



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

TESIS

**“EFECTOS DEL ESTRÉS CRÓNICO EN LA VIABILIDAD DE LAS
CÉLULAS DEL CÚMULO DURANTE EL CICLO ESTRAL”**

Para obtener el grado de
Maestra en Biología de la Reproducción Animal

PRESENTA:

BIOL. SARA ALEJANDRA VÁZQUEZ MADRID
Matrícula: 2213800841
Sarahvm1992@gmail.com

CO-DIRECTORES

Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez
Dra. Miriam Fahiel Casillas Avalos

JURADO

Presidenta: Dra. Adriana Lizbeth Juárez Rojas
Secretaria: Dra. Irma Jiménez Morales
Vocal: Dra. Alma Guadalupe López López
Vocal: Dra. Marcela Arteaga Silva

Iztapalapa, Ciudad de México a 17 de Octubre, 2024

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

La que suscribe, SARA ALEJANDRA VÁZQUEZ MADRID alumna del posgrado en: MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autora de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **“Efectos del estrés crónico en la viabilidad de las células del cúmulo durante el ciclo estral”**.

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para lo obtención del grado de Maestro en Biología Experimental es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la ciudad de México el 17 de Octubre de 2024.

Atentamente



Sara Alejandra Vázquez Madrid

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 17 de Octubre de 2024

Comisión Académica del Posgrado
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL
Presente

La que suscribe, **Sara Alejandra Vázquez Madrid**, alumna con número de matrícula **2213800841**, del posgrado **MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL** de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y los datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación “Efectos del estrés crónico en la viabilidad de las células del cúmulo durante el ciclo estral” a desarrollar en la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA. Lo anterior, en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y, en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiesen ocasionarse a esta Casa de Estudios.



Sara Alejandra Vázquez Madrid

COMITÉ TUTORAL

Codirectora

Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez
Profesora Titular C TC
Laboratorio de Neuropsicoendocrinología
Departamento Biología de la Reproducción
División Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa.

Codirectora

Dra. Miriam Fahiel Casillas Avalos
Profesora Titular A TC
Departamento de Biología de la Reproducción
División Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa.

Asesora

Dra. Adriana Lizbeth Juárez Rojas
Profesora Asociada D TC
Laboratorio de Neuropsicoendocrinología
Departamento de Biología de la Reproducción
División Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa.

Adscripción del Jurado del Examen de Grado

Presidenta

Dra. Adriana Lizbeth Juárez Rojas.

Profesora Asociada D TC
Laboratorio de Neuropsicoendocrinología
Departamento de Biología de la Reproducción
División Ciencias Biológicas y de la Salud

Secretaria

Dra. Irma Jiménez Morales.

Profesora Titular de Carrera Nivel C de Tiempo Completo
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
UAM Iztapalapa.

Vocal

Dra. Alma Guadalupe López López.

Profesora Asociada de Carrera Nivel D
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
UAM Iztapalapa.

Vocal

Dra. Marcela Arteaga Silva

Profesora Titular de Carrera Nivel C
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
UAM Iztapalapa.

FIRMA DE LOS MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por la Comisión de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, aprobó la Tesis titulada: **“Efectos del estrés crónico en la viabilidad de las células del cúmulo durante el ciclo estral.”** con fecha 17 de Octubre de 2024.



Presidenta
Dra. Adriana Lizbeth Juárez Rojas



Secretaria
Dra. Irma Jiménez Morales



Vocal
Dra. Alma Guadalupe López López



Vocal
Dra. Marcela Arteaga Silva

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neuropsicoendocrinología del Departamento de Biología de la Reproducción, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección y asesoría de la Doctora María del Socorro Imelda Retana Márquez, la Doctora Miriam Fahiel Casillas Avalos y la Doctora Adriana Lizbeth Juárez Rojas.

Para la realización de los estudios de maestría la alumna Sara Alejandra Vázquez Madrid contó con el apoyo de beca CONAHCYT mediante el número de registro de la beca 811846/CVU: 1167854

Dedicatoria

A mis padres porque a pesar de las adversidades que presenta la vida me han enseñado a salir adelante y a no rendirme. Por su apoyo incondicional en todos los ámbitos, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes.

A mi Beli por los momentos que hemos vivido juntas, por tu compañía.

A mi hermana por escucharme y hacerme reír cuando lo necesito.

Agradecimientos:

A la Dra. María del Socorro Retana Márquez por apoyarme durante la maestría. Gracias por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por compartir sus conocimientos, por su tiempo y compromiso. También por su paciencia para guiarme durante este tiempo.

A la Dra. Lizbeth Juárez por sus palabras de aliento, por compartir sus experiencias, por su disposición.

A la Dra. Casillas Avalos por su apoyo en este trabajo, por compartir sus conocimientos, por sus ideas y motivación.

A mis compañeros Yenny, Habit, Yoab, Karla, por brindarme su amistad, confianza y apoyo.

A la UAM, unidad Iztapalapa por abrirme las puertas y formarme profesionalmente.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| ABREVIATURAS | 3 |
| INTRODUCCIÓN | 5 |
| Respuesta de estrés | 5 |
| Mecanismos de la respuesta de estrés..... | 6 |
| Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal..... | 7 |
| Regulación neuroendócrina de la reproducción femenina | 8 |
| Desarrollo folicular ovárico..... | 11 |
| Esteroidogénesis ovárica..... | 16 |
| Células del cúmulo..... | 18 |
| Comunicación bidireccional células del cúmulo-ovocito..... | 21 |
| Maduración nuclear y citoplasmática del ovocito..... | 23 |
| ANTECEDENTES | 26 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 28 |
| JUSTIFICACIÓN | 28 |
| PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 28 |
| HIPÓTESIS | 28 |
| OBJETIVO | |
| GENERAL | 29 |
| OBJETIVOS | |
| PARTICULARES | 29 |
| MÉTODOS | 29 |
| Declaración de Ética | 29 |
| Animales | 29 |
| Diseño experimental | 30 |
| Progresión del ciclo estral | 31 |
| Aplicación del estresor | 32 |
| Registro del peso corporal | 33 |

| | |
|--|-----------|
| Índice de los pesos de órganos reproductivos..... | 33 |
| Análisis Hormonal..... | 34 |
| Corticosterona..... | 34 |
| Estradiol, progesterona, hormona luteinizante..... | 34 |
| Viabilidad celular..... | 35 |
| Evaluación de la maduración de ovocitos in vivo | 35 |
| Análisis estadístico..... | 35 |
| RESULTADOS..... | 36 |
| Ciclicidad estral..... | 36 |
| Ganancia de peso corporal | 39 |
| Índices de los órganos reproductivos femeninos | 40 |
| Peso ovárico relativo..... | 40 |
| Peso uterino relativo..... | 40 |
| Peso vaginal relativo..... | 41 |
| Concentración sérica de hormonas | 42 |
| Corticosterona..... | 42 |
| Hormona luteinizante..... | 43 |
| Estradiol..... | 44 |
| Progesterona..... | 45 |
| Viabilidad de las células del cúmulo | 45 |
| Viabilidad de ovocitos | 46 |
| Maduración de ovocitos In Vivo | 47 |
| DISCUSIÓN..... | 48 |
| CONCLUSIONES..... | 58 |
| PERSPECTIVAS..... | 58 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 59 |

RESUMEN

El estrés es definido como la respuesta del organismo a las alteraciones que ocurren en el equilibrio de diversos parámetros fisiológicos que mantiene la homeostasis del organismo; dicha respuesta depende de la intensidad y duración del estresor. El estrés puede derivar en diversos trastornos, como algunas alteraciones reproductivas, por lo que existe una relación significativa entre el estrés y la falla reproductiva, lo que coloca al estrés como una de las posibles causas de infertilidad. Los estresores causan la activación del eje Hipotálamo- Hipófisis-Adrenal (HHA), lo que incrementa el cortisol en humanos o la corticosterona en roedores. La activación crónica de este eje ha demostrado ser perjudicial en la reproducción femenina, inhibiendo directamente al eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar los efectos del estrés crónico sobre la viabilidad de las células del cúmulo, y de los ovocitos, la maduración, y su impacto en el ciclo estral, utilizando el modelo de estrés por inmersión en agua fría en ratas hembra adultas, ya que ha demostrado ser un activador eficaz del eje HHA, capaz de causar un incremento significativo en las concentraciones plasmáticas de corticosterona. Se utilizaron ratas hembra adultas de la cepa Wistar, asignadas a dos grupos, uno control y otro de estrés crónico. La exposición al estresor se realizó diariamente durante 35 días consecutivos; durante este tiempo se evaluó la progresión de los ciclos estrales y se registraron los pesos corporales diariamente. Al finalizar los 35 días, las hembras fueron sometidas a eutanasia, la mitad de las ratas se encontraban en la etapa de proestro y la otra mitad en la etapa de diestro. Se obtuvo sangre para la evaluación de la concentración de estradiol, progesterona, hormona luteinizante (LH) y corticosterona en suero por el método de ELISA. Se extrajeron los úteros, las vaginas y los ovarios para el registro de sus pesos. De los ovarios se obtuvieron los complejos células del cúmulo-ovocitos (COCs); en los ovocitos se evaluó la etapa de maduración *in vivo* y la viabilidad; en las células del cúmulo, se determinó la viabilidad. Los resultados mostraron que las hembras estresadas crónicamente tuvieron ciclos estrales anormalmente largos, con mayor número de días en proestro y estro; sus pesos corporales, uterinos, vaginales y ováricos fueron menores que los de las hembras control. La viabilidad de las células del cúmulo, así como la etapa de maduración y la viabilidad de los ovocitos fueron menores que en las hembras del grupo control. Estos datos muestran que el estrés crónico altera significativamente la funcionalidad reproductiva en las hembras y estas alteraciones están

relacionadas con la disminución de los niveles de hormonas reproductivas, LH, progesterona y estradiol, así como con el incremento de la corticosterona. Estos resultados muestran que el estrés es un factor de infertilidad femenina.

Palabras clave: Estrés crónico, LH, estradiol, células del cúmulo.

ABSTRACT

Stress is defined as the response of the organism to alteration in the equilibrium of several biological variables that maintain body homeostasis; this response depends on the intensity and duration of a stressor. Stress can cause several reproductive disorders, and there is a significant relationship between stress and reproductive failure, being one of the possible causes of infertility. Stressors cause activation of the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal axis (HPA), which increases cortisol in humans or corticosterone in rodents. Chronic activation of this axis has been shown to be detrimental to female reproduction of the Hypothalamus-Pituitary-Ovary axis. Therefore, the aim of the present study was to determine the participation of the effects of chronic stress on the viability of cumulus granulosa cells, viability and maturation of oocytes and the impact in the estrous cycle, using cold-water immersion stress model in adult female rats, since it has demonstrated to be an effective activator of the HPA axis, capable of causing the increase in corticosterone concentrations. Adult female Wistar rats were used and assigned to two groups, control and chronic stress. The exposure to the stressor was carried out daily for 35 consecutive days. During the that time, the progression of the estrous cycles was evaluated, and body weights were recorded daily. At the end of the 35 days, females were euthanized, half of which were in the proestrus stage and the other half in the diestrus stage. Blood was obtained to evaluate the serum concentration of estradiol, progesterone, Luteinizing Hormone (LH), and corticosterone by ELISA method. The uteri, vaginas, and ovaries, were removed for recording their weights. Cumulus cells-oocytes complexes (COCs) were obtained from ovaries; in oocytes the stages of maturation *in vivo* and viability was evaluated; in cumulus cells, viability was determined. The results showed that chronically stressed females had abnormally lengthened estrous cycles, with a greater number of days in proestrus and estrus. Their body, uterine, and vaginal weights were lower than those of control females. The viability of the cumulus cells, as well as the stage of maturation and viability of the oocytes, was lower than in females from the control group. These data show that chronic stress significantly alters reproductive functionality

in females and these alterations are related to the decrease in the levels of the reproductive hormones, LH, estradiol, and progesterone, as well as the increase in corticosterone. Therefore, this work shows that stress is a factor of female infertility.

Keywords: Chronic stress, LH, estradiol, cumulus cells.

ABREVIATURAS

| | |
|----------------|---|
| ACTH | Hormona adrenocorticotrópica |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| AMPC | Adenosina 3'5'-monofosfato cíclico |
| ADCY3 | Adenilil ciclase tipo 3 |
| ARC | Núcleo arcuato |
| AVP | Arginina vasopresina |
| AVPV | Núcleo anteroventral periventricular |
| BDNF | Factor neutrófico derivado del cerebro |
| bFGF | Factor de crecimiento básico para fibroblastos |
| COCs | Complejo ovocito- <i>cumulus</i> |
| CL | Cuerpo lúteo |
| CRH | Hormona liberadora de corticotropina |
| ERK | Vía de señalización quinasa regulada por señales extracelulares |
| ERO | Especies reactivas de oxígeno |
| ER | Receptores de estrógenos |
| E ₂ | Estradiol |
| FIGLA | Factor de transcripción de foliculogénesis básica hélice-asa-hélice |
| FSH | Hormona foliculoestimulante |
| Gas | Proteína Gs alfa |

| | |
|----------------|--|
| GMPc | Guanosina monofosfato cíclico |
| GnRH | Hormona liberadora de gonadotropinas |
| hCG | Hormona gonadotropina coriónica humana |
| IGF-I | factor de crecimiento similar a la insulina 1 |
| Kiss1 | Kisspeptina |
| KT | Ligando kit |
| LH | Hormona luteinizante |
| MAPK | Vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos |
| NPPC | péptido natriurético C |
| NPY | Neuropéptido Y |
| PKA | Proteína cinasa A |
| PD3A | Fosfodiesterasa |
| PDGF | Factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| PGF2 α | Prostaglandina F2 α |
| PKA | Proteína quinasa A |
| POA | Área preóptica |
| PVN | Núcleo paraventricular |
| P ₄ | Progesterona |
| SGA | síndrome general de adaptación |
| StAR | Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral alfa |
| TGF- β | Factor de crecimiento transformador-beta |
| VMN | Núcleo ventromedial |
| VTA | Área ventral tegmental |
| VEGF | Factor de crecimiento endotelial vascular |

INTRODUCCIÓN

Respuesta de estrés

El término estrés se refiere a la respuesta del organismo a estímulos (estresores) que son impredecibles e incontrolables (Koolhaas *et al.*, 2011). Un estresor se considera un estímulo que amenaza la homeostasis y el estrés es la respuesta del organismo encaminada a recuperar la homeostasis (Chrousos, 2009). En general, los estresores se pueden dividir en cuatro categorías principales: 1) estresores físicos, como las temperaturas extremas, las lesiones, el ejercicio intenso, la radiación intensa, los niveles altos de ruido y otros; 2) estresores psicológicos, que afectan las emociones y pueden provocar ansiedad, miedo y frustración; 3) estresores psicosociales, derivados de las interacciones entre individuos, como la presencia de un animal en el territorio de un dominante; en los humanos, como el desempleo y la separación matrimonial; 4) estresores mixtos, que tienen componentes tanto físicos como psicológicos (Pacák y Palkovits, 2001).

