UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



EFECTO DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A ARSÉNICO POR VÍA ORAL EN LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES HORMONALES EN OVARIO DE RATA WISTAR

QUE PRESENTA:

Ing. Susana Perrusquía Luévano

PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA



Chihuahua, Chih., a 22 de enero de 2021.

Oficio: 25/CA/SIP/21

Dr. Ildebrando Pérez Reyes Secretario de Investigación y Posgrado Facultad de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de Chihuahua P r e s e n t e:

Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: Efecto de la exposición crónica a arsénico por via oral en la expresión de receptores hormonales en ovario de rata Wistar, presentada por la estudiante ling. Susana Perrusquía Luévano alumna del programa de Maestría en Ciencias en Química.

Después de la revisión, indicamos a la tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

> Atentamente "Por la Ciencia para Bien del Hombre"

Dra. Margarita Levario Carrillo Asesora de tesis

Dra. Maria del Rocio Infante Ramirez Asesora de tesis Dra. Maria del Carmen González Horta Asesora de tesis

Dra. Blanca Estela Sánchez Ramírez Directora de tesis

Dr. Ildebrando Pérez Reyes Secretario de Investigación y Posgrado

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS SECRETARIA WIESDACIÓN Y POSUBADO

***El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.

> FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Circuito Universitario Campus Universitario #2 C.P. 31125 Tel. +52 (614) 236 6000 Chihushua, Chihushua, México http://www.fog.uach.mx





Chihuahua, Chih., a 20 de enero del 2021

Dr. Ildebrando Pérez Reyes Secretario de Investigación y Posgrado Facultad de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de Chihuahua P r e s e n t e

En mi calidad de Directora de la tesis intitulada "EFECTO DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A ARSÉNICO POR VÍA ORAL EN LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES HORMONALES EN OVARIO DE RATA WISTAR", presentada por la pasante de la Maestría en Ciencias en Biotecnología Susana Perrusquía Lúevano, me permito hacer de su conocimiento que después de revisar y hacer las indicaciones correspondientes a la tesista sobre las correcciones que necesario efectuar y habiéndolas realizado, extiendo la presente:

LIBERACIÓN DE TESIS

Manifiesto que la tesis, de la cual adjunto una copia, ha cumplido con los objetivos señalados por lo que se considra que puede proceder a los trámites para su revisiónpor el Comité de Tesis para la obtención del grado.

Sin otro particular por el momento, quedamos de Usted.

Atentamente.

Directora de Tesis

D. en C. Blanca Estela Sanchez Ramírez

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Biotecnología III de la Secretaria de
Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas en la Universidad Autónoma de Chihuahua. El autor del trabajo recibió beca del Consejo
Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; No de registro 963530).

DEDICATORIA

"Cuando por las noches mires al cielo, al pensar que en una de aquellas estrellas estoy yo riendo, será para ti como si todas las estrellas riesen. ¡Tú sólo tendrás estrellas que saben reír!"

-Antoine de Saint-Exupéry El principito

A mi mami, que es la estrella más brillante en el cielo y que desde ahí me ha guiado y acompañado en esta hermosa etapa.

A mi papá, que no se rinde jamás y nunca ha dejado de apoyarme, por motivarme siempre a aprender más cada día.

¡Los amo con todo lo que soy!

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a Dios por brindarme el hermoso regalo de la vida, por darme una hermosa familia y bendecirme cada día. Gracias por ayudarme a concluir esta etapa de mi vida y darme la fuerza que necesité en cada paso que di durante este camino.

A mi mamá, porque sé que fuiste tu quien me mostró este camino, porque sabías que necesitaba una motivación tras tu partida, estoy segura que pusiste a las personas en el tiempo y el lugar exacto, todo se acomodó de manera perfecta para que pudiera aprovechar esta oportunidad. Y aunque físicamente ya no estás, sé que nunca dejas de cuidarme, siempre estas a mi lado. Te extraño y siempre me harás falta.

A mi papá, por nunca dejar de apoyarme, que en cualquier situación donde quise tirar la toalla siempre sabías que decirme para impulsarme, agradezco enormemente que nunca dudas de mis capacidades y habilidades, y que a pesar de que esta experiencia nos puso a algunos kilómetros de distancia, solo con escuchar tu voz te siento al lado mío. Gracias por demostrarme día con día la confianza que tienes en mí, que fue un reto para ti verme volar del nido, al igual que para mí hacerlo, pero que hasta el día de hoy me siento orgullosa de lo que hemos logrado juntos durante todos estos años de vida que tengo.

Gracias papás, por sus esfuerzos, por las bases y los valores que han cimentado en mí, porque gracias a ustedes soy lo que soy. ¡Los amo infinitamente!

A mi hermano, que, a pesar de nuestras diferencias, sé que siempre estaremos el uno para el otro. En muchas ocasiones me sentí como la hermana menor en lugar de ser la mayor y eso me demuestra que, aunque eres joven aún, mis papás hicieron un excelente trabajo contigo. Eres una persona brillante, capaz y noble, y estoy segura de que te espera un futuro prometedor. ¡Te amo bicho!

A la Dra. Blanca, por aceptarme como su tesista, aun sabiendo mis deficiencias en el área biológica. Gracias por ser mi madre académica, por apoyarme y guiarme durante esta grata experiencia. Gracias por su paciencia ante mis nulos conocimientos de inmunología, pero desde que tomé esa materia con usted, me encantó. Gracias por su cariño, tiempo y su confianza. Es un gran ejemplo a seguir.

A la Dra. Carmen por todos conocimientos que me brindó, pero sobre todo por la paciencia que me tuvo en bioquímica. ¡Caray! me hizo sudar la gota gorda. Gracias por sus consejos y risas compartidas. A la Dra. Rocío por ayudarme a comprender y esclarecer dudas que se me presentaron, por las observaciones realizadas para presentar siempre un mejor trabajo, por las risas en clases y su buena vibra que siempre transmite. A la Dra. Margarita por el apoyo que me brindo y los conocimientos que me enseñó y los que reforzó en mi en el área de estadística, por su disposición y siempre trato amable hacia mi persona. A la Dra. Luly por abrirme las puertas de su laboratorio cuando lo necesité y permitirme culminar mi tesis siempre con los brazos abiertos y una enorme sonrisa.

Sin duda, una de las experiencias más bonitas y que nunca cambiaría fue el conocer a mis compañeros de generación, a esos 3 muchachones que como me dan carrilla, pero se han ganado un buen pedazo de mi corazón. Fito, Daniel, Rodrigo, ustedes saben bien que son mi familia y que los quiero mucho. Fito gracias por abrirme las puertas de tu casa y presentarme a Jacky, quien también es como una hermana para mí, por ser mi confidente y escuchar mis podcasts siempre jaja. Daniel ¿qué te puedo decir? Creo que todo se resume a Mötley Crüe... Rodrigo, en verdad siempre voy a admirar lo inteligente que eres y siempre agradeceré tu disposición de apoyarme cuando algo se me dificultaba, siempre recordaré la tremenda carrilla que me dabas jaja. Creo que me quede corta de palabras aquí sobre lo mucho que significan para mí, pero pues ustedes ya me conocen, así que escribirlo está de más.

También quiero agradecer las risas y las tazas de café compartidas con Ale, Benja, Lalo, Omar, Alex, Velvett, Denisse... Gracias por su amistad y cariño. Los quiero.

A todos los profesores que me dieron clase, que me aceptaron y me hicieron crecer no solo profesionalmente, sino también como persona. A mis compañeros de laboratorio, Biotecnología III, por compartir sus experiencias, conocimientos, por los momentos que viví a su lado, así como también el apoyo que me brindaron con mis ratitas. Muchas gracias.

A Francisco, por llegar a mi vida cuando menos lo esperaba y ser lo que necesitaba, por animarme, motivarme y apoyarme en el último tirón. Por tus abrazos que me llenan de paz y tranquilidad. Pero sobre todo por hacerme muy feliz. Muchas gracias por todo, te quiero.

A mis amigos y familiares, mi tía Fina, Maggie, Luis Javier, Christi, Viviana, Marlene, Gris, Lupita, Clari, Mony, Evelyn, Pedro, Néstor, Adolfo... quienes siempre han estado ahí para apoyarme a pesar de la distancia.

También quiero agradecer el apoyo del personal del Laboratorio de Anatomía Patológica y Citológica Exfoliativa a cargo del Dr. Ernesto Ramos Martínez para la realización de los cortes histológicos. A la maestra Carmen Avitia quien me contactó con la Q.B.P. María Del Carmen Gámez del Laboratorio Clínico LACE donde me facilitaron su microscopio para continuar con mi trabajo de tesis.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN	4
3.	ANTECEDENTES GENERALES	7
3.1.	Generalidades del Arsénico	7
3.2.	Exposición mundial a As	7
3.3.	Efectos sistémicos de la exposición a Arsénico	9
3.4.	Efectos en la salud reproductiva	11
3.5.	Fisiología endocrina	12
3.6.	Fisiología del ovario mamífero	13
3.7.	Esteroidogénesis	17
3.8.	Receptores hormonales	19
3.8.1.	Receptor de estrógenos	20
3.8.2.	Receptor de progesterona.	24
3.9.	Antecedentes particulares	30
4.	OBJETIVOS TÉCNICOS	35
4.1.	Objetivo General	35
4.2.	Objetivos Particulares	35
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	37
5.1.	Reactivos	37
5.2.	Equipo	37
5.3.	Materiales	38
5.4.	Soluciones	38
5.5.	Metodología	40
5.5.1.	Estrategia Experimental	40
5.5.2.	Protocolo de exposición en animales	41
5.5.3.	Determinación del ciclo estral mediante lavado vaginal	41
5.5.4.	Tinción citológica con Kit Hemocolorante rápido Hycel	42

5.5.5.	Tinción citológica con Wright.	. 42
5.5.6.	Citología vaginal.	. 42
5.6.	Características del ciclo estral en rata	. 43
5.6.1.	Pesaje	. 44
5.6.2.	Sacrificio y obtención de muestras	. 44
5.7.	Procesado de muestras	. 44
5.8.	Determinación de niveles de FSH, LH, estradiol y progesterona séricos	. 45
5.8.1.	Fundamento de cuantificación quimioluminiscencia	. 45
5.9.	Cuantificación de As inorgánico en tejido	. 45
5.10.	Silanización de portaobjetos	. 46
5.10.1	. Cortes histológicos	. 46
5.10.2	2. Protocolo.	. 47
5.11.	Tinción de H&E	. 48
5.11.1	. Protocolo.	. 48
5.12.	Análisis de las alteraciones morfológicas tras la exposición a NaAsO2	. 49
5.12.1	. Fibrosis	. 51
5.12.2	2. Congestión vascular	. 51
5.13.	Inmunolocalización	. 51
5.13.1	. Procedimiento	. 52
5.14.	Inmunohistoquímica (IHQ)	. 53
5.14.1	. Procedimiento	. 53
5.15.	Análisis de imágenes	. 55
5.16.	Análisis estadístico	. 55
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	. 57
6.1.	Parámetros reproductivos	. 57
6.2.	Análisis del ciclo estral	. 57
6.3.	Concentración de As inorgánico en tejido hepático	. 59
6.4.	Alteraciones en el desarrollo folicular debidas a la exposición a NaAsO2	. 60
6.5.	Alteraciones morfológicas ováricas tras la exposición a NaAsO ₂	. 64



	Efecto de la exposición a NaAsO ₂ en los niveles séricos de LH, FSH, es sterona.	
6.7.	Localización inmunohistoquímica de receptores hormonales	. 69
	Efecto de la exposición a NaAsO₂ en la expresión de receptores hormonale PR	
7.	CONCLUSIONES	. 76
8.	PERSPECTIVAS	. 79
9.	REFERENCIAS	. 80
APÉN	IDICE I	. 88
APÉN	IDICE II	. 90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.Desarrollo folicular	. 16
Figura 2. Síntesis de hormonas esteroides gonadales	. 18
Figura 3. Interacción entre las células de la granulosa y de la teca	. 19
Figura 4. Fases del ciclo estral en rata	. 43
Figura 5. Pasos para la realización de cortes histológicos	. 48
Figura 6. Cortes histológicos de ovario de rata teñidos con H&E	. 49
Figura 7. Clasificación de folículos ováricos	. 50
Figura 8. Secuencia del ciclo estral en rata	. 59
Figura 9. Efecto de la exposición a NaAsO2 en el desarrollo folicular	. 63
Figura 10. Efecto de la exposición a NaAsO ₂ en los niveles séricos de LH, estradio	ol y
progesterona	. 67
Figura 11. Localización inmunohistoquímica del ERα en las células de la teca en ova	ario
de ratade	. 69
Figura 12. Localización inmunohistoquímica del ERβ en las células de la teca en ova	ario
de ratade	.70
Figura 13. Localización inmunohistoquímica del PR en las células de la teca en ova	ario
de ratade	.70
Figura 14. Efecto de la exposición a NaAsO $_2$ en la expresión de receptores ER α , EF	≀β у
PR en ovario de rata	.71
Figura 15. Efecto del As en expresión de receptores hormonales en ovario	.78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Genes dependientes de estrógenos mediados por ERE	22
Tabla II Tipos de ligandos a Receptores de Estrógenos	24
Tabla III. Genes y proteínas dependientes de progesterona	28
Tabla IV. Estudios de exposición a As realizados en modelos murinos, dosis y	efectos
en la salud reproductiva	34
Tabla V. Determinación de la fase del ciclo estral	43
Tabla VI. Criterios para la clasificación folicular	50
Tabla VII. Parámetros corporales y gestacionales de los animales de los dife	erentes
grupos de estudio	57
Tabla VIII. Progresión del ciclo estral tras 22 días de exposición a NaAsO2	59
Tabla IX. Concentración de As presente en el tejido hepático	59
Tabla X. Desarrollo folicular en ratas expuestas a NaAsO ₂	62
Tabla XI. Alteraciones morfológicas encontradas en los grupos de estudio	64

1. RESUMEN

El arsénico (As) tiene potentes efectos tóxicos carcinogénicos y no carcinogénicos. Entre los no carcinogénicos, la exposición crónica a As produce efectos adversos a la salud reproductiva femenina. Se ha reportado que la exposición a As a través del agua de consumo incrementa los abortos espontáneos, partos prematuros, mortinatos e infertilidad. Los estudios sobre los efectos del As en la fisiología ovárica son escasos; alteraciones en los niveles hormonales y el incremento de folículos atrésicos han sido reportados. El objetivo de este trabajo fue analizar la expresión de los receptores hormonales de estrógenos (ERα y ERβ) y progesterona (PR) en ovarios de ratas Wistar expuestas a arsenito de sodio (NaAsO₂). Con este propósito ratas hembra de 2 meses de edad fueron expuestas a 0 ó 50 ppm de NaAsO₂ vía oral durante ≥28 días. Los animales se sacrificaron previa anestesia en la fase de proestro (FP) o diestro (FD) del ciclo estral (n=10), el cual se evaluó mediante tinción. Se determinaron los niveles séricos de gonadotropinas (LH y FSH), estradiol y progesterona, las alteraciones morfológicas se evaluaron por tinción H&E y la expresión de los receptores se determinó mediante inmunohistoquímica utilizando anticuerpos monoclonales comerciales y análisis de imágenes.

Los resultados mostraron que los efectos del NaAsO₂, en los ovarios de ratas expuestas, se asociaron a la FP y FD principalmente, con un incremento significativo en los folículos preantrales (p<0.01) y en los cuerpos lúteos maduros (p<0.05). Se detectó una disrupción del ciclo estral manifestada por alteración en la duración y sucesión de las fases de este. Aunque la FSH no fue detectable en las fases ni en los animales control ni en los expuestos, la LH en la FP mostró una disminución significativa y durante la FD el estradiol aumentó de manera considerable (p<0.05) en los animales expuestos. Los niveles de expresión de las proteínas de los receptores mostraron un incremento significativo de los ER β y PR (p<0.01) en la FP, mientras que en la FD hubo una disminución significativa (p<0.01) de la señal para los ER α y ER β .

Estos resultados nos permiten concluir que la exposición a As causa una disminución de los receptores $ER\alpha$ y $ER\beta$ en la FD, la cual posiblemente sea mediada por retroalimentación debido al incremento de estradiol en los animales expuestos.

Mientras que, en la FP, hubo una disminución de los ER α . Las alteraciones en la progresión del ciclo estral podrían ser el resultado de cambios en los niveles hormonales, probablemente a través de un mecanismo de activina A o del factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1). Sin embargo, estudios específicos son necesarios para confirmar este hecho.

ABSTRACT

Arsenic (As) has potent carcinogenic and non-carcinogenic toxic effects. Among the non-carcinogenic, chronic exposure to As produces severe adverse effects on female reproductive health. It has been reported that As exposure through drinking water produces an increase in spontaneous abortions, premature births, stillbirths, and infertility. Studies about the effects on ovarian physiology are scarce; alterations in hormonal levels and increased atretic follicles were reported. The objective of this work was to analyze the expression of estrogen (ER α y ER β) and progesterone (PR) receptors in ovaries of Wistar rats exposed to sodium arsenite (NaAsO₂). For this purpose, 2-monthold female rats were exposed to 0 or 50 ppm of NaAsO₂ orally for ≥28 days. The animals were sacrificed previous anesthesia in the proestrus (FP) or diestrus (FD) phase of the estrous cycle (n = 10), which was evaluated by staining. Gonadotropins (LH and FSH), estradiol, and progesterone serum levels were analyzed; morphological alterations were assessed by H&E staining, and receptor expression was determined by immunohistochemical analysis (IHQ) using commercial monoclonal antibodies and image analysis. Results showed that effects of NaAsO2 in the ovaries of exposed rats were mainly associated with FP and FD, increasing the preantral follicles (p <0.01) and mature corpora lutea (p <0.05) significantly. A disruption of the estrous cycle was detected, manifested by an alteration in its phases' duration and succession. Although FSH was not detectable in both estrous phases neither in control nor in the exposed animals, in the exposed animals, the LH showed a significant decrease in the FP, and estradiol increased considerably (p <0.05) in the DF. The protein receptor expression levels showed a significant increase in ERβ and PR (p <0.01) in FP, while in DF, there was a significant decrease (p <0.01) of the signal for ER α and ER β . These results allow us to conclude that exposure to As in DF causes a reduction in ER α and ER β receptors, which are possibly mediated by a feedback mechanism resulting from the increment in exposed animals' estradiol levels. Meanwhile, in FP, As exposure induces a decrease in ER α . The alterations on the progression of the estrous cycle could be the result of changes in hormonal levels, probably through an activin A or the factor of transforming growth β1 (TGF $-\beta$ 1) mechanism. However, specific studies are necessary to confirm this fact.

2. INTRODUCCIÓN

El arsénico (As) es un metaloide natural que se encuentra ampliamente distribuido en el mundo al que se reconoce por ser un agente tóxico y mutagénico. En la actualidad, alrededor de 200 millones de personas están expuestas a altas concentraciones de As, lo cual compromete la salud de estos individuos. Entre los efectos que el As tiene sobre la salud se encuentran varios tipos de cáncer (pulmón, hígado, riñón, vejiga, piel), así como desordenes no carcinogénicos como enfermedades cardiovasculares, problemas reproductivos y de desarrollo (Buchet & Lison, 2000; McClintock *et al.*, 2012; Smeester & Fry, 2018)

Se ha demostrado que en el estado de Chihuahua existen altas concentraciones de As en fuentes de agua natural, lo cual es una problemática de interés en el sector salud.

Varios estudios plantean la posibilidad de que el As actúe como disruptor endocrino del sistema reproductor femenino (Chatterjee & Chatterji, 2010; Chattopadhyay & Ghosh, 2010; S. Chattopadhyay, S. Ghosh, S. Chaki, J. Debnath, & D. Ghosh, 1999). En las últimas décadas, se tenido una mayor incidencia de abortos espontáneos y partos prematuros, en mujeres que se encuentran expuestas a fuentes de agua potable contaminadas con concentraciones mayores de 10 ppb de As, también se ha demostrado que esta exposición afecta la salud materna y la del recién nacido (Polin *et al.*, 2011; Smeester & Fry, 2018).

La información respecto al mecanismo de acción del As en la función esteroidogénica ovárica es muy escasa, se ha reportado que altos niveles de As son responsables de la supresión esteroidogénica y del aumento de la esteroidogénesis adrenocortical (Davey, Bodwell, Gosse, & Hamilton, 2007).

Las gónadas femeninas son los ovarios que, junto con el útero y las trompas de Falopio, constituyen el tracto reproductivo femenino. La función gonadal se encuentra dirigida por el eje hipotálamo-hipófisis, y es en el lóbulo anterior de la hipófisis la encargada de la producción de las gonadotropinas, la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), estas hormonas son necesarias para la correcta

esteroidogénesis. La secreción de las hormonas esteroides, el estradiol y la progesterona, estimuladas por FHS y LH, , influyen directamente en el funcionamiento de los órganos del sistema reproductor (S. Chattopadhyay *et al.*, 1999).

La esteroidogénesis ovárica tiene lugar en los folículos ováricos mediante interacciones entre las células de la teca y la granulosa. Las células de la teca se encargan de la producción de estradiol y las células del cuerpo lúteo de la síntesis y secreción de progesterona (Lee *et al.*, 2009; Pelletier, Labrie, & Labrie, 2000).

Los estrógenos y la progesterona actúan a través de sus receptores, proteínas altamente especializadas en comunicar el medio intracelular con el extracelular y se encargan de regular el funcionamiento de los órganos del sistema reproductor. Los estrógenos son las principales hormonas sexuales femeninas y tienen roles importantes tanto en el sistema reproductivo como a nivel sistémico. Se conocen dos isoformas del receptor de estrógenos (RE), α y β, REα presenta mayor afinidad que el REβ por el estradiol (Jakimiuk, Weitsman, Yen, Bogusiewicz, & Magoffin, 2002; Khristi *et al.*, 2018; Liew *et al.*, 2011). La progesterona, por su parte, tiene numerosas funciones como la preparación del útero para la implantación del óvulo fecundado y la regulación de las contracciones del oviducto para transportar el óvulo al útero, esta actúa también a través de receptores (PR) los cuales tienen alta afinidad por la progesterona y se encuentra en tejidos como el cuerpo lúteo, útero, glándulas mamarias, cerebro, páncreas, ovario, huesos (Bellido & Bellido, 1999; Edwards, 2005; D. P. Edwards, S. E. Wardell, & V. Boonyaratanakornkit, 2002; Graham & Clarke, 1997).

