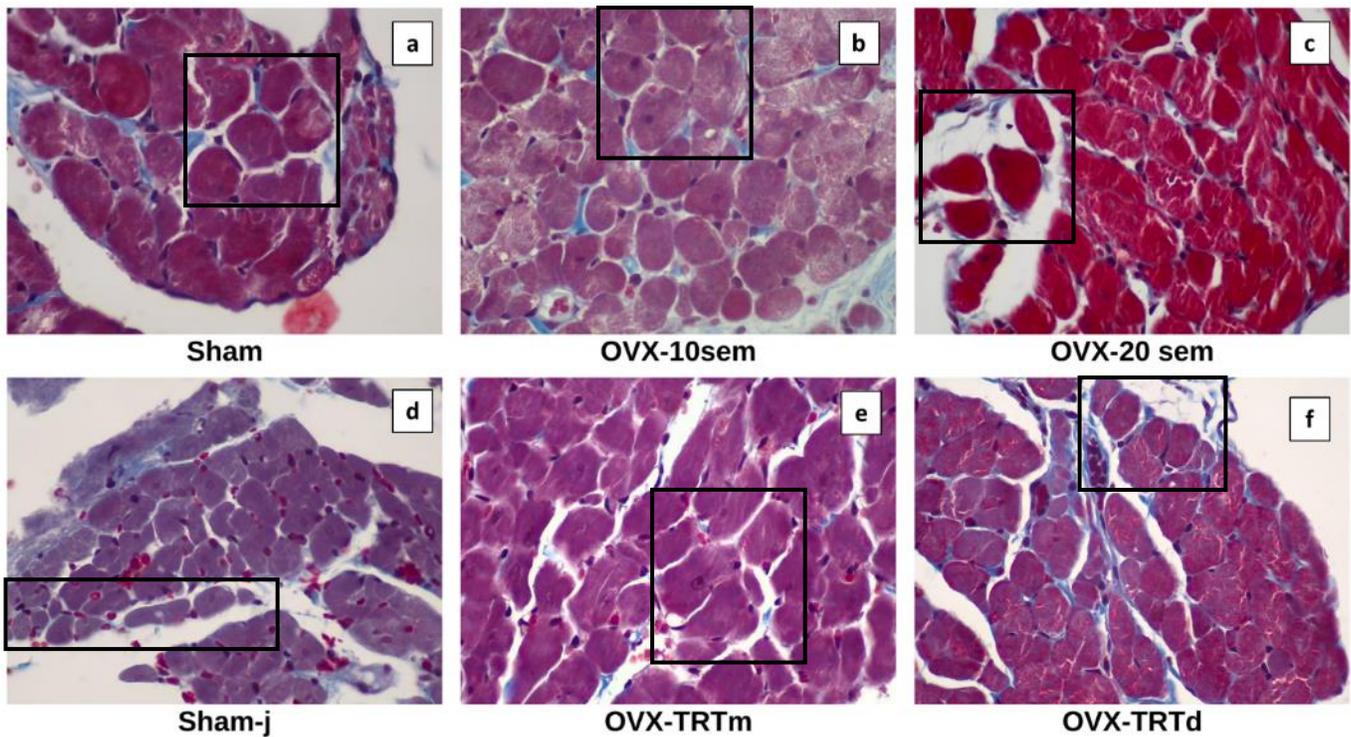


Imagen 4. Cardiomiocitos en tejido cardiaco de rata Wistar hembra ovariectomizada con terapia de reemplazo estrogénica temprana y tardía. Tinción tricrómica de Masson (400x).

La gráfica 2 muestra el área de los cardiomiocitos de rata Wistar ovariectomizada con terapia de reemplazo estrogénica temprana y tardía, en la cual no observan diferencias significativas entre los grupos experimentales, aunque muestra una serie de tendencias que se describen a continuación. Los miocitos cardiacos de Sham-joven muestran una tendencia a ser más pequeños frente a todos los demás grupos experimentales, estos pueden ser observados en la imagen 4-d (Sham-joven), donde se observan miocitos pequeños y de formas irregulares. Por su parte los cardiomiocitos de sham tienden a ser más grandes con respecto al sham-j y ligeramente más grandes comparados a OVX-20 sem, mientras que tienden a tener un menor tamaño comparados con el resto de los grupos. Estos pueden ser observados en la imagen 4-a (Sham-vieja), donde se muestran de un tamaño más grande y una forma ovalada en la mayoría de los miocitos. Por su parte, en la gráfica 2, también se observa una tendencia al aumento del tamaño de los miocitos cardiacos de OVX-TRTm con respecto a OVX-10 sem y a OVX-TRTd, mostrándose en la imagen 4-e (OVX-TRTm) de una forma irregular y de gran tamaño. El área de los cardiomiocitos en OVX-TRTd tiende a ser más pequeña que los miocitos cardiacos de OVX-TRTm, aunque comparado con OVX-10 sem se muestran de tamaño muy similar, en la imagen 4-f (OVX-TRTd) se observan los miocitos de OVX-TRT d de una forma ovalada y de un tamaño considerablemente grande, aunque se notan más pequeños que los de la imagen 4-e (OVX-TRTm), y de un tamaño y forma muy similar a la imagen 4-b (OVX-10 sem), aunque en dicha imagen se observa un tamaño variable de los miocitos, siguen

imperando los miocitos de tamaño grande. Finalmente, OVX-20 sem, mostro una tendencia a un menor tamaño de los miocitos cardiacos que OVX-10 sem y los grupos con tratamiento, representados en la imagen 4-c (OVX-20 sem), los miocitos cardiacos se observan de una forma irregular, aunque de un tamaño mediano.