En términos de duración, los estresores se pueden dividir en dos categorías principales: 1) estresores agudos, con exposición única y de tiempo limitado, segundos, minutos o pocas horas); 2) estresores crónicos, con exposición por más de seis horas, días, meses o años, de forma intermitente o continua). Los estresores también difieren en su intensidad, un estresor tiene una dimensión cuantitativa, la interpretación de una situación por parte de un individuo y su reacción pueden variar desde un control total hasta una pérdida de control parcial o total. Además, un estresor puede ser leve en términos de sus posibles consecuencias, o puede ser potencialmente mortal (Koolhaas *et al.*, 2011). La intensidad se puede determinar mediante los niveles de hormonas liberadas por el sistema de estrés (Pacák y Palkovits, 2001).

Hans Selye introdujo el concepto de estrés como una idea médica y científica en 1936; propuso el término “síndrome general de adaptación” (SGA) para explicar la progresión de la respuesta de estrés mediante tres fases sucesivas: la reacción de alarma, la etapa de resistencia y la etapa de agotamiento. Propuso que durante las etapas del SGA la intensidad de la respuesta al estrés puede variar (Pacák y Palkovits, 2001).

El organismo responde a los estresores mediante la activación del sistema nervioso central y periférico que tienen como propósito la recuperación de la homeostasis (Charmandari *et al.*,

2005). Sin embargo, en muchas ocasiones no se recupera la homeostasis y el organismo activa mecanismos alostáticos que permiten al cuerpo adaptarse a los cambios, en respuesta a los estresores crónicos. En este sentido, la respuesta prolongada y/o excesiva a los estresores puede causar consecuencias adversas que afectan la salud física y emocional (Charmandari *et al.*, 2005).

Mecanismos de la respuesta de estrés

La respuesta de estrés del organismo a los estresores está sustentada por el sistema de estrés, que tiene componentes tanto del sistema nervioso central, como periféricos. Estos componentes son el sistema *Locus Coeruleus* (LC)-sistema nervioso simpático-adrenomedular (LC-SNS) y el eje hipotálamo-hipofisis-adrenal (HHA) (Charmandari *et al.*, 2005). Los componentes centrales del sistema de estrés están ubicados en el hipotálamo y en el tronco encefálico. Durante el estrés agudo, que corresponde a la fase de alarma del SGA, se activan los somas de neuronas noradrenérgicas del LC. Estas neuronas a su vez estimulan a las neuronas del cerebro y a las neuronas del sistema nervioso simpático, las cuales activan a las células cromafines de la médula adrenal, liberándose así grandes cantidades de adrenalina y noradrenalina hacia la sangre. Asimismo, de las terminales simpáticas en el cerebro y en diversos órganos también se libera adrenalina y noradrenalina, produciendo una serie de respuestas conductuales y metabólicas que preparan al organismo para la respuesta de fuga o lucha (Charmandari *et al.*, 2005; de Kloet *et al.*, 2005).

El sistema LC- sistema nervioso simpático (SNS) responde rápidamente a los estresores; los nervios del SNS hacen sinapsis en la cadena bilateral de ganglios simpáticos con neuronas simpáticas posganglionares, que inervan ampliamente el músculo liso de los vasos sanguíneos, el corazón, los músculos esqueléticos, los riñones, el intestino y el hígado, entre otros órganos (Charmandari *et al.*, 2005). Al mismo tiempo, las neuronas del LC hacen sinapsis con neuronas parvocelulares localizadas en el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo, cuya estimulación causa la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y arginina vasopresina (AVP). Existen conexiones neuronales recíprocas entre las neuronas del PVN y las neuronas noradrenérgicas del LC, donde la CRH y la noradrenalina se estimulan mutuamente a través de los receptores para CRH tipo 1 y noradrenérgicos α_1 (Charmandari *et al.*, 2005).

Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

Cuando el estresor se presenta de una manera crónica, esto es si, su duración se alarga por varias horas, días, meses o años, entra la segunda etapa del SGA, conocida como etapa de resistencia. La coordinación de la respuesta durante el estrés crónico por el SNC incluye la participación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA), que es un importante regulador de las funciones homeostáticas (Charmandari *et al.*, 2005). Los principales efectores de esta etapa son el PVN, el lóbulo anterior de la hipófisis y la corteza suprarrenal. En ausencia de estresores, el PVN libera CRH hacia el sistema porta hipofisiario, a través del cual llega hasta los corticotropos de la adenohipófisis, donde estimula la secreción de la adrenocorticotropina (ACTH) y su liberación al torrente sanguíneo, a través del cual es transportada hasta la corteza de la glándula suprarrenal, donde se une a sus receptores en las células de la zona fascicular, estimulando la síntesis y secreción de glucocorticoides, cortisol en la mayoría de mamíferos, corticosterona en roedores.

Estas hormonas esteroideas ejercen retroalimentación negativa a nivel del hipocampo, del hipotálamo y de la hipófisis, para disminuir la secreción de las hormonas liberadas por los centros superiores y, en consecuencia, los glucocorticoides, para la autorregulación del eje. Esto impide que los efectos de los glucocorticoides tengan un efecto prolongado en sus tejidos blanco y puedan causar efectos nocivos en ellos (Laryea *et al.*, 2015). Sin embargo, en condiciones de estrés crónico, la actividad del eje HHA aumenta significativamente, y puede ejercer profundos efectos inhibitorios en otros sistemas, como el eje reproductivo a través de la secreción de la CRH y de los glucocorticoides (Mastorakos *et al.*, 2006) (Figura 1).

Para la mayoría de los mamíferos, la perpetuación de la especie constituye uno de los objetivos esenciales de la reproducción (Álvarez, 2008). La exposición crónica a diversas situaciones estresantes puede mantener activo al eje HHA durante largo tiempo e inducir la aparición y el desarrollo de patologías, alterando procesos psicológicos y fisiológicos como el crecimiento, la función inmunológica y la función reproductiva, de interés para este trabajo, (Chrousos *et al.*, 1992).

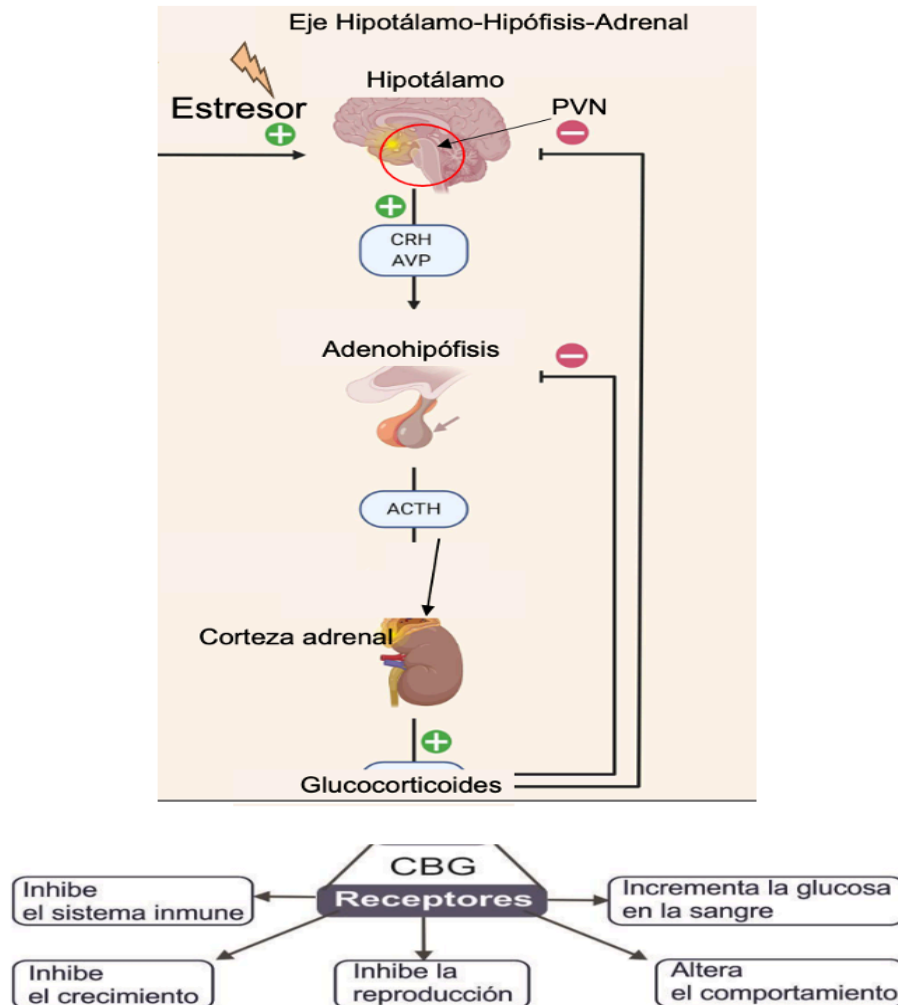


Figura 1. Activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HPA) ante los estresores. Existe una retroalimentación negativa que ejercen los glucocorticoides (GC) en el hipotálamo. Durante el estrés crónico, puede inhibirse la reproducción, así como la respuesta inmunológica y otros procesos. PVN, núcleo paraventricular; CRH, hormona liberadora de corticotropina; AVP, arginina vasopresina; ACTH, hormona adrenocorticotrópica; GCs, glucocorticoides; CBG, proteína globulina transportadora. Tomado de Carlton *et al.*, 2021.

Regulación neuroendócrina de la reproducción femenina

La adquisición de la capacidad reproductiva inicia con la pubertad (en ratas es entre los 35-40 días de vida), y requiere de una adecuada organización y regulación de los órganos que componen al eje hipotálamo-hipófisis-gónada, para el mantenimiento de la capacidad

reproductiva (Navarro *et al.*, 2007). Los eventos reproductivos en la hembra son controlados por las hormonas del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (HHO), las cuales regulan el funcionamiento de todos los órganos involucrados, el hipotálamo, la adenohipófisis, el ovario y los órganos blanco de las hormonas ováricas (Zeydabadi *et al.*, 2017).

El hipotálamo se localiza en el diencefalo y está constituido por varios núcleos. En los núcleos anteroventral periventricular (AVPV) y arqueado (ARC) se localizan neuronas que sintetizan y liberan el neuropéptido Kisspeptina (Kiss1). Este neuropéptido y su receptor, que está acoplado a proteína Gq (GPR54 o KISS1R), desempeñan un papel fundamental en el control central del eje HHO. Mediante sinapsis axosomáticas, las neuronas Kiss1 del AVPV estimulan la síntesis y la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en las neuronas cuyos somas neuronales están localizados en el área preóptica (POA) y presentan KISS1R (Kinsey-Jones *et al.*, 2009). La GnRH es secretada en la eminencia media, hacia los capilares venosos del sistema porta hipofisiario, es transportada hacia la hipófisis anterior, para estimular en los gonadotropos la síntesis y secreción de las hormonas gonadotrópicas, hormona foliculo estimulante (FSH) y LH (Lamb *et al.*, 2010).

La Kiss1 liberada del ARC estimula a las neuronas GnRH mediante su unión con sus receptores localizados en la terminal axónica. Esto define la pulsatilidad con la que es liberada la GnRH (Kinsey-Jones *et al.*, 2009). Las gonadotropinas hipofisarias cumplen un papel importante en el control de la función ovárica a partir de la pubertad. El ovario adulto presenta folículos en distintos estadios de maduración, atrésicos y cuerpos lúteos (CL) (Li *et al.*, 2007). La FSH es responsable del reclutamiento de los folículos secundarios en el ovario y estimula su maduración, así como la selección del o los folículos dominantes en el ovario y, junto con la LH, estimula la esteroidogénesis en las células foliculares ováricas. La LH estimula en las células foliculares de la teca la síntesis de andrógenos, principalmente androstendiona. Este andrógeno difunde hacia las células de la granulosa murales, las cuales presentan receptores para FSH, la cual favorece la aromatización de androstendiona hacia estrona y, posteriormente, ésta es transformada en estradiol (E₂), que es el principal estrógeno secretado por los folículos ováricos. Dicha hormona difunde hacia el fluido folicular y hacia la circulación sanguínea, para ser transportada a sus órganos blanco. La LH, junto con la FSH, estimulan en los folículos maduros el proceso de liberación de los ovocitos maduros, proceso que se conoce como ovulación (Lamb *et al.*, 2010). El E₂ liberado de los folículos ováricos estimula la receptividad sexual, actuando

sobre el núcleo ventromedial (VMN) del hipotálamo. Asimismo, estimula la función del epitelio del oviducto, el desarrollo del tejido glandular mamario, la proliferación celular del epitelio uterino y del epitelio vaginal (Hewitt y Korach, 2003). Además, el E₂ ejerce un efecto de retroalimentación negativa en las neuronas Kisspeptinérgicas del ARC, disminuyendo la síntesis de GnRH y de gonadotropinas en la adenohipófisis. A la mitad del ciclo menstrual, en primates superiores, y durante el proestro en las ratas, el E₂ se incrementa de manera importante, ejerciendo una retroalimentación positiva en el núcleo AVPV del hipotálamo, lo que favorece la liberación de Kiss1, la cual a su vez estimula la liberación pulsátil de GnRH y ésta, a su vez, induce una mayor liberación de LH y FSH desde la hipófisis anterior hacia la circulación periférica. Estas gonadotropinas estimulan la liberación del ovocito maduro desde los folículos maduros de los ovarios.

En la rata, este evento ocurre en las primeras horas del estro. El E₂ induce también el crecimiento del epitelio y del estroma endometrial; asimismo induce la expresión de los receptores para progesterona (P₄), la cual es crucial en la preparación del útero ante la posibilidad de que un embrión pueda implantarse en el útero. Una vez liberado el ovocito maduro, en su lugar quedan las células foliculares de la granulosa y de la teca, que se luteinizan y forman el CL, el cual secreta grandes cantidades de progesterona (P₄) y, en menor medida, E₂ (Cortés-Vidauri *et al.*, 2018). La P₄ también ejerce retroalimentación negativa sobre el ARC del hipotálamo. La inhibina es una hormona ovárica, de naturaleza proteica, secretada por las células foliculares, que interviene en el mecanismo de regulación de la secreción de FSH mediante retroalimentación negativa sobre la hipófisis anterior disminuyendo la secreción de FSH (Lamb *et al.*, 2010). En ausencia de un embrión, el útero sintetiza la prostaglandina F2α (PGF2α), la cual causa la regresión del CL, dicha regresión consta de tres eventos: disminuye la secreción de P₄ a niveles previos a la formación del CL, seguida de una muerte celular por apoptosis y la degeneración de la matriz extracelular por medio de luteólisis. La regresión del CL favorece la ciclicidad normal y permite el inicio de otro ciclo reproductivo (Aréchiga-Flores *et al.*, 2019) (Figura 2).