Con la finalidad de establecer un modelo para estudiar cómo afecta el As en la salud reproductiva humana se ha optado por realizar estudios experimentales en roedores. Estudios en ratas gestantes expuestas a 50 ppm de arsenito de sodio en agua potable mostraron que, no obstante que los ciclos completos de gravidez y lactancia no se vieron afectados, los niveles de testosterona y estradiol aumentaron (Bourguignon *et al.*, 2017). Sin embargo, las consecuencias en las madres se presentaron posteriormente, se alteró su ciclo estral, se disminuyeron los niveles de estradiol, incrementos en la FSH y una menor cantidad de folículos preovulatorios, adicionalmente se alteraron las características morfológicas en los ovarios, con un aumento en el número

de quistes, lo cual sugiere un sistema reproductivo deteriorado (Dávila-Esqueda *et al.*, 2012). También se ha planteado que el As puede interferir en el funcionamiento de los receptores de estrógenos, ya que el As es capaz de imitar los efectos del estradiol, aunque se desconoce el mecanismo exacto de acción (Chatterjee & Chatterji, 2010). También existe evidencia, de que cuando se presenta una exposición a As, la funcionalidad *in vivo* de las hormonas FSH y LH se ven disminuidas (Chatterjee & Chatterji, 2010; Chattopadhyay & Ghosh, 2010; S. Chattopadhyay *et al.*, 1999; Davey *et al.*, 2007). En cuanto a la información sobre el efecto de la exposición a As en los niveles de expresión de los receptores ER se ha encontrado una disminución en tejido uterino (Chatterjee & Chatterji, 2010), sin embargo no hay información sobre la expresión de este receptor en tejido ovárico, además de que no se consideran ambas isoformas de este receptor, por otra parte, no hay reportes sobre la expresión del PR en ovario.

El propósito de esta investigación es analizar el efecto de la exposición crónica a As en la expresión de los ER (α y β) y los PR en ovario de rata Wistar, con la finalidad de que los resultados que se obtengan aporten indicios acerca de los mecanismos involucrados en la disrupción observada en el sistema endocrino en murinos y que potencialmente podrían tener relevancia en el mejoramiento de la salud reproductiva femenina en humanos expuestos a As.

3. ANTECEDENTES GENERALES

3.1. Generalidades del Arsénico

El arsénico (As) es un metaloide natural y es muy conocido por tener efectos tóxicos mutagénicos. Este elemento se encuentra presente en todas las partes del medio ambiente y puede ser liberado de manera natural o por fuentes antropogénicas (Chatterjee & Chatterji, 2010).

El As se encuentra de manera natural en la corteza terrestre, este mineral es liberado de manera natural mediante la actividad volcánica, así como también por la erosión de depósitos minerales. Entre las fuentes antropogénicas se encuentran el uso de herbicidas y plaguicidas (Kumar, 2018). También los residuos de las actividades mineras y de fundición (Buchet & Lison, 2000). La fuente que tiene el mayor impacto es la extracción de agua a través de pozos, donde su ubicación se caracteriza por ser suelos ricos en minerales como el As.

Existen más de 100 minerales que contienen As, este se puede encontrar en su estado tri o pentavalente. La forma trivalente del arsénico se encuentra sólo bajo condiciones anaeróbicas (Buchet & Lison, 2000).

3.2. Exposición mundial a As

La problemática del As incluye aproximadamente 105 países en el mundo donde se ha detectado que la población se encuentra expuesta a envenenamiento por arsénico, la cifra de esta población asciende a los 200 millones de personas. Entre los países con mayor incidencia de As en fuentes de agua potable se encuentra: India, Bangladesh, Taiwán, Estados Unidos, Alemania, Japón, Australia (Chatterjee & Chatterji, 2010).

Se calcula que por los menos 4.5 millones de personas en Latinoamérica están expuestos a concentraciones altas de As de manera crónica, estas concentraciones van desde los 50 µg/L hasta los 2000 µg/L en fuentes de agua potable (McClintock *et al.,* 2012). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció que el límite máximo permisible de arsénico en el agua potable es de 0.01 mg/L, lo que es equivalente a 10 ppb o 10 µg/L (OMS, 2011).

Otra fuente de exposición a As para la población que se ha detectado en países como Bolivia, México, Brasil, Chile, Ecuador, El Salvador y Honduras es en consumibles como pescado, leche de vaca, granos y vegetales. En México, se ha demostrado que la leche de vaca contiene As (McClintock *et al.*, 2012).

Las fuentes de contaminación por As en México radican en el Cinturón Volcánico Transmexicano, el uso de plaguicidas a base de arsénico y en las actividades mineras. Entre los estados donde se han detectado altas concentraciones de As destacan Durango, Coahuila, Zacatecas, Morelos, Aguascalientes, Chihuahua, Puebla, Nuevo León, Guanajuato, Jalisco, Oaxaca y San Luis Potosí (McClintock *et al.*, 2012).

El estado de Chihuahua se caracteriza por ser una entidad desértica y con un alto contenido de depósitos minerales; ante la falta de fuentes de abastecimiento superficiales, ha sido necesaria la extracción del líquido vital desde el subsuelo mediante pozos profundos, siendo esta el agua que ha tenido contacto con minerales como el As (Alarcón, Leal, Martín, Miranda, & Benavides, 2014).

En estudios anteriores, se ha demostrado que gran parte de la población residente del estado, está expuesta a altas concentraciones de As inorgánico en el agua potable, por ejemplo, en Jiménez se ha registrado una concentración de 1.53 mg/L de As. Se estima que un 67% del agua subterránea del estado de Chihuahua presenta concentraciones por encima del límite máximo permisible por la normatividad mexicana, establecidos en 0.025 mg/L ó 25 ppb (Alarcón et al., 2014). Altas concentraciones de As en el agua potable pueden ser detectadas en Julimes, Jiménez, Meoqui, Coronado y Satevó, también, aunque en menor concentración en la Cd. Chihuahua y Saucillo.

La exposición crónica a altos niveles de arsénico inorgánico en el agua potable representa un riesgo significativo para los residentes del suroeste de Chihuahua, González Horta *et al.* (2015) demostraron que el 81.9% de la población en municipios como Meoqui, Julimes, Satevó, Coronado, Delicias, Jiménez, también, aunque en menor concentración en la Cd. Chihuahua y Saucillo beben agua con concentraciones de As por encima del máximo nivel permitido, estas concentraciones son desde 10 a 100 μg/L.

3.3. Efectos sistémicos de la exposición a Arsénico

El As en el agua potable es una de las problemáticas que mayor peso tiene en el mundo, ya que el arsenito de sodio es muy soluble en el agua lo cual facilita el ingreso de As a los organismos que la consumen, comprometiendo así su salud (Dávila-Esqueda et al., 2012). El ingreso de As al cuerpo principalmente se debe a la ingesta o a la inhalación, debido a que la absorción dérmica es menor (ATSDR, 2009). Una vez ingeridas, las formas solubles de arsénico se absorben fácilmente del tracto gastrointestinal al torrente sanguíneo y se distribuyen a los órganos y/o tejidos después de pasar por el hígado (Buchet & Lison, 2000).

El mecanismo de desintoxicación requiere que el arsenato (As^V) sea reducido a arsenito (As^{III}) y este a su vez pueda ser metilado, acción llevada a cabo en el hígado, así los metabolitos resultantes pueden ser excretados con mayor facilidad. La eficiencia de la metilación se ve comprometida a altas dosis de As, por lo tanto, cuando una persona continúa expuesta, puede sobrepasar la capacidad del hígado provocando que se acumule el As en tejidos blandos. En cambio, cuando se trata de una sola exposición, la vida media del As inorgánico es de aproximadamente 10 horas. Cerca del 70% del arsénico es excretado mediante la orina, el resto a través de la piel, cabello, uñas, heces y sudor (ATSDR, 2009).

El As^{III} tiene afinidad por los grupos sulfhídricos y como consecuencia, afecta a las enzimas que los contiene causando efectos críticos enzimáticos, entre ellos la reducción de la fosforilación oxidativa, afecta la gluconeogénesis, inhibe la ruta de oxidación del piruvato y por consiguiente afecta el ciclo del ácido cítrico (ATSDR, 2009). Además, esta misma afinidad se ve demostrada en cuanto a los receptores hormonales que contienen grupos tioles, el As se une a estos receptores evitando que los esteroides lo hagan. Se tiene evidencia de que el As puede causar daño en el sistema respiratorio, hematológico, neurológico, cardiovascular y gastrointestinal (ATSDR, 2009). El As^{III} tiene efectos diabetogénicos ya que inhibe la captación de la glucosa estimulada por insulina por los adipocitos 3T3-L1 mediante la inhibición de la PDK-1 y de la fosforilación catalizada por PDK-1/2 de PKB/Akt (Paul, Harmon, Devesa, Thomas, & Stýblo, 2007). La exposición crónica a arsénico inhibe la oxidación del glutatión e incrementa el estrés

oxidativo en las células β pancreáticas, las cuales son altamente responsivas al incremento de la concentración de glucosa. La diabetes tipo 2 está asociada a la disfunción de las células β y de la resistencia a la insulina. Las células β sanas son capaces de compensar la resistencia a la insulina mediante el incremento de la secreción de insulina o de la masa de las células β (Fu *et al.*, 2010).

El arsénico es reconocido como un carcinógeno humano con sitios objetivos de cáncer como los pulmones, hígado, riñón, vejiga y la piel (Xu, Tokar, & Waalkes, 2014) y se ha relacionado con varios desórdenes no cancerosos, como son problemas circulatorios y de los nervios periféricos (Dávila-Esqueda *et al.*, 2012), además de enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico, problemas reproductivos y de desarrollo (Chatterjee & Chatterji, 2010).

El arsenito de sodio (NaAsO₂) es la forma más tóxica en la que se puede encontrar el arsénico; es más tóxico que el pentóxido de arsénico, además de que su solubilidad es más alta (Dávila-Esqueda *et al.*, 2012). El As inorgánico es más tóxico que la forma orgánica, y de ésta, su forma trivalente es más potente que su forma pentavalente.

La absorción de arsénico inorgánico resulta en la distribución del elemento través del cuerpo presentando afinidad relativa por uñas y cabello; la biotransformación del arsénico involucra un proceso de reducción-metilación el cual ocurre principalmente en el hígado y conlleva a la formación de ácidos metilarsónico y metilarsínico (Buchet & Lison, 2000). Kitchin (2001) sugiere que estas formas son más tóxicas que el arsénico inorgánico, ya que los metabolitos metilados de As trivalente tienen una alta altividad biológica, puesto que pueden interactuar con objetivos celulares como proteínas y DNA. Los mecanismos de acción involucrados incluyen efectos epigenéticos, principalmente hipometilación del DNA, inmunosupresión (Vahter, 2008), cabe destacar que el As puede aumentar la incidencia de mutaciones de manera indirecta por medio de la alteración de los mecanismos de reparación del DNA actuando como un co-cancerígeno o como un promotor de crecimiento tumoral (Buchet & Lison, 2000). Adicionalmente, se ha reportado que la exposición a As produce disfunción endocrina tanto en la exposición directa, como en la exposición *in útero* debido a que los metabolitos metilados atraviesan fácilmente la placenta y se ha reportado un incremento en el riesgo de deterioro del

crecimiento fetal, así como también incrementan los efectos adversos durante la niñez temprana (Vahter, 2008).

3.4. Efectos en la salud reproductiva

La información respecto al mecanismo de acción del As en la función esteroidogénica ovárica y el eje reproductor femenino es muy escasa, sin embargo, se conoce que las mujeres que han estado expuestas a concentraciones mayores a 10 ppb de As a través del agua de consumo incrementan su posibilidad a sufrir abortos espontáneos y mortinatos, así mismo, se ha visto que las madres expuestas a As afectan la salud del recién nacido ocasionando un bajo peso al nacer así como la predisposición a tener un desarrollo cognitivo deteriorado y un aumento en la incidencia de carcinoma tanto en la madre como en el recién nacido en su etapa adulta (Chatterjee & Chatterji, 2010).

También se ha reportado casos de aborto espontáneo, bajo peso al nacer y reducción de la lactancia en países como Ucrania, Taiwán y Bangladesh, relacionadas con el consumo de agua contaminada con As. Además de una elevada tasa de muerte fetal y aborto espontáneo en Bengala Occidental, India (Chattopadhyay & Ghosh, 2010).

Se han realizado diversas investigaciones para relacionar el daño patológico causado por el As en la salud reproductiva femenina. Chatterjee and Chatterji (2010) realizaron un análisis histológico en útero donde tras la exposición oral de 10 mL de agua destilada con 4 μg/mL de arsenito de sodio encontraron degeneración de las células epiteliales y de las glándulas endometriales. En el mismo año, Chattopadhyay and Ghosh (2010), expusieron ratas Wistar hembra vía oral a 0.4 μg/mL de agua contaminada con arsenito de sodio observaron un decremento en el número de folículos secundarios y terciarios, así como en los folículos de Graaf. Bourguignon *et al.* (2017) encontraron en ratas que la exposición con 50 ppm de NaAsO₂ vía oral una disminución de folículos preovulatorios y la formación de quistes. Yu *et al.* (2019) en su estudio encontraron que tras una exposición en ratas a una concentración de 8 mg/kg de peso de NaAsO₂ mediante 8 inyecciones intraperitoneales aplicadas una cada tercer día hubo modificaciones en la estructura del tejido ovárico reduciendo el número o porcentaje de folículos normales y aumentaron los folículos atrésicos. Estas afecciones en la

morfología ovárica y del útero se relacionan directamente con una salud reproductiva deteriorada, lo cual compromete la fertilidad femenina por la disminución de folículos ováricos, la probabilidad de que el ovocito fecundado no pueda implantarse de manera adecuada para su desarrollo y esto ocasione un aborto espontáneo.

3.5. Fisiología endocrina

El sistema endocrino es el responsable de la homeostasis, así como también del crecimiento, el desarrollo, la presión sanguínea, la reproducción y el metabolismo, entre otras. Las glándulas endocrinas son el hipotálamo, los lóbulos anterior y posterior de la hipófisis, la tiroides, la paratiroides, la corteza suprarrenal, las gónadas, la placenta y el páncreas (Costanzo, 2011).

La función gonadal está dirigida por el eje hipotálamo-hipófisis tanto en hombres como en mujeres. El hipotálamo y la glándula hipofisaria funcionan de modo coordinado para orquestar muchos de los sistemas endocrinos. La unidad hipotalámico-hipofisaria regula las funciones de las glándulas tiroides, suprarrenal y reproductoras. La hipófisis está formada por un lóbulo posterior y uno anterior, el hipotálamo está conectado a la glándula hipofisaria mediante un tallo, de este modo el hipotálamo controla a esta glándula. El lóbulo anterior se encarga de secretar hormonas peptídicas, entre ellas la prolactina (PRL), la hormona del crecimiento (GH), la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la hormona estimulante de la tiroides (TSH), la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Costanzo, 2011).

La secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) se realiza en el hipotálamo. Las gonadotropinas son secretadas en la hipófisis anterior bajo la influencia de la GnRH, estableciendo un eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Las características de las señales emitidas por estos tejidos tendrán impacto en el destino metabólico, en la capacidad de unión y activación de sus receptores y eventualmente inducir una respuesta biológica específica (De Tomasi, Crespo, & Crespo, 2012).

La secreción de la GnRH es la responsable de la liberación de las hormonas FSH y LH. Durante la etapa reproductiva, las secreciones de GnRH, FSH y LH aumentan, sin embargo, las concentraciones de LH serán mayores que las de FSH. La secreción de

hormonas esteroideas gonadales es estimulada por la secreción pulsátil de FSH y LH, y esta pulsatilidad es clave para la función reproductiva normal. Las hormonas esteroideas son sintetizadas a partir del colesterol y son secretadas por las gónadas, la corteza suprarrenal, el cuerpo lúteo y la placenta. Estas hormonas son el cortisol, estradiol, estriol, progesterona, testosterona, aldosterona y el 1,25-dihidroxicolecalciferol (Costanzo, 2011). El crecimiento de los folículos primordiales es independiente de gonadotropinas, sin embargo, en la fase preantral, los receptores de LH se expresan, estimulando así la secreción de andrógenos en las células de la teca, los cuales son el sustrato de las células de la granulosa para la producción de estrógenos. El correcto funcionamiento de la LH, FSH, insulina y la funcionalidad de otras enzimas esteroidogénicas terminará en la ovulación (Kautzky-Willer, Harreiter, & Pacini, 2016).

Entre los estrógenos se encuentran la estrona, el estriol y el 17β -estradiol, siendo este último el más importante el cual es secretado por el ovario. Por otro lado, la estrona procede de la conversión extraglandular de la androstenediona en tejidos periféricos y finalmente el estriol, el cual es excretado en la orina resultado de la metabolización del estradiol y de la estrona.

La secreción del estradiol varía a lo largo del ciclo, en la literatura de Tresguerres (2009) reportan que durante la fase folicular se encuentran valores de hasta 30 pg/mL, durante la ovulación alcanza niveles que llegan a 300 pg/mL y durante la fase lútea se encuentra alrededor de 200 pg/mL. La progesterona es un esteroide que procede de la pregnenolona, los niveles que se pueden encontrar en la fase folicular son de 0.5 ng/mL. A partir de la ovulación los valores podrán alcanzar niveles de hasta 20 ng/mL, estos en su mayoría secretados en el cuerpo lúteo. Tiene la capacidad de disminuir la frecuencia de la pulsatilidad de la LH, sin comprometer la de la FSH.

3.6. Fisiología del ovario mamífero

En los mamíferos femeninos, el ovario es el sitio de almacenamiento de los ovocitos y es ahí mismo donde se desarrollarán durante la vida fetal. La función principal del ovario es la maduración del ovocito para su fertilización (Tesone & Irusta, 2007). Tienen dimensiones aproximadas de 4 x 3 x 1 cm, y están alojados en la pelvis fijados por un pliegue peritoneal llamado mesovario (Tresguerres, 2009).

El ovario está estructurado por tres regiones: la médula central, un córtex externo y un hilio interno que permite el anclaje del ovario al mesovario. La médula central está constituida por un estroma de tejido conectivo laxo y fibroso, el córtex por oocitos y folículos ováricos y finalmente el hilio, el cual contiene nervios, vasos sanguíneos y linfocitos, así como también tejido conectivo que brinda sostén para el anclaje antes mencionado. De estas regiones la de mayor importancia es el córtex, debido a que es en donde se llevan a cabo principalmente las funciones del ovario (Tresguerres, 2009).

Las gónadas femeninas son los ovarios que, junto con el útero y las trompas de Falopio, constituyen el tracto reproductivo femenino. A partir de la pubertad, se producen variaciones hormonales cíclicas, las cuales afectan al ovario como al cuerpo lúteo y útero, preparándolo para la expulsión del ovocito y la implantación del mismo (Tesone & Irusta, 2007).

En el ovario se encuentran los folículos ováricos, la cantidad de estos está establecida desde antes de nacer e irán disminuyendo hasta llegar a su depletación en la menopausia. La activación de los folículos primordiales consiste en el reclutamiento irreversible para continuar su desarrollo y maduración para culminar ya sea en la ovulación o en atresia. La principal característica de un folículo primordial es el permanecer inactivos por años, lo cual sirve como una reserva para la vida reproductiva femenina y hasta que ocurre un estímulo el folículo primordial madurará y crecerá para mantener la fertilidad femenina. Algunos de estos estímulos pueden ser mecánicos y posteriormente se traducen en señales bioquímicas que afectan la expresión génica o la señalización celular (Shah et al., 2018). Los folículos ováricos son las unidades funcionales del ovario y se encuentran dentro de su arquitectura, son de vital importancia para la oogénesis y la producción de hormonas que apoyan características sexuales secundarias, así como las primeras semanas de embarazo. Los folículos están compuestos del ovocito y de capas de célula de la granulosa y de la teca que proveen de nutrientes para que el ovocito crezca conforme el folículo madura. De los miles de folículos existentes desde el nacimiento, solo unos cuantos madurarán hasta un estado folicular avanzado. Una vez que el folículo primordial sale del arresto celular en la profase I, la foliculogénesis y la ovogénesis proceden en conjunto. La activación del folículo primordial a uno preantral temprano no depende de la FSH, sin embargo, esta hormona es necesaria a partir de que el folículo presenta antro hasta convertirse en un folículo ovulatorio (Shah *et al.*, 2018).

En la maduración de los folículos están involucrados múltiples factores. Una vez que el folículo primordial caracterizado por tener una capa de las células de la granulosa aplanadas sale del arresto celular, las células de la granulosa se vuelven cúbicas y la zona pelúcida empieza a encapsular el ovocito y se convierte en un folículo primario. Estos folículos primarios comienzan a desarrollar receptores de FSH, pero en esta etapa son independientes de las gonadotropinas hasta que se encuentran en la fase antral. La activina apoya la foliculogénesis mediante eventos de adhesión para mantener las interacciones entre el ovocito y las células de la granulosa, incrementando la adhesión de las células de la granulosa a la membrana basal, así como también el mantenimiento de la estructura de la zona pelúcida. Conforme el folículo primario se transforma en uno secundario o preantral, más capas de la granulosa rodean al ovocito y las células de la teca son reclutadas para rodear la lámina basal de la capa más externa del folículo. Las células de la teca se dividen en interna y externa. La formación del antro, el cual contiene líquido que contiene hormonas esteroideas, polisacáridos, proteínas y FSH, requiere que las células de la granulosa se muevan entre ellas y las acuaporinas presentes en las células de la granulosa ayudan en el transporte de agua hacia el folículo, esto marca la transición hacia un folículo antral. En esta etapa de desarrollo, el crecimiento folicular depende del estímulo de FSH, tienen un tamaño entre 2-5 mm, muchos folículos terminarán en la atresia, mientras unos cuantos se convertirán en folículos preovulatorios o de Graaf donde uno de ellos se convertirá en uno dominante con un tamaño de hasta 20 mm de diámetro. La maduración finaliza con la expulsión del ovocito del folículo dominante durante la ovulación. Este proceso se muestra en la figura 1. Simultáneamente, los ovocitos primarios reanudan la meiosis, pero el péptido natriurético de tipo C (CNP), secretado por las células de la granulosa de los folículos preantrales y antrales, inhibe la reanudación meiótica de los ovocitos y evita su maduración prematura antes del aumento de LH. Después del aumento de LH, los niveles de CNP se regulan negativamente, lo que permite la progresión de la meiosis. El pico de LH que precede a la ovulación induce la síntesis y secreción de múltiples enzimas proteolíticas que



permitirán y la eclosión del folículo dominante para la liberación del ovocito. Una vez que se expulsa el ovocito, comienza el desarrollo del cuerpo lúteo a través de la invasión de los capilares sanguíneos de las células de la teca hacia la capa de la granulosa. El cuerpo lúteo posteriormente pasa por un mecanismo apoptótico para convertirse en un cuerpo albicans. El aumento de LH conduce intercambios de mediadores solubles, enzimas proteolíticas, remodelación de la matriz extracelular que ocasionan la expulsión del ovocito (Shah *et al.*, 2018). El cuerpo lúteo se sintetiza y segrega hormonas esteroideas, que son precisas para la adecuada implantación y mantenimiento del zigoto, en el caso de que ocurra la fertilización, de no hacerlo se genera el sangrado menstrual (Costanzo, 2011; Tesone & Irusta, 2007).