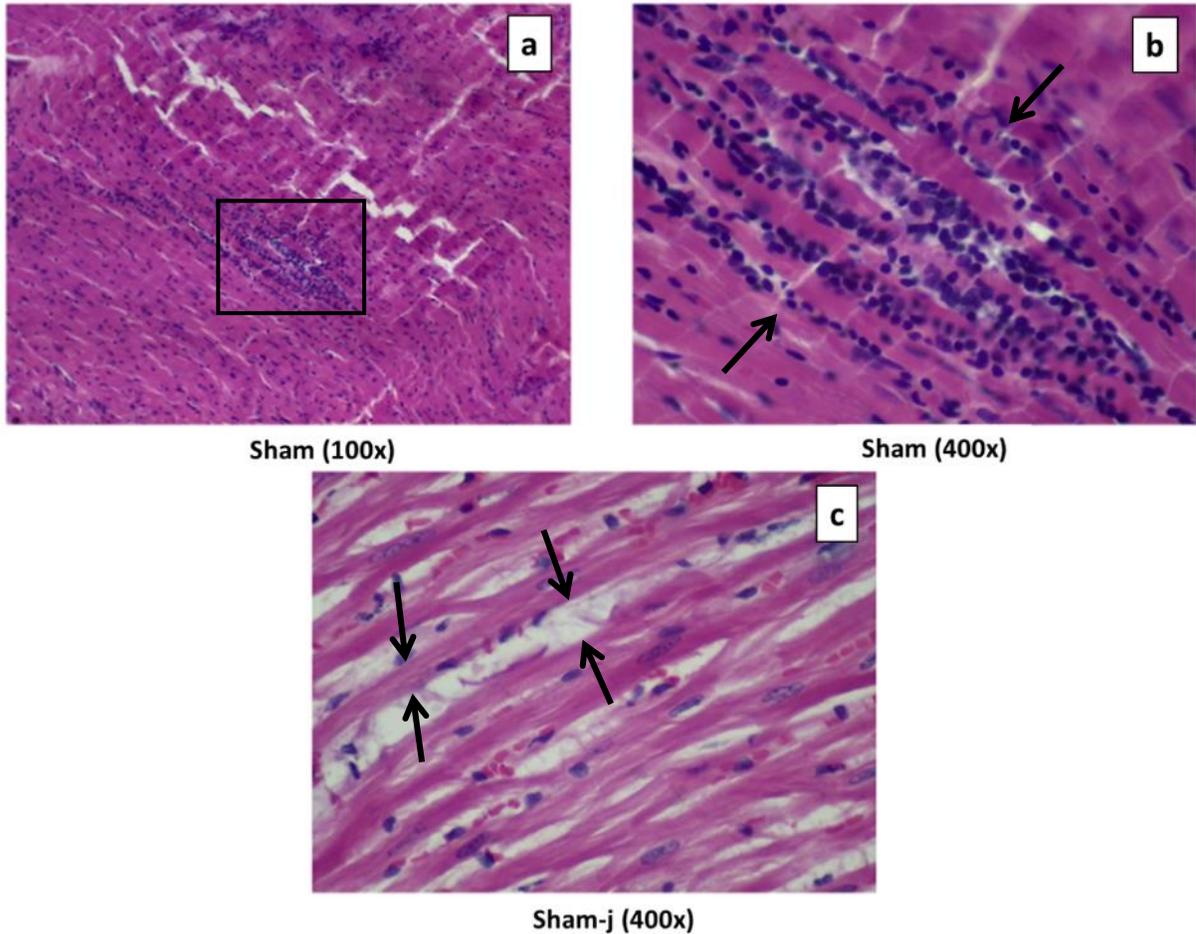


Imagen 5. Anormalidades morfológicas en los grupos Sham vieja y Sham joven.

En la imagen 5-a (Sham vieja 100x) e imagen 5-b (Sham vieja 400x) se puede observar una miocarditis linfocitaria, en la imagen 5-a (Sham vieja 100x) presenta la extensión del área de la miocarditis, mientras que, en la imagen 5-b (Sham vieja 400x), se puede observar con mayor claridad la presencia de los linfocitos y como poco a poco comienzan a degradar las fibras cardiacas. En la imagen 5-c (Sham joven) se observan las fibras musculares más separadas y delgadas de lo común, además de la ausencia de núcleos en las fibras cardiacas. Todas las imágenes presentadas, fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina.

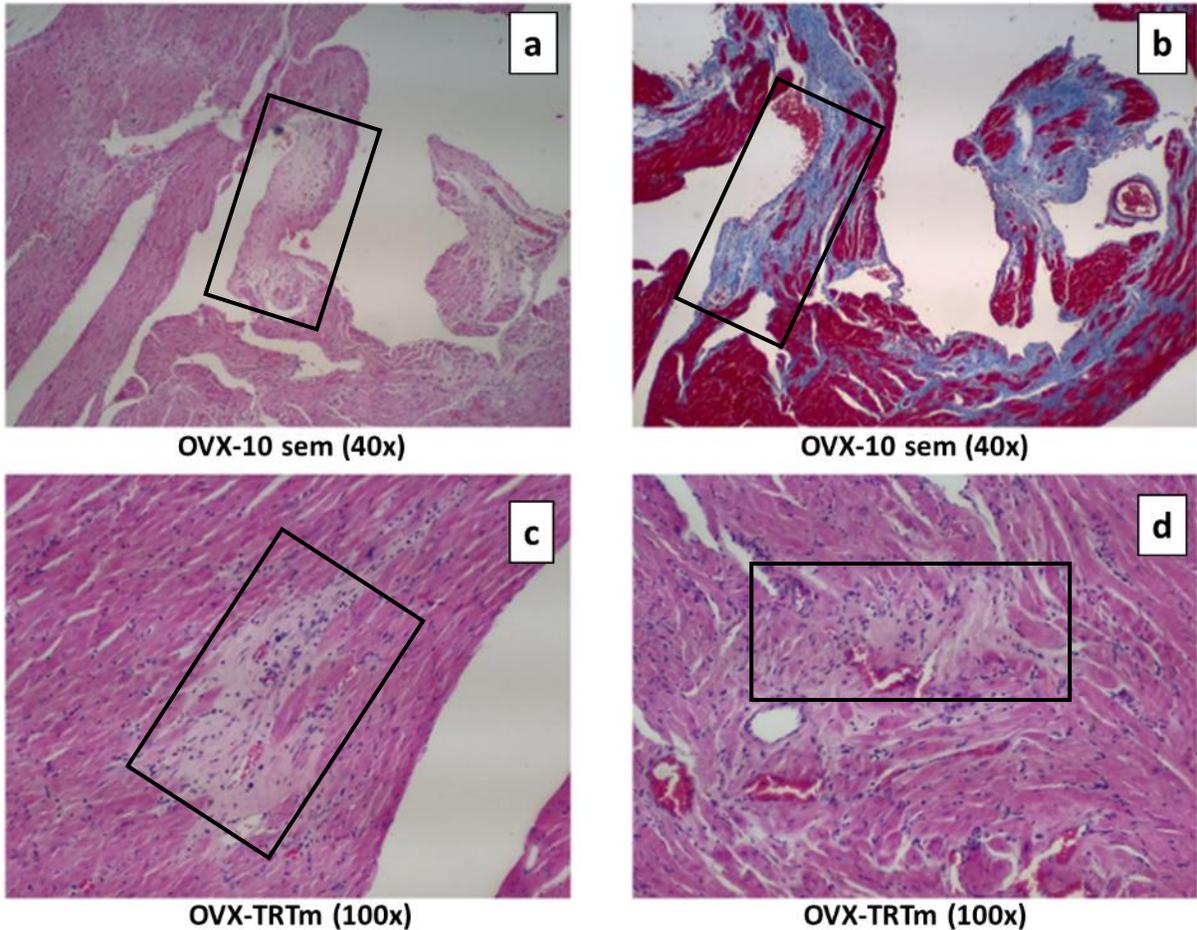


Imagen 6. Anormalidades en los grupos OVX-10 semanas y OVX-TRTm.