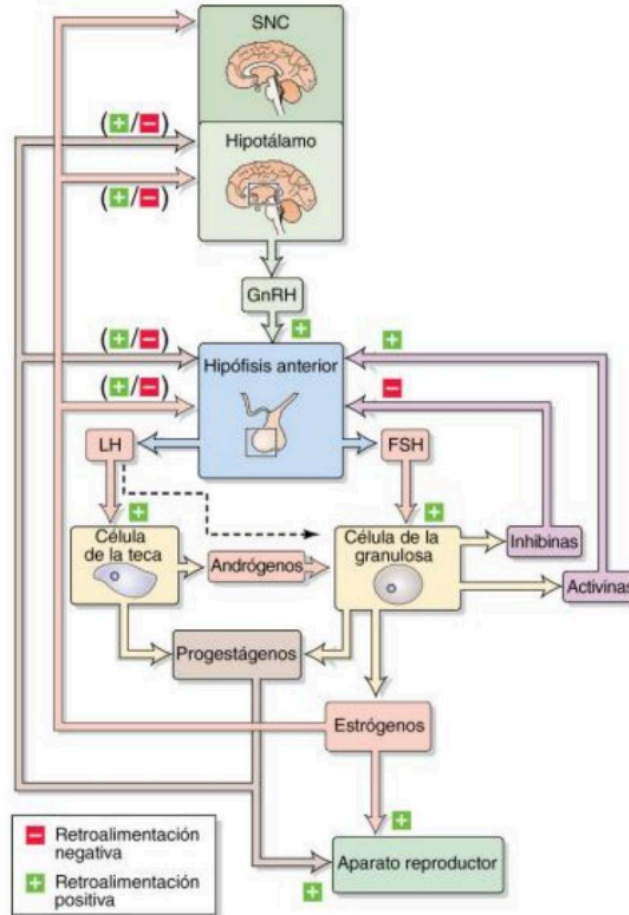


Figura 2. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Las neuronas de soma pequeño en el ARC y en el POA del hipotálamo secretan GnRH, la cual llega hasta las gonadotropas para sintetizar y liberar a las hormonas gonadotrópicas, FSH y LH. La LH se une a receptores en las células de la teca para aumentar la biosíntesis de andrógenos. Los andrógenos entran en las células de la granulosa, donde se aromatizan a estrógenos. La línea punteada indica que las células de la granulosa también tienen receptores para la LH. La FSH se une a sus receptores en las células de la granulosa para incrementar la producción de enzimas esteroidogénicas y de activina e inhibina. La activina y la inhibina solo actúan sobre la hipófisis anterior. El E₂ y la P₄ actúan en la hipófisis anterior y sobre neuronas hipotalámicas, ejerciendo retroalimentación positiva y negativa. SNC, sistema nervioso central. Tomado de Boron *et al.*, 2009.

Desarrollo folicular ovárico

En el ovario adulto, los folículos ováricos pueden estar en diferentes estadios de maduración. A medida que el folículo se modifica morfológicamente, se llevan a cabo cambios bioquímicos que reflejan el proceso de diferenciación celular (Vantman y Vega, 2010). Los folículos primordiales se consideran las unidades reproductivas del ovario, ya que dan origen a los folículos dominantes y, en consecuencia, a los ciclos reproductivos. Los folículos primordiales

contienen un ovocito primario pequeño, detenido en el diploteno de la meiosis I, así como una sola capa de células de la granulosa aplanadas, rodeadas de una lámina basal, formando un microambiente que las separa de otras células. Además, carecen de suministro de sangre independiente, por lo que tienen acceso limitado a las hormonas gonadotrópicas (Williams y Erickson, 2012). En modelos murinos, se ha identificado en los ovocitos un factor de transcripción de foliculogénesis básica hélice-asa-hélice (FIGLA), el cual es crítico para la formación de los folículos en el nacimiento (Soyal *et al.*, 2000). En ausencia de esta proteína, los ovocitos en el recién nacido no sobreviven y causan esterilidad. Los ovocitos de los folículos primordiales secretan el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y al factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF), los cuales estimulan a las células de la granulosa para aumentar la secreción del ligando kit (KL), que promueve el crecimiento de los ovocitos y el desarrollo del folículo (Williams y Erickson, 2012). La entrada de los folículos primordiales en el grupo de folículos en desarrollo se conoce como reclutamiento o activación de folículos primordiales. Cuando las diferentes cohortes de folículos primordiales comienzan a madurar, pasan al estadio de folículos primarios, donde las células de la granulosa, que constituyen una sola capa de células cuboidales, continúan secretando KL, lo que promueve aún más la activación del folículo. Los ovocitos de los folículos primarios secretan el factor de crecimiento diferencial 9 (GDF-9) y la proteína morfogénica ósea (BMP-15), que promueve la proliferación de las células de la granulosa (Williams y Erickson, 2012). En el siguiente estadio de maduración están los folículos secundarios. Cerca del momento de la transición de folículo primario a secundario, aparecen varias capas de células de tipo estromal alrededor de la lámina basal. A medida que avanza el desarrollo del folículo secundario, aparecen dos capas primarias de células de la teca, que se diferencian en las células intersticiales de la teca interna y teca externa. El desarrollo de las células de la teca también va acompañado de la neoformación de numerosos vasos sanguíneos pequeños, presumiblemente mediante angiogénesis. En consecuencia, la sangre ahora circula alrededor del folículo, llevando nutrientes y gonadotropinas al folículo en desarrollo (Williams y Erickson, 2012). En el siguiente nivel de desarrollo se forman los folículos antrales, que se caracterizan por presentar una cavidad o antro que contiene el líquido folicular, este líquido es un exudado plasmático condicionado por productos secretores de los ovocitos y de las células de la granulosa. Como las células de la granulosa siguen proliferando y el antro aumentando de tamaño, la capa de las células de

granulosa queda dividida en dos grupos: las células de la granulosa murales, que rodean el antro y, las células del cúmulo, que quedan en contacto con el ovocito (Williams y Erickson, 2012) (Figura 3).

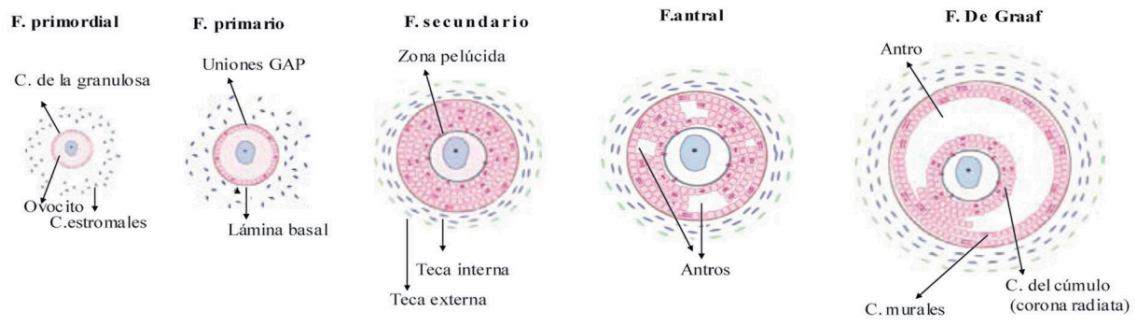


Figura 3. Foliculogénesis ovárica, los folículos primordiales crecen y se diferencian hasta folículo de Graaf. El proceso comienza con el ovocito encerrado dentro de una sola capa de células de la granulosa, y termina con un folículo multicapa completamente desarrollado. Tomado de González *et al.*, 2010.

Durante el crecimiento de una onda folicular, se pueden describir cuatro fases: reclutamiento, selección, dominancia y atresia (Fortune *et al.*, 2004). Existen dos tipos de reclutamiento durante el desarrollo folicular, el inicial y el cíclico. En el primero, un grupo de folículos comienza su desarrollo sin depender del estímulo de gonadotropinas y, en el segundo, un grupo de folículos presentan receptores para responder a las gonadotropinas. En el reclutamiento inicial un grupo de folículos primordiales inician su crecimiento en respuesta a factores intraováricos como son los miembros de la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), en presencia de estos factores no alcanzan el estado preovulatorio, sino que permanecen quiescentes hasta ser capaces de responder al estímulo de las gonadotropinas. El reclutamiento cíclico se inicia después de la pubertad (Fortune *et al.*, 2004). El segundo reclutamiento depende de las concentraciones séricas de FSH.

En roedores, durante el ciclo estral, un grupo de folículos comienzan a desarrollarse, a partir de una cohorte de folículos antrales pequeños, y empiezan a madurar bajo un aporte adecuado de gonadotropinas, especialmente por un aumento en la concentración de FSH, que les permite avanzar en su desarrollo. El desarrollo folicular antral se desencadena al inicio de la primera onda de crecimiento folicular, estimulada por la segunda elevación transitoria de FSH, la cual

ocurre después de la ovulación. Los folículos reclutados responden a la FSH aumentando su crecimiento y la síntesis de E_2 , así como una elevación en la producción de inhibina y activina, estas hormonas inhiben y estimulan, respectivamente, el crecimiento de los folículos, mientras que la folistatina se mantiene en bajas concentraciones. Esta proteína neutraliza a los miembros de la familia del TGF- β , para continuar con su maduración (Gigli *et al.*, 2006).

Al momento del reclutamiento, los diferentes folículos de la cohorte son desiguales; los más pequeños son ricos en Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) y más sensibles a su efecto inhibitorio en la diferenciación celular. Por tanto, el efecto estimulador de la FSH sobre la actividad de la aromatasa es mayor en los folículos más grandes de la cohorte. Entre los folículos reclutados en cada onda folicular se establece una competencia por la dominancia, por lo cual solamente un folículo de la cohorte adquiere un desarrollo funcional y estructural, lo que le permite seguir su crecimiento en un ambiente bajo en concentraciones de gonadotropinas, al tiempo que los otros folículos en desarrollo sufren atresia (Meduri *et al.*, 2006).

El folículo o los folículos dominantes, en comparación con los subordinados, presenta concentraciones mayores de E_2 en el líquido folicular, factor de crecimiento parecido a la insulina tipo-I (IGF-I), activina-A e inhibina-A (Gigli *et al.*, 2006). A medida que los folículos maduran, comienzan a responder a la LH, lo cual puede ser parte del mecanismo de selección del folículo dominante; los cambios en el patrón de expresión del ARNm para los receptores de las gonadotropinas y enzimas esteroideogénicas dentro de las células foliculares, están ligados a las modificaciones en las concentraciones sanguíneas de gonadotropinas. La selección se relaciona con la interferencia del folículo más grande sobre la capacidad de los folículos más pequeños de recibir un adecuado soporte gonadotrópico.

Esto podría ocurrir mediante dos vías: 1) la vía pasiva, por la cual el folículo mayor inhibe indirectamente el crecimiento de los folículos menos maduros reduciendo las concentraciones de FSH por debajo del umbral necesario para mantener a los otros folículos; 2) La vía activa, en la que el folículo mayor secreta inhibina, impidiendo de esta manera, directamente, el crecimiento de los demás folículos (Mihm *et al.*, 2000). Durante la etapa de dominancia, el folículo dominante recibe estímulos hormonales que colaboran para el aumento de su irrigación sanguínea. La maduración de este folículo se relaciona con niveles altos de proteína reguladora de la esteroideogénesis aguda (StAR), la síntesis de receptores para FSH y principalmente para LH (LHR), así como la síntesis de proteínas y enzimas aromatasas necesarias para la síntesis

y secreción de estrógenos y progestágenos. El folículo dominante alcanza un tamaño marcadamente superior a los demás, y es responsable de la secreción de E_2 . Esta actividad estrogénica está relacionada con el incremento en la expresión de genes para aromatasa y el receptor para FSH, así como la adquisición de receptores para LH en las células de la granulosa. Esto aumenta la capacidad del folículo dominante para producir más E_2 . En los folículos humanos, la asociación de inhibina y E_2 puede inhibir la liberación de FSH en la hipófisis anterior, para evitar que otros folículos de la cohorte adquieran la proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A) y se vuelvan dominantes (Fortune *et al.*, 2004).

La gran mayoría de los folículos que no son reclutados degeneran a través del proceso conocido como atresia, que consiste en la muerte por apoptosis de los folículos que no fueron seleccionados como dominantes. Con la atresia, cesa la síntesis de E_2 y las concentraciones de P_4 intrafolicular aumentan; durante este proceso se observan núcleos picnóticos y fragmentación nuclear en las células de la granulosa, así como su desprendimiento por la pérdida de la matriz extracelular, del mismo modo, ocurre desprendimiento del complejo *cumulus*-ovocito y, en algunos casos, hipertrofia de las células de la teca. Además, ocurre la pérdida de uniones comunicantes y de receptores para gonadotropinas (Tabarowski *et al.*, 2005) (Figura 4).

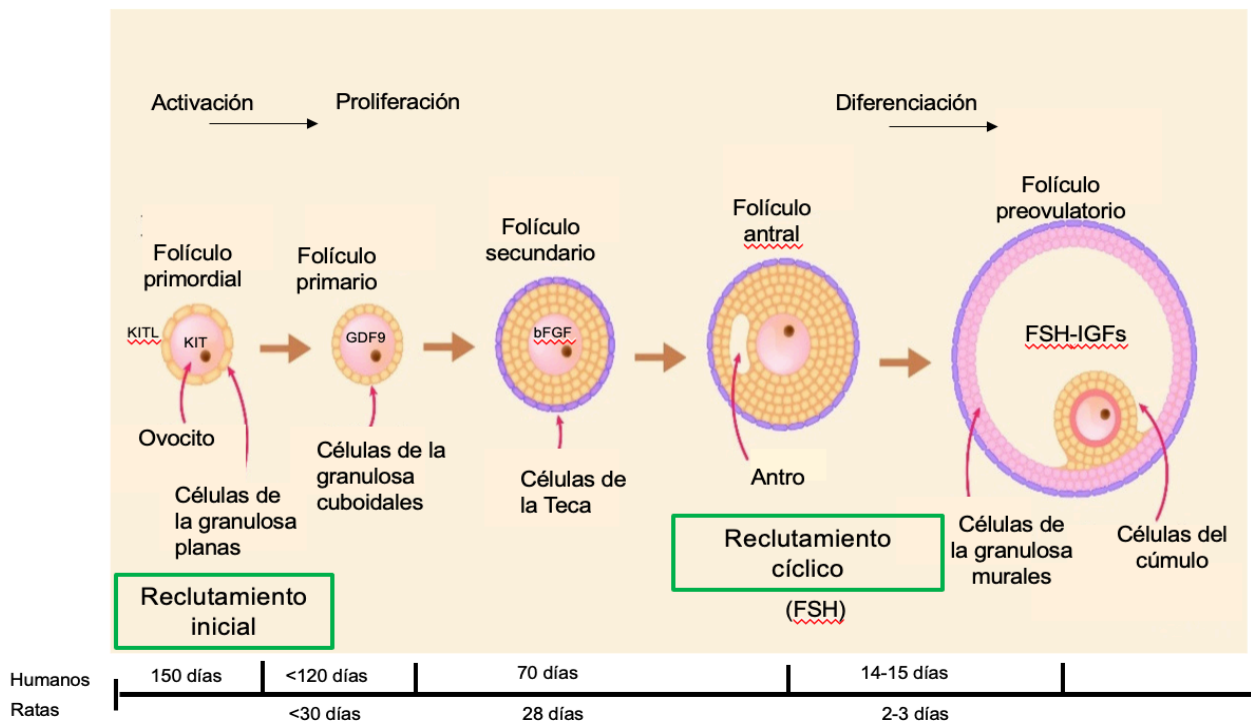


Figura 4. Duración del reclutamiento y selección de folículos en ovarios de humanos y de rata. Adaptado de McGee y Hsueh, 2000; Turathum *et al.*, 2021.