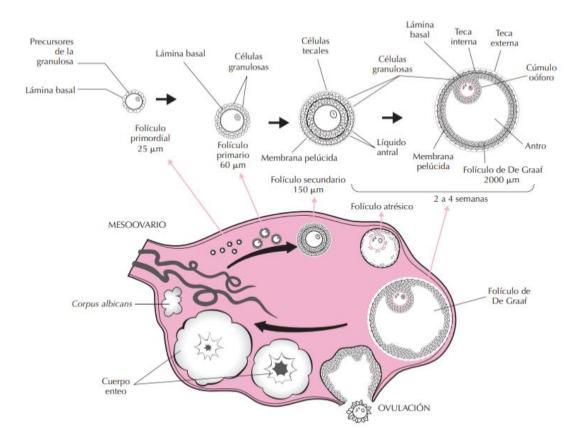


Figura 1.Desarrollo folicular.

Proceso de maduración de los folículos, se observan la presencia de las diferentes células que lo conforman de acuerdo al estadio en que se encuentra, así como también los diferentes tamaños que presenta por fase. Posterior a la ovulación se muestra la formación del cuerpo lúteo y finalmente el cuerpo albicans. Tomada de Tresguerres (2009).

3.7. Esteroidogénesis

El principal sustrato para la biosíntesis de las hormonas esteroideas es el colesterol de baja densidad (LDL) el cual, es captado por receptores y translocado en la membrana interna de la mitocondria en las células de la granulosa y de la teca y es convertido en pregnanos, progestágenos, estranos, androstanos (Figura 2). Esto es posible gracias a diversas proteínas reguladoras como la StAR, la cual está controlada por la unión de la LH a su receptor acoplado a proteína G en las células de la teca y el estímulo de la adenilato ciclasa, la cual cataliza la producción del monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) a partir de adenosín trifosfato (ATP). El cAMP producido activa la proteína quinasa A, que cataliza la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP (CREB) activando la transcripción de StAR y otros factores asociados con la producción de hormonas esteroides. En la membrana interna de la mitocondria, el colesterol se transforma en pregnenolona por la P450scc (enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol). La pregnenolona es un precursor para las hormonas esteroides y puede difundirse entre las células de la granulosa y de la teca, posteriormente será convertida por la citocromo P450 17A1 y la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD) a androstenediona y ésta a su vez en otros andrógenos, los cuales pueden difundirse en las células de la granulosa y mediante la aromatasa ser en estrona y posteriormente mediante la 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD) finalmente a estradiol (Cui, Shen, & Li, 2013; Fuentes & Silveyra, 2019).



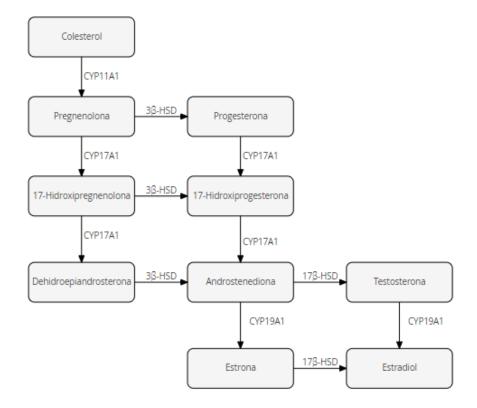


Figura 2. Síntesis de hormonas esteroides gonadales.

CYP11A1: Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol; CYP17A1: Citocromo P450 17A1; 3β -HSD: 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; CYP19A1: aromatasa; 17β -HSD: 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

En la Figura 3 se observa como la esteroidogénesis ovárica se da mediante la relación entre las células de la teca y las células de la granulosa. Las células de la granulosa producen estradiol y progesterona, y aunque son capaces de producir progesterona de manera independiente, la biosíntesis de estrógenos implica una colaboración entre las células antes mencionadas (De Tomasi *et al.*, 2012; Fuentes & Silveyra, 2019).



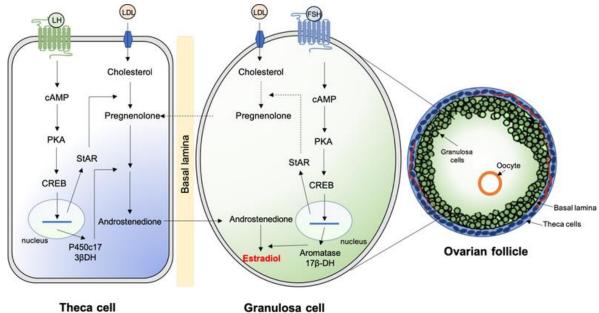


Figura 3. Interacción entre las células de la granulosa y de la teca.

La LH induce la producción de andrógenos en las células de la teca, los cuales posteriormente son internalizados en las células de la granulosa adyacentes a la membrana basal, donde para ser convertidos posteriormente en estrógenos necesitan de la FSH y de la aromatasa (Fuentes & Silveyra, 2019).

3.8. Receptores hormonales

Las hormonas esteroideas regulan la función ovárica en los mamíferos. Los estrógenos y la progesterona son hormonas esteroideas que regulan el funcionamiento de los órganos del sistema reproductor. Estás hormonas actúan a través de sus receptores, proteínas intracelulares altamente especializadas en comunicar el medio intracelular con el extracelular, y los cuales actúan como factores de transcripción (Espinoza *et al.*, 2013).

Los receptores de hormonas esteroideas son miembros de una superfamilia de receptores nucleares, los cuales al unirse a su ligando activan factores que regulan la transcripción de genes. Los receptores nucleares se caracterizan por tener un dominio de unión al ligando (LBD) cercano al C-terminal, un dominio muy conservado de unión al DNA (DBD) y un dominio N-terminal (NTD) de transactivación (Edwards, 2005). Estos receptores han mostrado además que median la activación de vías de señalización no genómicas, independientes de su actividad transcripcional (V. Boonyaratanakornkit & Edwards, 2007). Entre estos mecanismos se encuentra la activación de proteínas, tirosina quinasas, proteínas-G y hasta la modulación de canales de iónicos. Las

hormonas esteroideas pueden interactuar con la membrana celular, y con ello puede controlar cascadas de señalización intracelulares (Saczko *et al.*, 2017).

3.8.1. Receptor de estrógenos.

El receptor de estrógenos (ER) al igual que los receptores de progesterona (PR) y andrógenos son proteínas que pertenecen a la familia de los receptores nucleares. Existen 4 tipos de receptores a estrógenos: ER α , ER β , GPR30 y ER-X. Tanto ER α como ER β son indispensables para la función ovárica normal y las acciones cardioprotectoras mediadas por estrógenos (Cui *et al.*, 2013).

Contrario a la idea que solamente existía un ER, se determinó un segundo receptor en ovario de rata, al que denominaron ER β , mientras que el primer ER fue nombrado ER α . El ER α consta de 600 aminoácidos, mientras que ER β tiene 500; una diferencia entre estos receptores es su afinidad por el estradiol, el ER α es 4 veces más afín que el RE β , el cual tiene una afinidad alta por los fitoestrógenos, lo cual le confiere una actividad protectora contra el cáncer (Espinoza *et al.*, 2013).

Los estrógenos al ser las principales hormonas femeninas sexuales, tienen roles importantes tanto en el sistema reproductivo como en sistemas no reproductivos. Los estrógenos pueden sintetizarse en tejidos no reproductivos como el hígado, corazón, cerebro; así como también en tejidos específicos donde estos estrógenos desempeñarán sus roles, en el cerebro por ejemplo se ha encontrado que la presencia de la aromatasa en este órgano sugiere que el estradiol tiene un papel muy importante en funciones específicas cerebrales, ocasionando neuropatologías severas (Cui *et al.*, 2013). La unión entre el receptor y la hormona es capaz de activar la transcripción de genes y es finamente regulada en función del tejido donde ocurre (Márquez, 2002).

El estrógeno puede atravesar la membrana plasmática e interactuar con los receptores intracelulares $ER\alpha$ y $ER\beta$ donde ejercen sus efectos directos mediante la unión a secuencias específicas del DNA, así como también activando la cascada de señalización intracelular. Debido a esto se pueden clasificar en dos tipos de efectos: genómicos y no genómicos. En el genómico, es necesaria la migración del estrógeno al núcleo y su interacción con secuencias palindrómicas denominadas *elementos de*

respuesta a estrógenos (EREs), los cuales se encuentran en muchos genes promotores y regiones reguladoras (Tabla I). Sin embargo, se sabe que más de un tercio de los genes regulados por el ER no tienen una secuencia ERE. Por otro lado, al efecto no genómico se atribuye a la señalización genómica indirecta, basada en la activación de la expresión génica por receptores de estrógenos que no se unen directamente al DNA, son complejos proteína-proteína que interactúan con otros factores de transcripción y elementos de respuesta, señalizando indirectamente y que puede activar o suprimir un gen diana. Otra forma indirecta es mediante la producción de segundos mensajeros intracelulares, la regulación del cAMP y la activación de proteín-quinasa para la activación de cascadas de señalización ocasionando cambios en la expresión de genes. Tanto ERα como ERβ son blancos de fosforilación por proteínas cinasas, incluyendo las proteín cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), lo que sugiere que se puede autorregular la expresión de sí mismo mediante una acción no genómica (Fuentes & Silveyra, 2019).

El ER α se expresa predominantemente en las células de la teca, así como también en las células epiteliales germinales. Se ha reportado que la síntesis de androstenediona en las células de la teca, se encuentra negativamente regulada por la acción parácrina del estradiol, esta androstenediona se convierte posteriormente en estradiol en las células de la granulosa. Una vez secretado, el estradiol se unirá al ER α encargándose de regular la producción de androstenediona. Por lo tanto, el ER α en las células de la teca tiene un rol importante en la regulación de la esteroidogénesis femenina (Khristi *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2009)

Tabla I.Genes dependientes de estrógenos mediados por ERE

Gen	Función
SFRP4 Fz-1	Se expresan en las células de la granulosa de los folículos maduros. Impacta en la diferenciación o expresión de genes involucrados en la ruptura del folículo y la ovulación.
Wnt4	Su deficiencia marca una reducción en el número de oocitos.
Pcsk6	Se requiere que esté suprimido en células de la granulosa para la transición del folículo preantral a antral.
Cyp51	Promueve el inicio de la meiosis en la foliculogénesis temprana. Reacciones involucradas en la síntesis de colesterol, esteroides y lípidos.
lhh	Inhibe la señalización de Hedgehog-Patch, la cual tiene un rol en la comunicación entre las células de la granulosa y las de la teca en desarrollo.
Ciclina D2	Proliferación granulosa del ovario y de las células germinales.
TGFβ	Inhibe la producción de progesterona en las células de la granulosa.
BMP-4 BMP-7	Inhiben la producción de progesterona dependiente de FSH mientras estimulan la producción de estradiol dependiente de FSH en células de granulosa.
Familia BMP	Inhibidores de la luteinización.
GDF-9	Es esencial para las etapas tempranas del desarrollo folicular. Estimula el crecimiento de los folículos preantrales. Promueve la supervivencia folicular suprimiendo la apoptosis de las células de la granulosa y la atresia folicular.
FOXO1	Se expresa en células de la granulosa en ovarios fetales, prepubertos y adultos. Regulador de la supervivencia, proliferación y función de las células de la granulosa.
Inhibina	Secretada por las células de la granulosa. Proporciona una regulación negativa de la secreción de FSH.

(Liew, Sarraj, Drummond, & Findlay, 2011; Z. Liu et al., 2009; Otsuka, McTavish, & Shimasaki, 2011; Polin, Fox, & Abman, 2011; Ting & Zelinski, 2017)

La mayoría de las acciones llevadas a cabo por estrógenos en los ovarios son mediadas por los receptores ERβ. Se ha encontrado que este receptor se localiza en diferentes poblaciones celulares ováricas, principalmente en las células de la granulosa. También se han encontrado receptores estrogénicos en la membrana celular de distintos tejidos como en tejido alveolar, mamario, útero y líneas celulares (Márquez, 2002; Vasconcellos, Paredes, Aguilar, & Navarrete, 2015). Se ha llegado a considerar que el ERβ ovárico es el mediador más importante en la foliculogénesis, su expresión en células germinales y de la granulosa durante la producción de estradiol es constante (Jakimiuk *et al.,* 2002; Rosenfeld, Roberts, & Lubahn, 2001; Vasconcellos *et al.,* 2015)

Los estrógenos aumentan la expresión de sus receptores, así como la expresión de los PR y los receptores de andrógenos, mientras que la progesterona suprime a su receptor y por consecuencia disminuye los receptores de estrógeno (Bellido & Bellido, 1999).

Además de los estrógenos, existen 5 tipos de ligandos a receptores de estrógenos: endoestrógenos, fitoestrógenos, xenoestrógenos, moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERMs) y metaloestrógenos los cuales se muestran en la Tabla II (Fuentes & Silveyra, 2019).

Tabla II *Tipos de ligandos a Receptores de Estrógenos.*

Endoestrógenos	Fitoestrógenos	Xenoestrógenos	SERMs	Metaloestrógenos
Estrona	Isoflavonas	Medicamentos	Tamoxifeno	Cationes:
Estrona 17β-estradiol Estriol Estretrol	Isoflavonas Cómeros Lignanos	Aditivos alimentarios Cosméticos corporales Plaguicidas Químicos industriales	Tamoxifeno Clomifeno Toremifeno Raloxifeno Ormeloxife no	Cationes: Aluminio (Al³+), Antimonio (Sb³+), Bario (Ba²+), Cadmio (Cd²+), Cromo (Cr²+), Cobalto (Co²+), Cobre (Cu²+), Plomo (Pb²+), Mercurio (Hg²+), Níquel (Ni²+) Aniones: Arsenito (AsO₃³-), Selenito (SeO₃²-),
				Vanadato (VO ₄ ³⁻)

(Fuentes & Silveyra, 2019)

Pettersson, Grandien, Kuiper, and Gustafsson (1997) demostraron que el $ER\alpha$ y $ER\beta$ pueden interactuar *in vivo* e *in vitro* formando heterodímeros, los cuales pueden unirse a EREs. Chakraborty, Willett, and Biswas (2012) encontraron que incluso el heterodímero $ER\alpha\beta$ es más estable que el homodímero $ER\beta\beta$, además, el complejo heterodimérico inhibe la proliferación celular, lo cual puede ser utilizado como una estrategia de terapia contra el cáncer de mama, ya que esta patología, de acuerdo con Sotoca *et al.* (2008), muestra una sobreexpresión del $ER\alpha$ en comparación con $ER\beta$, por lo cual podría modular el efecto proliferativo de $ER\alpha$.

3.8.2. Receptor de progesterona.

El receptor de progesterona (PR) es un regulador clave en los tejidos reproductivos femeninos, ya que tiene la capacidad de controlar procesos de desarrollo así como la proliferación y diferenciación durante el ciclo reproductivo y el embarazo (Grimm, Hartig, & Edwards, 2016).

El receptor de progesterona es un miembro de la familia de los receptores esteroides hormonales de factores de transcripción dependientes de ligando, el cual se expresa en tejido reproductivo femenino y en el sistema nervioso central. El PR regula la expresión de genes involucrados en el desarrollo, diferenciación y proliferación de ciertos tejidos, además está involucrado en procesos patológicos en cánceres endocrinos (Grimm *et al.*, 2016).

El PR está compuesto, al igual que el ER, por dominio de unión al ligando (LBD) o dominio C-terminal (CTD), un dominio muy conservado de unión al DNA (DBD) y un dominio N-terminal (NTD). Además, el PR cuenta con dos dominios de activación transcripcional (AFs) que le permite interactuar con proteínas co-reguladoras ubicadas en la superficie; AF1 se encuentra dentro del NTD y AF2 en el LBD. El NTD es muy importante, ya que es necesario para la completa actividad de transcripción del PR y es responsable de que se lleven a cabo distintas actividades de las dos isoformas del PR, así como también de funciones promotoras y celulares del PR (Dean P Edwards, Suzanne E Wardell, & Viroj Boonyaratanakornkit, 2002; Grimm *et al.*, 2016).

Los PR reconocen y se unen al DNA en el elemento de respuesta a hormona (HRE), lo cual realiza un cambio conformacional en las hélices del LBD para activar o reprimir factores de transcripción (Grimm *et al.*, 2016).

Como antes se mencionó, los receptores esteroideos pueden funcionar de manera independiente, pero también tienen la capacidad de afectar la actividad y conformación estructural cuando se unen en un receptor intacto. El PR sufre amplias modificaciones postraduccionales que incluven fosforilación, acetilación, ubiquitinación, SUMOilación (unión a la proteína SUMO, del inglés small ubiquitinrelated modifier) y metilación. Un PR fosforilado en ausencia de hormona, puede modular varias funciones del PR, como la translocación nuclear, la dimerización, la unión al DNA, la estabilidad de la proteína, sensibilidad a la hormona, el progreso del ciclo celular, interacciones entre proteínas coreguladoras y la actividad transcripcional. Se ha encontrado que la eliminación de un sitio de fosforilación in vivo resultó en una fertilidad disminuida, alteración del ciclo estral y una desregulación de los genes diana de progesterona en las glándulas mamarias. Cuando el PR es ubiquitinado, se degrada rápidamente por proteasomas y esto conduce a una regulación baja de los receptores. La acetilación en la región bisagra es inducible por hormonas y tiene un papel en la regulación de la cinética de la captación nuclear de PR y el momento de la activación temprana de los genes diana. En el caso de la SUMOilación, esta tiene un efecto supresor en la activación transcripcional de muchos genes, principalmente aquellos involucrados en la proliferación y supervivencia celular, pero también incrementa la transcripción de otros genes (Grimm et al., 2016).

La unión de la hormona termina en la localización nuclear, donde el receptor activa el genoma en la cromatina para unirse a secuencias específicas en el DNA, estás secuencias consenso son GGT/AACAnnnTGTTCT en el elemento de respuesta a progesterona (PRE) (Tabla III). El motivo de los factores de transcripción más enriquecidos son aquellas ubicados regiones consenso de hexanucleótido del PRE (Grimm *et al.*, 2016).

Existen dos isoformas para el receptor de progesterona: PR-A (94 kDa) y PR-B (116 kDa), pero la isoforma completa es el PR-B, ya que el PR-A tiene el extremo N-terminal truncado. Ambas isoformas son codificadas por el mismo gen, pero tanto sus funciones, expresión y regulación son distintas. El PR-B es un fuerte activador de transcripción de genes, mientras que el PR-A puede actuar como un *trans*-represor dependiente de ligando del PR-B y de otros receptores esteroides incluyendo el ER (Edwards, 2005; Gutiérrez Rodríguez & Camacho Arroyo, 2016).

La progesterona tiene un rol importante mediante la inducción de LH para llevar a cabo la ovulación y la luteinización. Se ha demostrado que la isoforma PR-A es en su mayoría la responsable de mediar el efecto de la progesterona durante este proceso, así como también se encarga de la decidualización de las células estromales en el endometrio y de la inhibición de los efectos proliferativos en el endometrio. Por otro lado, la isoforma PR-B es la encargada de la ramificación ductal de las glándulas mamarias y del desarrollo de las glándulas lóbulo alveolares en el embarazo (Dean P Edwards *et al.*, 2002).

La presencia del PR en células ováricas ha demostrado que la progesterona tiene un efecto regulatorio de la función de las células foliculares y lúteas ováricas (Natraj & Richards, 1993).

Estos efectos se atribuyen a que la progesterona regula los niveles de gonadotropinas, además de que actúa directamente sobre las células ováricas para controlar la tasa que entra en apoptosis. Se han descubierto receptores de progesterona de membrana que actúan en las células ováricas: MPR (MPRa, MPRb, o MPRγ) y el PGRMC1 (del inglés progesterone receptor membrane component-1) (Peluso, Pappalardo, Losel, & Wehling, 2006), los cuales pueden activar vías de señalización y finalmente activar factores de transcripción

Tabla III.Genes y proteínas dependientes de progesterona

Gen/Proteína	Función
Activina	Inhibe la secreción de progesterona por las células de la granulosa.
Folistatina	Es sintetizada en células de la granulosa, regula la secreción de progesterona.
PR A	Represor de PRB, reducción de la responsividad de progestinas, andrógenos, glucocorticoides, receptores de estrógenos.
Estrógeno	Regulador de su efecto en la proliferación celular durante la fase lútea.
PRL	Involucrada en la decidualización (transformación morfológica y funcional del compartimento endometrial estromal).
TGFβ	Bloquea el crecimiento celular en células epiteliales ováricas normales.
IGF-1	Amplificar la acción de la hormona gonadotropina en términos de aumento de la esteroidogénesis por la proliferación de células de la granulosa ovárica.
IGFBP-1	Se expresa en las células estromales en la fase media a tardía lútea para evitar la proliferación celular epitelial.
Relaxina	Aumento en la relaxina puede facilitar la ruptura del folículo al aumentar la secreción de activador de plasminógeno, colagenasa, proteoglicanasa, y β-glucuronidasa.
Progesterona	Estimular o inhibir la proliferación celular en el útero, mantener el embarazo mediante el crecimiento uterino y acciones de represión de las contracciones miometriales. Regula la ovulación. Su expresión es inducida por LH en células de la granulosa de folículos maduros preovulatorios. En ausencia de progesterona, las células de la granulosa de los folículos maduros preovulatorios muestran inhabilidad para luteinizar correctamente.
FAAH	Niveles bajos de esta hidrolasa incrementan la probabilidad de tener síndrome de ovario poliquístico (SOP).
BCL2L1	Actúa como anti- o pro- regulador apoptótico.
c-myc	Regulador del crecimiento celular. Su sobreexpresión es un hallazgo común en el cáncer ovárico avanzado.

Continuación

C/EBP-β La reducción de la expresión ovárica de C/EBP-β inhibe la ovulación. Los ovocitos quedan atrapados dentro

del folículo.

Jun: modulación de la expresión de aromatasa específica de ovario en células de la granulosa.

Familia AP-1 Sobreexpresión de c-Jun, JunB, Fra1, and Fra2 → proto-oncogenes. JunB activa la vía Ras/Raf/MAPK que

media los efectos de la FSH y activa el factor AP-1 en las células de la granulosa.