En la imagen 6-a (OVX-10 sem) se observa una posible región con infarto miocárdico, con la tinción de Hematoxilina-Eosina. En las regiones más claras de la imagen, representan el área de infarto, la cual puede ser confirmada en la imagen 6-b (OVX-10 sem), la cual es tomada de la misma región con la tinción de Masson, donde se observa la presencia de colágeno de una coloración azul y al comparar con la imagen del lado izquierdo, se pueden observar las mismas regiones del área de infarto con deposición de colágeno. Por otro lado en el grupo OVX-TRTm se observa en la imagen 6-c (OVX-TRTm) teñida con la tinción de Hematoxilina-Eosina, una posible región con infarto en el ventrículo derecho, la cual se puede notar con la ausencia de fibras miocárdicas reemplazadas por tejido fibrótico que se observa en un tono rosa más claro, en esta zona además se nota la presencia de células inflamatorias, la pérdida de núcleos y fibras musculares cuyos límites no están definidos, mientras que en la imagen 6-d (OVX-TRTm), la cual esta teñida de la misma manera con Hematoxilina-Eosina, igualmente se puede observar un infarto miocárdico, pues existe una

región donde las fibras musculares dejan de estar definidas, además de la presencia de células inflamatorias y la pérdida de núcleos por parte de los miocitos cardiacos.

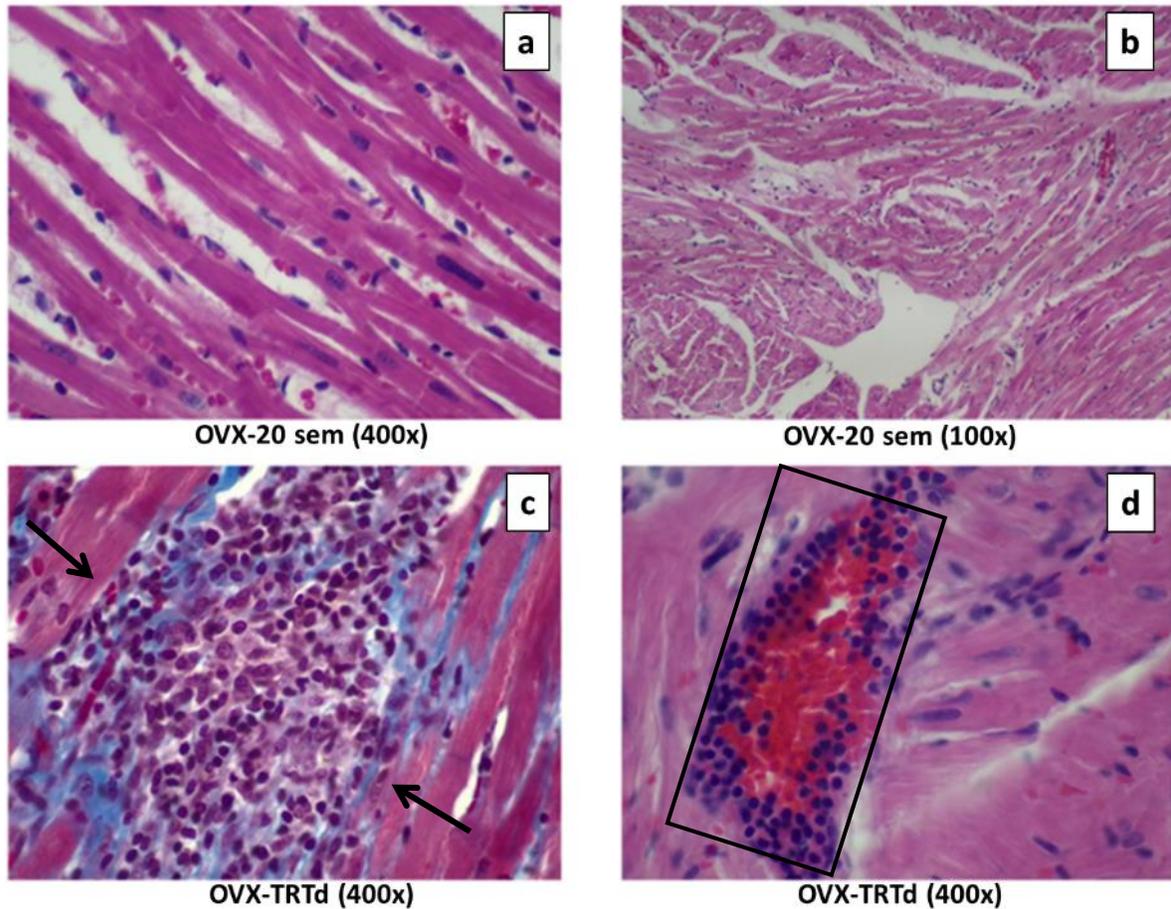


Imagen 7. Anormalidades en los grupos OVX-20 semanas y OVX-TRTd

En la imagen 7-a (OVX-20 sem 400x) con Hematoxilina-Eosina se observan fibras muy separadas entre sí, delgadas y presencia de leucocitos entre las fibras cardiacas, mientras que la imagen 7-b (OVX-20 sem 100x) con Hematoxilina-Eosina, se observa presencia de leucocitos y fibras musculares desordenadas sin núcleo, con presencia de una pequeña área de tejido conectivo. La imagen 7-c (OVX-TRTd 400x) con Masson muestra una miocarditis en el ventrículo derecho, donde se observan principalmente neutrófilos segmentados, así como algunos linfocitos mientras que en la imagen 7-d (OVX-TRTd 400x) con Hematoxilina-Eosina, se observa una infiltración de linfocitos en un vaso sanguíneo dentro del ventrículo derecho del miocardio, se observa como los linfocitos forman un anillo en los alrededores del vaso sanguíneo, y como algunos comienzan a expandirse hacia el miocardio.

## 11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La menopausia es una etapa del sexo femenino donde ocurren una serie de cambios a nivel sistémico, caracterizada principalmente por la caída en los niveles de hormonas sexuales, siendo una de las principales los estrógenos. Conforme avanza la menopausia se comienzan a presentar problemas en diversos sistemas del organismo, siendo uno de los principales el sistema cardiovascular, donde la incidencia de enfermedades cardiovasculares (ECV) aumentan comparadas con mujeres premenopáusicas. Este aumento de la incidencia de enfermedades cardiovasculares se atribuye a la pérdida de hormonas sexuales, destacando los estrógenos, de los cuales se ha confirmado su papel cardioprotector a través de diversos estudios (Iorga et al., 2017). Por ello, en el presente estudio, se evaluaron los efectos de la terapia de reemplazo estrogénica temprana y tardía sobre la morfología del miocardio, deposición de colágeno y área de cardiomiocitos.