Esteroidogénesis ovárica

La producción normal de esteroides ováricos es un proceso complejo y estrictamente regulado por las hormonas gonadotrópicas. La esteroidogénesis en la mayoría de los mamíferos (incluyendo humanos y ratones) parece ocurrir a través del modelo de dos células/dos gonadotropinas mediante el cual los andrógenos se sintetizan a partir del colesterol. La proteína StAR es el principal transportador de colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la interna, donde se encuentra la mayor parte de las enzimas. Por lo tanto, StAR es un regulador crítico limitante de la tasa de producción de esteroides. La expresión y actividad de la proteína StAR está regulada por muchos factores, comenzando con la activación del receptor de LH en las células de la teca (Gómez-Chang *et al.*, 2012). La señalización activada por LH a través de su receptor acoplado a proteína G induce la síntesis de segundos y terceros mensajeros, que han sido reconocidos como reguladores de la actividad de StAR. Si bien muchas vías de señalización intracelular se han relacionado con esteroides ováricos inducidos por la LH, la elevación de AMPc, inducida por gonadotropinas, es una de las pocas vías que se ha demostrado claramente. Tanto los receptores de FSH como de LH se unen a sus respectivos ligandos, acoplados a proteínas heterotriméricas G que a su vez se componen por las subunidades α , β (G α s). A su vez, esta proteína G α s estimula a la adenilil ciclasa, la cual sintetiza AMPc intracelular a partir de ATP, el cual activa a la proteína quinasa A (PKA); ésta promueve la esteroidogénesis al aumentar la síntesis y la actividad de StAR, a través de la fosforilación de la serina. Además, la PKA regula la expresión y actividad de las enzimas citocromo P450 17 α -hidroxilasa/17-20 liasa/17-20 desmolasa (CYP17) en las células de la teca, así como la enzima citocromo aromatasa p450 (CYP19) en las células de la granulosa, favoreciendo la síntesis de testosterona, estrona y 17 β -estradiol (Jamnongjit y Hammes, 2006). Bajo el estímulo del pico preovulatorio de gonadotropinas, así como la participación de factores de crecimiento y citocinas, ocurre la ovulación, después de la cual, las células foliculares se

luteinizan, por lo que la biosíntesis de esteroides cambia cualitativa y cuantitativamente hacia la síntesis de P_4 .

Durante la etapa folicular, que corresponde a la etapa de proestro en la rata, la producción de E_2 por las células de la granulosa, requiere de la síntesis de precursores androgénicos (androstendiona) a partir del colesterol, bajo la acción de la LH (Figura 5, panel izquierdo). Los andrógenos difunden hacia el compartimento avascular de las células de la granulosa. A este nivel, y por efecto de la FSH, los andrógenos son biotransformados a estrógenos por acción de la aromatasa (CYP19). En la fase lútea (Figura 5, panel derecho), que corresponde a la etapa de diestro en la rata, el compartimento ocupado por las células de la granulosa se vasculariza, permitiendo así el aporte de colesterol, aunado a la presencia de receptores para LH, así como el incremento en la expresión de enzimas esteroidogénicas, lo que resulta en el aumento de la producción de P_4 y E_2 derivados de los andrógenos de las células luteínicas de la teca (Gómez-Chang et al., 2012).

Después del pico de LH, el ovocito secundario en la metafase II (MII) es liberado del folículo maduro y entra en el oviducto, donde puede ser fecundado. El folículo dominante se transforma en el CL, que es una estructura endocrina dinámica, atípica y temporal. La luteinización del folículo dominante por la LH se produce por la acción de factores angiogénicos contenidos en el líquido folicular, lo que permite la proliferación de capilares sanguíneos y fibroblastos a la lámina basal de las células de la granulosa. Este mecanismo parece ser esencial para permitir que el colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad) llegue a las células luteinizadas y éstas sinteticen P_4 a través de la acción de las enzimas citocromo P450 y 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa A^{4-5} isomerasa (3β -HSD). La P_4 es responsable de los cambios que ocurren durante la fase lútea y es esencial para el mantenimiento de la gestación (Gómez-Chang et al., 2012).

En otras células esteroidogénicas, existen otras vías de señalización que se activan en forma dependiente de AMPc, pero independiente de PKA, como en las células de la granulosa, donde a través de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (dependientes de AMPc) se activan también diferentes vías como: la vía de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), la vía de señalización de fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3-K) y la activación de la proteína quinasa B (PKB). La MAPK ha sido implicada en la regulación de la esteroidogénesis utilizando LH y gonadotropina coriónica humana (hCG), las cuales, además de elevar las

concentraciones de AMPc, activan a cinasas efectoras de MAPK (ERK1/2) en las células de la granulosa luteinizadas. También se ha observado que, durante la luteinización de las células de la granulosa, la secreción de P₄ inducida por hCG coincide con un descenso en la expresión de la subunidad catalítica de PKA, lo que sugiere que durante la luteinización de las células de la granulosa la síntesis de progesterona es menos dependiente de PKA (Gómez-Chang *et al.*, 2012) (Figura 5).

Células del cúmulo

A medida que el folículo ovárico progresa desde primario a preantral, la capa de células de la granulosa cuboidea prolifera para formar múltiples capas. Esta proliferación de células de la granulosa es independiente de las gonadotropinas, lo que sugiere que los factores secretados por los ovocitos son cruciales para el crecimiento del folículo. Entre esos factores está el factor de crecimiento diferencial 9 (GDF9) y la proteína morfogenética ósea (BMP-15) (Turathum *et al.*, 2021). Mientras que los factores intraováricos mencionados anteriormente, son los principales reguladores del crecimiento de las células de la granulosa preantrales, los factores extraováricos, en particular la hormona FSH, junto con el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), son cruciales para la diferenciación de las células de la granulosa murales (Turathum *et al.*, 2021).

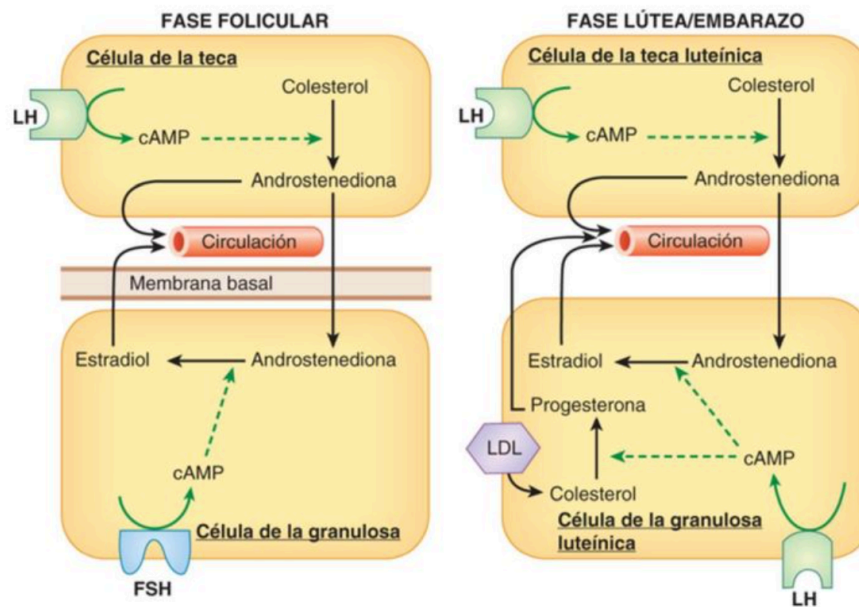


Figura 5. Esteroidogénesis ovárica. Durante la fase folicular (panel izquierdo) y la fase lútea (panel derecho). Tomado de Cunningham *et al.*, 2015.

En los folículos preantrales, las células de la granulosa se dividen en dos poblaciones: las células granulosas murales, ubicadas en la pared folicular y, las células del cúmulo (CC), que rodean al ovocito. Las células de la granulosa murales recubren la pared del folículo y tienen un papel predominantemente esteroidogénico, ya que solo estas células granulosas expresan el gen para la enzima p450 aromatasa, responsable de la aromatización de los andrógenos, y presentan grandes cantidades de 3-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y citocromo p450, además de poseer gran cantidad de receptores para FSH (Yen, 2001). Existen diferencias morfológicas entre las células murales y las del cúmulo; las murales son células epitelioides, fusiformes, redondas, estrelladas o irregulares, mientras que las del cúmulo son en su mayoría redondas en forma (Turathum *et al.*, 2021).

Las CC son células somáticas que rodean al ovocito, tienen un papel importante en el crecimiento, la maduración meiótica, la ovulación y la fertilización del ovocito en los mamíferos (Demiray *et al.*, 2019). La primera capa que rodea al ovocito se llama *corona radiata*. Las CC se forman a partir de células indiferenciadas de la granulosa, que son el principal tipo celular que generan el microambiente necesario para el ovocito en desarrollo (Huang y Wells, 2010). Estas células forman un epitelio pseudoestratificado que se conectan con el ovocito a través de proyecciones membranales. Las CC y el ovocito forman el complejo ovocito- cúmulo (COCs). La comunicación entre el ovocito y estas células regula la expresión de genes y la síntesis de proteínas, lo que permite la diferenciación y expansión de las CC y la maduración del ovocito. Las CC penetran la zona pelúcida (ZP) mediante uniones comunicantes (Kidder y Mhawi, 2002). En la transición de los folículos antrales a folículos preovulatorios, las CC proliferan y se establecen las uniones comunicantes con ovocito durante la maduración meiótica. Las funciones de las CC son apoyar el crecimiento del ovocito, producir ácido hialurónico (HA), experimentar la expansión en respuesta a la FSH, a diferencia de las células de la granulosa murales, que tienen funciones endocrinas y favorecen el desarrollo del folículo (Najafabadi, 2015).

Después del pico de LH, las CC se expanden, acumulando HA en la matriz extracelular, lo que contribuye a la ovulación y la subsecuente fertilización en el ámpula del oviducto (Zhuo y Kimata,

2001). La superfamilia TGF- β regula la función ovárica que favorece la diferenciación y proliferación de las CC, la expansión de los COCs y la producción de HA, causando la ovulación (Figura 6).

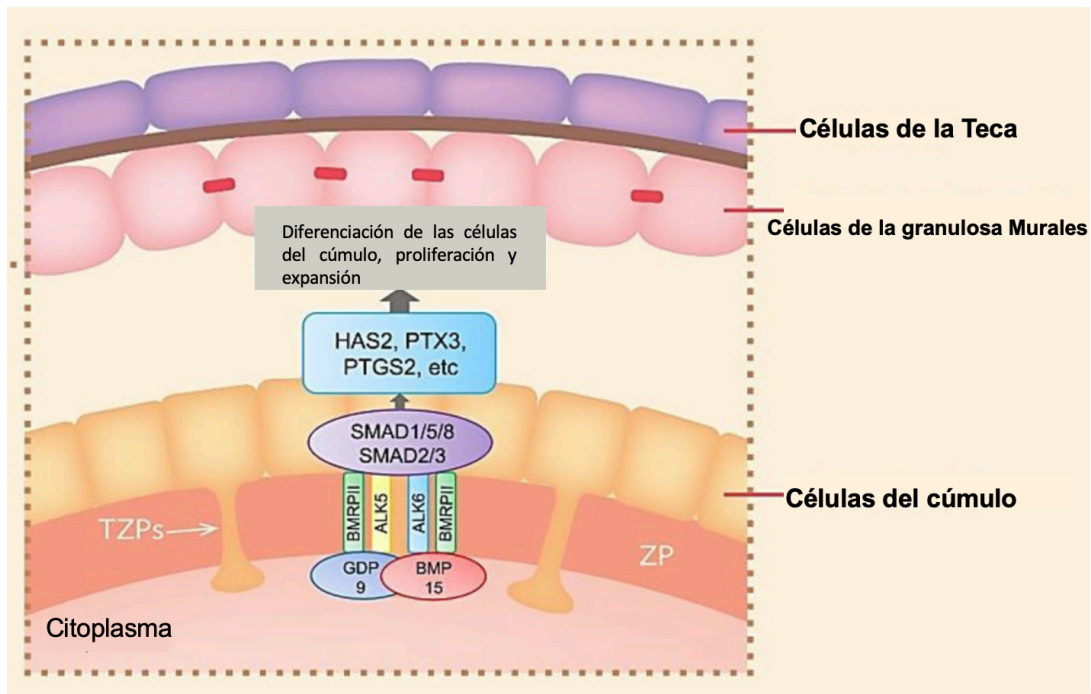


Figura 6. Interacciones moleculares que inducen la diferenciación de las CC. La proteína morfogénica ósea (BMP-15) y el factor de crecimiento diferencial 9 (GDF-9) promueven la expresión de genes en las CC y son importantes para su diferenciación, proliferación, expansión del COC y la producción de HA para que ocurra la ovulación. Tomado de Turathum *et al.*, 2021.

Una característica distintiva de las CC es su capacidad para pasar de una estructura celular compacta a una estructura celular dispersa. Este proceso se conoce como mucificación e implica que las células de la granulosa sintetizan HA y versicano, un proteoglicano que se localiza en la matriz extracelular (Turathum *et al.*, 2021).