SP1 Promueve la angiogénesis activando VEGF.

(Alsina Sanchís et al., 2017; Viroj Boonyaratanakornkit et al., 2007; Graham & Clarke, 1997; Robker, Akison, & Russell,

2009; Rusovici & LaVoie, 2003; Sharma & Richards, 2000; Su et al., 2017)

El estímulo en los PR promueve la supervivencia de las células periovulatorias de la granulosa, tanto en rata como en humano (Rung *et al.*, 2005).

En rata, el mRNA del PR se ha localizado en células de la granulosa de los folículos preovulatorios durante el pico de secreción de la LH, pero no antes de este. El mRNA del PR no se ha detectado en células de la teca o en el cuerpo lúteo. Lo cual demuestra que la inducción de PR mediante LH es crítica para la acción de la progesterona en la regulación de la ovulación y en la activación de genes específicos (Natraj & Richards, 1993).

3.9. Antecedentes particulares

Se ha demostrado que los compuestos de As tienen diversos efectos endocrinos, los cuales pueden causar fallas en los órganos reproductores de animales y de humanos. El daño mitocondrial puede llevar a una respuesta apoptótica alterada en los folículos ováricos (Dávila-Esqueda *et al.*, 2012). Akram *et al.* (2009) en un estudio realizado en ratas con una exposición a 50, 100 y 200 ppm de arsenito de sodio durante 28 días, encontraron una disminución significativa en el peso de los ovarios y de las células ováricas, así como también daño al DNA.

El arsénico es responsable de la supresión de la esteroidogénesis ovárica, así como la elevación de la esteroidogénesis adrenocortical, cuando el nivel de arsénico está por encima de 0.4 ppm (Chattopadhyay & Ghosh, 2010). S. Chattopadhyay *et al.* (1999) establecieron que las enzimas 17β-HSD, 7β-HSD se inhiben ante la presencia de As; y Perveen *et al.* (2019) reafirmaron que la 17β-HSD así como la Δ5,3β-HSD fueron significativamente inhibidas por el As^{III}. Así mismo, varios trabajos han demostrado que los niveles séricos de LH, FSH y estradiol se ven significativamente disminuidos tras la exposición a As (Perveen *et al.* (2019); Yu *et al.* (2019); Chattopadhyay *et al.* (1999)). Se ha reportado que en la esteroidogénesis ovárica las gonadotropinas FSH y LH se inhiben cuando se presenta exposición al arsénico (Chatterjee & Chatterji, 2010).

evitando que el ciclo continúe de manera normal.

LI A CH

Dávila-Esqueda *et al.* (2012) demostraron que la administración de As^{III} durante el desarrollo pre y post natal disminuyó la foliculogénesis; en cuanto a las características morfológicas de los ovarios, se encontró cromatina picnótica en células de la granulosa, acompañada de vacuolización citoplásmica empujando al núcleo a la periferia, además de modificar el número de células adrenocorticales, lo que provocó un inicio tardío de la pubertad. Chattopadhyay, Ghosh, Chaki, Debnath, and Ghosh (1999) reportaron en ratas expuestas a 0.4 ppm que el ciclo estral se veía comprometido por la exposición, ocasionando que de los días 22 a 28 de exposición se empezara a presentar un estancamiento en la fase diestro del ciclo, es decir la última etapa esto podría atribuirse a la inhibición de las enzimas 3β-HSD y 17β-HSD lo cual ocasiona una disminución de LH y FSH ocasionando bajos niveles de estrógeno

Estudios anteriores han sugerido que el arsénico puede interferir con el funcionamiento del ER, causando una fuerte supresión de la expresión de genes dependientes del ER estimulado por hormonas a concentraciones de 1 µmol/kg in vivo y tan bajas como 0.25 µM (20 ppb) en cultivos celulares, aunque el mecanismo exacto queda por determinar (Davey et al., 2007). El arsénico actúa como un potente estrógeno ambiental (Chatterjee & Chatterji, 2010). Stoica, Pentecost, and Martin (2000) demostraron que el arsenito imita los efectos del estradiol, disminuyendo la expresión del ERa y aumentando la expresión del PR, además el arsenito tiene la capacidad de activar el ERα a concentraciones tan bajas como 1 nM. Al-Bader (2006) logró ubicar la presencia de los receptores $ER\alpha$ y $ER\beta$ en tejido placentario, lo cual puede ser utilizado como un control positivo de estos receptores. En cuanto a la progesterona, Yuan et al. (2012) observaron que la presencia de As estimula la síntesis de progesterona. En contraste con esto, Yu et al. (2019) observaron la disminución en los niveles séricos de progesterona en ratas tras la exposición a 8 mg/kg vía intraperitoneal, lo cual deja en conflicto cual es el mecanismo de acción que tiene el As sobre el receptor de progesterona.

En el estudio de Bourguignon et al. (2017) se expusieron ratas en gravidez a una concentración de 50 ppm de arsenito de sodio en agua potable, se encontró que su

LI A CH

embarazo no se vio afectado. Las consecuencias se presentaron después de la lactancia en las madres expuestas a arsénico, ya que presentaron un ciclo estral comprometido, un decremento en el estradiol, un incremento en la hormona folículo estimulante (FSH), menos folículos preovulatorios y presencia de quistes ováricos, sugiriendo una reproducción deteriorada.

En Chile, existe un historial de reportes de agua potable contaminada con una alta concentración de As, ahí se ha encontrado que se han elevado la mortalidad fetal tardía, la mortalidad neonatal y la mortalidad postneonatal, se encontró también una reducción del peso al nacer y anemia en la madre (McClintock *et al.*, 2012).

En la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua Gutiérrez-Torres et al. (2015) realizó una investigación en ratonas Balb/c preñadas para observar la alteración de los transportadores de glucosa placentarios tras la exposición vía oral a 0, 12 y 20 ppm de NaAsO₂ del día 8 a 18 de gestación encontrando que las camadas de los grupos expuestos mostraron pesos menores que las no expuestas, además de un decremento en el peso placentario el cual podría estar asociado a un deterioro de la vasculogénesis placentaria o alteración en la formación del sincitio, causados por estrés oxidativo que podría generar patologías placentarias como la preeclampsia. Se encontraron cambios morfológicos en la placenta como fibrosis, hemorragias, congestión vascular e infartos. Los resultados obtenidos sugieren que la exposición a As induce daño al tejido placentario y compromete el suministro de nutrientes, oxígeno, hormonas y otros factores de crecimiento necesarios para el bienestar fetal.

Posteriormente, Gómez, Sánchez, González, Levario, and Ballinas (2020) encontraron que tras la exposición a 50 y 100 ppm de NaAsO₂ en ratas hembra Wistar por 28 días se presentaron alteraciones morfológicas relacionadas al proceso inflamatorio, como lo es la congestión vascular, la cual fue analizada como ausencia y presencia de esta, se encontró un incremento significativo con respecto al grupo control. Además, se observó aumento de los folículos atrésico y de tejido fibroso, así como un también incremento en la expresión de la IL-1β, citocina responsable de la liberación de citocinas como del factor de necrosis tumoral α (TNF-α) quien también

LI A CH

incremento su expresión tras la exposición. El TNF-α induce la activación de la cicloxigenasa 2 (COX-2) para la inducir la producción de prostaglandinas responsables de la fiebre y el dolor. Un incremento de las prostaglandinas provocará vasodilatación, lo cual atraerá a más células mediante cascadas de señalización y el rolling al sitio de daño aumentando así la congestión vascular y montando el proceso inflamatorio, donde el aumento de la P-selectina puede provocar fibrosis en el tejido. Tras observar el aumento de IL-1β y TNF-α sugieren que ante la presencia de As se presenta un estado de inflamación crónica al tejido ovárico.

En la Tabla IV se muestra de manera resumida los estudios de exposición a As que se han realizado en modelos murinos, así como dosis, duración del tratamiento y efectos observados.

Tabla IV.Estudios de exposición a As realizados en modelos murinos, dosis y efectos en la salud reproductiva

Año	Autor	Modelo	Dosis	Duración	Tejido	Resultado
1999	Chattopadhyay et al.	Rata	0.4 ppm	16 y 28 días	Ovario	Interrupción del ciclo estral; inhibición de 3β-HSD, 17β-HSD. ↓FSH, LH, E2 ↓Estrógenos
2009	Akram <i>et al.</i>	Rata	50, 100 y 200 ppm	28 días	Ovario	Daño al DNA y células ováricas, muerte celular.
2010	Chatterjee & Chatterji	Rata	4 μg/mL	28 días	Útero	↓E2, FSH, LH, ERα; degradación de tejido
2010	Chattopadhyay & Ghosh	Rata	0.4 ppm	28 días	Ovario, útero	Interrupción del ciclo estral; inhibición de 3β-HSD, 17β-HSD. ↓FSH, LH, E2 ↓Folículos preantrales, antrales y de Graaf
2017	Bourguignon <i>et</i> al.	Rata	5 y 50 ppm	18 dg	Ovario	↓Peso corporal, ↓E2, ↓folículos preovulatorios, ↓células de la granulosa y de la teca. Acumulación en hígado
2018	Yu <i>et al.</i>	Rata	8 mg/kg IP	16 días	Ovario	↓E2, P4, esteroidogénesis. Daño histológico estructural
2019	Perveen <i>et al.</i>	Rata	10 mg/kg	16 días	Ovario	↓3β-HSD, 17β-HSD, LH, FSH, Folículos de Graaf. ↑Folículos atrésicos
2020	Gómez <i>et al.</i>	Rata	50 y 100 ppm	28 días	Ovario	↑Daños por inflamación, congestión vascular, necrosis, fibrosis, quistes. ↑ Folículos atrésicos.

 3β -HSD: 3β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa, 17β -HSD: 17β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa, LH: Hormona luteinizante, FSH: Hormona folículo estimulante, E2: Estradiol, P4: Progesterona, ERα: Receptor de estrógenos α

4. OBJETIVOS TÉCNICOS

4.1. Objetivo General

Determinar el efecto del As en la expresión de receptores hormonales en tejido de ovario de rata Wistar.

4.2. Objetivos Particulares

- Analizar el efecto de la exposición crónica a As en el ciclo estral y en los niveles séricos de gonadotropinas en ratas hembra Wistar.
- Determinar el efecto de la exposición a As en la expresión de los receptores hormonales ER (α y β) y PR en ovario de rata Wistar mediante IHQ.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿Cómo es el patrón de producción de gonadotropinas y ováricas en ratas expuestas a As por vía oral?
- ¿Cómo se modifica la expresión de los receptores ER y PR en el ovario de ratas expuestas a As por vía oral?

JUSTIFICACIÓN

Determinar el efecto del As sobre la expresión de receptores hormonales en tejido de ovario de rata Wistar, ayudará a entender los mecanismos por los cuales la exposición a As afecta a los receptores hormonales, ER (α y β) y PR, ocasionando disfunción ovárica. Se tiene conocimiento de que el As es responsable de inducir daño al tejido placentario y a su vez de comprometer el suministro de nutrientes al producto, esto mediante la generación de estrés oxidativo incrementando la expresión de enzimas proinflamatorias.

En esta investigación se pretende establecer si la expresión de los receptores hormonales se ve disminuida o si ésta es interrumpida en su totalidad cuando el organismo se encuentra en exposición a As. La metodología por la cual se esclarecerá este objetivo consiste en estudios sobre niveles séricos de LH y FSH,

análisis histopatológico de los tejidos ováricos con H&E y se evaluará la expresión de los receptores en el tejido ovárico mediante inmunohistoquímica (IHQ).

HIPÓTESIS

Existe una disminución en la expresión de los receptores hormonales ER (α y β) y PR en el ovario de ratas hembra Wistar expuestas a arsenito de sodio respecto a ratas no expuestas a este tóxico.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

HYCEL

Tinción de Wright (64840). Hemocolorante rápido (548). Ácido nítrico 30% (1550). Hematoxilina de Harris (738).

SIGMA-ALDRICH

Meta arsenito de sodio (S7400). Cloruro de sodio (S3014). Paraformaldehído (P6148). (3-aminopropil) trietoxisilano (A3648). Solución de peróxido de hidrógeno 30% (w/w) en agua (H1009). Tween 20 (P-9416).

J. T. Baker

Fosfato de potasio monobásico (3246-01). Fosfato de sodio dibásico, 12-Hidrato (3822-01)

Cloruro de potasio (3040-01). Alcohol etílico absoluto (9000-02). Metanol (9093-03). Xileno (9490-03). Ácido perclórico 69-72% (9652-01). Ácido sulfúrico (9681-05). Ácido clorhídrico 36.5-38.0% (9530-33).

Santa Cruz Biotechnology

Tris HCl (sc-301951). DAB (sc-24982). $ER\alpha(D-12)$ (sc-8005). $ER\beta(B-1)$ (sc-390243). PR (AB-52) (sc-810). m-lgGkBP-HRP (sc-516102).

Golden Bell reactivos

Solución de acetona 80% (v/v) (53900)

Reactivos generales

Leche descremada Svelty (Nestlé) Figura 0%. Resina Entellan (Merck diagnóstica, Mexico). Pentobarbital (Aranda).

5.2. Equipo

Microscopio Olympus BX41 con cámara Olympus DP72, balanza analítica Sartorius (Mod. BP110), balanza granataria, parrilla de calentamiento con agitación magnética, micropipetas, centrífuga eppendorf 5804R, vórtex, potenciómetro Hanna

Instruments HI 2211. espectrómetro de absorción atómica acoplado a generación de hidruros (HG-AAS) PerkinElmer (AAnalystTM 700 acoplado a FIAS 100).

5.3. Materiales

Termómetro, filtros milipore N°4, portaobjetos y cubreobjetos MADESA, vasos coplin, material quirúrgico para disección,

5.4. Soluciones

Solución salina de fosfatos (PBS)

Reactivos	1X	3X
NaCl (g)	8	24
KCI (g)	0.2	0.6
Na ₂ HPO ₄ * (g)	1.15	3.45
KH ₂ PO ₄ (g)	0.2	0.6
*Puede ser sustituido por Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3.58	10.74

Se disuelven las cantidades necesarias en agua desionizada, se ajusta el pH a 7.4 con HCl 1N, se afora a 1 L. Se esteriliza a 15 lb de presión durante 15 minutos. Se almacena a 4°C.

Solución stock de arsenito de sodio (NaAsO₂) 1000 mg/L

Se toman 250 mg de NaAsO₂ y se disuelven en 250 mL de agua desionizada, se almacena en un frasco ámbar de vidrio a 4°C. Se diluye de acuerdo a su uso.

Paraformaldehído (PFA) 3.5%

Se calienta a 66°C 67 mL de agua, después a 60°C se adiciona lentamente y en campana de extracción 3.5 g de PFA. Se añaden 2 gotas de NaOH 2N para disolver partículas, se retira del calor y se adiciona 33 mL de PBS 3X. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl concentrado y se afora a 100 mL. Se filtró a través de un filtro

milipore o nalgene y se dejq enfriar a temperatura ambiente. Se almacena en un frasco ámbar en refrigeración a 4°C. Su estabilidad es de 7 días.

• Solución de silane 2%

Se adicionan 2 mL de silane a 98 mL de acetona pura. Rinde para dos vasos coplin.

Gelatina Jell-O con NaAsO₂

Se preparó a una concentración 1.25 para asegurar la consistencia de la gelatina, para cada gelatina se tomaron 4750 μ L de gelatina y se le añadió 250 μ L de NaAsO₂ para obtener así un volumen final de 5 mL.

Solución inactivadora de peroxidasas endógenas

Para preparar 10 mL se mezclan 9 mL de metanol con 1 mL de peróxido de hidrógeno al 30%. Se prepara al momento de uso.

Solución amortiguadora de fosfato salino – Tween 20 (PBST)

A 50 mL de PBS 1X se añaden 25 µL de Tween 20 y se almacena a 4°C.

Solución bloqueadora PBST-leche 10%

Para 40 mL, se toman 40 mL de PBST-leche y se le añaden 4 g de leche descremada Svelty. Se almacena a 4°C y su estabilidad es de 7 días.

Solución diluyente para anticuerpos PBST-leche 1%

Para 10 mL, se toma 10 mL de PBST y se le agrega 0.1 g de leche descremada Svelty. Se almacena a 4°C y su estabilidad es de 7 días.

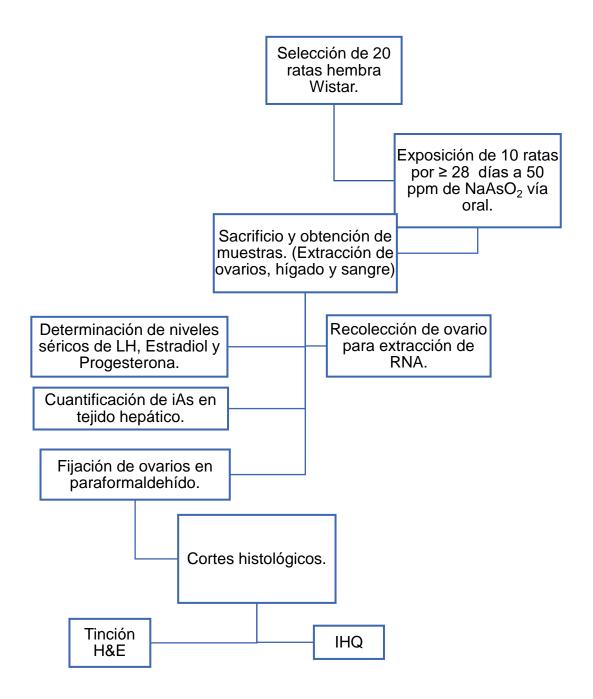
DAB 1X

A 50 partes de Tris-HCl se le agregan 1 parte de DAB 50X y 1 parte de peróxido de hidrógeno al 0.5%.



5.5. Metodología

5.5.1. Estrategia Experimental



5.5.2. Protocolo de exposición en animales

El protocolo se llevó a cabo en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Para esta investigación se utilizaron 20 ratas hembra de la cepa Wistar con un peso aproximado de 200 g; se dividieron de forma aleatoria en cuatro grupos y se dispusieron en jaulas individuales.

Las ratas se dividieron en 2 grupos, uno que se encontraría en la fase proestro y otro en la fase diestro, cada grupo conformado por 10 especímenes y 5 de cada grupo fueron expuestas de manera oral diaria a 50 ppm de arsenito de sodio por un periodo de ≥ 28 días. La exposición se llevó a cabo mediante la administración diaria de una porción de gelatina comercial reducida en azúcar (5 mL) con la concentración de NaAsO₂ antes mencionada; a los grupos control se les administró gelatina sin As para mantener la igualdad de condiciones. Previo a la exposición (10 días antes), se administró a las ratas muestras de gelatina para que se familiarizaran con ellas y garantizar el consumo futuro. Las ratas fueron sometidas a ciclos de 12 h de luz y oscuridad, a una temperatura de 20± 2°C, contaron con acceso libre a agua y a 20 g alimento administrado diariamente, de los cuales al igual que de la gelatina se llevó un registro diario. La determinación de la fase del ciclo estral se realizó como se muestra a continuación.

5.5.3. Determinación del ciclo estral mediante lavado vaginal

Se realizó de acuerdo con McLean, Valenzuela, Fai, and Bennett (2012)

- 1. Con una micropipeta de 200 μL tomar aproximadamente 50 μL de PBS 1X estéril.
- Asir a la rata por la cola y depositarla sobre la tapa de la jaula y colocarla de manera que sus patas delanteras estén agarradas a la jaula y sus patas traseras estén libres.
- En esta posición, es muy probable que la rata orine, se recomienda esperar a que termine la micción y posterior a esto, enjuagar el área con exceso de PBS 1X estéril utilizando otra puntilla.



- Colocar cuidadosamente el extremo de la puntilla llena de PBS 1X estéril en la abertura del canal vaginal.
- 5. Vaciar lentamente los 50 μL en la abertura del canal vaginal, aspirar el líquido. Repetir varias veces para obtener un número suficiente de células en una sola muestra.
- Colocar el líquido en el portaobjetos de vidrio y dejar que la muestra seque completamente a temperatura ambiente. Una vez secos, estos frotis se pueden teñir inmediatamente o almacenarse y teñirse en una fecha posterior.

5.5.4. Tinción citológica con Kit Hemocolorante rápido Hycel.

- Colocar el portaobjetos en el primer frasco con la solución fijadora, realizar cinco baños de 1 segundo cada uno.
- 2. Retirar al segundo recipiente que contenga la solución 5841, realizar cinco baños de 1 segundo cada uno.
- 3. Sumergir en el tercer recipiente que contenga la solución 5842, dar cinco baños de 1 segundo cada uno.
- 4. Enjuagar con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.

5.5.5. Tinción citológica con Wright.

- 1. Fijar las muestras en metanol puro.
- 2. Colocar 1-2 mL de colorante de Wright sobre cada una de las muestras y esperar 3 minutos.
- 3. Añadir suavemente el buffer de fosfatos en la misma cantidad que el colorante esperar por 5 minutos.
- 4. Enjuagar con agua destilada para eliminar el exceso del colorante. Un lavado prolongado reducirá la coloración de las células.

5.5.6. Citología vaginal.

- Examinar el frotis bajo microscopía de luz para determinar los tipos de células presentes.
- 2. Comenzar examinando el frotis completo con un aumento menor. Seleccionar un área representativa y moverse a una mayor ampliación. Se



podrán ver células epiteliales escamosas corniformes, leucocitos y/o células epiteliales nucleadas. La proporción de células presentes permitirá determinar la etapa estral de la rata en el momento de la recolección de la muestra y su estado hormonal inmediato.

5.6. Características del ciclo estral en rata

La determinación de la fase del ciclo estral en rata se determinó de acuerdo con la metodología antes mencionada, con base a los criterios mostrados en la Tabla V y Figura 4.

Tabla V.Determinación de la fase del ciclo estral.

Fase del ciclo	Descripción del frotis vaginal	Duración
Proestro	Células epiteliales nucleadas	12 h
Estro	Abundantes células escamosas	21 h
Metaestro	Presencia de leucocitos y células escamosas	32 h
Diestro	Abundantes leucocitos	12 h

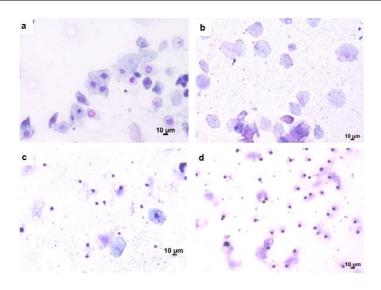


Figura 4. Fases del ciclo estral en rata.