La fibrosis cardíaca es el exceso de la deposición de matriz extracelular (MEC), siendo uno de sus principales componentes el colágeno. El colágeno puede compensar la muerte de células producidas por un daño. La producción apropiada de colágeno es buena para preservar la integridad estructural del corazón. Sin embargo, una excesiva deposición de colágeno, causa disfunción cardíaca (Kurose, 2021). En nuestros resultados no encontramos diferencias significativas entre el grupo sham-vieja y sham-joven, pero si existe una tendencia al aumento en la deposición de colágeno debida al proceso de envejecimiento. Como lo demostró (Chiao et al., 2012), la deposición de colágeno aumenta en función de la edad independientemente del sexo, Chiao y col. propusieron que el aumento en la expresión de Metaloproteasa 9 (MMP-9) durante el envejecimiento juega un papel muy importante en el aumento de la deposición de colágeno. En este mismo sentido en nuestros resultados los grupos OVX-10 semanas y OVX-20 semanas no son diferentes del grupo Sham vieja lo cual concuerda con lo presentado por (Alencar et al., 2017) en su estudio, encontró que en las ratas viejas la deposición de colágeno era mayor que en ratas de edad media, independientemente de la presencia o ausencia de estrógenos.

En este sentido, ha sido reportado que la ovariectomía causa un aumento en la deposición de colágeno (Cabanelas et al., 2012), sin embargo, solo en el grupo OVX-10 semanas encontramos una diferencia con respecto al grupo sham-joven, lo cual se podría atribuir a la ausencia de estrógenos, por otro lado, contrario a lo que esperábamos en el grupo OVX-20 semanas, la deposición de colágeno tiende a disminuir, lo cual nos podría indicar que la deficiencia de estrógenos en un principio puede alterar la deposición de colágeno. Esto

puede deberse a cambios en la expresión de la Metaloproteasa 2 (MMP-2) ocasionando la acumulación de esta proteína. Es posible que transcurrido el tiempo hasta llegar a 20 semanas post ovariectomía, el corazón a través de mecanismos compensatorios pueda recuperar la actividad de la MMP-2, aumentando su actividad (Lam et al., 2009), lo cual podría conducir a una disminución en los niveles de colágeno del grupo OVX-20 sem muy similares a los del grupo sham-vieja.

Por otro lado, al evaluar la deposición de colágeno de los grupos con terapia de reemplazo estrogénica no se encontraron diferencias significativas con respecto de los grupos con ovariectomía o sham, aunque parece existir una tendencia a tener una mayor deposición de colágeno que el grupo sham-joven, esto nos sugiere que la terapia de reemplazo estrogénica a una dosis de 5 µg/Kg no influye en la deposición de colágeno. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por (Lekgabe et al., 2006), donde no encontraron diferencias significativas en los niveles de colágeno entre grupos sham, OVX y con terapia de reemplazo estrogénica. De esta manera, estos resultados nos podrían indicar que la deposición de colágeno no es afectada por los estrógenos únicamente, la ovariectomía bilateral permite simular la menopausia, sin embargo la remoción de los ovarios implica no solo la pérdida de estrógenos y progesterona, sino también la pérdida de la producción local de LH, FSH, andrógenos y otros péptidos que regulan la función reproductiva y que participan en la regulación de diversas funciones en el organismo incluyendo el miocardio (Schirman-Hildesheim et al., 2008).

Es importante resaltar que el efecto de los estrógenos si puede causar una alteración en la deposición de colágeno, sin embargo, esta también pudiera ser influenciada por mecanismos compensatorios sistémicos del organismo, como la regulación de los factores de transcripción similares a Kruppel (KLF), en especial el KLF-15, el cual de acuerdo con (Creemers & Pinto, 2011) ha mostrado inhibir la señalización fibrótica, estando regulado positivamente por Angiotensina II, y negativamente por el TGF β1. Otro mecanismo involucrado es mediante el péptido natriurético de tipo C, del cual se han descrito sus propiedades antifibróticas, y que es estimulado por el aumento de niveles de TGF β1 y ET-1, actuando como un regulador autocrino contra la fibrosis cardiaca excesiva (Horio et al., 2003), y finalmente la regulación de la expresión de las metaloproteinasas.

Además, debido a que la terapia de reemplazo estrogénica temprana y tardía no presentó alteraciones sobre la deposición de colágeno, es que podemos atribuir que este proceso puede depender principalmente de los efectos generados por el envejecimiento. La evidencia ha mostrado que durante el envejecimiento se ha encontrado aumentos en los

niveles de MMP-9, la cual es capaz de activar al factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF  $\beta 1$ )(Chiao et al., 2012), a su vez, el TGF  $\beta 1$  promueve la transición de fibroblastos a miofibroblastos (Fan et al., 2012) provocando un aumento de la síntesis de colágeno tipo I y III, vimentina y fibronectina.

En cuanto a la evaluación del área de los cardiomiocitos, no se encontraron diferencias entre el grupo Sham-joven y Sham vieja, aunque el grupo sham-vieja mostro una tendencia al aumento en el área de los cardiomiocitos, esta diferencia pese a no ser significativa nos podría sugerir que la edad influye en el aumento del área de los cardiomiocitos, se ha sugerido que este aumento en el área de los cardiomiocitos es resultado de una disminución en el número de estas células, provocadas por un aumento de los niveles de especies reactivas de Oxígeno (ROS) que causa mayores tasas de apoptosis, y además induce reacciones inflamatorias (Meschiari et al., 2017) ocasionando la hipertrofia de los cardiomiocitos como compensación a las células perdidas (Yabluchanskiy et al., 2014).

Con respecto de los grupos ovariectomizados, se observa que el tamaño de los cardiomiocitos a 10 semanas post ovariectomía tiende a aumentar con respecto del sham-vieja, sin embargo, tras 20 semanas post ovariectomía estos valores son similares al grupo sham-vieja, por lo tanto, estos resultados sugieren que la pérdida de hormonas sexuales afecta de forma diferente a la estructura de los miocitos cardiacos dependiendo del tiempo transcurrido tras la cirugía, tras 10 semanas parece iniciar un proceso hipertrófico en el tejido cardiaco que tras 20 semanas post ovariectomía parece ser compensado por mecanismos de reparación que revierten este efecto y provocan que el área de los cardiomiocitos disminuya hasta los valores del grupo sham-vieja. En este sentido, es bien sabido que la hipertrofia cardiaca es afectada por el calcio, a través de la calcineurina, la actividad de esta hormona aumenta la transcripción de genes que inducen a la hipertrofia, pero también se propone que el péptido natriurético atrial puede ser un regulador de la hipertrofia al bloquear parte de la señalización que induce a la transcripción de genes que causan hipertrofia cardiaca (Pedram et al., 2005). Este péptido, también se ha descubierto que es regulado por los estrógenos a través del receptor de estrógenos alfa y beta (Jankowski et al., 2001), de manera que cuando los niveles de estrógenos disminuyen, los niveles de ANP también lo hacen, ocasionando que la señalización de la hipertrofia no sea bloqueada y por lo tanto esta aumente. Esto confirma nuestros resultados donde los miocitos aumentaron de tamaño tras 10 semanas post cirugía, sin embargo, tras 20 semanas post ovariectomía pareciera que existe un mecanismo de compensación que hasta el momento es desconocido, y del cual no hay información disponible, debido a la