El aumento de LH impulsa el proceso de expansión de las CC y está mediado por las células de la granulosa mural, éstas producen EGF, que se libera y se une al receptor de EGF en las CC, esto mejora la expresión de los genes Has2, Ptg2, Ptx3 y Tnfaip6, necesarios para la formación y estabilización de la matriz extracelular de las CC y su expansión. Esto facilita el

desprendimiento del COC de la pared del folículo, así como su extrusión en el momento de la ovulación (Baumgarten y Stocco, 2018).

Comunicación bidireccional células del cúmulo-ovocito

Las conexinas son una familia de proteínas homólogas, su función más conocida es formar canales de membrana intercelular, que permite el paso de pequeñas moléculas entre células, y este proceso es conocido como comunicación intercelular. Existen 21 diferentes tipos de conexinas en células humanas y 20 en ratones, estas reciben su nombre con base a su tamaño en kDa. Seis conexinas se oligomerizan para formar un conexón (Winterhager y Kidder, 2015). Cuando los conexones de la membrana plasmática de una célula se acoplan de extremo a extremo con los conexones de una célula adyacente, se forman canales intercelulares permeables a los solutos de bajo peso molecular. Cuando existen múltiples canales intercelulares, que unen a dos células se denomina placa de unión comunicante. Cada conexina posee cuatro regiones transmembrana, dos bucles extracelulares, uno intracelular y los extremos amino y carboxilo orientados hacia el lado citoplasmático (Winterhager y Kidder, 2015). En la rata, la estructura de las uniones comunicantes entre el ovocito y las CC implica exclusivamente un hexámero de conexina 37 (Cx-37) entre la membrana de la *corona radiata* y el oolema, mientras que en las CC la estructura está hecha exclusivamente de conexina 43 (Cx43) (Russell *et al.*, 2016).

Estas uniones se asocian con la transferencia de moléculas hidrofílicas, con un peso molecular inferior a 1 KDa. Las uniones comunicantes entre las CC y el ovocito se conocen como proyecciones transzonales (TZP), que son extensiones especializadas de las células de la *corona radiata* (Turathum *et al.*, 2021).

A lo largo de las etapas de foliculogénesis, las uniones comunicantes acoplan las células de la granulosa entre sí y con el ovocito, estableciendo un sincitio metabólico que es esencial para la ovogénesis. A través de estas uniones, las células de la granulosa envían nutrientes, incluidos los aminoácidos (glicina, alanina, lisina y taurina), glucosa para apoyar el metabolismo del ovocito en crecimiento, además de iones para regular el pH (Alam y Miyano, 2019). Además, permite que las CC mantengan al ovocito detenido en la profase I mediante la transferencia de señales inhibitorias intracelulares, estos canales compuestos por Cx43 son regulados para la apertura y cierre de este, que se activa dependiendo de su estado de fosforilación de la Cx43

(Brañes *et al.*, 2004). Otro papel importante de las CC en el crecimiento de los ovocitos es sincronizar la maduración nuclear y citoplasmática, además de regular la reanudación de la meiosis a través de las uniones comunicantes (Turathum *et al.*, 2021). En el ratón, se requieren componentes esenciales de señalización para mantener el arresto meiótico. La FSH estimula en las células de la granulosa murales la producción del péptido natriurético C (NPPC), el cual al unirse con su receptor NPR2 en las CC estimula la generación de GMPc, posteriormente el GMPc se difunde a través de las uniones comunicantes al ovocito, donde inhibe la actividad de la fosfodiesterasa 3 (PD3A) y la hidrólisis del AMPc, manteniendo así sus niveles elevados, el AMPc es producido por el mismo ovocito vía proteína G que se une a su receptor (GPR3) y la activación de adenilil ciclasa endógena del ovocito (Liu *et al.*, 2013). La proteína quinasa A (PKA) regula la actividad del factor promotor de la maduración (MPF) por medio de la fosfatasa CDC25 que se encarga de desfosforilar a la cinasa dependiente de ciclina (CDK1), y a las quinasas Wee1 y Myt1 que participan en la fosforilación de CDK1. Los niveles altos de AMPc dan como resultado la fosforilación de CDK1 y la inactivación de MPF, manteniendo así el arresto meiótico (Liu *et al.*, 2013) (Figura 7).

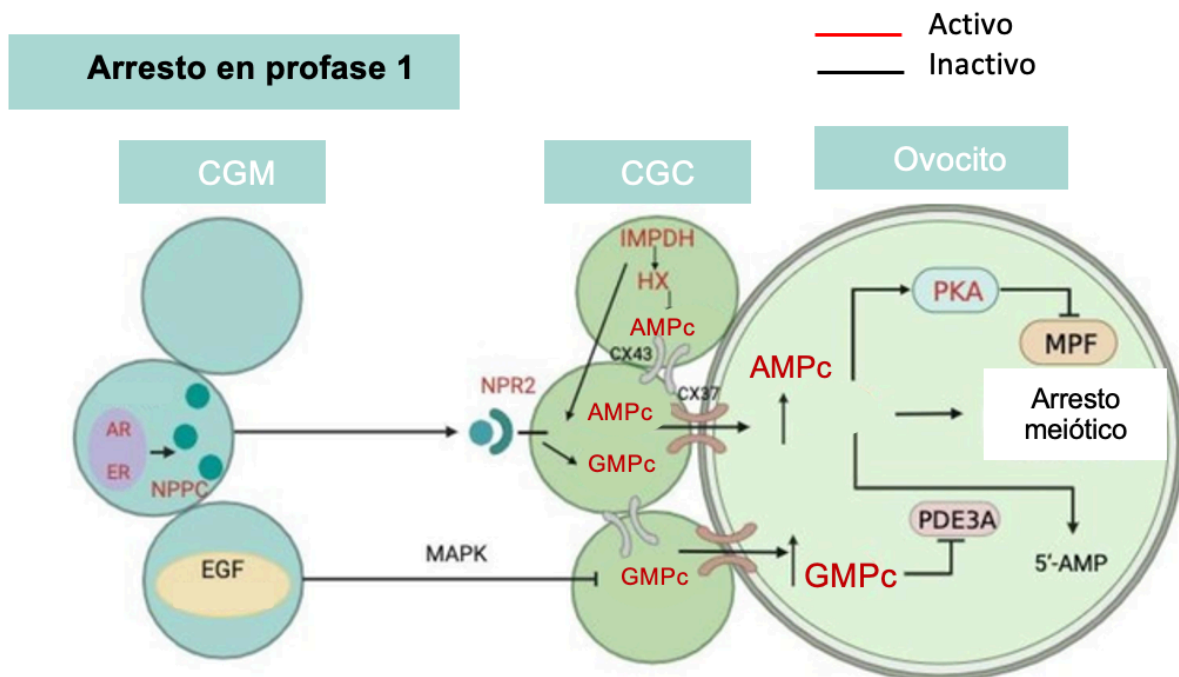


Figura 7. Mecanismos que regulan el arresto meiótico, el mantenimiento del arresto de los ovocitos en la profase I requiere altos niveles de AMPc. Las células de la granulosa murales producen NPPC, esto estimula la producción de GMPc en las CC, que ingresa a los ovocitos a través de las uniones comunicantes (Cx37) y evita que la PDE3A

hidroliza el AMPc. El AMPc activa la PKA, lo que lleva a la inactivación del MPF y al mantenimiento del arresto en los ovocitos. Tomada de Pei *et al.*, 2023.

Maduración nuclear y citoplasmática del ovocito

La meiosis es el proceso mediante el cual las células germinales diploides, reducen su número de cromosomas a la mitad en preparación para combinarse con un gameto haploide del sexo opuesto para crear un individuo diploide, genéticamente diferente de los progenitores. En las hembras de los mamíferos, la meiosis se produce durante un período de tiempo prolongado; durante la etapa fetal, las ovogonias inician la meiosis, pero quedan detenidas en la etapa de diploteno de la profase I (Eppig *et al.*, 2004). A partir de la pubertad en las hembras de mamífero, el pico preovulatorio de LH induce la reanudación de la meiosis I hasta MII, en la que se detiene nuevamente la meiosis y finalmente son ovulados (Alam y Miyano, 2019).

En una amplia variedad de especies animales el MPF, desempeña un papel fundamental. Es un heterodímero compuesto por quinasa 1 (CDK1), dependiente de ciclina (B). CDK1 fosforila residuos de serina y treonina específicos de sus proteínas, por lo que es necesario unirse con la ciclina B para garantizar sus funciones (Pan y Li, 2019). En la ratona, el núcleo de los ovocitos, también conocido como vesícula germinal (VG) exhibe una configuración de cromatina única que está sujeta a modificaciones dinámicas durante la ovogénesis. Este proceso de maduración es fundamental para conferir al gameto femenino competencia meiótica y de desarrollo; las modificaciones postraduccionales de las proteínas histonas, como la acetilación y la metilación, son cruciales para la formación de heterocromatina y, por lo tanto, desempeñan un papel clave en la remodelación del genoma del ovocito (Vanhoutte *et al.*, 2007). Esta estrategia implica modificaciones múltiples y jerárquicas de la cromatina que regulan la dinámica nuclear en respuesta a una señal programada durante el desarrollo, presumiblemente de origen paracrino, antes de la reanudación de la meiosis (Vanhoutte *et al.*, 2007).

La maduración de los ovocitos implica una serie compleja de eventos de remodelación molecular y de sus organelos, en particular mitocondrias, gránulos corticales, citoesqueleto y retículo endoplásmico, entre la reanudación del primer ciclo celular meiótico y la detención del ciclo celular en la metafase de la MII (Pei *et al.*, 2023). Los gránulos corticales, desempeñan un papel crucial en la fertilización al sufrir exocitosis después de la fertilización, lo que lleva al

bloqueo de la polispermia en la ZP en los mamíferos. Las mitocondrias son fundamentales para suministrar energía a los ovocitos con adenosín trifosfato (ATP). Además, el retículo endoplasmático es capaz de almacenar y liberar calcio (Ca^{2+}), lo cual es esencial durante la fertilización.

El citoesqueleto, compuesto principalmente por microtúbulos y microfilamentos, regula la reorganización del huso con la red de microfilamentos durante la meiosis. Cualquier alteración de los microtúbulos o microfilamentos puede provocar una falla en el movimiento y la segregación de los cromosomas, lo que resulta en una detención de la metafase (Pei *et al.*, 2023). La reanudación de la meiosis después del aumento de la LH, se ve facilitada por al menos dos mecanismos que reducen la actividad de la PKA: una reducción del AMPc por la PDE3A y la redistribución de la PKA. El aumento de LH implica la regulación de las uniones comunicantes, la maduración de los ovocitos depende de la actividad MAPK de las CC, la LH provoca una rápida fosforilación dependiente de MAPK, lo que cierra las uniones comunicantes entre las CC, mientras que las uniones comunicantes entre ovocitos y CC permanecen abiertas (Edson *et al.*, 2009). Después de la activación del MPF se reanuda la meiosis, se produce la condensación y segregación cromosómica, la envoltura nuclear se rompe y la división asimétrica del citoplasma da como resultado la extrusión del primer cuerpo polar. A diferencia de la mitosis, no hay una fase S intermedia y, en cambio, la meiosis progresa a una segunda división para reducir el genoma de diploide a haploide. La actividad de un factor citostático (CSF) causa la detención en MII en el ovocito mediante la estabilización del MPF y no se completa la segunda división meiótica hasta la fertilización (Edson *et al.*, 2009) (Figura 8).

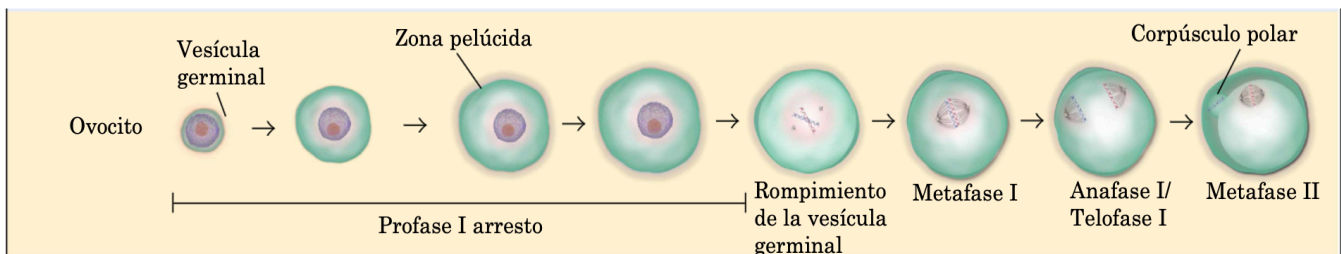


Figura 8. Ovogénesis. El ovocito reinicia la meiosis, sufre rompimiento de la VG y progresa hacia anafase I y telofase I, para completar la meiosis I. Al completar la primera división meiótica, el primer cuerpo polar se extruye y el ovocito se detiene, en metafase II. Posteriormente es ovulado y la meiosis concluye con la fecundación. Tomado de Mihalas *et al.*, 2017.

Una vez que los ovocitos han madurado hasta la metafase II, en respuesta al aumento de LH, la estructura del folículo se remodela radicalmente para permitir la ovulación y se produce una serie de procesos esenciales (Robker *et al.*, 2018). El aumento de LH desencadena las etapas finales de la maduración de los ovocitos, así como la ruptura folicular. La LH circulante se une a su receptor (LH-R), acoplado a la proteína G, en las células de la granulosa mural de los folículos maduros, lo que desencadena la activación de múltiples vías de señalización intracelular, incluidas la proteína quinasa A, ERK1/2, la proteína quinasa C y proteínas Ras (Richards y Ascoli, 2018). Estas distintas cascadas de señalización son efectoras de aspectos específicos de la maduración de los ovocitos y la ruptura folicular. El aumento de LH activa a las quinasas ERK1/2 lo que induce la transcripción de ligandos similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF-L), anfirregulina, epirregulina y betacelulina, en las células de la granulosa murales. La secreción de estos ligandos es esencial para activar el receptor de EGF (EGFR) en las CC e iniciar la respuesta ovulatoria en los COCs (Robker *et al.*, 2018). A medida que el folículo responde al aumento de LH, uno de los eventos visualmente más impactantes e importantes es la expansión de los COCs. Estos se expanden en volumen mediante la rápida inducción de genes que codifican proteínas estructurales, proteoglicanos y enzimas sintetizadoras de glicosaminoglicanos, lo que da como resultado la formación de una matriz extracelular (ECM), altamente especializada que envuelve las capas del cúmulo y al ovocito (Russell y Robker, 2007). La enzima prostaglandina sintasa 2 (Ptgs2) cataliza la producción de precursores de prostaglandinas que son importantes para la señalización intrafolicular en la ovulación, las prostaglandinas interactúan con el receptor PGE2 tipo 2 (EP2) para inducir la expresión de genes de las CC que son críticos para la ovulación, como TNFAIP6, Has2, Ptx3 (Robker *et al.*, 2018).