En la fase proestro (a) se observan células epiteliales nucleadas, en la fase estro las células son escamosas (b), en la fase metaestro se observa la presencia de células escamosas y leucocitos (c) y en la fase diestro (d) se encuentra en su mayoría la presencia de leucocitos.

5.6.1. Pesaje

El procedimiento consistió en colocar a los animales en un recipiente metálico con orificios sobre la balanza con el objetivo de evaluar el peso corporal en gramos (g). El pesaje se realizó al inicio de la exposición a NaAsO₂, cada 7 días y antes del sacrificio.

5.6.2. Sacrificio y obtención de muestras

El sacrificio de las ratas se realizó mediante exceso de anestesia (pentobarbital) a una dosis de 150 mg de pentobarbital/kg de peso realizando el cálculo para obtener los mL a inyectar vía intraperitoneal. Se extrajo mediante punción cardiaca sangre venosa para determinar los niveles séricos de gonadotropinas. Se diseccionaron los ovarios, útero e hígado.

5.7. Procesado de muestras

El tubo con sangre se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos y se recuperó el suero. Las muestras se pueden refrigerar en 2-8°C por un período máximo de 5 días. Si no se puede realizar la prueba dentro de este tiempo, las muestras se deben almacenar a -20°C por hasta 30 días. Evitar congelar y descongelar. Se enviará al menos 1 mL de la muestra al laboratorio clínico.

En cuanto a los ovarios, un ovario de cada rata se fijó en paraformaldehído amortiguado al 3.5% y se almacenaron en viales color ámbar de boca ancha de 30 mL. Posteriormente, fueron embebidos en parafina y se realizaron cortes histológicos para tinción con H&E e IHQ.

El otro ovario de cada rata se congeló a -80°C para la extracción de RNA total.

Los hígados de las ratas fueron diseccionados y almacenaron a -20°C en tubos Falcon de 50 mL mientras se llegó el momento de su procesamiento en la cuantificación de As inorgánico.

5.8. Determinación de niveles de FSH, LH, estradiol y progesterona séricos

El análisis se realizó en el laboratorio clínico Roma, con dirección en Ave. Francisco Villa No 4104. Col San Felipe V Etapa, mediante la técnica de quimioluminiscencia, donde se utilizó una curva de calibración por analito y los reactivos procedieron de la compañía Abbott Laboratories.

5.8.1. Fundamento de cuantificación quimioluminiscencia.

La quimioluminiscencia es una metodología de lectura la cual está fundamentada en el principio de emisión luminosa a través de una reacción de enzima-sustrato. Tiene aplicación en la determinación de sustancias de tipo hormonal y no hormonal de sangre y de otros líquidos corporales. La relación existente entre la intensidad de la emisión es proporcional a la concentración de la proteína de interés. La metodología es la siguiente: se tiene en una placa el anticuerpo primario, después se adiciona el suero o sustancia a evaluar, se adiciona el anticuerpo secundario biotinilado y conjugado con estreptavidina y peroxidasa. Se adiciona luminol y se emite la luz, la cual se mide en un luminómetro (García Rodríguez & Martinez Maldonado, 2009; Meseguer Lloret, 2004).

5.9. Cuantificación de As inorgánico en tejido

La cuantificación se realizó basada en la técnica de digestión húmeda de Cox (1980) modificada (Devesa *et al.*, 2004).

Una muestra de ≈100 mg del tejido hepático se homogeniza en 1 mL de agua destilada. Del homogenado se toma una alícuota de 100 μL y se coloca en un vaso de precipitado de 50 mL, se le adiciona 4 mL de HNO₃ y HClO₄, se cubre con un vidro de reloj y se calienta gradualmente hasta alcanzar los 115°C en una parrilla con base de arena. Se deja enfriar para posteriormente adicionar 2 mL de H₂SO₄ concentrado y se coloca en la parrilla hasta alcanzar una temperatura de 280°C. Se mantiene a esa temperatura hasta que exista un viraje a un color verde-amarillo y durante 10 minutos más después de un cambio a color transparente. Después se deja enfriar a temperatura ambiente y se afora a 10 mL con HCl 2.1 M, realizando de primera instancia en el vaso de precipitado para luego transferirlo a un tubo

cónico de 15 mL. Las muestras se almacenan a 4°C protegidas de la luz para su posterior cuantificación.

La cuantificación se realiza en un espectrómetro de absorción atómica acoplado a generación de hidruros (HG-AAS) PerkinElmer (AAnalystTM 700 acoplado a FIAS 100).

Se realiza una curva de calibración de seis puntos desde 5 ppb hasta 30 ppb en un aumento de 5 ppb por punto. El blanco es una muestra de agua tridestilada sin As. Las lecturas se llevan a cabo de la siguiente manera: 5 muestras, el blanco, seguido de un estándar de 15 ppm para verificar que el equipo siga calibrado. Se realizará una curva y se obtendrá la ecuación para así poder determinar la concentración de As de las muestras. Es necesario considerar el factor de dilución utilizado y el tamaño del tejido. Los resultados se expresarán en µg As/mg tejido hepático (Véase Apéndice I).

5.10. Silanización de portaobjetos

La silanización permite que el tejido se adhiera a la superficie del portaobjetos, evitando que se desprendan durante la serie de lavados a los que se someterán durante los procesos de tinción con hematoxilina-eosina (H&E) y en la IHQ. El proceso consiste en sumergir los portaobjetos durante 3 minutos en una solución de 3-amino-trietoxisilane al 2% (2 mL de silane en 98 mL de acetona) y posteriormente se lavan con agua desionizada dos veces por 5 minutos; los portaobjetos se colocan de manera vertical para su secado a temperatura ambiente (Guerrero, Sánchez, González, Levario, & Infante, 2017).

El portaobjeto silanizado se encuentra cargado positivamente y esto es lo que ayuda a que interactúe con las cargas negativas del tejido atrayéndolas (De Dios Soler & Acosta Haab, 2018).

5.10.1. Cortes histológicos

Los cortes histológicos de los ovarios se llevan a cabo en el Laboratorio de Anatomía Patológica y Citología Exfoliativa bajo la supervisión del Dr. Ernesto Ramos Martínez. Las secciones son de 4 mm de grosor de cada muestra. Por cada ovario se tomaron 8 cortes a diferentes niveles.

5.10.2. Protocolo.

- Preparación del tejido
 - Dos baños de formol
 - Cinco baños de alcohol al 96%
 - Un baño de alcohol absoluto
 - o Dos baños de xileno
 - Un baño de parafina

• Bloqueo

- Retirar la tapa
- Vaciar parafina en el molde, colocar el tejido y tapar con la cápsula.
- Verter parafina sobre la cápsula.
- Enfriar los bloques en el congelador.

Desbloqueo

- o Retirar el molde.
- Quitar el exceso de parafina.

Cortes

- o Colocar el bloque con el tejido en el microtomo y ajustar.
- Rebajar parte de la muestra para que el corte no sea superficial.
- Colocar la tira de corte en el baño María (49°C).
- Adherir el corte al portaobjetos silanizado.

Desparafinado

En caso de realizar la tinción de H&E

Colocar las laminillas en el horno a 290°C durante 8 min.



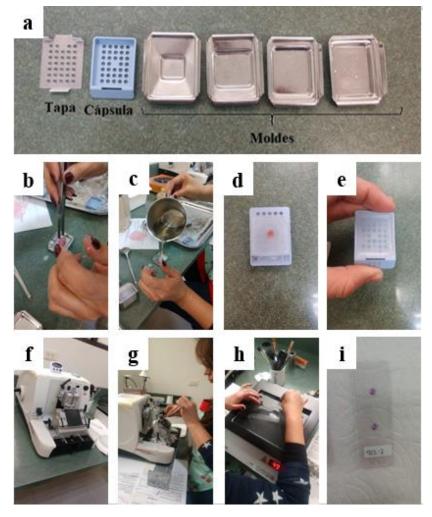


Figura 5. Pasos para la realización de cortes histológicos.

Materiales a). Colocación del tejido b). Vaciado de parafina c). Vista anterior del bloque d). Vista posterior del bloque e). Microtomo f). Corte de 4 mm del tejido ovárico g). Montaje del corte del ovario en portaobjetos silanizados h). Vista final de un corte ovárico teñido con H&E (4i).

5.11. Tinción de H&E

Se realiza para comprobar las alteraciones histológicas de los ovarios resultantes tras la exposición a NaAsO₂.

5.11.1. Protocolo.

- Tres baños de xileno de 8 min.
- Enjuague 15x en:
 - Un baño de alcohol absoluto
 - Dos baños de alcohol 96



- Un baño de agua de la llave
- Un baño de hematoxilina 4 min.
- Enjuagar con agua de la llave 15x.
- Un baño de agua acidificada (HCl 6%), entra y sale.
- Enjuagar con agua de la llave 15x.
- Un baño de agua amoniacada 6%, entra y sale.
- Enjuagar con agua de la llave 15x.
- Dos baños de alcohol 96 enjuague 15x
- Un baño de eosina 1 min.
- Enjuague 15x en:
 - Dos baños de alcohol 96
 - Un baño de alcohol absoluto
 - Dos baños de xileno
- Montado
 - Secar el exceso de xileno sin tocar el corte.
 - Añadir la resina en el centro de la laminilla.
 - Colocar el cubreobjetos (retirar burbujas en caso de existir).
 - Dejar secar.



Figura 6. Cortes histológicos de ovario de rata teñidos con H&E.

5.12. Análisis de las alteraciones morfológicas tras la exposición a NaAsO2

El análisis de las alteraciones morfológicas se realizó en los cortes ováricos de 4 µm con H&E utilizando un microscopio Olympus BX41 con cámara Olympus DP72. Así mismo, se incrementó el número de muestra utilizando cortes a 20 µm de cada



uno de los ovarios esto con la finalidad de considerar diferentes niveles del ovario y tener 4 cortes por ovario, para obtener una n = 80. Se tomaron las microfotografías necesarias para contemplar todos los folículos y cuerpos lúteos presentes. Los folículos ováricos se clasificaron conforme a los criterios de Bernal, Vickers, Hampton, Poynton, and Sloboda (2010) y los cuales se muestran en la Tabla VI y Figura 7 (fotos representativas).

Tabla VI.Criterios para la clasificación folicular

Tipo de Folículo	Criterio
Primordial	El ovocito está rodeado por una sola capa de células foliculares aplanadas.
Primario	El ovocito está rodeado solo por células de la granulosa cúbica.
Secundario	Se presentan capas de células de la granulosa y de la teca, sin antro visible.
Terciario o de Graaf	Presencia del antro y cumulus oophorus.
Antral/Atrésico	Disgregación de las células de la granulosa, presencia de células picnóticas.

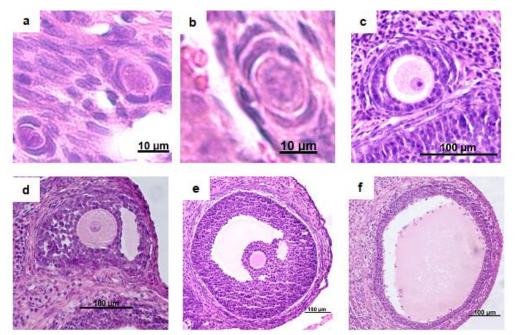


Figura 7. Clasificación de folículos ováricos.

a). Folículo primordial, b). folículo primario, c). folículo preantral, d). folículo antral, e). folículo de Graaf, f). folículo atrésico.

5.12.1. Fibrosis

Se tomaron microfotografías donde se detectó la presencia de fibrosis y se procedió a realizar la medición en el software Image-Pro Plus v. 4.1 (Media Cibernetics Co.) mediante la herramienta de rejilla, se cuantificó el área ocupada por la fibrosis y se obtuvo el porcentaje de área que esta ocupaba.

5.12.2. Congestión vascular

Se tomaron las microfotografías necesarias de todos los cortes ováricos para abarcar por completo el ovario, se procedió a medir mediante el software Image-Pro Plus v. 4.1 (Media Cibernetics Co.) los diámetros menores y mayores de las venas, considerando que su localización no se encontrara en la médula.

5.13. Inmunolocalización

Es una técnica que consiste en la localización de proteínas mediante anticuerpos, está basada en la alta especificidad y afinidad de la reacción antígeno-anticuerpo, permite la medición de la expresión de biomarcadores. Las proteínas a inmunolocalizar son los receptores de estrógenos α y β así como también el receptor de progesterona.

El anticuerpo específico se unirá al antígeno específico para formar un complejo antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos no se unen de modo covalente a los antígenos, sino que lo realizan por complementariedad espacial y química. Esta interacción se lleva a cabo entre el paratope (región variable del anticuerpo) y el epítope. La atracción es mediante interacciones electrostáticas y una posterior estabilización mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (de Dios Soler & Acosta, 2018).

El anticuerpo primario se une específicamente a su antígeno complementario, localizado en el tejido, posteriormente se añade un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante, lo que posibilitará que la señal sea visible al agregar e incubar el sustrato cromógeno diaminobencidina (DAB).



- Desparafinado: Se colocan las laminillas en una parrilla a 60°C hasta que la parafina se funda.
- Hidratación: Se realizan baños en vasos coplin: dos en xileno, dos en etanol puro, seguido por uno al 96%, 80%, 70% y finalmente un baño en PBS 1X.
 La duración de cada baño es de 5 minutos.
- Inactivación de peroxidasas endógenas: se cubre el tejido con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 15 minutos en ausencia de luz. Posteriormente se lavan las muestras tres veces con la solución PBS 1X durante 2 minutos por lavado.
- Bloqueo: Para evitar las interacciones inespecíficas de proteínas se cubre el tejido con una solución bloqueadora PSTB-leche al 10% y se incuba por un lapso de 15-20 minutos y luego se escurre el portaobjetos a temperatura ambiente. No dejar que el tejido se seque.
- Incubación con el anticuerpo primario: Se cubre el tejido con el anticuerpo específico del antígeno a demostrar. Se realiza la dilución del anticuerpo en una solución en PBST-leche al 1% y se incuba en cámara húmeda durante la noche a 4°C. Posteriormente, las laminillas se lavan tres veces por dos minutos con PBS 1X.

Los anticuerpos primarios que se utilizaron son los siguientes:

- ERα (D-12): sc-8005 de Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dilución 1:50.
- ERβ (1531): sc-390243 de Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dilución
 1:50.
- o PR (AB-52): sc-810 de Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dilución 1:100.
- Incubación con el anticuerpo secundario: se cubre el tejido con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 hora a 37°C. El anticuerpo secundario utilizado fue m-lgGκ BP-HRP: sc-516102 de Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dilución 1:100. Se lavan las muestras tres veces por dos minutos con PBS 1X.
- Revelado: La incubación se realiza en ausencia de luz y a temperatura ambiente. Se utiliza la solución cromógena DAB el cual es el sustrato para

IIIHAHCH

la HRP, el cual al ser enzimáticamente modificado produce un producto de color marrón en la zona donde se localizó el antígeno.

- Contraste: Se realiza un baño con hematoxilina 1:1 durante 1 minuto.
 Realizar un lavado con agua de la llave durante 5 minutos y después 3 lavados con agua destilada por 5 min.
- Deshidratación: el proceso es inverso al descrito en la hidratación. Se comienza con un baño de PBS 1X, seguido de baños ascendentes de etanol al 70%, 80% 96% y dos baños al 100% de etanol, luego se dan dos baños de xileno, cada baño dura 5 minutos.
- Montaje: Después del último baño se coloca una gota de resina Entellan sobre el tejido y se cubre con un cubreobjetos. El secado toma por lo menos 8 h, pasado este tiempo se puede realizar la observación al microscopio.

5.14. Inmunohistoquímica (IHQ)

Esta técnica tiene el mismo principio que la inmunolocalización, la diferencia es que no se le da contraste con un colorante, esto con la finalidad de poder medir la expresión de la proteína de interés.

5.14.1. Procedimiento.

- Desparafinado: Se colocan las laminillas en una parrilla a 60°C hasta que la parafina se funda.
- Hidratación: Se realizan baños en vasos coplin: dos en xileno, dos en etanol puro, seguido por uno al 96%, 80%, 70% y finalmente un baño en PBS 1X.
 La duración de cada baño es de 5 minutos.
- Inactivación de peroxidasas endógenas: se cubre el tejido con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 15 minutos en ausencia de luz. Posteriormente se lavan las muestras tres veces con la solución PBS 1X durante 2 minutos por lavado.
- Bloqueo: Para evitar las interacciones inespecíficas de proteínas se cubre el tejido con una solución bloqueadora PSTB-leche al 10% y se incuba por un



lapso de 15-20 minutos y luego se escurre el portaobjetos a temperatura ambiente. No dejar que el tejido se seque.

- Incubación con el anticuerpo primario: Se cubre el tejido con el anticuerpo específico del antígeno a demostrar. Se realiza la dilución de acuerdo al anticuerpo en una solución de PBST-leche al 1% y se incuba en cámara húmeda durante la noche a 4°C. Posteriormente, las laminillas se lavan tres veces por dos minutos con PBS 1X.
- Incubación con el anticuerpo secundario: se cubre el tejido con el anticuerpo secundario durante 1 hora a 37°C. Este se adiciona para facilitar la formación de uniones no covalentes estables entre el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y la porción Fc del primer anticuerpo. Se lavan las muestras tres veces por dos minutos con PBS 1X.
- Revelado: La incubación se realiza en ausencia de luz y a temperatura ambiente. Se utiliza la solución cromógena DAB el cual es el sustrato para la HRP, el cual al ser enzimáticamente modificado produce un color marrón en la zona donde se localizó el antígeno.
- Deshidratación: el proceso es inverso al descrito en la hidratación. Se comienza con un baño de PBS 1X, seguido de baños ascendentes de etanol al 70%, 80% 96% y dos baños al 100% de etanol, luego se dan dos baños de xileno, cada baño dura 5 minutos.
- Montaje: Después del último baño se coloca una gota de resina Entellan sobre el tejido y se cubre con un cubreobjetos. El sacado toma por lo menos 8 h, pasado este tiempo se puede realizar la observación al microscopio.

Los anticuerpos primarios que se utilizaron son:

- ERα (D-12): sc-8005 de Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dilución 1:50.
- ERβ (1531): sc-390243 de Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dilución 1:50.
- PR (AB-52): sc-810 de Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dilución 1:100.

Anticuerpo secundario:

 m-lgGκ BP-HRP: sc-516102 de Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dilución 1:100.

5.15. Análisis de imágenes

Para la adquisición de las imágenes se utilizó el microscopio triocular Olympus BX41 equipado con una cámara CCD Pixera y el análisis se realizó utilizando el software Image-Pro Plus v. 4.1 (Media Cibernetics Co.). Para el análisis se tomaron 10 microfotografías de las zonas con señal de cada muestra (control o expuesto). Las determinaciones de la intensidad de la señal para los diferente receptores ER (α y β) y PR se realizaron en unidades arbitrarias de intensidad óptica (UAD) en las laminillas reveladas por IHQ y sin contraste; se realizaron 20 mediciones de señal en cada laminilla para una n= 200 de cada ovario por receptor. Previo a la realización de la determinación se realizó la calibración del programa; el protocolo de calibración se describe en el Apéndice II. Los resultados se expresan en UAD.

5.16. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software Minitab 18 y GraphPad Prism 8.4.3.

Después de realizar las pruebas de normalidad, se analizaron mediante una prueba de *t-Student* de dos muestras. Los datos que no mostraron un comportamiento normal fueron analizados mediante la prueba de Mann-Whitney.

Los análisis estadísticos realizados bajo la prueba de *t-Student* de dos muestras fueron el aumento de peso, los niveles séricos de gonadotropinas, cantidad de folículos primarios y preantrales en fase proestro, en fase diestro se analizaron los folículos preantrales y antrales, se analizó los niveles de iAs en tejido hepático. Estos resultados se presentan como la media ± SD.

El análisis de la presencia y ausencia de fibrosis se realizó mediante la prueba exacta de Fisher. Los resultados se expresan como número y porcentaje de individuos que presentaron daño en tejido tras la exposición a NaAsO₂.

Los análisis estadísticos realizados mediante la prueba de Mann-Whitney fueron el consumo de alimento y el peso de los ovarios, cantidad de folículos primordiales, antrales, atrésicos y cuerpos lúteos en fase proestro, mientras que en

la fase de diestro se analizó la cantidad de folículos primordiales, primarios, atrésicos y cuerpos lúteos.

Para realizar el análisis de la expresión de los receptores hormonales se procedió a realizar la prueba estadística de determinar el coeficiente de correlación intraclase (ICC), para corroborar la consistencia de las mediciones realizadas, es decir, que el observador no presente diferencias al medir un mismo punto. Para ello se tomaron al azar 3 laminillas, de las cuales se tomaron 5 microfotografías y de cada una realizó la determinación de 8 mediciones de las unidades arbitrarias de densidad (UAD) por duplicado, para tener así una n=80. Se capturaron las mediciones en la herramienta StatTools: Intraclass Correlation Program de la Universidad China de Hong Kong y se obtuvo un ICC de 0.9916 lo cual indica una consistencia en las mediciones realizadas.

Los resultados de la expresión de los receptores hormonales se presentan como la mediana y el primer y tercer cuartil (25 – 75%).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Parámetros reproductivos

Aunque durante el protocolo de exposición se observó que las ratas comenzaron a mostrar una menor ingesta de su alimento tras el consumo del NaAsO₂, no hubo una diferencia significativa en el consumo de alimento, mismo resultado obtenido por Chattopadhyay and Ghosh (2010) (Tabla VII). En cuanto a la ganancia de peso, el grupo expuesto mostró una disminución no significativa con respecto al control sin exposición. Lo cual concuerda con lo reportado por Gómez et al. (2020) y S. Chattopadhyay et al. (1999). En cuanto al peso de las gónadas, se observó una ligera disminución del peso húmedo de los ovarios, sin embargo, no fue significativa (Tabla VII). Se realizó el cálculo del índice gonadosomático y la diferencia entre grupos no fue significativa. La disminución detectada coincide con lo reportado por Akram et al. (2009), Bourguignon et al. (2017), S. Chattopadhyay et al. (1999) y Chattopadhyay and Ghosh (2010). Estos resultados sugieren que la exposición no comprometió el desarrollo físico de las ratas.

Tabla VII.Parámetros corporales y gestacionales de los animales de los diferentes grupos de estudio.

	Concentración de NaAsO ₂ (ppm)			
	0	50	р	
Consumo de alimento (g/día)	19.85 / RIQ (18.52-19.96)	19.21 / RIQ (18.51-19.52)	0.54	
Aumento de peso (g)	22.6 ± 11.8	19.9 ± 9.12	0.57	
Peso húmedo de los ovarios (mg)	161.8 / RIQ (158.57-202.73)	181.1 / RIQ (169.4-205)	0.39	

Los valores representan la X±SD / Mediana y rango intercuartílico (25 - 75%). n=10, p>0.05.