falta de estudios temporales sobre la evolución de la menopausia y la ovariectomía en el sexo femenino. Nosotros sugerimos que al igual que el mecanismo compensatorio de la MMP-2 mencionado anteriormente, a 20 sem post ovariectomía esta enzima aumente su actividad o expresión y contribuya a disminuir la hipertrofia cardiaca.

Ahora bien, con la terapia de reemplazo estrogénica tanto temprana como tardía no se observó ninguna diferencia con respecto del resto de los grupos. Las áreas de los cardiomiocitos son incluso similares a las del grupo OVX-10 semanas, por lo que se sugiere que la terapia de reemplazo estrogénica tanto temprana como tardía no tuvo efectos sobre el área de los cardiomiocitos, estos resultados contrastan con lo reportado por (van Eickels et al., 2001) quienes demostraron en ratón hembra con hipertrofia inducida por sobrecarga de volumen, que los cardiomiocitos del grupo OVX + hipertrofia presentan un mayor tamaño que los miocitos del grupo con terapia de reemplazo estrogénica, mostrando que la terapia disminuye la hipertrofia de los miocitos cardiacos. También se contrasta por lo sugerido por (Pedram et al., 2005), quienes en su estudio encontraron que los estrógenos restringen la señalización de calcineurina y estimulan la producción y secreción de ANP y esto contribuye a un control de la hipertrofia cardiaca. Es posible que las diferencias entre nuestros resultados se deban a que en el presente estudio se empleó una dosis mínima de 5 ug/kg de estradiol, mientras que en los estudios reportados las dosis van desde 180 ug/kg, aunado a ello Pedram y col (2005), probaron el efecto de los estrógenos en un cultivo de miocitos cardiacos aislados, lo cual puede ser muy diferente cuando se estudia en un organismo completo, como es el caso de nuestra investigación.

Los resultados del grupo OVX-TRTm también se pueden explicar al observar las alteraciones en la morfología cardiaca, ya que en este grupo (imagen 6 c e imagen 6 d) se encontraron dos posibles áreas de infarto, las cuales son similares a las reportadas por (Duncanson & Mackey-Bojack, 2018). De acuerdo con (de Almeida et al., 2018) después de un infarto miocárdico, el tratamiento con terapia de reemplazo estrogénica no atenúa la hipertrofia ni la deposición de colágeno, encontrándose además que no se reduce la expresión de angiotensina II, por lo que sus efectos fibróticos e hipertróficos se mantuvieron, confirmando nuestros resultados.

Finalmente, entre otro de los hallazgos histológicos más importantes, se encontró la infiltración leucocitaria, la cual, de acuerdo con (Duncanson & Mackey-Bojack, 2018) se puede clasificar como miocarditis. La miocarditis en el grupo sham (imagen 5 a e imagen 5 b), puede ser parte de una respuesta inflamatoria atribuida al envejecimiento, ya que a pesar de que se siguen teniendo niveles estables de estrógenos por parte de la rata, estos

ya no serían capaces de controlar el deterioro funcional propio del envejecimiento. En acuerdo con nuestros resultados (Yabluchanskiy et al., 2014) demostraron que el envejecimiento aumenta la respuesta inflamatoria en el miocardio, la cual es consecuencia de la falta de angiogénesis ante la hipertrofia de los cardiomiocitos. Por su parte la miocarditis presente en el grupo OVX-TRTd (mostradas en la imagen 7-c) muestra el predominio de neutrófilos segmentados y (imagen 7-d) linfocitos, demostrando así que la terapia de reemplazo estrogénica tardía no fue capaz de mediar la respuesta inflamatoria. Aunque los estudios de (Miller et al., 2004) y (Mori et al., 2011) reportaron que la terapia estrogénica temprana si logra modular la respuesta inflamatoria en el miocardio, disminuyendo la expresión de moléculas proinflamatorias entre un 60 y 80%, lo que parece indicar que los estrógenos pueden ser capaces de modular la respuesta inflamatoria en el corazón siempre y cuando la terapia estrogénica sea temprana. Confirmando nuestros resultados ya que, en el presente estudio, la terapia de reemplazo estrogénica tardía no fue eficaz de mediar la inflamación, a diferencia de la terapia temprana donde no se encontró infiltración leucocitaria que indicará un proceso de miocarditis.

## 12. CONCLUSIONES

El envejecimiento causa diversos cambios en la estructura del corazón como el aumento del área de los cardiomiocitos, una mayor presencia de células inflamatorias, así como el aumento en la deposición de colágeno, donde la ovariectomía empeora las alteraciones en la función cardíaca pudiendo llegar a ocasionar infartos miocárdicos y así alterando también la estructura del miocardio.

Aunque los estrógenos participan y parecen ser clave en la inhibición de muchas vías de señalización fibróticas e hipertróficas en el corazón, no son los únicos involucrados, ya que con la terapia de reemplazo estrogénica temprana y tardía a una dosis 5 µg/Kg/día V.O. no se lograron revertir los cambios que ocasiona la ovariectomía bilateral y esto podría deberse a la inmensa cantidad de moléculas y/o péptidos que se pierden durante la remoción de los ovarios que simula la menopausia, como LH, FSH, andrógenos y demás péptidos.