Todo el folículo sufre una remodelación profunda, que incluye degradación proteolítica, inflamación y angiogénesis. La metaloproteinasas ADAMTS-1, junto con el versicano, regulados por el receptor para P₄, son los responsables de la degradación de la pared del folículo para que el ovocito sea liberado. Esta proteasa es sintetizada por las células de la granulosa murales, aunque la forma activa se localiza en la matriz extracelular de los COCs expandidos. La angiogénesis en la vasculatura que rodea el folículo es esencial para la ovulación y se regula principalmente mediante la inducción de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Robker *et al.*, 2018).

ANTECEDENTES

La función reproductiva es uno de los primeros eventos que se alteran con el estrés. Diversos estudios han reportado alteraciones en todos los niveles del eje HHO (Smith *et al.*, 2003; Tilbrook *et al.*; 2000; Álvarez, 2008). El estrés crónico causado por diversos estresores como alimentación limitada, baja temperatura (4°C), inmovilización, cambios en el ritmo diurno; durante diez días consecutivos en ratas hembra causa disminución en las concentraciones séricas de E₂, incremento en los niveles de testosterona, dopamina y norepinefrina, así como menor receptividad (Yoon *et al.*, 2005). Además, el contenido de la enzima óxido nítrico sintasa neural (nNOS) y la endotelial (eNOS) en el tejido vaginal es menor en hembras estresadas, debido al incremento en la testosterona y la baja concentración de E₂, lo que causa menor relajación del músculo liso y menor flujo sanguíneo vascular, en respuesta al estímulo sexual en el tejido vaginal (Yoon *et al.*, 2005). El estrés por calor en ratas induce disminución de la cantidad de folículos preantrales saludables, ciclos estrales irregulares, el peso corporal de la hembra es menor y la tasa de natalidad se reducen a medida que la temperatura se incrementa, de los 25.6 °C a los 32.4 °C (Abu *et al.*, 2020). El estrés por calor en cabras (inducido mediante una cámara climática a 35 °C) y en ratas, altera el crecimiento folicular, disminuye la concentración plasmática de LH, E₂, así como los receptores para LH y la actividad de la aromatasa en las células de la granulosa, así como las concentraciones de E₂, en el fluido folicular, retrasando así la maduración de los ovocitos y la ovulación.

Aunado a lo anterior, el crecimiento fetal es reducido, lo mismo que el peso de la placenta debido al aumento en la resistencia vascular causada por alteraciones en la angiogénesis (Hansen, 2009). Adicionalmente el estrés por calor, inducido mediante una cámara climática a 42 °C por 3 h, aumenta el porcentaje de folículos atrésicos y el número de folículos antrales con señales apoptóticas. La proteína HSP70, Bim y la caspasa 3 fueron abundantes, disminuyendo a la proteína aromatasa, así mismo, disminuye las concentraciones de E₂, en suero y provoca apoptosis en las células de la granulosa (Li *et al.*, 2016).

La reproducción de los mamíferos es el resultado de una regulación compleja de varios factores *in vivo*, por lo cual la temperatura fría es un factor ambiental importante. El estrés por frío inducido mediante una cámara a -10°C por 4 hrs altera el ciclo estral, las ratas muestran prolongación de las fases de estro y diestro, estas etapas se prolongan (Xu *et al.*, 2018). Los niveles séricos de

P₄, E₂ y PRL disminuyen, además la exposición prolongada al frío produce alteraciones en la morfología del útero debido a una menor expresión de ARNm para receptores de E₂ (ER) en útero (Xu *et al.*, 2018).

La exposición de ratas hembra a estrés por inmersión en agua helada (0 – 1 °C) durante 20 min por 7, 14 y 21 días provoca alargamiento de los ciclos estrales debido a los bajos niveles de E₂ y P₄; el diámetro folicular y el número de folículos es menor en las ratas expuestas a estrés, así como el diámetro de las capas de células de la granulosa y de la teca; el lumen uterino es menor, el epitelio endometrial disminuye, es irregular, edematoso y con menor número de glándulas, además de haber vasoconstricción en el ovario y en el útero. Los cambios en los ovarios y el útero debido a la vasoconstricción podrían deberse a la disminución del suministro de sangre en los órganos reproductivos (Wang *et al.*, 2020).

La respuesta de estrés varía con la edad, ya que modifica la actividad del SNS en ratas hembra adultas, dando como resultado un aumento de los niveles noradrenérgicos, altera la función ovárica, provoca la formación de quistes foliculares y aumenta la secreción de andrógenos en el ovario (Espinoza *et al.*, 2023).

Las crías de ratas expuestas a estrés por frío presentan un retraso en la apertura vaginal, asociado con bajas concentraciones de E₂, en ratas prepúberes el estrés crónico puede retrasar el inicio de la pubertad (Espinoza *et al.*, 2023). El estrés crónico por inmersión en agua fría a 15 °C por 15 min durante 30 días consecutivos en ratas hembra alarga el ciclo estral, extendiéndose el número de días en proestro y el estro, las hembras muestran menor proceptividad y receptividad (lordosis), la tasa de gestación es menor, aumenta el número de fetos reabsorbidos, el contenido hipotalámico de Kiss1 y GnRH disminuye, así como las concentraciones de E₂, P₄ y LH (Retana-Márquez *et al.*, 2020). Estos resultados muestran que el estrés crónico tiene un efecto negativo en la reproducción femenina. Además, el estrés crónico por inmersión en agua fría reduce la viabilidad de los ovocitos, así como su maduración *in vivo*, con la mayoría de los ovocitos en etapa de VG; el número de ovocitos con anomalías es mayor, los cuales presentan deformación en la ZP, citoplasma compacto o granuloso (Casillas *et al.*, 2021). En conclusión, las temperaturas extremas tienen un efecto nocivo en los ovocitos y las CC.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estrés altera diversas funciones reproductivas en la hembra, entre ellas el desarrollo de los folículos en el ovario, el desarrollo de los ovocitos, generando bajas tasas de maduración de ovocitos y de gestación. Asimismo, disminuye la concentración de las hormonas sexuales femeninas como LH, FSH, E₂ y P₄ e incrementa los glucocorticoides en el suero. Sin embargo, actualmente no hay estudios en los que se evalúen los posibles efectos que el estrés crónico causa en las células del cúmulo, las cuales son importantes en los procesos de viabilidad y en la maduración de los ovocitos.

JUSTIFICACIÓN

A pesar de que se han estudiado las alteraciones reproductivas que el estrés genera en las hembras, en la actualidad no existen reportes acerca de su impacto en las CC y cómo esto afecta el desarrollo del ovocito. Es importante evaluar los efectos del estrés en la viabilidad de estas células, ya que esto podría comprometer el proceso de maduración folicular y afectar la viabilidad de los ovocitos.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué efecto tendrá el estrés crónico sobre la viabilidad en las CC, así como en la viabilidad y maduración de los ovocitos?

HIPÓTESIS

El estrés generará bajas concentraciones séricas de hormonas sexuales, alterando la progresión del ciclo estral, así como baja viabilidad de las células del cúmulo y bajos porcentajes de viabilidad y maduración de ovocitos *in vivo*.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto del estrés crónico en el control endocrino del ovario y su impacto en la ciclicidad estral y en los complejos ovocitos-células del cúmulo en ratas hembra adultas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la progresión del ciclo estral en ratas hembra.
- Valorar la actividad del eje HHO y del eje HHA.
- Evaluar la ganancia de peso corporal y los índices de pesos de órganos reproductivos.
- Determinar la viabilidad de las CC.
- Estimar el porcentaje de viabilidad y maduración de los ovocitos.

MÉTODOS

Declaración de Ética

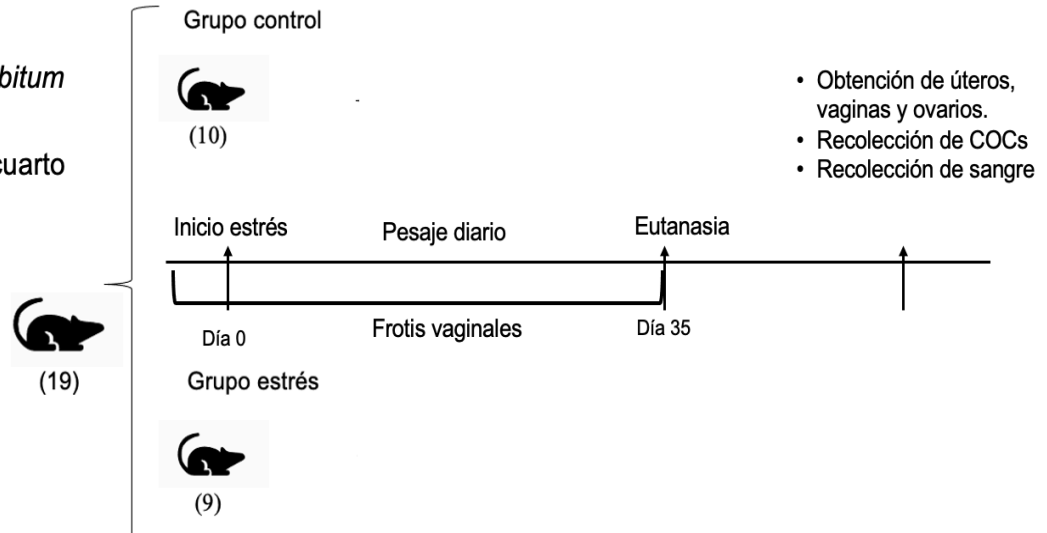
El manejo de los animales de experimentación, así como los procedimientos experimentales utilizados en este proyecto estuvieron apegados a la reglamentación de animales domésticos y de laboratorio considerada en los Lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, 2010, así como a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Animales

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar, de 3 meses de edad, con un peso corporal entre 220-240 g, que fueron obtenidas del Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana. Las ratas se mantuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad invertido (12:12), con temperatura ambiente controlada (22 ± 1 °C), y acceso a alimento y agua *ad libitum*. Las ratas se asignaron aleatoriamente a uno de los dos grupos siguientes: control (n = 10) y estrés crónico (n = 9).

Diseño experimental

- Ciclo luz- oscuridad invertido (12:12)
- Comida y agua *ad libitum*
- Temperatura del cuarto $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$



Estresor: inmersión en agua fría ($15 \text{ }^\circ\text{C}$), 15 minutos, por 35 días.

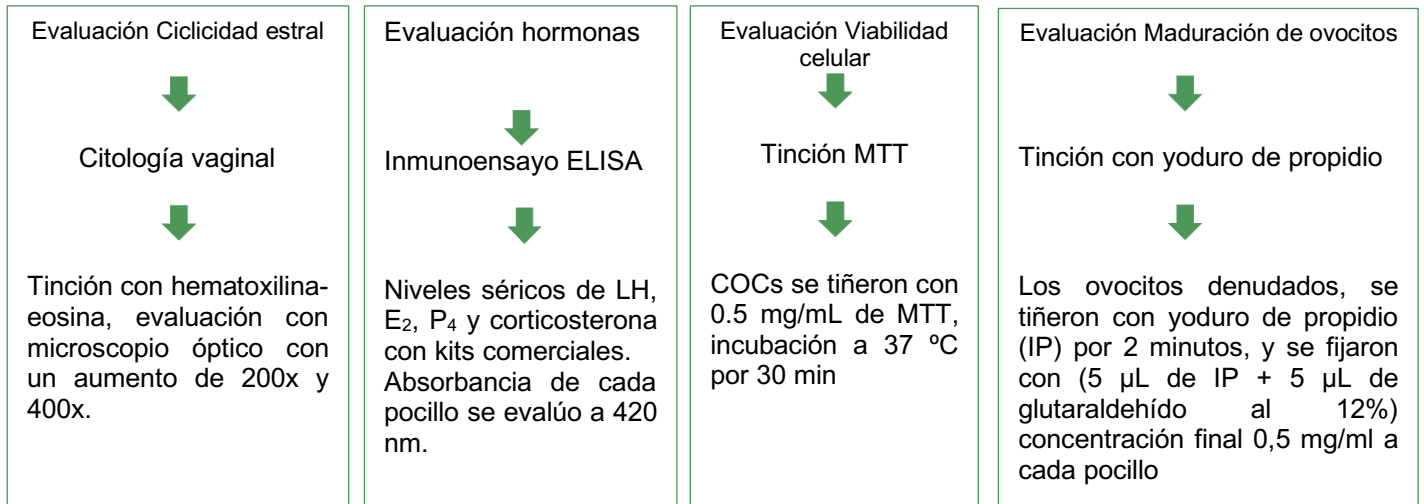
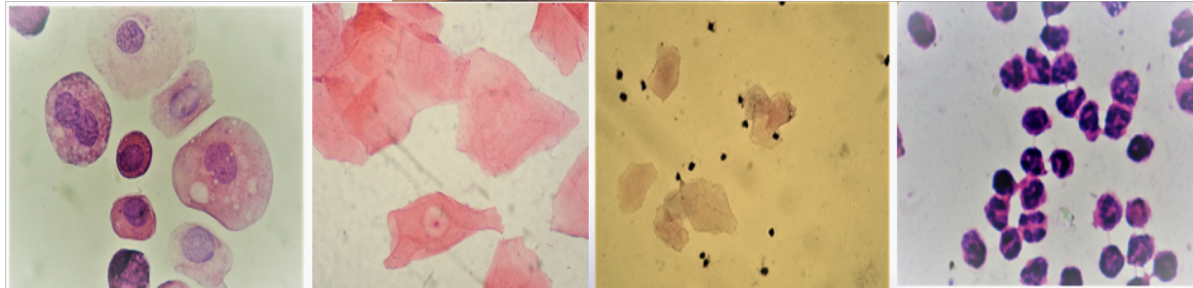


Figura 9. Representación esquemática del diseño experimental.

Las hembras del grupo control se mantuvieron en sus cajas sin alteraciones y sólo se manipularon para registrar sus pesos corporales cada día. Las ratas del grupo de estrés fueron estresadas durante 35 días consecutivos. En ese tiempo, también se evaluó la ciclicidad estral mediante citología vaginal. Un día después de finalizar el periodo de estrés, las ratas de ambos grupos, la mitad en proestro y la otra mitad en diestro, de cada grupo, fueron sometidas a eutanasia por decapitación. Se obtuvo sangre del tronco tirocervical para la evaluación de las concentraciones séricas de corticosterona, LH, E₂ y P₄; se extrajeron los úteros y las vaginas para registrar sus pesos. De los ovarios se obtuvieron los COCs por punción de los folículos. Estos se depositaron en cajas de Petri, se seleccionaron los ovocitos con citoplasma uniforme y rodeados de una masa compacta de CC. Se determinó la viabilidad de las CC y de los ovocitos, así como su maduración *in vivo*.