6.2. Análisis del ciclo estral

En este estudio se observó que, durante el protocolo de exposición, a partir del día 22, el ciclo estral de las ratas expuestas osciló entre las fases de metaestro y diestro, generando un retraso de hasta 5 días en algunas ratas, así mismo de observó también variabilidad en la duración de cada fase, esto se puede observar en el ejemplo de la Tabla VIII y la Figura 8.

Los resultados observados coinciden con lo reportado por Chattopadhyay and Ghosh (2010) quienes observaron que entre 18 ± 2 días de exposición se encontraba estancado el ciclo estral en la fase de diestro. Para pasar de la fase metaestro a diestro se requiere que se eleven de manera significativa los niveles séricos de progesterona y que haya un aumento ligero de estradiol, mientras que para pasar de la fase diestro a proestro es necesario un aumento significativo en los niveles de estradiol, FSH y LH, así como una disminución significativa de progesterona, esto con la finalidad de estimular el crecimiento y la maduración de los folículos para que en la fase de estro se realice de manera adecuada la selección de los folículos antrales (McLean et al., 2012).

Estudios realizados previamente por Gutiérrez-Torres *et al.* (2015) mostraron que en la exposición a NaAsO₂ a más de 20 ppm había un déficit en la reproducción, lo que llevaba a los ratones hembra a no establecer el estado de preñez

Los resultados observados sugieren que la exposición a As promueve, además de las alteraciones en la esteroidogénesis ovárica ocasionando un arresto del ciclo estral por los niveles de hormonas gonadotrópicas que se generan ante la presencia de As.

Tabla VIII.

Progresión del ciclo estral tras 22 días de exposición a NaAsO₂

Día	Fase	
22	E	
23	D-P	P
24	D-P	
25	M-D	DE
26	M	
27	E-M	M
28	D	
29	D-P	Figura 8. Secuencia del ciclo estral en

6.3. Concentración de As inorgánico en tejido hepático

Las muestras de hígado procesadas mediante la digestión húmeda fueron cuantificadas mediante la técnica de HG-AAS en el Laboratorio de Química Analítica III de la Facultad de Ciencias Químicas de la UACH.

La concentración de As inorgánico total encontrada en los tejidos de las ratas expuestas fueron significativamente mayores a las del grupo control (Tabla IX).

Tabla IX.Concentración de As presente en el tejido hepático.

Crupo	Concentración de NaAsO2	Concentración
Grupo	(ppm)	(µg As/g tejido)
Control	0	4.12 ± 3.81
Expuesto	50	17.55 ± 6.34*

Valores expresados como media ± SD. *p<0.05. n=10. Prueba de *t-Student* de dos muestras.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Afolabi *et al.* (2015) donde los μ g As/g tejido tras 12 semanas de exposición a 50 ppm NaAsO₂ en hígado se encuentra entre 19.92 \pm 2 μ g As/g tejido, valores cercanos a los obtenidos en el

presente trabajo. Estos resultados son respaldados por Al-Forkan *et al.* (2016) donde observaron un incremento significativo en la acumulación de As en tejido hepático tras 90 días de exposición a 50 ppm de NaAsO₂ con respecto al grupo control.

6.4. Alteraciones en el desarrollo folicular debidas a la exposición a NaAsO2

Debido al desfase observado en los animales del grupo expuesto con respecto a la fase del ciclo estral, se optó por analizar las alteraciones morfológicas y endócrinas dividiéndolos en fase de proestro y diestro. Los resultados del análisis de las alteraciones en el desarrollo folicular en los animales expuestos y control se presentan en la Tabla X. En la fase proestro no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo expuesto en cuanto al número de folículos.

En cuanto a la fase diestro (Tabla X), en esta fase se encontró una disminución no significativa en el número de folículos primordiales y primarios, aunada a un incremento significativo en el número de folículos preantrales y un aumento no significativo en folículos atrésicos (Tabla X, Figura 9B). Así mismo, se encontró un aumento significativo en el número de cuerpos lúteos en el ovario de las ratas expuestas con respecto a las ratas control.

De acuerdo con Liu, Wu, Yan, and Zhang (2009), el arsénico tiene la capacidad de afectar el funcionamiento de dos proteínas reguladoras de péptidos, la activina A y el factor de crecimiento transformante β1 (TGF–β1). La activina A se encuentra ampliamente distribuida en diferentes tejidos y órganos y desempeña un papel importante en la regulación fisiológica ovárica, promoviendo la ovogénesis y la proliferación de las células de la granulosa, mejorando el crecimiento y la diferenciación de los folículos primordiales a terciarios, induce la atresia folicular para garantizar que el individuo tenga los mejores folículos para una reproducción exitosa (Adu-Gyamfi *et al.*, 2020). Por su parte, el TGF-β1 tiene efectos en la diferenciación y proliferación de las células de la granulosa, mejora la acción de la FSH, puede actuar como un potente inhibidor del crecimiento de las células

epiteliales (Adashi *et al.*, 1989; Bendell & Dorrington, 1988). El TGF-β tiene efectos sobre las células intersticiales de la teca y ejerce efectos divergentes en la esteroidogénesis, en presencia de TGF-β1, se inhibe el estímulo de LH para la biosíntesis de andrógenos, mientras que la biosíntesis de progesterona se incrementa (Magoffin, Gancedo, & Erickson, 1989). Los efectos de la exposición a arsénico están relacionado con lesiones y con la formación de fibrosis, donde TGF-β1 es un factor regulador importante (F.-R. Liu *et al.*, 2009) Se ha encontrado que un incremento de TGF-β1 promueve la síntesis de la activina A, la cual tiene una retroalimentación positiva, aumentando significativamente su expresión, promoviendo de esta manera el aumento significativo de los folículos secundarios y atrésicos tras la exposición a este tóxico.

Además, el incremento en los folículos atrésicos podría deberse a que la presencia de As interrumpe la señalización hormonal y por ende afecta la maduración de los folículos, lo cual concuerda con lo reportado por Perveen *et al.* (2019) y por Gómez *et al.* (2020).

Como se discutirá a mayor profundidad más adelante, el incremento significativo observado en los cuerpos lúteos puede atribuirse a que, de acuerdo con Stocco, Telleria, and Gibori (2007) durante la luteinización debe de existir una disminución del ERβ para que se lleve a cabo de manera adecuada el desarrollo del cuerpo lúteo, y tras la exposición se observó una significativa disminución de esta proteína durante la fase de diestro (resultados que se muestran posteriormente) y esta disminución podría ser la causa por la cual se presentó el incremento de cuerpos lúteos maduros.

Tabla X.Desarrollo folicular en ratas expuestas a NaAsO₂

Fase	Tipo de Folículo	Cantidad		Control		Expuesto		
		Control	Expuesto	▼/Mdn	± SD / RIQ (25 -75%)	▼/Mdn	± SD / RIQ (25 -75%)	р
Proestro	Primordial	32	35	6	3 – 6	4	4 – 7	0.84
	Primario	77	76	15.4	± 7.73	15.2	± 8.17	0.97
	Preantral	26	31	5.2	± 3.63	6.2	± 3.7	0.68
	Antral	115	55	14	13 – 17	11	6 – 11	0.46
	Atrésico	420	169	78	31 – 150	30	24 – 33	0.29
	CL Maduro	38	60	6	2 – 8	9	7 – 9	0.25
	CL Inmaduro	3	5	0	0 - 0	0	0 – 0	0.49
Diestro	Primordial	65	28	11	8 – 18	6	5 – 7	0.06
	Primario	98	59	15	10 – 25	12	10 – 12	0.59
	Preantral	22	43	4.4	± 1.34	8.6	± 2.41	0.01*
	Antral	64	81	12.8	± 3.27	16.2	± 6.94	0.36
	Atrésico	278	561	64	31 – 83	95	41 – 112	0.25
	CL Maduro	23	55	4	4 - 4	5	7 – 16	0.04*
	CL Inmaduro	1	6	0	0 – 0	0	0 – 0	0.52

Los valores representan la cantidad de estructuras ováricas encontradas en los cortes histológicos de tejido ovárico de acuerdo a la fase del ciclo estral en la que se encontraba la rata. En cuanto a la fase proestro se presenta mediana y rango intercuartílico (25 - 75%). Media y SD en folículos primarios y preantrales. En la fase diestro se presenta mediana y rango intercuartílico (25 - 75%). Media ± SD en folículos preantrales y antrales. n=40, *p<0.05.



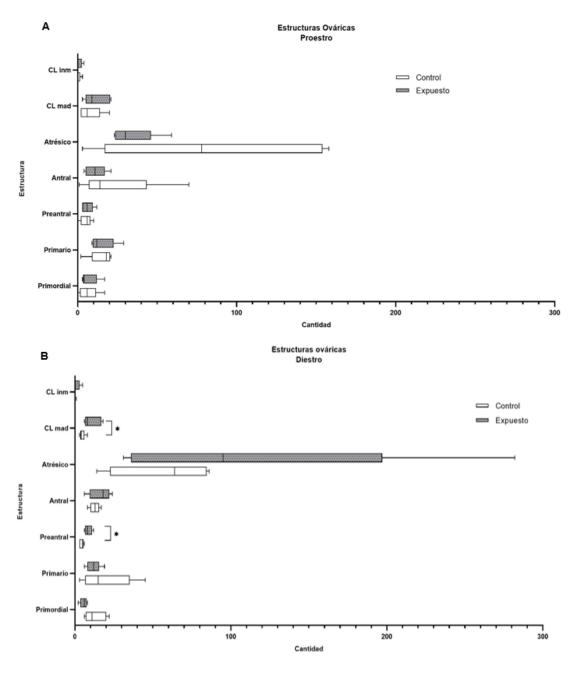


Figura 9. Efecto de la exposición a NaAsO $_2$ en el desarrollo folicular. A, fase proestro; B, fase diestro. Cada barra representa la presenta mediana y rango intercuartílico (1-99%), n = 10, *p<0.05.

6.5. Alteraciones morfológicas ováricas tras la exposición a NaAsO₂

Fue de nuestro interés investigar si la extensión del daño encontrado en el tejido ovárico era significativa entre los grupos. Para ello se determinaron las diferencias en la extensión de las lesiones utilizando las herramientas de medición y máscara en el ImageProPlus. Los resultados se expresan como medidas en pixeles de las alteraciones morfológicas encontradas en el ovario de los grupos de estudio se resumen en la Tabla XI. En el análisis estadístico de congestión vascular bajo la prueba de Mann-Whitney no se encontró una diferencia significativa entre el diámetro mayor y menor de los lechos vasculares del grupo expuesto a As en comparación con el grupo control. Los resultados encontrados por Gómez *et al.* (2020) mostraron que la exposición a arsénico cursa con el incremento en la congestión vascular y en la presencia de fibrosis en el tejido ovárico.

Tabla XI.Alteraciones morfológicas encontradas en los grupos de estudio.

Congestión vascular	Grupo	Mediana	р	
Diámetre mover	Control	104.355	0.732	
Diámetro mayor	Expuesto	103.760		
Diámetro menor	Control	41.282	0.405	
Diametro menor	Expuesto	39.184	0.405	
Fibrosis	Control n (%)	Expuesto n (%)	р	
Presencia	3 (33.33)	6 (66.67)	0.369	
Ausencia	7 (63.64)	4 (36.36)	0.309	

Los datos en la congestión vascular se analizaron bajo la prueba de Mann Whitney. Los valores se expresan como la mediana. En cuanto a la fibrosis se realizó el análisis mediante la prueba exacta de Fisher. Los valores se expresan como número y porcentaje de individuos que presentaron daño en tejido tras la exposición a NaAsO₂. n = 10, p>0.05.

La congestión vascular es una de las manifestaciones fisiopatológicas de un proceso inflamatorio. Los vasos sanguíneos se dilatan debido a la acción de

citocinas y quimiocinas para facilitar la llegada de las células que median y regulan la respuesta inmune. Tras la exposición a arsénico se ha encontrado un incremento en la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), la cual cataliza la formación de prostaglandinas (Gómez *et al.*, 2020). Las prostaglandinas son lípidos autocoides derivados del ácido araquidónico, realizan funciones para mantener la homeostasis y mediar mecanismos patogénicos, la respuesta inflamatoria y el desarrollo de neoplasia, así como también de amplificar la señal de dolor en el área donde ocurre la el proceso inflamatorio (Ricciotti & FitzGerald, 2011).

En cuanto a la fibrosis, Gómez *et al.* (2020) encontraron un aumento en la presencia de fibrosis en el ovario de ratas expuestas a 50 y 100 ppm. En este estudio, se muestra un incremento en la presencia de fibrosis, sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla XI).

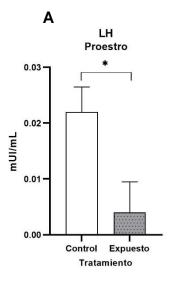
El proceso de fibrosis se presenta tras una lesión, ya sea por un trauma, un proceso infeccioso, autoinmune o toxicológico, el resultado más común es la muerte celular, esto principalmente en aquellas células que se localizan en el sitio de la lesión, así como también en las células que intervengan en el proceso para sanar el área afectada, esta muerte celular monta una respuesta en el sistema inmune debido a los estímulos inflamatorios que liberan las células necróticas y tejidos dañados, conocidos como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), los cuales son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Algunos de los factores liberados por las células dañadas son las alarminas, las cuales son capaces de reclutar células inflamatorias al sitio de daño mediante quimiocinas y citocinas. Entre las citocinas proinflamatorias se encuentran la IL-6, IL-1 β y TNF- α , las cuales son profibróticas. La IL-1 β promueve la formación de fibrosis en una manera parcialmente dependiente de IL-17. El TNF-α tiene propiedades profibróticas y la IL-3 se ha demostrado que actúa como un potente inductor de citocinas proinflamatorias y de movilizar y reclutar células inflamatorias. Por otro lado, los macrófagos derivados de monocitos expresan factores que influencian la fibrosis y la regeneración del tejido como el TGF-β, metaloproteínasas de la matriz extracelular (MMPs), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el Resistin-Like Molecule- α (RELM α). El TGF- β induce la migración de los fibroblastos y promueve el crecimiento de estos y activa la síntesis de colágeno, el RELM α apoya la producción de colágeno en los fibroblastos y el PDGF induce la mitosis celular de los fibroblastos y la quimiotaxis. Los macrófagos expresan MMPs e TIMP, los cuales además de tener actividad colagenolítica, pueden regular la degradación de la matriz, controlar la actividad de las quimiocinas, ya sea para atraer neutrófilos o para inactivar quimiocinas (Heindryckx & Li, 2018).

6.6. Efecto de la exposición a NaAsO₂ en los niveles séricos de LH, FSH, estradiol y progesterona.

En este estudio se determinaron los niveles de hormonas séricas en fase de proestro y diestro. Los resultados mostraron que niveles de FSH no fueron detectables, sin embargo, los niveles de LH, estradiol (E2) y progesterona (P4) séricos si lo fueron, los resultados se muestran en la Figura 10. Estudios realizados por Chattopadhyay *et al.* (1999) mostraron que los niveles hormonales se ven alterados por la exposición a arsénico. Sin embargo, en dicho estudio no se realizó la cuantificación por fases del ciclo estral.

En la fase de proestro se encontró que la LH tuvo una disminución significativa en los grupos expuestos con respecto al control; no se observaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de estradiol y progesterona tras la exposición (Figura 10, A, C y E, respectivamente). Los bajos niveles de LH encontrados en este estudio en los animales expuestos, difieren con lo reportado (McLean *et al.*, 2012), ya en esta fase de proestro se debería de observar la mayor concentración de LH, lo cual apoya a la regulación del estradiol y de la progesterona para disminuir su concentración. Como se puede observar, en esta fase los niveles de LH fueron menores con una tendencia, aunque no significativa, a aumentar los niveles de estradiol y de progesterona. Estos resultados sugieren que en los animales expuestos a NaAsO₂ podría haber una disrupción en el eje hipófisis-ovario, donde los altos niveles de progesterona y estradiol estén generando una retroalimentación negativa que disminuye los niveles de LH y de FSH.





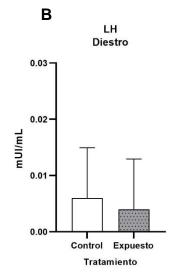
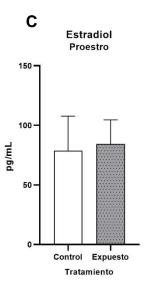
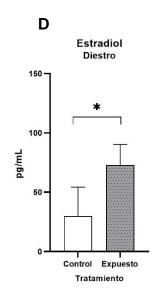
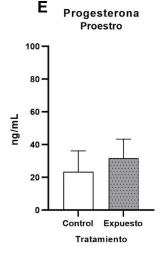


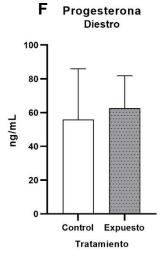
Figura 10. Efecto de la exposición a NaAsO₂ en los niveles séricos de LH, estradiol y progesterona.

A, C y E, niveles hormonales encontrados en los grupos experimentales en la fase de proestro; B, D y F, niveles hormonales encontrados en los grupos experimentales en la fase de diestro. Cada barra representa la media ± SD de los valores séricos (n = 5), *p<0.05. Prueba de t-Student de dos muestras.









En la fase diestro los niveles de LH (Figura 10, B) no mostraron diferencia significativa entre el grupo expuesto o no a NaAsO2, sin embargo, los valores de esta hormona fueron menores a los observados en la fase de proestro (Figura 10 A y B, respectivamente), lo cual coincide con lo reportado en la literatura (McClean et al., 2012). Los niveles de LH en los grupos expuestos en ambas fases no muestran diferencia estadísticamente significativa. En cuanto a los niveles de estradiol, se encontró una diferencia significativa entre el grupo expuesto y el grupo control, siendo mayores los niveles en el grupo expuesto que en el grupo control. Esta diferencia se debió principalmente al descenso del estradiol en el grupo control de la fase de proestro a diestro (Figura 10 C y D, respectivamente), lo cual coincide con lo descrito por McClean et al (2012). Sin embargo, los niveles de estradiol en el grupo expuesto se mantuvieron elevados y en niveles similares a la fase de proestro, lo cual podría explicar en parte que los animales tuvieran niveles no detectables de FSH. Adicionalmente, el estradiol puede tener importantes efectos en diferentes tipos de células y a través de mecanismos relacionados con los receptores ER α y ER β , pero también a través de receptores independientes de la activación genómica (GPER1), tales como citocinas inflamatorias (por ejem.; IL-2), moléculas de adhesión (ejem.: heregulin), reguladores del ciclo celular (proteínas activadoras de RAS como las ciclinas A y D1), factores de crecimiento péptídicos incluyendo al EGF, la insulina, el IGF1 y el TGFβ (Fuentes & Silveira, 2019). Así pues, un incremento en los niveles de esta hormona podría tener múltiples efectos con importantes repercusiones en la fisiología ovárica.

Por su parte, los niveles de progesterona en la fase de diestro mostraron un incremento no significativo en ambos grupos con respecto a fase de proestro (Figura 10 E y F, respectivamente), pero sin revelar diferencia significativa entre ambos grupos. El aumento de los niveles de progesterona en la fase de diestro corresponde al establecimiento de la fase lútea en el ser humano, contribuye a la regulación de la LH y favorece a la preparación del útero para la correcta implantación del ovocito fecundado.

6.7. Localización inmunohistoquímica de receptores hormonales

La localización de los receptores se detectó mediante inmunohistoquímica utilizando anticuerpos monoclonales comerciales específicos contra la cadena ligera kappa de las proteínas del ER α , ER β y del PR en el ovario de ratas tratadas y no tratadas con arsénico.

La localización del ER α (Figura 11) en las células de la teca coincidió con lo reportado con Jakimiuk *et al.* (2002), Khristi *et al.* (2018), Lee *et al.* (2009), Pelletier *et al.* (2000) y Rosenfeld *et al.* (2001). El ER β (Figura 12) se localizó en las células de la granulosa reportadas anteriormente por Márquez (2002), Vasconcellos *et al.* (2015). En cuanto al PR se localizó solamente en las células de la granulosa (Figura 13) concordando con lo indicado por Natraj and Richards (1993).

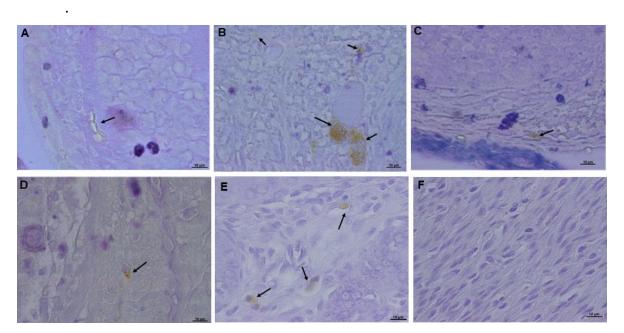


Figura 11. Localización inmunohistoquímica del ER α en las células de la teca en ovario de rata. Microfotografías representativas de la localización del ER α en ovario de rata control. Las flechas indican las células positivas a este receptor. Aumento original 60x. A y B inmunolocalización en tejido ovárico de rata control; C y D en tejido ovárico de rata expuesta; E control positivo de inmunolocalización en tejido uterino de rata control; D control negativo en tejido uterino.



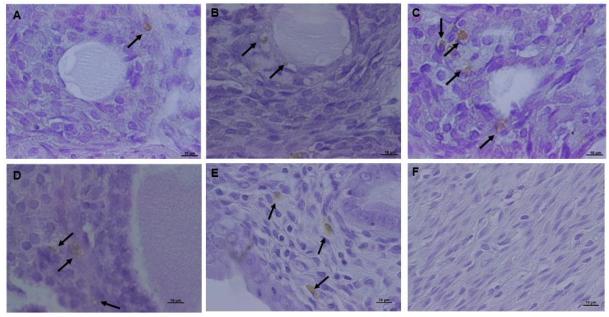


Figura 12. Localización inmunohistoquímica del ERβ en las células de la teca en ovario de rata. Microfotografías representativas de la localización del ERβ en ovario de rata control. Las flechas indican las células positivas a este receptor. Aumento original 60x. A y B inmunolocalización en tejido ovárico de rata control; C y D en tejido ovárico de rata expuesta; E control positivo de inmunolocalización en tejido uterino de rata control; D control negativo en tejido uterino.