### 13. REFERENCIAS

- Alencar, A. K., da Silva, J. S., Lin, M., Silva, A. M., Sun, X., Ferrario, C. M., . . . Groban, L. (2017). Effect of Age, Estrogen Status, and Late-Life GPER Activation on Cardiac Structure and Function in the Fischer344xBrown Norway Female Rat. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 72(2), 152-162. <https://doi.org/10.1093/gerona/glw045>
- Ascenzi, P., Bocedi, A., & Marino, M. (2006). Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med*, 27(4), 299-402. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2006.07.001>
- Barakat, R., Oakley, O., Kim, H., Jin, J., & Ko, C. J. (2016). Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function. *BMB Rep*, 49(9), 488-496. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2016.49.9.141>
- Batistela, V. R., Pellosi, D. S., de Souza, F. D., da Costa, W. F., de Oliveira Santin, S. M., de Souza, V. R., . . . Hioka, N. (2011). pKa determinations of xanthene derivates in aqueous solutions by multivariate analysis applied to UV-Vis spectrophotometric data. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 79(5), 889-897. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.03.027>
- Björnström, L., & Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol*, 19(4), 833-842. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0486>
- Bowers, S. L., Banerjee, I., & Baudino, T. A. (2010). The extracellular matrix: at the center of it all. *J Mol Cell Cardiol*, 48(3), 474-482. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.08.024>
- Brunton, L., Lazo, J., & Parker, K. (2007). *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la TERAPÉUTICA* (11va ed.). McGraw-Hill.
- Cabanelas, L. A., Carbonel, A. A., dos Santos, M. A., Simões, R. S., Liberatori-Filho, A. W., Baracat, E. C., & Soares Júnior, J. M. (2012). [Cardiomyocytes morphology and collagen quantification in the myocardium of female rats treated with isoflavones or estrogens]. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 34(10), 447-452. <https://doi.org/10.1590/s0100-72032012001000003>
- Cagnacci, A., & Venier, M. (2019). The Controversial History of Hormone Replacement Therapy. *Medicina (Kaunas)*, 55(9). <https://doi.org/10.3390/medicina55090602>
- Carson, F., & Hladik, C. (2009). *Histotechnology. A self-instructional text* (3 edición ed.). American Society for Clinical Pathology Press.
- Chambliss, K. L., & Shaul, P. W. (2002). Rapid activation of endothelial NO synthase by estrogen: evidence for a steroid receptor fast-action complex (SRFC) in caveolae. *Steroids*, 67(6), 413-419. [https://doi.org/10.1016/s0039-128x\(01\)00177-5](https://doi.org/10.1016/s0039-128x(01)00177-5)
- Cheskis, B. J., Greger, J. G., Nagpal, S., & Freedman, L. P. (2007). Signaling by estrogens. *J Cell Physiol*, 213(3), 610-617. <https://doi.org/10.1002/jcp.21253>
- Chiao, Y. A., Ramirez, T. A., Zamilpa, R., Okoronkwo, S. M., Dai, Q., Zhang, J., . . . Lindsey, M. L. (2012). Matrix metalloproteinase-9 deletion attenuates myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in ageing mice. *Cardiovasc Res*, 96(3), 444-455. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs275>
- Chung, M. T., Cheng, P. Y., Lam, K. K., Chen, S. Y., Ting, Y. F., Yen, M. H., & Lee, Y. M. (2010). Cardioprotective effects of long-term treatment with raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, on myocardial ischemia/reperfusion injury in ovariectomized rats. *Menopause*, 17(1), 127-134. <https://doi.org/10.1097/gme.0b013e3181b4c4ac>

- Creemers, E. E., & Pinto, Y. M. (2011). Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart. *Cardiovasc Res*, 89(2), 265-272. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq308>
- Cui, J., Shen, Y., & Li, R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med*, 19(3), 197-209. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.12.007>
- Davies, M., Sarri, G., & Lumsden, M. A. (2017). Diagnosis of the menopause: NICE guidance and quality standards. *Ann Clin Biochem*, 54(5), 516-518. <https://doi.org/10.1177/0004563217706381>
- de Almeida, S. A., Claudio, E. R. G., Mengal, V., Brasil, G. A., Merlo, E., Podratz, P. L., . . . de Abreu, G. R. (2018). Estrogen Therapy Worsens Cardiac Function and Remodeling and Reverses the Effects of Exercise Training After Myocardial Infarction in Ovariectomized Female Rats. *Front Physiol*, 9, 1242. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01242>
- DeLeon, C., Wang, D. Q., & Arnatt, C. K. (2020). G Protein-Coupled Estrogen Receptor, GPER1, Offers a Novel Target for the Treatment of Digestive Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, 578536. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.578536>
- Derayea, S., & Nagy, D. (2018). Application of a xanthene dye, eosin Y, as spectroscopic probe in chemical and pharmaceutical analysis; a review. *Reviews in Analytical Chemistry*, 37(3), 1-14.
- Do Rego, J. L., Seong, J. Y., Burel, D., Leprince, J., Luu-The, V., Tsutsui, K., . . . Vaudry, H. (2009). Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Front Neuroendocrinol*, 30(3), 259-301. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.05.006>
- Duncanson, E. R., & Mackey-Bojack, S. M. (2018). Histologic Examination of the Heart in the Forensic Autopsy. *Acad Forensic Pathol*, 8(3), 565-615. <https://doi.org/10.1177/1925362118797736>
- Fan, D., Takawale, A., Lee, J., & Kassiri, Z. (2012). Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 5(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-5-15>
- Finkelstein, J. S., Brockwell, S. E., Mehta, V., Greendale, G. A., Sowers, M. R., Ettinger, B., . . . Neer, R. M. (2008). Bone mineral density changes during the menopause transition in a multiethnic cohort of women. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(3), 861-868. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-1876>
- Frangogiannis, N. G. (2021). Cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res*, 117(6), 1450-1488. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa324>
- Frey, N., Katus, H. A., Olson, E. N., & Hill, J. A. (2004). Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation*, 109(13), 1580-1589. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000120390.68287.BB>
- Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 116, 135-170. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>
- Garcia, M., Mulvagh, S. L., Merz, C. N., Buring, J. E., & Manson, J. E. (2016). Cardiovascular Disease in Women: Clinical Perspectives. *Circ Res*, 118(8), 1273-1293. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.307547>
- Gersh, B. J., Maron, B. J., Bonow, R. O., Dearani, J. A., Fifer, M. A., Link, M. S., . . . Guidelines, A. C. o. C. F. A. H. A. T. F. o. P. (2011). 2011 ACCF/AHA Guideline for the Diagnosis and Treatment of Hypertrophic Cardiomyopathy: a report of the American College of Cardiology

- Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. Developed in collaboration with the American Association for Thoracic Surgery, American Society of Echocardiography, American Society of Nuclear Cardiology, Heart Failure Society of America, Heart Rhythm Society, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol*, 58(25), e212-260. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.06.011>
- Goodwill, A. G., Dick, G. M., Kiel, A. M., & Tune, J. D. (2017). Regulation of Coronary Blood Flow. *Compr Physiol*, 7(2), 321-382. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160016>
- Horio, T., Tokudome, T., Maki, T., Yoshihara, F., Suga, S., Nishikimi, T., . . . Kangawa, K. (2003). Gene expression, secretion, and autocrine action of C-type natriuretic peptide in cultured adult rat cardiac fibroblasts. *Endocrinology*, 144(6), 2279-2284. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0128>
- Iorga, A., Cunningham, C. M., Moazeni, S., Ruffenach, G., Umar, S., & Eghbali, M. (2017). The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. *Biol Sex Differ*, 8(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s13293-017-0152-8>
- Jankowski, M., Rachelska, G., Donghao, W., McCann, S. M., & Gutkowska, J. (2001). Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(20), 11765-11770. <https://doi.org/10.1073/pnas.201394198>
- Jia, M., Dahlman-Wright, K., & Gustafsson, J. (2015). Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 29(4), 557-568. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.04.008>
- Kapoor, C., Vaidya, S., Wadhwan, V., Kaur, G., Pathak, A., & Hitesh. (2016). Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). *J Cancer Res Ther*, 12(1), 28-35. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.157337>
- Kennedy, A., Finlay, D. D., Guldenring, D., Bond, R., Moran, K., & McLaughlin, J. (2016). The Cardiac Conduction System: Generation and Conduction of the Cardiac Impulse. *Crit Care Nurs Clin North Am*, 28(3), 269-279. <https://doi.org/10.1016/j.cnc.2016.04.001>
- Kessler, E. L., Rivaud, M. R., Vos, M. A., & van Veen, T. A. B. (2019). Sex-specific influence on cardiac structural remodeling and therapy in cardiovascular disease. *Biol Sex Differ*, 10(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13293-019-0223-0>
- Klein, D. A., Paradise, S. L., & Reeder, R. M. (2019). Amenorrhea: A Systematic Approach to Diagnosis and Management. *Am Fam Physician*, 100(1), 39-48.
- Klinge, C. M. (2020). Estrogenic control of mitochondrial function. *Redox Biol*, 31, 101435. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101435>
- Knowlton, A. A., & Lee, A. R. (2012). Estrogen and the cardiovascular system. *Pharmacol Ther*, 135(1), 54-70. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.03.007>
- Kurose, H. (2021). Cardiac Fibrosis and Fibroblasts. *Cells*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/cells10071716>
- Lam, K. K., Cheng, P. Y., Hsiao, G., Chen, S. Y., Shen, H. H., Yen, M. H., & Lee, Y. M. (2009). Estrogen deficiency-induced alterations of vascular MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 in ovariectomized rats. *Am J Hypertens*, 22(1), 27-34. <https://doi.org/10.1038/ajh.2008.306>
- Lekgabe, E. D., Royce, S. G., Hewitson, T. D., Tang, M. L., Zhao, C., Moore, X. L., . . . Samuel, C. S. (2006). The effects of relaxin and estrogen deficiency on collagen deposition and

- hypertrophy of nonreproductive organs. *Endocrinology*, 147(12), 5575-5583. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0533>
- Leonard, A. K., Loughran, E. A., Klymenko, Y., Liu, Y., Kim, O., Asem, M., . . . Stack, M. S. (2018). Methods for the visualization and analysis of extracellular matrix protein structure and degradation. *Methods Cell Biol*, 143, 79-95. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2017.08.005>
- Litwack, G. (2018). Human biochemistry. In (1a ed., pp. 761): Academic Press.
- Liu, M., López de Juan Abad, B., & Cheng, K. (2021). Cardiac fibrosis: Myofibroblast-mediated pathological regulation and drug delivery strategies. *Adv Drug Deliv Rev*, 173, 504-519. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.03.021>
- Lobo, R. A. (2017). Hormone-replacement therapy: current thinking. *Nat Rev Endocrinol*, 13(4), 220-231. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.164>
- Martínez, J., Montañó, J., Uribe, A., & Lemionet, D. (2014). Climaterio y menopausia. Guía de práctica clínica. In México: Colegio Mexicano de Especialistas en Ginecología y Obstetricia.
- Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. (2018). *Técnicas histológicas. Protocolos*. Facultad de Biología. Universidad de Vigo.
- Mehta, L. S., Beckie, T. M., DeVon, H. A., Grines, C. L., Krumholz, H. M., Johnson, M. N., . . . American Heart Association Cardiovascular Disease in Women and Special Populations Committee of the Council on Clinical Cardiology, C. o. E. a. P., Council on Cardiovascular and Stroke Nursing, and Council on Quality of Care and Outcomes Research. (2016). Acute Myocardial Infarction in Women: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 133(9), 916-947. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000351>
- Meloan, S., & Puchtler, H. (1987). "Harris Hematoxylin," what Harris really wrote and the mechanism of hemalum stains. *The journal of histotechnology*, 10(4), 257 - 261.
- Meschiari, C. A., Ero, O. K., Pan, H., Finkel, T., & Lindsey, M. L. (2017). The impact of aging on cardiac extracellular matrix. *Geroscience*, 39(1), 7-18. <https://doi.org/10.1007/s11357-017-9959-9>
- Miller, A. P., Feng, W., Xing, D., Weathington, N. M., Blalock, J. E., Chen, Y. F., & Oparil, S. (2004). Estrogen modulates inflammatory mediator expression and neutrophil chemotaxis in injured arteries. *Circulation*, 110(12), 1664-1669. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000142050.19488.C7>
- Mizukami, Y. (2010). In vivo functions of GPR30/GPER-1, a membrane receptor for estrogen: from discovery to functions in vivo. *Endocr J*, 57(2), 101-107. <https://doi.org/10.1507/endocrj.k09e-332>
- Monteleone, P., Mascagni, G., Giannini, A., Genazzani, A. R., & Simoncini, T. (2018). Symptoms of menopause - global prevalence, physiology and implications. *Nat Rev Endocrinol*, 14(4), 199-215. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.180>
- Mori, T., Kai, H., Kajimoto, H., Koga, M., Kudo, H., Takayama, N., . . . Imaizumi, T. (2011). Enhanced cardiac inflammation and fibrosis in ovariectomized hypertensive rats: a possible mechanism of diastolic dysfunction in postmenopausal women. *Hypertens Res*, 34(4), 496-502. <https://doi.org/10.1038/hr.2010.261>
- Namazi, M., Sadeghi, R., & Behboodi Moghadam, Z. (2019). Social Determinants of Health in Menopause: An Integrative Review. *Int J Womens Health*, 11, 637-647. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S228594>
- Nilsson, B. O., Olde, B., & Leeb-Lundberg, L. M. (2011). G protein-coupled oestrogen receptor 1 (GPER1)/GPR30: a new player in cardiovascular and metabolic oestrogenic signalling. *Br J Pharmacol*, 163(6), 1131-1139. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01235.x>