Progresión del ciclo estral

Para el seguimiento del ciclo estral, se realizaron frotis vaginales diariamente, durante dos semanas, antes de iniciar el experimento. Los frotis fueron obtenidos una hora antes del inicio del período de oscuridad. Para la toma de muestra se utilizó solución salina y un asa de acero inoxidable (Figura 10 A). La muestra obtenida, se colocó en un portaobjetos y posteriormente se tiñó con hematoxilina-eosina para su observación al microscopio óptico (Olympus, modelo CX41RF) a un aumento de 400x. Las etapas del ciclo estral se identificaron de acuerdo con la citología vaginal: etapa de proestro, células nucleadas; estro, células cornificadas; metaestro, células cornificadas y leucocitos; diestro, leucocitos (Retana-Márquez *et al.*, 2020). Los ciclos estrales se consideraron normales cuando se observaron proestro, estro completo, metaestro, y diestro en ciclos de 4 a 5 días (Figura 10 B).



Proestro
80-100%
Células
epiteliales
nucleadas

Estro
80-100%
Células epiteliales:
queratinizadas

Metaestro
50% Leucocitos
50% Células epiteliales
queratinizadas

Diestro
80-100%
Leucocitos

Figura 10 A) Toma de frotis vaginales. 10 B) Tipos de células del epitelio vaginal observadas en las muestras tomadas a lo largo del ciclo estral. Aumento 400x

Aplicación del estresor

Las ratas del grupo estrés se trasladaron a otra habitación, donde las hembras se colocaron individualmente en una caja de acrílico con tapa que contenía agua fría (temperatura = 15 °C, profundidad = 15 cm), durante 15 min. Las ratas permanecieron en una posición erguida (como se observa en la figura 12), manteniendo la cabeza por encima del nivel de agua. El estresor se aplicó una vez al día, a las 10:00 am durante 35 días consecutivos. Al final de los 15 min, las ratas se sacaron de la caja de acrílico y fueron secadas. El orden en que se llevaron al área donde fueron estresadas fue aleatorio (Retana-Márquez et al., 2003).



Figura 12. Rata hembra sometida a estrés por inmersión en agua fría

Registro del peso corporal

El peso corporal de las hembras de ambos grupos se registró utilizando una báscula con canastilla (Sartorius) diariamente de manera rutinaria a las 9:30h desde el inicio hasta el final del experimento.

Índice de los pesos de órganos reproductivos

Los pesos relativos de los ovarios, útero y vagina se determinaron de acuerdo con las siguientes fórmulas:

Peso relativo de ovarios = peso del ovario (mg) / peso corporal (g) x 100

Peso relativo de úteros = peso del útero (mg) / peso corporal (g) x 100

Peso relativo de vaginas = peso de la vagina (mg) / peso corporal (g) x 100

Análisis Hormonal

Todas las hormonas se determinaron por el método de inmunoensayo competitivo ELISA, se utilizaron kits especiales para cada hormona (Arbor Assays DetectX®). Cada ejecución incluyó una curva estándar. La absorbancia de cada pocillo se evaluó a 420 nm con un lector de placas de microtitulación BioRad xMark™.

Corticosterona

- 1.- se utilizó una placa ELISA de 96 pocillos, y en cada pocillo se depositaron 50 µL de muestra sérica de corticosterona
- 2.- se añadieron 75 µL de solución amortiguadora
- 3.- se agregaron 25 µL del conjugado de corticosterona
- 4.- se depositaron 25 µL del anticuerpo de corticosterona
- 5.- Se cubrió la placa, y se centrifugó a temperatura ambiente por 1 hora (700 rpm)
- 6.- Al pasar la hora, se lavó 4 veces con amortiguadora diluida (300 µL por pocillo), y se añadieron 100 µL del sustrato de Tetrametilbencidina (TMB)
- 7.- la placa se incubó a temperatura ambiente (18°C-23°C) por 30 min. La ejecución del ensayo incluyó una curva estándar y el límite de detección fue de 17.5 ng/mL.

Estradiol, progesterona, hormona luteinizante

- 1.- Se depositaron 100 µL de muestra de cada hormona en una placa ELISA de 96 pocillos
- 2.- Se añadieron 25 µL del conjugado de cada hormona y 25 µL del anticuerpo para cada hormona
- 3.- Se cubrió la placa y agitó durante 2h a 700 rpm
- 4.- Posteriormente se aspiró y lavó cada pocillo 4 veces con 300 µL de solución amortiguadora
- 5.- Se agregaron 100 µL del sustrato de Tetrametilbencidina (TMB) a cada pocillo.
- 6.- Se dejó incubar la placa a temperatura ambiente (18°C-23°C) por 30 minutos. Para la ejecución incluyó una curva estándar. Se determinó la absorbancia de cada pocillo a 450 nm

con un lector de placa de microtitulación. El mismo procedimiento se utilizó para las hormonas P₄ y LH, pero cada una se llevó a cabo de manera individual. El límite de detección para E₂ fue de 2.05 pg/mL, para P₄ fue de 0.1 ng/mL y para LH fue de 0.94 ng/mL.

Viabilidad celular

La evaluación de la viabilidad de los ovocitos y de las CC se realizó mediante la tinción de azul de tetrazolio (MTT), inmediatamente después de su colecta. Los ovocitos y las CC se tiñeron con 0.5 mg/mL de MTT en solución salina de fosfatos (PBS). Después de 30 min en incubación a 37 °C, para su evaluación los ovocitos y las CC se observaron en un microscopio óptico (Zeiss Axiostar, Alemania) con aumento de 40x. Las células teñidas de color púrpura se consideraron como vivas (viables) y las incoloras como muertas (no viables). Para su análisis se utilizó el programa CellProfiler 2021 (identifica células).

Evaluación de la maduración de ovocitos in vivo

El primer paso fue realizar la punción de los folículos ováricos usando una aguja desechable de 8 mm, dentro de una caja de Petri para obtener los COCs, posteriormente los COCs se desnudaron (se retiraron las CC), una vez separados los ovocitos, estos se tiñeron con 5 µL de yoduro de propidio (IP) por 2 min, y se fijaron con 5 µL de glutaraldehído al 12%, después se realizó el montaje en un portaobjetos para su evaluación en un microscopio de epifluorescencia de la marca Axiostar Pluss, ZEISS®, con una longitud de onda de excitación de 547 nm, con un rango de detección de 541-572 nm, a un aumento de 100x. Los criterios para la evaluación de la maduración nuclear fueron los siguientes: ovocitos con vesícula germinal (VG): inmaduros; en MI: en proceso de maduración, en MII: maduros.

Análisis estadístico

Las bases de datos se crearon en Excel. El análisis estadístico y las gráficas se realizaron con los programas estadísticos GB Stat™ y GraphPad Prism 6.0. Los datos se expresaron como

Media \pm error estándar de la media (E.E.M). Los porcentajes de viabilidad de las CC y la maduración de los ovocitos se analizaron con la prueba chi cuadrada. El número de ciclos estrales se analizaron mediante la prueba *t-student*. Los pesos de los órganos, así como las concentraciones hormonales fueron analizados con ANOVA de dos vías, con los tratamientos y las etapas del ciclo como factores, seguida de la prueba post hoc Newman-Keuls, para comparaciones múltiples. La ganancia de peso corporal se analizó mediante regresión lineal. El nivel de significancia estadística se fijó en $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Ciclicidad estral

Las citologías vaginales mostraron cambios en el epitelio vaginal de las hembras control y de estrés durante los ciclos estrales. Los ciclos de las hembras control se presentaron de forma regular con una duración de 4-5 días, con la presencia de todas las etapas en progresión normal, proestro, estro, metaestro y diestro; en este grupo, el promedio del número de ciclos estrales durante 35 días fue 8.6. El estrés crónico causó irregularidades en la progresión del ciclo estral; se observaron alteraciones a partir del día 3 de estrés, los ciclos estrales se alargaron de uno a más días, pasando más tiempo en las etapas de proestro y estro, sin progresar a la siguiente etapa. El promedio del número de ciclos estrales en las ratas estresadas fue 5.9, menor a lo observado en las hembras control (Figura 13).

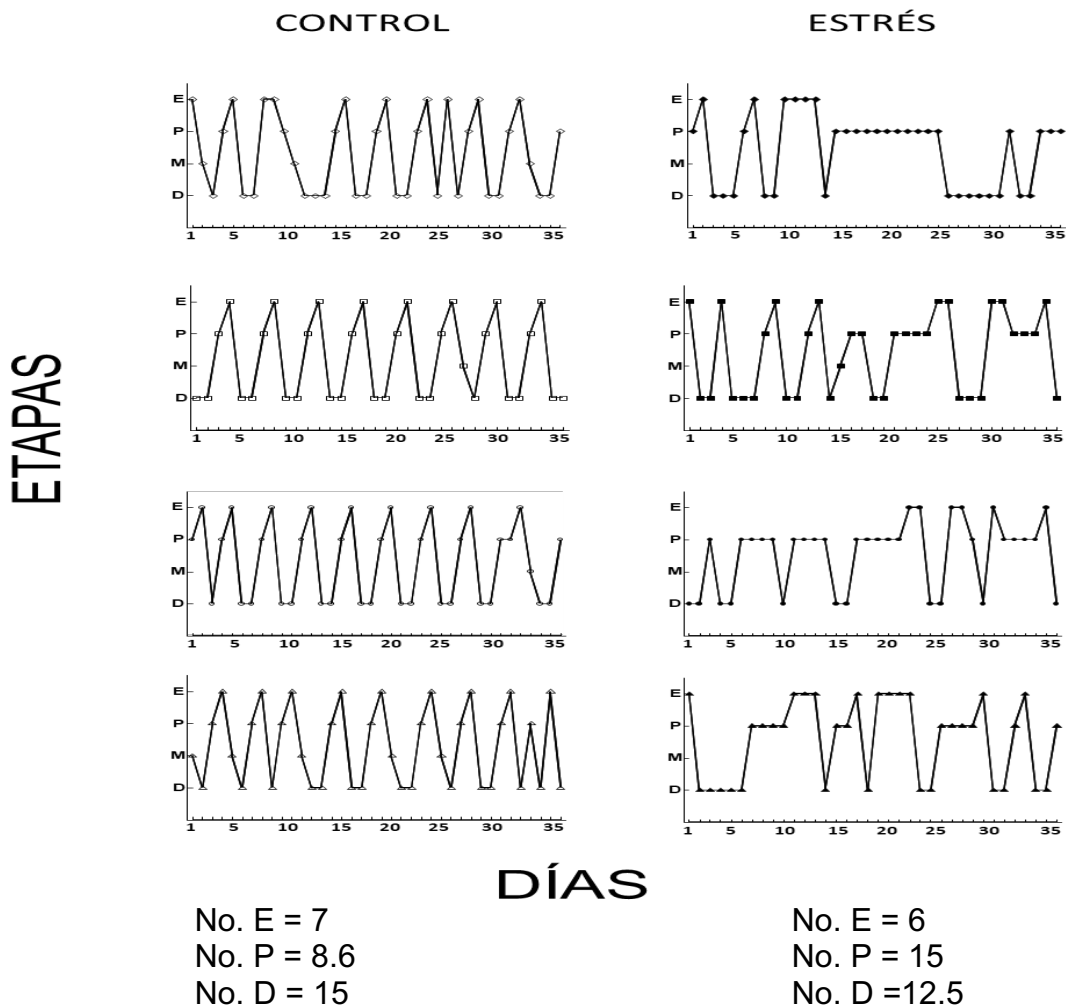


Figura 13. Las gráficas representan la ciclicidad estral a lo largo de las distintas etapas que se presentan del ciclo estral durante 35 días. Cada gráfica muestra el ciclo estral de una rata para cada grupo, control y estrés. Las hembras control mostraron una correcta progresión pasando por todas las etapas. El estrés crónico redujo el número de ciclos estrales, alargando los días en proestro. Proestro (P), Estro (E), Metaestro (M), Diestro (D). Eje Y: etapas del ciclo estral. Eje X: días durante los cuales se tomaron los frotis vaginales. Control: n=10, estrés n = 9.

El número de días en proestro fue mayor en las ratas estresadas (15) en comparación con las ratas del grupo control (8.6); el número de días en estro fue similar para ambos grupos en grupo estrés (6) y en control (7); el número de días en diestro fue menor en las ratas estresadas (12.5) comparando con las ratas control (15) (Figura 14).

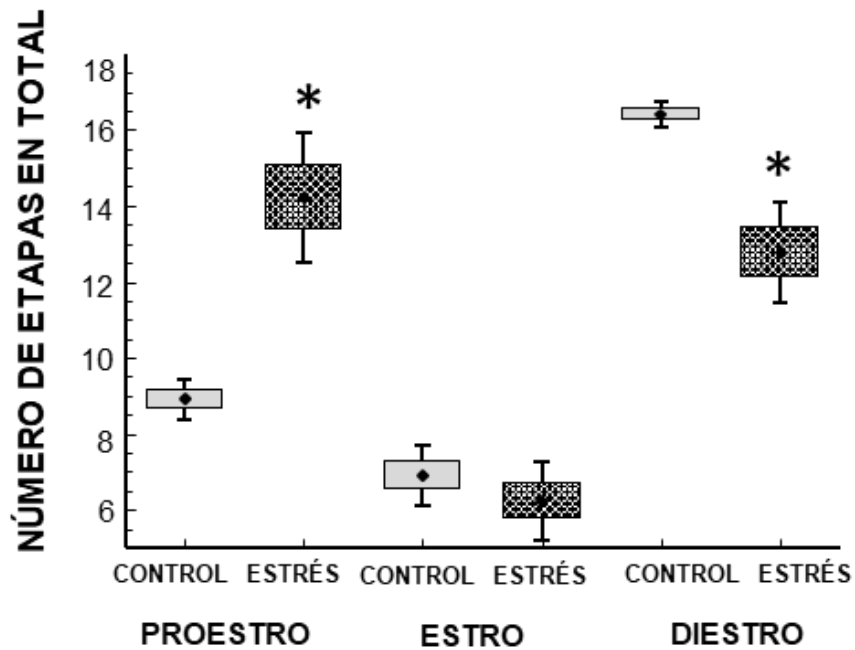


Figura 14. Número de días en cada etapa del ciclo estral a lo largo de 35 días. Datos mostrados como Media ± E.E.M. * $p= 0.01$ en comparación con el control.

En relación con el porcentaje de hembras que presentaron ciclos estrales, se observó que el 100% de las hembras del grupo de estrés crónico presentó alteraciones en el ciclo estral en comparación con las hembras control, de las cuales el 30% mostró alguna alteración en la progresión de los ciclos estrales, esto es, un día más de proestro, de estro o de diestro (Figura 15).