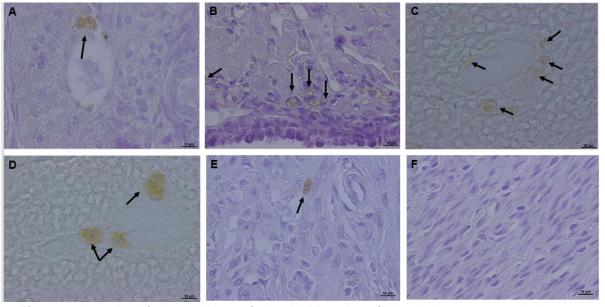
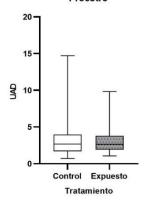


Figura 13. Localización inmunohistoquímica del PR en las células de la teca en ovario de rata. Microfotografías representativas de la localización del PR en ovario de rata control. Las flechas indican las células positivas a este receptor. Aumento original 60x. A y B inmunolocalización en tejido ovárico de rata control; C y D en tejido ovárico de rata expuesta; E control positivo de inmunolocalización en tejido uterino de rata control; D control negativo en tejido uterino.

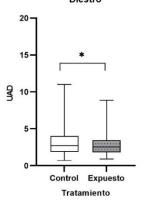
6.8. Efecto de la exposición a NaAsO2 en la expresión de receptores

hormonales: ERα, ERβ y PR.

A Receptor de Estrógenos α Proestro



B Receptor de Estrógenos α Diestro



Receptor de Estrógenos β

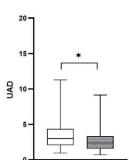
Diestro

C Receptor de Estrógenos β
Proestro

20

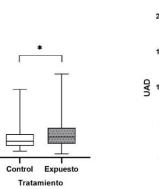
15

₹ 10·



Control

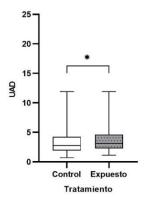
β





Tratamiento

Expuesto



Receptor de Progesterona

Proestro

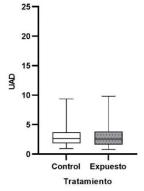


Figura 14. Efecto de la exposición a NaAsO₂ en la expresión de receptores $ER\alpha$, $ER\beta$ y PR en ovario de rata.

Los niveles de expresión de los receptores se determinaron mediante IHQ y análisis de imágenes en unidades de densidad arbitraria (UAD) en ovario de ratas control no expuestas o expuestas a 50 ppm. A y B, receptor $ER\alpha$, en fase de proestro y diestro respectivamente; C y D, ERβ; E y F, PR. Cada barra representa la mediana y el rango intercuartílico (1-99%)diferentes expresión de los receptores (n = 1000). Prueba de Mann Whitney, *p<0.05.

El nivel de expresión de los receptores se realizó de acuerdo con la metodología descrita y en cortes no contrastados. Cabe mencionar que, de acuerdo a la bibliografía, este sería el primer estudio donde se reportan estos niveles considerado las fases específicas del ciclo estral, además de ser el primer estudio en tejido ovárico. Los resultados obtenidos se comparan con los resultados obtenidos en otras investigaciones en tejidos en los cuales se expresan estos receptores.

En la fase proestro no se observaron diferencias significativas en cuanto al nivel de expresión del ERα en el ovario de los animales expuestos contra el control sin exposición (Figura 14A). Sin embargo, en la fase diestro se encontró una disminución significativa de la expresión del ER α en el ovario de animales expuestos a NaAsO₂ con respecto a los controles sin exposición (Figura 14B). Esto concuerda con lo reportado por Stoica et al. (2000), quienes observaron un decremento de la proteína del ERα hasta en un 50% en células de cáncer de mama MCF-7 tras la exposición a 0.1 µM de NaAsO2 en cultivo y mediante inmunoblot. Ellos también reportaron que el arsenito bloquea la unión del estradiol al ERα, esto pudiera ser la razón por la cual se ve disminuida la expresión en la fase diestro. Adicionalmente, se ha reportado que tras un knockout (αERKO) de este receptor las hembras son infértiles y muestran ovarios que poseen folículos grandes, hemorrágicos y quísticos, manifiestan también la falta de ovulación espontánea. Los ovarios αERKO contienen folículos normales hasta los folículos antrales pequeños, las características predominantes son múltiples folículos hemorrágicos grandes y la ausencia de cuerpos lúteos, lo que indica un fenotipo anovulatorio, se manifiestan elevados niveles de LH, lo cual afecta en la retroalimentación negativa en el hipotálamo (Emmen et al., 2005).

En cuanto a la expresión del ER β , en la fase de proestro (Figura 14C) se encontró un aumento significativo en la intensidad de expresión de proteína del receptor de estrógenos β , esto concuerda con lo reportado por Che *et al.* (2019) quienes encontraron un aumento significativo del nivel de proteína en células epiteliales alveolares tipo II (AECII) expuestas a NaAsO₂, tejido en el cual también se expresa el ER β , esto podría ser atribuido a que el As puede actuar como un

estrógeno ambiental y puede incrementar la expresión de ERβ e interferir con la señalización del receptor de estrógenos (Che *et al.*, 2019). En nuestro estudio, nosotros encontramos que durante el proestro los niveles de estradiol no tuvieron diferencia significativa con el grupo control, por lo cual el aumento en la expresión podría ser debido al bloqueo en el señalamiento intracelular, sin embargo, estudios a mayor profundidad se requieren para asegurar este evento.

En cuanto a la fase de diestro, se encontró una disminución significativa en la expresión del ERβ (Figura 14D) en el grupo expuesto con respecto al control sin exposición. La disminución en este receptor probablemente pueda atribuirse a la regulación de los receptores debido al incremento en los niveles séricos de estradiol, los cuales se encontraron elevados de forma significativa en esta etapa, ya que, al haber un exceso de ligando, el receptor se regula de manera inversa.

Se ha encontrado que tras el knockout del ER β (β ERKO) las hembras adultas son subfértiles, poseen ovarios caracterizados por mostrar escasez de folículos en crecimiento y cuerpos lúteos. β ERKO muestran niveles normales de gonadotropinas y los ovarios poseen todas las etapas de maduración folicular, incluyendo el cuerpo lúteo, sin embargo, las camadas en roedores tienden a mostrar un menor número de productos (Emmen *et al.*, 2005). ER β tiene un rol directo en el desarrollo folicular ya que es requerido para la formación del antro y la maduración de los folículo preovulatorios (Hegele-Hartung *et al.*, 2004).

Emmen *et al.* (2005) demostraron *in vitro* que la foliculogénesis y la ovulación pueden ocurrir normalmente en ausencia del ER α pero no en ausencia del ER β lo cual sugiere que el ER podría no mediar de manera directa la respuesta ovulatoria tras el pico de LH, sino que tiene un papel más importante en la propagación de la diferenciación folicular que conduce al pico de LH para que se lleve de manera exitosa la ovulación.

En cuanto al receptor para la progesterona (PR), en la fase de proestro se encontró un incremento significativo (Figura 14E) en el nivel de expresión de proteína del receptor, en tanto que en la fase de diestro no se encontraron diferencias

significativas (Figura 14F). Estos resultados coinciden con lo reportado por Stoica et al. (2000) en células de cáncer de mama MCF-7.

En nuestro estudio, el incremento en la expresión en fase de proestro tras la exposición a As podría resultar en una alteración en la señalización durante esta fase, debido a que a pesar de que la diferencia no fue significativa en los niveles séricos de progesterona encontrados en el grupo expuesto fue mayor, se esperaría que el nivel de expresión del PR fuera menor debido a la retroalimentación negativa.

La diferencia en la expresión del receptor entre los grupos control en ambas fases es estadísticamente significativa, esto bajo la prueba de *t-Student* de dos muestras (p=0.044), esto podría atribuirse a que durante la fase proestro los niveles séricos de progesterona son menores, por lo tanto, la expresión de los receptores aumenta, mientras que en la fase de diestro los niveles de progesterona se elevan, y el nivel de expresión de PR disminuye. Mientras que en los grupos expuestos en ambas fases bajo la prueba de Mann-Whitney la diferencia resultó ser estadísticamente significativa (p=0.00), esto podría atribuirse a que tras analizar los niveles séricos de progesterona en ambas fases en las ratas expuestas se encontró un aumento significativo de progesterona en la fase diestro (p=0.047), incremento asociado a un comportamiento normal del ciclo estral, por lo cual se esperaría una disminución en la expresión del PR en esta fase, donde los resultados de la expresión del receptor no fue estadísticamente significativa, lo cual podría indicar que el As no interrumpe la señalización en la fase diestro.

El PR esta expresado en el eje reproductivo femenino desde el hipotálamo y la hipófisis hasta el ovario, en las células de la granulosa de los folículos preovulatorios en respuesta al incremento de LH que ocurre justo antes de la ovulación, incremento no observado tras el protocolo de exposición a As, esto podría indicar que el As afecta la síntesis de LH, repercutiendo en la esteroidogénesis ovárica. Se ha reportado que el bloqueo de su ligando resulta en fallo total de la ovulación (Bishop, Hennebold, Kahl, & Stouffer, 2016). El knockout del PR (PRKO) conduce a un fenotipo anovulatorio, y aunque se administren gonadotropinas exógenas, lo ovocitos quedan atrapados en los folículos.

El PR es necesario específicamente para la ruptura folicular inducida por LH para la ovulación, pero no para la posterior luteinización de las células de la granulosa para formar el cuerpo lúteo. Tras el knockout de este receptor se observan tasas de ovulación severamente reducidas, así como también defectos en la implantación, lo cual afecta a la fertilidad. El aumento de progesterona por los folículos preovulatorios, relacionado con la reanudación de la meiosis y la maduración del ovocito, podría sugerir un papel para la progesterona y/o PR en este proceso; pero la baja expresión de PR en las células de cúmulo en relación con las de la granulosa podría indicar que no está involucrado en la maduración del complejo cúmulo-ovocito o en la viabilidad del ovocito (Akison & Robker, 2012).

7. CONCLUSIONES

Los resultados encontrados en ratas hembra expuestas a 50 ppm de NaAsO₂ mediante la ingesta oral en gelatina nos permiten concluir que esta dosis de exposición no produjo cambios significativos en el peso de las ratas, consumo de alimento y peso de las gónadas no tuvieron un cambio, por lo tanto, se podría decir que en cuanto a esos parámetros no se observó comprometido el desarrollo físico de las ratas.

Se identificó un aumento en la cantidad de As inorgánico presente en tejido hepático, órgano en el cual lleva a cabo su biotransformación, demostrando así la acumulación de este tóxico en el órgano tras el protocolo de exposición.

La exposición a NaAsO₂ ocasionó alteraciones en el ciclo estral, se observó un retardo en la maduración de los folículos con alteraciones en la continuidad del ciclo estral, incremento en la cantidad de folículos preantrales y cuerpos lúteos maduros. El incremento en cuerpos lúteos maduros podría estar en relación a la disminución observada en las hormonas gonadotrópicas, la LH mostró una disminución de 5.5 veces, en el grupo expuesto en la fase proestro, comparado con el control. La disminución de la LH podría contribuir a mantener durante más tiempo los folículos antrales y preantrales, sin embargo, se requieren estudios más específicos para demostrar este hecho. En cuanto a la fase de diestro, se encontró un aumento significativo de 2.43 veces en el estradiol en el grupo expuesto, esto podría contribuir a incrementar los efectos de esta hormona disminuyendo la FSH por retroalimentación, lo que en la fase sucesiva podría limitar el número de folículos primarios. En los niveles de progesterona no se observó una diferencia significativa entre grupos en ninguna de las fases, lo cual podría indicar que el As no afecta a la producción de esta hormona.

En cuanto a la expresión de los receptores para estradiol y progesterona, se localizó el $ER\alpha$ en las células de la teca de los folículos ováricos y en la fase diestro, tras la exposición a $NaAsO_2$, se observó una disminución significativa de la proteína de este receptor. En nuestro estudio se observó que la disminución en la fase diestro del $ER\alpha$ no afectó el desarrollo de los folículos preantrales ni antrales, sino que estos

incrementaron, en contraste con lo reportado por Emmen *et al.* (2005), quienes discuten que la disminución del ER α podría condicionar la maduración de los folículos en el siguiente ciclo disminuyendo el número de folículos a madurar. El ER β se inmunolocalizó en las células de la granulosa, su nivel de expresión durante la fase de proestro tuvo un aumento significativo debido probablemente al incremento en la producción de estradiol en dicha fase, sin embargo, la disminución significativa en la fase de diestro sea la consecuencia de una retroalimentación negativa por niveles muy elevados de estradiol en dicha fase.

En cuanto al receptor PR este fue localizado en células de la granulosa donde la expresión de la proteína del PR en la fase proestro manifestó un incremento significativo tras la exposición a As, esto podría señalar alteraciones en la señalización hormonal, ya que, al comparar los niveles séricos de progesterona con la intensidad de expresión del receptor, los niveles del receptor encontrados no deberían de ser significativos.

La integración de los resultados se observa en un resumen gráfico (Figura 17). El As afecta a la hipófisis anterior ocasionando una alteración en los niveles séricos hormonales de estradiol, LH y FSH disminuyendo la maduración de los folículos ováricos. El As puede interferir en la unión de los estrógenos y progesterona a su receptor, esto podría ser mediante el bloqueo de unión de la hormona al receptor o afectando a las proteínas que conforman el complejo de transcripción provocando una expresión anormal de los genes dependientes de estrógenos y progesterona relacionados con la salud reproductiva, como son TGFβ, FOXO1, GDF-9, activina, entre otros. Ambos mecanismos comprometen la función ovárica del individuo, considerando la desregulación hormonal, la disminución de LH podría contribuir al arresto del ovocito dentro del folículo, el decremento en la FSH evita que los folículos maduren de manera adecuada y no se conviertan en folículos terciarios y se queden como folículos preantrales, consecuencia del incremento de TGF-β1 y la activina tras la presencia de As, también dirige hacia el desarrollo deteriorado de los folículos ováricos, incrementando la atresia. La desregulación del ERα condiciona la maduración de los folículos, presentándose folículos hemorrágicos y quísticos, así



como anovulación. La disminución del ERβ conduce a la escasez de folículos en crecimiento y cuerpos lúteos, así como a la falta del desarrollo del antro folicular. Los efectos de la disminución del PR se dirigen sobre todo al fallo en la ovulación y a la mala implantación del ovocito tras la fecundación. Todas estas complicaciones podrían contribuir a la incidencia de abortos espontáneos, partos prematuros, mortinatos e infertilidad en la población femenina expuesta a concentraciones de As. Estudios adicionales sobre los receptores de LH y FSH podrían ayudar a comprender si el As afecta desde ese punto de regulación hormonal o si es directo el efecto sobre los receptores hormonales, también un análisis del TGF-β y de la activina A en ovario proporcionaría información sobre el mecanismo de acción que tiene el As sobre la maduración folicular, y con ello, tener un panorama más amplio de cuales puntos de regulación el As afecta para encontrar alternativas que mejoren la salud reproductiva femenina.

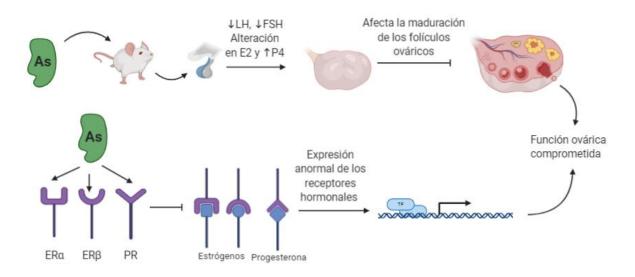


Figura 15. Efecto del As en expresión de receptores hormonales en ovario.

8. PERSPECTIVAS

Para ampliar el conocimiento obtenido acerca del efecto de la exposición crónica a As en la expresión de los receptores hormonales se propone continuar con la investigación de los siguientes puntos:

- Analizar la expresión de los receptores hormonales en ovario considerando las fases proestro y diestro mediante microarreglos o RT-qPCR (Chatterjee & Chatterji, 2010).
- Analizar la expresión de los receptores de LH y FSH en ovario considerando las fases proestro y diestro del ciclo estral, ya que se esperarían niveles anormales como reportan Bourguignon *et al.* (2017), S. Chattopadhyay *et al.* (1999), Davey *et al.* (2007).
- Analizar la expresión del TGF- β y de la Activina A en ovario mediante RTqPCR (F.-R. Liu *et al.*, 2009).

9. REFERENCIAS

- Adashi, E. Y., Resnick, C. E., Hernandez, E. R., May, J. V., Purchio, A., Twardzik, D. R. J. M., & endocrinology, c. (1989). Ovarian transforming growth factor-β (TGFβ): cellular site (s), and mechanism (s) of action. *61*(2), 247-256.
- Adu-Gyamfi, E. A., Djankpa, F. T., Nelson, W., Czika, A., Sah, S. K., Lamptey, J., . . . Wang, Y.-X. J. C. (2020). Activin and inhibin signaling: From regulation of physiology to involvement in the pathology of the female reproductive system. 133, 155105.
- Afolabi, O. K., Wusu, A. D., Ogunrinola, O. O., Abam, E. O., Babayemi, D. O., Dosumu, O. A., . . . Toxicology. (2015). Arsenic-induced dyslipidemia in male albino rats: comparison between trivalent and pentavalent inorganic arsenic in drinking water. *16*(1), 15.
- Akison, L., & Robker, R. J. R. i. D. A. (2012). The critical roles of progesterone receptor (PGR) in ovulation, oocyte developmental competence and oviductal transport in mammalian reproduction. *47*, 288-296.
- Akram, Z., Jalali, S., Shami, S. A., Ahmad, L., Batool, S., & Kalsoom, O. (2009). Genotoxicity of sodium arsenite and DNA fragmentation in ovarian cells of rat. *Toxicology letters*, *190*(1), 81-85. doi:10.1016/j.toxlet.2009.07.003
- Al-Bader, M. D. (2006). Estrogen receptors alpha and beta in rat placenta: detection by RT-PCR, real time PCR and Western blotting. *Reproductive Biology Endocrinology*, *4*(1), 13.
- Al-Forkan, M., Islam, S., Akter, R., Shameen Alam, S., Khaleda, L., Rahman, Z., & Salma Chowdhury, D. J. J. C. H. S. (2016). A sub-chronic exposure study of arsenic on hematological parameters, liver enzyme activities, histological studies and accumulation pattern of arsenic in organs of Wistar albino rats. *5*(2).
- Alarcón, M., Leal, L., Martín, I., Miranda, S., & Benavides, A. (2014). Arsénico en Agua: presencia, cuantificación analítica y mitigación. *Centro de Investigación en Materiales Avanzados*.
- Alsina Sanchís, E., Figueras, A., Lahiguera, A., Gil Martín, M., Pardo, B., Piulats, J. M., . . . Vidal, A. (2017). TGFβ controls ovarian cancer cell proliferation. International journal of molecular sciences, 18(8), 1658.
- ATSDR. (2009). La toxicidad del Arsénico. Estudios de Caso en Medicina Ambiental (CSEM).

 Retrieved from https://www.atsdr.cdc.gov/es/csem/arsenic/comousarcurso.html el 05/06/19
- Bellido, P., & Bellido, P. (1999). Receptores a estrógenos y progesterona. *45*(1), 9-13.
- Bendell, J. J., & Dorrington, J. (1988). Rat thecal/interstitial cells secrete a transforming growth factor-β-like factor that promotes growth and differentiation in rat granulosa cells. *Endocrinology*, *123*(2), 941-948.



- Bernal, A. B., Vickers, M. H., Hampton, M. B., Poynton, R. A., & Sloboda, D. M. (2010). Maternal undernutrition significantly impacts ovarian follicle number and increases ovarian oxidative stress in adult rat offspring. *PLoS One, 5*(12), e15558. doi:10.1371/journal.pone.0015558
- Bishop, C. V., Hennebold, J. D., Kahl, C. A., & Stouffer, R. L. J. B. o. r. (2016). Knockdown of progesterone receptor (PGR) in macaque granulosa cells disrupts ovulation and progesterone production. *94*(5), 109, 101-110.
- Boonyaratanakornkit, V., & Edwards, D. P. (2007). Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids. *Semin Reprod Med, 25*(3), 139-153. doi:10.1055/s-2007-973427
- Boonyaratanakornkit, V., McGowan, E., Sherman, L., Mancini, M. A., Cheskis, B. J., & Edwards, D. P. (2007). The role of extranuclear signaling actions of progesterone receptor in mediating progesterone regulation of gene expression and the cell cycle. *Molecular Endocrinology*, 21(2), 359-375.
- Bourguignon, N. S., Bonaventura, M. M., Rodríguez, D., Bizzozzero, M., Ventura, C., Nuñez, M., . . . Libertun, C. (2017). Evaluation of sodium arsenite exposure on reproductive competence in pregnant and postlactational dams and their offspring. *Reproductive Toxicology*, 69, 1-12. doi:10.1016/j.reprotox.2017.01.002
- Buchet, J. P., & Lison, D. (2000). Clues and uncertainties in the risk assessment of arsenic in drinking water. *Food chemical toxicology, 38*, S81-S85.
- Chakraborty, S., Willett, H., & Biswas, P. (2012). Insight into estrogen receptor betabeta and alpha-beta homo-and heterodimerization: A combined molecular dynamics and sequence analysis study. *Biophysical chemistry*, *170*, 42-50.
- Chatterjee, A., & Chatterji, U. (2010). Arsenic abrogates the estrogen-signaling pathway in the rat uterus. 8(1), 80.
- Chattopadhyay, Ghosh, Chaki, Debnath, & Ghosh. (1999). Effect of sodium arsenite on plasma levels of gonadotrophins and ovarian steroidogenesis in mature albino rats: duration-dependent response. *J Toxicol Sci, 24*(5), 425-431. doi:10.2131/jts.24.5_425
- Chattopadhyay, S., & Ghosh, D. (2010). Role of dietary GSH in the amelioration of sodium arsenite-induced ovarian and uterine disorders. *Reproductive Toxicology*, 30(3), 481-488.
- Chattopadhyay, S., Ghosh, S., Chaki, S., Debnath, J., & Ghosh, D. (1999). Effect of sodium arsenite on plasma levels of gonadotrophins and ovarian steroidogenesis in mature albino rats: duration-dependent response. *The Journal of toxicological sciences*, *24*(5), 425.
- Che, W., Yang, M., Cheng, Y., Wu, M., Lan, Y., & Zhang, H. J. T. i. V. (2019). Arsenic induces gender difference of estrogen receptor in AECII cells from ICR fetal mice. *56*, 133-140.
- Costanzo, L. S. (2011). Fisiología 4 ed.: Elsevier.