- Norman, A., & Henry, H. (2015). *Hormones* (3a ed.). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2009-0-02025-X>
- O'Donnell, A., & Yutzey, K. E. (2020). Mechanisms of heart valve development and disease. *Development*, 147(13). <https://doi.org/10.1242/dev.183020>
- O'Lone, R., Frith, M. C., Karlsson, E. K., & Hansen, U. (2004). Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol*, 18(8), 1859-1875. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0044>
- Olde, B., & Leeb-Lundberg, L. M. (2009). GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology. *Trends Endocrinol Metab*, 20(8), 409-416. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.04.006>
- Paciuc, J. (2020). Hormone Therapy in Menopause. *Adv Exp Med Biol*, 1242, 89-120. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-38474-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-38474-6_6)
- Papadopoulos, V., & Miller, W. L. (2012). Role of mitochondria in steroidogenesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 26(6), 771-790. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.002>
- Pawlina, W., & Ross, M. (2020). *Ross. Histología: Texto y atlas. Correlación con biología molecular y celular* (8 ed.). Wolters Kluber.
- Pearce, S. T., & Jordan, V. C. (2004). The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 50(1), 3-22. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2003.09.003>
- Pedram, A., Razandi, M., Aitkenhead, M., & Levin, E. R. (2005). Estrogen inhibits cardiomyocyte hypertrophy in vitro. Antagonism of calcineurin-related hypertrophy through induction of MCIP1. *J Biol Chem*, 280(28), 26339-26348. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414409200>
- Pedram, A., Razandi, M., O'Mahony, F., Lubahn, D., & Levin, E. R. (2010). Estrogen receptor-beta prevents cardiac fibrosis. *Mol Endocrinol*, 24(11), 2152-2165. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0154>
- Potter, B., Schragar, S., Dalby, J., Torell, E., & Hampton, A. (2018). Menopause. *Prim Care*, 45(4), 625-641. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2018.08.001>
- Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2011). The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*, 7(12), 715-726. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.122>
- PUCHTLER, H., & ISLER, H. (1958). The effect of phosphomolybdic acid on the stainability of connective tissues by various dyes. *J Histochem Cytochem*, 6(4), 265-270. <https://doi.org/10.1177/6.4.265>
- Pugach, E. K., Blenck, C. L., Dragavon, J. M., Langer, S. J., & Leinwand, L. A. (2016). Estrogen receptor profiling and activity in cardiac myocytes. *Mol Cell Endocrinol*, 431, 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.05.004>
- Périan, S., & Vanacker, J. M. (2020). GPER as a Receptor for Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs). *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, 545. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00545>
- Raftogianis, R., Creveling, C., Weinshilboum, R., & Weisz, J. (2000). Estrogen metabolism by conjugation. *J Natl Cancer Inst Monogr*(27), 113-124. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a024234>
- Saladin, K. (2013). *Anatomía y Fisiología. La unidad entre forma y función* (6 ed. ed.). McGraw Hill.
- Samak, M., Fatullayev, J., Sabashnikov, A., Zeriuoh, M., Schmack, B., Farag, M., . . . Weymann, A. (2016). Cardiac Hypertrophy: An Introduction to Molecular and Cellular Basis. *Med Sci Monit Basic Res*, 22, 75-79. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.900437>
- Samavat, H., & Kurzer, M. S. (2015). Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Lett*, 356(2 Pt A), 231-243. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.04.018>

- Sampias, C., & Rolls, G. (2022). Descripción general de la tinción con H&E: Una guía de mejores prácticas. 2022.
- Santen, R. J., & Simpson, E. (2019). History of Estrogen: Its Purification, Structure, Synthesis, Biologic Actions, and Clinical Implications. *Endocrinology*, 160(3), 605-625. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00529>
- Santoro, N., Roeca, C., Peters, B. A., & Neal-Perry, G. (2021). The Menopause Transition: Signs, Symptoms, and Management Options. *J Clin Endocrinol Metab*, 106(1), 1-15. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa764>
- Schirman-Hildesheim, T. D., Gershon, E., Litichever, N., Galiani, D., Ben-Aroya, N., Dekel, N., & Koch, Y. (2008). Local production of the gonadotropic hormones in the rat ovary. *Mol Cell Endocrinol*, 282(1-2), 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.11.014>
- Schlinger, B. A., Pradhan, D. S., & Soma, K. K. (2008). 3beta-HSD activates DHEA in the songbird brain. *Neurochem Int*, 52(4-5), 611-620. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.05.003>
- Takahashi, T. A., & Johnson, K. M. (2015). Menopause. *Med Clin North Am*, 99(3), 521-534. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2015.01.006>
- Tortora, G., & Derrickson, B. (2006). *Principios de Anatomía y Fisiología* (13 ed.). Editorial Médica Panamericana.
- van Eickels, M., Grohé, C., Cleutjens, J. P., Janssen, B. J., Wellens, H. J., & Doevendans, P. A. (2001). 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation*, 104(12), 1419-1423. <https://doi.org/10.1161/hc3601.095577>
- Wu, J., Dai, F., Li, C., & Zou, Y. (2020). Gender Differences in Cardiac Hypertrophy. *J Cardiovasc Transl Res*, 13(1), 73-84. <https://doi.org/10.1007/s12265-019-09907-z>
- Xu, Y., Arenas, I. A., Armstrong, S. J., & Davidge, S. T. (2003). Estrogen modulation of left ventricular remodeling in the aged heart. *Cardiovasc Res*, 57(2), 388-394. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(02\)00705-8](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(02)00705-8)
- Yabluchanskiy, A., Ma, Y., Chiao, Y. A., Lopez, E. F., Voorhees, A. P., Toba, H., . . . Jin, Y. F. (2014). Cardiac aging is initiated by matrix metalloproteinase-9-mediated endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 306(10), H1398-1407. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00090.2014>
- Zhao, G., Qiu, Y., Zhang, H. M., & Yang, D. (2019). Intercalated discs: cellular adhesion and signaling in heart health and diseases. *Heart Fail Rev*, 24(1), 115-132. <https://doi.org/10.1007/s10741-018-9743-7>
- Zhu, B. T., & Conney, A. H. (1998). Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis*, 19(1), 1-27. <https://doi.org/10.1093/carcin/19.1.1>

## 14. ANEXOS

Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán  
Colegio de Técnicos Académicos



Otorgan la presente

# CONSTANCIA

**A: Erik Pérez-García, Diana Ramírez-Hernández,  
Jazmín Flores-Monroy y Diego Lezama-Martínez**

Por haber obtenido el *segundo lugar* con el cartel

**Estudio histológico en miocardio de rata Wistar hembra ovariectomizada  
con terapia estrogénica temprana y tardía**

En el **5º Congreso Nacional de Tecnología**  
presentado el 19 de octubre de 2022.

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Estado de México, octubre de 2022.

  
**Dr. David Quintanar Guerrero**  
Director de la Facultad

  
**Mtro. Alan Olazábal Fenochio**  
Presidente del Colegio  
de Técnicos Académicos

**5º** Congreso Nacional de Tecnología  
**CONATEC 2022**  
"DIVULGACIÓN DE LA TECNOLOGÍA COMO SOPORTE DE LA ACADEMIA"



Folio: 202200388