- Cui, J., Shen, Y., & Li, R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in molecular medicine*, *19*(3), 197-209.
- Davey, J. C., Bodwell, J. E., Gosse, J. A., & Hamilton, J. W. (2007). Arsenic as an endocrine disruptor: effects of arsenic on estrogen receptor–mediated gene expression in vivo and in cell culture. *Toxicological sciences*, *98*(1), 75-86.
- Dávila-Esqueda, M. E., Jiménez-Capdeville, M. E., Delgado, J. M., De la Cruz, E., Aradillas-García, C., Jiménez-Suárez, V., . . . Llerenas, J. R. (2012). Effects of arsenic exposure during the pre-and postnatal development on the puberty of female offspring. *Experimental toxicologic pathology, 64*(1-2), 25-30.
- De Dios Soler, M., & Acosta Haab, G. (2018). Guía de inmunohistoquímica para técnicos
- De Tomasi, J. B., Crespo, A. A., & Crespo, A. (2012). Desarrollo folicular en el ovario. *Rev Sal Quintana Roo, 5*, 12-18.
- Devesa, V., Del Razo, L. M., Adair, B., Drobná, Z., Waters, S. B., Hughes, M. F., . . . Thomas, D. J. (2004). Comprehensive analysis of arsenic metabolites by pH-specific hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19(11), 1460-1467.
- Edwards, D. P. (2005). Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone., 67(1), 335-376. doi:10.1146/annurev.physiol.67.040403.120151
- Edwards, D. P., Wardell, S. E., & Boonyaratanakornkit, V. (2002). Progesterone receptor interacting coregulatory proteins and cross talk with cell signaling pathways. *J Steroid Biochem Mol Biol, 83*(1-5), 173-186. doi:10.1016/s0960-0760(02)00265-0
- Edwards, D. P., Wardell, S. E., & Boonyaratanakornkit, V. (2002). Progesterone receptor interacting coregulatory proteins and cross talk with cell signaling pathways. *83*(1-5), 173-186.
- Emmen, J. M., Couse, J. F., Elmore, S. A., Yates, M. M., Kissling, G. E., & Korach, K. S. J. E. (2005). In vitro growth and ovulation of follicles from ovaries of estrogen receptor (ER) α and ERβ null mice indicate a role for ERβ in follicular maturation. *146*(6), 2817-2826. doi: 10.1210/en.2004-1108
- Espinoza, J. L., Emiliano, M. E., Hernández Aguilar, G., Abreu, A., Denes, F., Rojas Durán Jorge, . . . Soto, A. H. (2013). El papel de los estrógenos y sus receptores en la prevención y promoción de enfermedades proliferativas de la glándula prostática. *eNeurobiologia*, *4*(8).
- Fu, J., Woods, C. G., Yehuda-Shnaidman, E., Zhang, Q., Wong, V., Collins, S., . . . Pi, J. (2010). Low-level arsenic impairs glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells: involvement of cellular adaptive response to oxidative stress. *J Environmental health perspectives, 118*(6), 864-870. doi:10.1289/ehp.0901608

- Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *116*, 135. doi:10.1016/bs.apcsb.2019.01.001
- García Rodríguez, C., & Martinez Maldonado, I. (2009). Ventajas del método de quimioluminiscencia frente al de radioinmunoanálisis (RIA). *Visión Científica,* 1, 60.
- Gómez, Z., Sánchez, B., González, C., Levario, M., & Ballinas, L. (2020). Expresión de proteínas relacionadas a la inflamación y al funcionamiento endotelial en ovario de ratas wistar expuestas a arsenito de sodio. (Maestría en Ciencias en Biotecnología), Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, Chih.
- González Horta, C., Ballinas Casarrubias, L., Sánchez Ramírez, B., Ishida, M. C., Barrera Hernández, A., Gutiérrez Torres, D., . . . Mendez, M. A. (2015). A concurrent exposure to arsenic and fluoride from drinking water in Chihuahua, Mexico. *International journal of environmental research public health, 12*(5), 4587-4601.
- Graham, J. D., & Clarke, C. L. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews*, *18*(4), 502-519.
- Grimm, S. L., Hartig, S. M., & Edwards, D. P. (2016). Progesterone receptor signaling mechanisms. *Journal of molecular biology, 428*(19), 3831-3849.
- Guerrero, F., Sánchez, B., González, C., Levario, M., & Infante, R. (2017). Expresión de proteínas relacionadas a la inflamación en placenta de ratones Balb/c expuestos a arsénito de sodio durante la gestiación. (Maestría en Ciencias en Biotecnología), Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, Chih.
- Gutiérrez-Torres, D. S., González-Horta, C., Del Razo, L. M., Infante-Ramírez, R., Ramos-Martínez, E., Levario-Carrillo, M., & Sánchez-Ramírez, B. (2015). Prenatal exposure to sodium arsenite alters placental glucose 1, 3, and 4 transporters in Balb/c mice. *J BioMed research international, 2015.* doi:10.1155/2015/175025
- Gutiérrez Rodríguez, A., & Camacho Arroyo, I. (2016). Papel del factor de bloqueo inducido por progesterona (PIBF) en embarazo y cáncer. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas, 19*(2), 109-115.
- Hegele-Hartung, C., Siebel, P., Peters, O., Kosemund, D., Muller, G., Hillisch, A., . . . Fritzemeier, K. (2004). Impact of isotype-selective estrogen receptor agonists on ovarian function. *101*, 5129-5134.
- Heindryckx, F., & Li, J.-P. (2018). Role of proteoglycans in neuro-inflammation and central nervous system fibrosis. *Matrix Biology*, *68*, 589-601. doi:10.1016/j.matbio.2017.11.010
- Jakimiuk, A. J., Weitsman, S. R., Yen, H.-W., Bogusiewicz, M., & Magoffin, D. A. (2002). Estrogen receptor α and β expression in theca and granulosa cells from women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 87(12), 5532-5538.



- Kautzky-Willer, A., Harreiter, J., & Pacini, G. (2016). Sex and gender differences in risk, pathophysiology and complications of type 2 diabetes mellitus. *J Endocrine reviews*, *37*(3), 278-316. doi:10.1210/er.2015-1018
- Khristi, V., Chakravarthi, V. P., Singh, P., Ghosh, S., Pramanik, A., Ratri, A., . . . Rumi, M. K. (2018). ESR2 regulates granulosa cell genes essential for follicle maturation and ovulation. *Molecular cellular endocrinology*, *474*, 214-226.
- Kitchin, K. T. (2001). Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. *Toxicology applied pharmacology, 172*(3), 249-261.
- Kumar, R. (2018). Cytomodulatory effect of Lactobacillus sporogenes on ovary of arsenic exposed mice *International Journal of Advanced Research*, *6*, 1155-1164. doi:10.21474/IJAR01/6332
- Lee, S., Kang, D.-W., Hudgins-Spivey, S., Krust, A., Lee, E.-Y., Koo, Y., . . . Ko, C. (2009). Theca-Specific Estrogen Receptor-α Knockout Mice Lose Fertility Prematurely. *Endocrinology*, *150*(8), 3855-3862. doi:10.1210/en.2008-1774 %J Endocrinology
- Liew, S. H., Sarraj, M. A., Drummond, A. E., & Findlay, J. K. (2011). Estrogendependent gene expression in the mouse ovary. *PloS one, 6*(2).
- Liu, F.-R., Wu, J., Yan, C., & Zhang, L.-S. (2009). Relationship of arsenic-exposure to liver injury, activin A and transforming growth factor-β1 in rats. *World Chinese Journal of Digestology, 17*, 747-752. doi:10.11569/wcjd.v17.i8.747
- Liu, Z., Rudd, M. D., Hernandez-Gonzalez, I., Gonzalez-Robayna, I., Fan, H.-Y., Zeleznik, A. J., & Richards, J. S. (2009). FSH and FOXO1 regulate genes in the sterol/steroid and lipid biosynthetic pathways in granulosa cells. *Molecular Endocrinology*, 23(5), 649-661.
- Magoffin, D. A., Gancedo, B., & Erickson, G. F. (1989). Transforming growth factorβ promotes differentiation of ovarian thecal-interstitial cells but inhibits androgen production. *Endocrinology*, *125*(4), 1951-1958.
- Márquez, D. C. (2002). Receptor de estrógeno: Bases moleculares aplicadas a la medicina. *Vitae: Academia Biomédica Digital*(10), 12.
- McClintock, T. R., Chen, Y., Bundschuh, J., Oliver, J. T., Navoni, J., Olmos, V., . . . Parvez, F. (2012). Arsenic exposure in Latin America: Biomarkers, risk assessments and related health effects. *Science of the Total Environment*, 429, 76-91.
- McLean, A., Valenzuela, N., Fai, S., & Bennett, S. (2012). Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. *journal of visualized experiments*, e4389. doi:10.3791/4389
- Meseguer Lloret, S. (2004). *Métodos quimioluminiscentes en química analítica*: Universitat de València.



- Natraj, U., & Richards, J. S. (1993). Hormonal regulation, localization, and functional activity of the progesterone receptor in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *Endocrinology*, 133(2), 761-769.
- Otsuka, F., McTavish, K. J., & Shimasaki, S. (2011). Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Molecular reproduction development*, 78(1), 9-21.
- Paul, D. S., Harmon, A. W., Devesa, V., Thomas, D. J., & Stýblo, M. (2007). Molecular mechanisms of the diabetogenic effects of arsenic: inhibition of insulin signaling by arsenite and methylarsonous acid. *J Environmental health* perspectives, 115(5), 734-742. doi:10.1289/ehp.9867
- Pelletier, G., Labrie, C., & Labrie, F. (2000). Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *Journal of Endocrinology*, 165(2), 359-370.
- Peluso, J. J., Pappalardo, A., Losel, R., & Wehling, M. (2006). Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's antiapoptotic action. *Endocrinology*, *147*(6), 3133-3140.
- Perveen, H., Dey, A., Nilavar, N. M., Chandra, G. K., Islam, S. S., & Chattopadhyay, S. (2019). Dietary CCPS from bitter gourd attenuates sodium arsenite induced female reproductive ailments cum infertility in wistar rats: anti-inflammatory and anti-apoptotic role. *Food Chemical Toxicology*, *131*, 110545.
- Pettersson, K., Grandien, K., Kuiper, G. G., & Gustafsson, J.-A. k. (1997). Mouse estrogen receptor β forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor α. *Molecular Endocrinology*, *11*(10), 1486-1496.
- Polin, R. A., Fox, W. W., & Abman, S. H. (2011). Fetal and Neonatal Physiology: Expert Consult-Online and Print: Elsevier health sciences.
- Ricciotti, E., & FitzGerald, G. A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, vascular biology, 31*(5), 986-1000. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.207449
- Robker, R. L., Akison, L. K., & Russell, D. L. (2009). Control of oocyte release by progesterone receptor-regulated gene expression. *Nuclear receptor signaling,* 7(1), nrs. 07012.
- Rosenfeld, C. S., Roberts, R. M., & Lubahn, D. B. (2001). Estrogen receptor-and aromatase-deficient mice provide insight into the roles of estrogen within the ovary and uterus. *Molecular reproduction development, 59*(3), 336-346.
- Rung, E., Friberg, P. A., Shao, R., Larsson, D. G., Nielsen, E., Svensson, P. A., . . . Billig, H. (2005). Progesterone-receptor antagonists and statins decrease de novo cholesterol synthesis and increase apoptosis in rat and human periovulatory granulosa cells in vitro. *Biol Reprod*, 72(3), 538-545. doi:10.1095/biolreprod.104.033878
- Rusovici, R., & LaVoie, H. A. J. B. o. r. (2003). Expression and distribution of AP-1 transcription factors in the porcine ovary. *69*(1), 64-74.



- Saczko, J., Michel, O., Chwilkowska, A., Sawicka, E., Maczynska, J., & Kulbacka, J. (2017). Estrogen Receptors in Cell Membranes: Regulation and Signaling. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 227, 93-105. doi:10.1007/978-3-319-56895-9_6
- Shah, J. S., Sabouni, R., Vaught, K. C. C., Owen, C. M., Albertini, D. F., Segars, J. H., & genetics. (2018). Biomechanics and mechanical signaling in the ovary: a systematic review. *Journal of assisted reproduction*, *35*(7), 1135-1148. doi:10.1007/s10815-018-1180-y
- Sharma, S. C., & Richards, J. S. J. J. o. B. C. (2000). Regulation of AP1 (Jun/Fos) factor expression and activation in ovarian granulosa cells Relation of JunD and Fra2 to terminal differentiation. *275*(43), 33718-33728.
- Smeester, L., & Fry, R. C. (2018). Long-term health effects and underlying biological mechanisms of developmental exposure to arsenic. *J Current environmental health reports*, *5*(1), 134-144. doi:10.1007/s40572-018-0184-1
- Sotoca, A. M., Berg, H. v. d., Vervoort, J., Saag, P. v. d., Strom, A., Gustafsson, J.-A., . . . Murk, A. J. (2008). Influence of cellular ERalpha/ERbeta ratio on the ERalpha-agonist induced proliferation of human T47D breast cancer cells. *Toxicological Sciences*, 105, 303-311. doi:0.1093/toxsci/kfn141
- Stocco, C., Telleria, C., & Gibori, G. (2007). The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocrine Reviews*, 28, 117-149. doi:10.1210/er.2006-0022
- Stoica, A., Pentecost, E., & Martin, M. B. (2000). Effects of arsenite on estrogen receptor-α expression and activity in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology*, *141*(10), 3595-3602.
- Su, F., Geng, J., Li, X., Qiao, C., Luo, L., Feng, J., . . . Lv, M. (2017). SP1 promotes tumor angiogenesis and invasion by activating VEGF expression in an acquired trastuzumab-resistant ovarian cancer model. *Oncology reports*, 38(5), 2677-2684.
- Tesone, M., & Irusta, G. (2007). Fascículo XII Función Reproductiva Femenina: Bases Fisiológicas. Fisiopatología y su Diagnóstico. *Separata, 15-8*, https://www.montpellier.com.ar/Uploads/Separatas/sepFisiopatXIIendocrinD. pdf.
- Ting, A. Y., & Zelinski, M. B. (2017). Characterization of FOXO1, 3 and 4 transcription factors in ovaries of fetal, prepubertal and adult rhesus macaques. *Biology of reproduction*, *96*(5), 1052-1059.
- Tresguerres, J. A. F. (2009). *Anatomía y fisiología del cuerpo humano*: McGraw-Hill Interamericana de España S.L.
- Vahter, M. (2008). Health effects of early life exposure to arsenic. *J Basic clinical pharmacology toxicology,* 102(2), 204-211. doi:10.1111/j.1742-7843.2007.00168.x

U A CH

- Vasconcellos, A., Paredes, M., Aguilar, C., & Navarrete, J. (2015). Distribución de Receptores de Estrógenos Beta en el Ovario de Ovejas Prepúberes. International Journal of Morphology, 33(1), 388-392.
- Xu, Y., Tokar, E. J., & Waalkes, M. P. (2014). Arsenic-induced cancer cell phenotype in human breast epithelia is estrogen receptor-independent but involves aromatase activation. *Archives of toxicology*, *88*(2), 263-274.
- Yu, H., Kuang, M., Wang, Y., Rodeni, S., Wei, Q., Wang, W., & Mao, D. (2019). Sodium arsenite injection induces ovarian oxidative stress and affects steroidogenesis in rats. *Biological trace element research*, 189(1), 186-193.
- Yuan, X. H., Lu, C. L., Yao, N., An, L. S., Yang, B. Q., Zhang, C. L., & Ma, X. (2012). Arsenic induced progesterone production in a caspase-3-dependent manner and changed redox status in preovulatory granulosa cells. *Journal of cellular physiology*, 227(1), 194-203.

APÉNDICE I

Instrucciones para encender y operar el espectrómetro de absorción atómica acoplado a generación de hidruros AAnalystTM 700 acoplado a FIASTM 100

Encendido del equipo

Para el correcto funcionamiento del equipo se debe encender primero el equipo, seguido de la bomba y el equipo de cómputo. Posteriormente, se abre el programa WinLab 32 y se espera a que se detecte la técnica y el estado del equipo. Si la técnica activa fuera la incorrecta se procede a realizar el cambio realizando los pasos siguientes:

- 1. Seleccionar File.
- 2. Seleccionar Change technique.
- Seleccionar FIAS-MHS.

Una vez establecida la técnica se debe alinear el equipo en la ventana "FIAS". Una vez alineado, se coloca la celda, se enciende la celda y la lámpara correspondiente a la técnica de As y se abre el flujo del Argón. Antes de comenzar a utilizar el equipo HGAAS, se debe cerciorar que las mangueras de la bomba estén en la posición correcta y sin obstrucciones, que la membrana esté seca, que el voltaje no sufra variaciones y que la energía de la lámpara haya alcanzado valores de entre 38 y 45 mA de energía.

Curva de calibración y lectura de muestras y estándares

La curva de calibración se establece antes de cada corrida de muestras, con estándares de 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 ppb de NaAsO₂ a partir de la solución stock de 1000 ppm. Se tomó un valor de correlación de r2 ≥ 0.990 como aceptable. Una vez establecida la curva de calibración se procede a la preparación y lectura de muestras.

Para poder realizar la lectura por esta técnica se debe realizar previamente una incubación de las muestras y estándares con KI al 10% durante 45 min a fin de que

en una reacción de oxidación todo el As sea llevado a una valencia de III. Para la preparación se adicionan los reactivos en el siguiente orden:

- 1. Se adicionó a un matraz aforado de 10 mL previamente lavado en baño ácido (HNO₃ al 2%) un volumen de agua tridestilada.
- 2. Posteriormente, se vierte 1 mL de HCl concentrado.
- 3. Una vez mezclado el agua con el ácido, se adicionan 2 mL de muestra o 2 mL de HCl 2.1 M para los estándares.
- 4. Después se agrega 1 mL de KI al 10% en intervalos de 2 min (tiempo de lectura del equipo) e inmediatamente se aforó con agua tridestilada.

Una vez transcurridos los 45 min de incubación se realiza la lectura en el equipo. Posteriormente, las absorbancias son transformadas a través de la ecuación de regresión lineal derivada de los datos de la curva de calibración (la absorbancia de un blanco de digestión se resta de la absorbancia de las muestras). Para obtener la concentración de As total absorbida por el tejido hepático se usa la siguiente ecuación:

Donde la concentración de As en la muestra digerida se obtiene a partir de la absorbancia obtenida del equipo y la ecuación tras la curva de estandarización. En cuanto a los factores de dilución es importante recordar que se inicia a partir de 100 mg de tejido/mL de agua y que de este homogenado se toman 100 µL, por lo cual el primer factor de dilución es 100, el otro factor corresponde a la cantidad de muestra digerida que se ingresa al equipo de absorción, es decir 1 mL de los 10 mL totales (muestra + matriz), por lo tanto el segundo factor de dilución es 10.

APÉNDICE II

Calibración para realizar las mediciones con el software Image-Pro Plus.

- Tomar la fotografía "negro" y "blanco". La fotografía "negro" se toma con el microscopio apagado, está representa un nivel de transmitancia de cero. La fotografía "blanco" es de un control negativo con el objetivo 60X, la cantidad de luz que atraviesa el tejido sin señal colorida representa el máximo de transmitancia.
- 2. Se abre el programa y las microfotografías "negro" y "blanco", seleccionar *Edit* de la barra de herramientas, luego *Convert to* y de las opciones elegir *Gray scale 8.*
- 3. Seleccionar en la barra de herramientas *Measure*, la opción *Calibration* y de ésta la opción *Intensity*.
- 4. Se abre una nueva una ventana donde se elige *New*, y se llena el campo de *Name* con el nombre de la persona que realiza la calibración y la fecha. Debajo del gráfico seleccionar *Std optical density*.
- 5. De las opciones que se presentan a la derecha de la ventana, seleccionar *Options*.
- 6. Se abre una ventana llamada Optical Density Calibration y se selecciona la opción Image del menú de Black level. Se abre una nueva ventana donde se pide valorar el negro. El valor actual debe de ser cero. Se selecciona cualquier punto de la fotografía del "negro" y se selecciona OK. Se regresa a la ventana anterior y se selecciona Image del menú Incident level, se abre una nueva ventana y sobre la imagen "blanco" se selecciona un punto con tejido y seleccionar OK.
- 7. El programa regresa a la primera ventana donde se selecciona *OK* para guardar la calibración realizada.

Esta calibración se realiza antes de comenzar las mediciones sobre el tejido y se recomienda usar la misma calibración para todas las mediciones.

El análisis de densidad óptica determina la cantidad de materia al medir la cantidad de luz que puede atravesar el tejido medido. Para medir la densidad óptica se tomaron 5 fotografías representativas de cada zona a analizar de un total de 10 ovarios escogidos al azar. La microfotografía se convirtió a escala de grises, se utilizó line profile analysis del menú de Measure, se llevó el largo de la línea utilizada para realizar las mediciones a un aproximado de 5 µm y se realizaron 6 mediciones por microfotografía. Se registraron las mediciones en una base de datos para su posterior análisis.

Instrucciones para medir la señal en los tejidos.

- Abrir la microfotografía que se va a analizar seleccionar en la barra de herramientas Edit luego Convert to y Grayscale 8.
- Seleccionar Measure, luego Line profile. Se abre una nueva ventana y a la izquierda presenta tres opciones: Line, Circle y Free Form; debido a la forma de expresión se selecciona circle.
- 3. En el gráfico a la derecha se establece el tamaño de la barra en µm (en este caso por haber hecho la selección de *Line profile*). Las barras en color verde se ajustan con el cursor sobre el gráfico.
- 4. Sobre la microfotografía se encuentra la barra de medición que se acaba de ajustar. Con el cursor en forma de cruz blanca tomar el extremo de la derecha y reducir hacia la izquierda hasta la distancia que se requiere (en el gráfico se puede observar la reducción de la barra).
- 5. Una vez ajustada la barra al tamaño y dirección deseados se ajustan las barras verdes del gráfico al rango seleccionado (por ejemplo, si se requiere 1-5 µm mover una barra verde hacia el 0 y la otra hacia el 5, ajustar el diámetro del círculo a la escala elegida).
- 6. Para establecer la densidad óptica base, la barra que se encuentra sobre la imagen se mueve con el cursor (verificar que no está en forma de cruz blanca) y se coloca sobre el tejido sin señal y en el recuadro sobre la gráfica seleccionar *Reference*. Cualquier pigmentación superior a ésta se reconocerá como señal.



7. Mover círculo de medición al área de tejido que presenta señal (si se modifica el diámetro del círculo se debe repetir a partir del paso 2), registrar la densidad óptica que indica en *Area*.