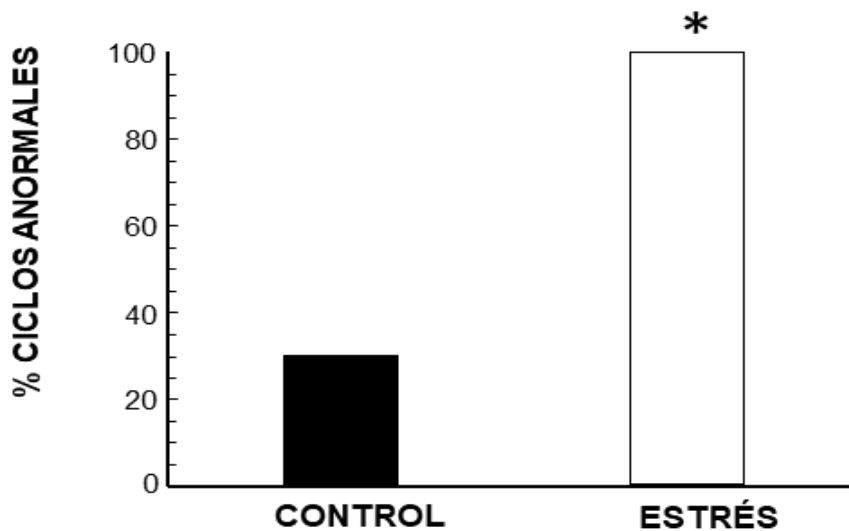


Figura 15. Porcentaje de ciclos estrales anormales en las ratas hembra. Las ratas estresadas presentaron mayor porcentaje de ciclos estrales anormales en comparación con el control. diferencia significativa con respecto al control. $p = 0.05$.

Ganancia de peso corporal

Las ratas que fueron sometidas a estrés crónico por inmersión en agua fría durante 35 días consecutivos no presentaron pérdida de peso corporal; sin embargo, la ganancia de peso en este grupo fue significativamente menor en comparación con el grupo control desde el día 10 hasta el último día del experimento. En la Figura 16 se muestran las curvas de ganancia de peso corporal para ambos grupos. Se incluye la ecuación obtenida por regresión lineal, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación para cada curva. El análisis estadístico muestra que la pendiente de la curva de ganancia de peso del grupo estrés fue significativamente menor en comparación con la pendiente del grupo control ($p= 0.0001$). El coeficiente de correlación de la ganancia de peso a lo largo de los días fue alto, tanto en las ratas estresadas ($r = 0.955$) como en las ratas control ($r = 0.996$), indicando una correlación positiva. La pendiente de la curva de ganancia de peso en las ratas estresadas fue menor que la de las ratas control.

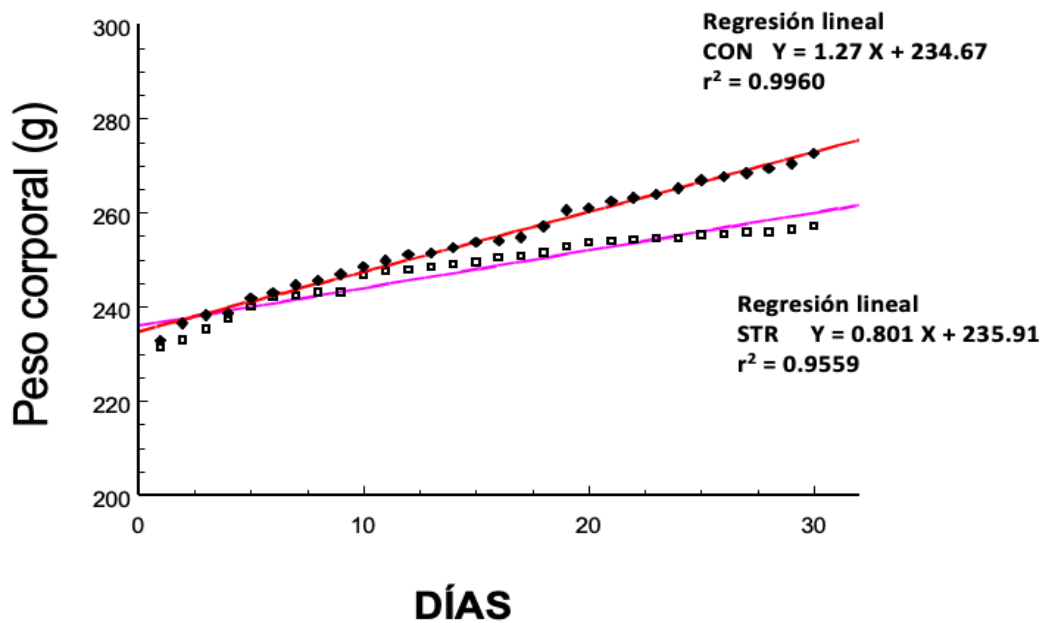


Figura 16. Curva de ganancia de peso corporal de las hembras control (línea roja) y ratas sometidas a estrés crónico por inmersión en agua fría (línea rosa). La ganancia de peso fue más lenta en el grupo estrés a partir de los 10 días de haber comenzado con la aplicación del estresor. Cada punto representa el promedio de peso por día para cada grupo, $n=19$. CON: control, STR: estrés.

Índices de los órganos reproductivos femeninos

Peso ovárico relativo

Con respecto a los pesos ováricos relativos, se observó que las hembras del grupo control tuvieron un mayor peso ovárico en la etapa de proestro en comparación con las hembras estresadas que mostraron un menor peso. Los valores del peso ovárico en la etapa de diestro para el grupo de estrés no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control (Figura 17).

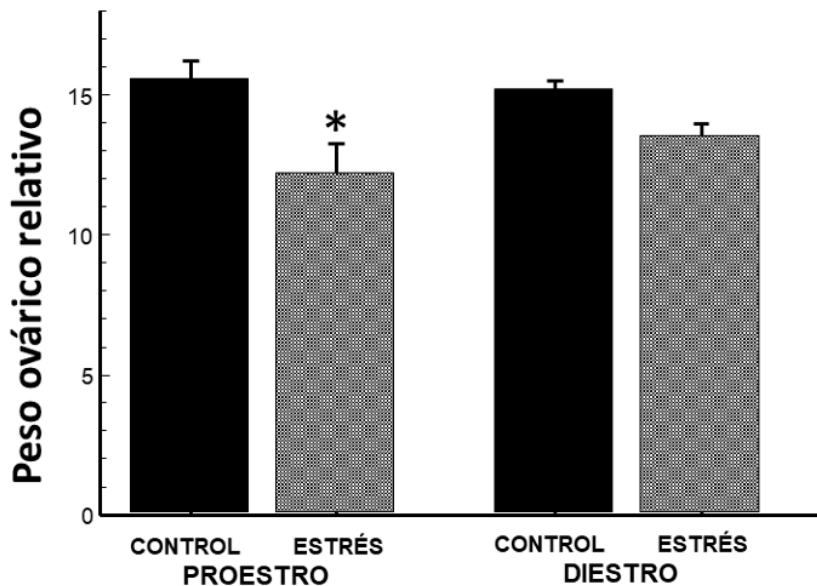


Figura 17. Pesos ováricos relativos en hembras control y estresadas crónicamente. Los pesos fueron menores en las hembras estresadas, solamente durante el proestro. Los datos se muestran como Media \pm E.E.M, * diferencia significativa con respecto al grupo control, $p = 0.05$. CON: control, STR: estrés.

Peso uterino relativo

De manera similar a lo observado en los pesos vaginales, los pesos uterinos relativos en la etapa de proestro fueron menores en las hembras del grupo de estrés en comparación con el

grupo control. En la etapa de diestro no se observaron diferencias significativas entre los pesos uterinos de ambos grupos (Figura 18).

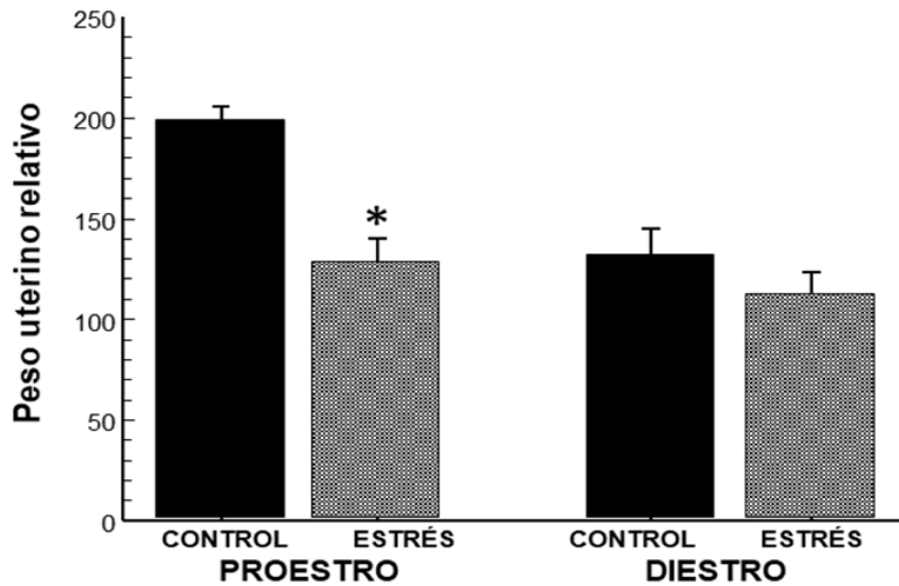


Figura 18. Pesos uterinos relativos. Los pesos fueron menores en las hembras del grupo de estrés, únicamente en la etapa de proestro. Los datos se muestran como Media \pm E.E.M, * diferencia significativa con respecto al grupo control, $p= 0.01$. CON: control, STR: estrés.

Peso vaginal relativo

Los pesos vaginales durante el proestro fueron menores en el grupo de estrés crónico, en comparación con el grupo control. Los pesos vaginales relativos en la etapa de diestro no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 19).

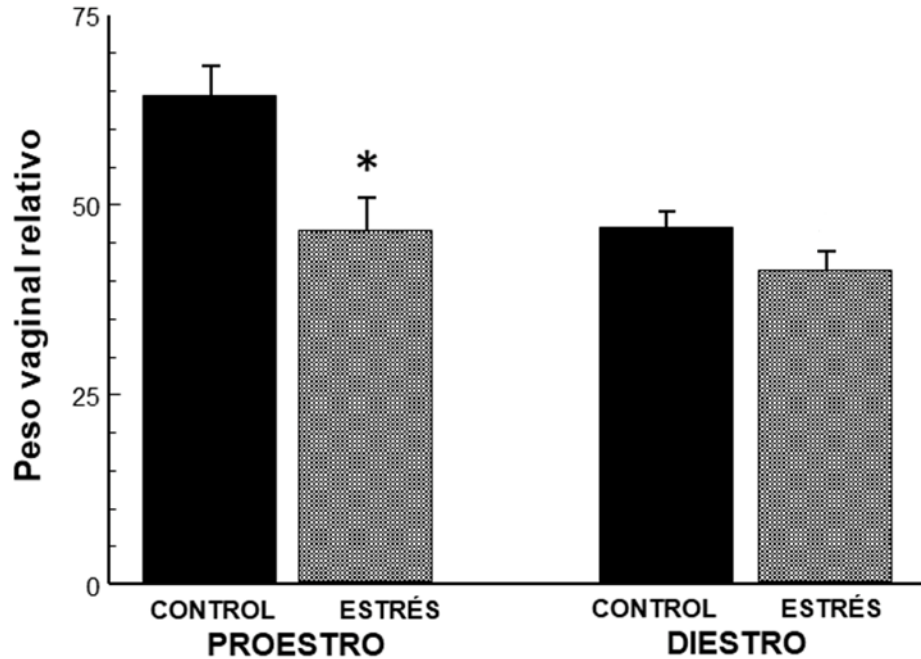


Figura 19. Pesos vaginales relativos de las hembras control y estresadas crónicamente. Las hembras de estrés tuvieron menores pesos durante el proestro. Datos mostrados como Media \pm E.E.M. * diferencia significativa con respecto al grupo control, $p = 0.01$. CON: control, STR: estrés.

Concentración sérica de hormonas

Corticosterona

Las concentraciones séricas de corticosterona en las hembras estresadas crónicamente fueron significativamente mayores que en las hembras control. Los niveles de corticosterona en el grupo de estrés fueron casi tres veces mayores que los observados en el grupo control ($p = 0.01$) (Figura 20).

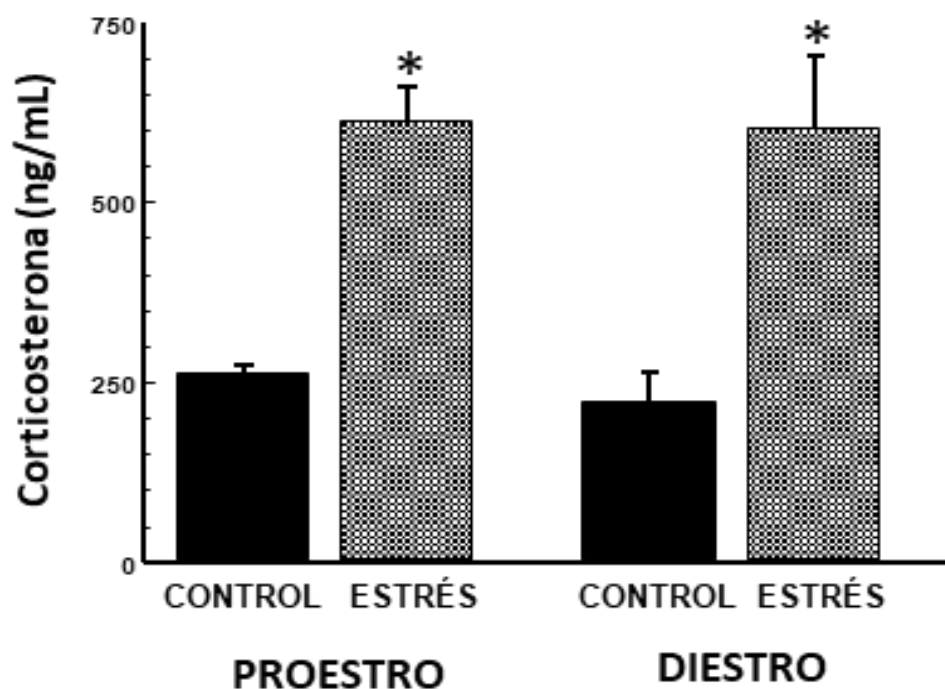


Figura 20. Niveles de corticosterona en hembras control y estresadas crónicamente. En las hembras expuestas a estrés las concentraciones de corticosterona fueron elevados a niveles mayores al doble del grupo control. Los datos se muestran como Media \pm E.E.M. * diferencia significativa con respecto al grupo control, $p=0.01$.

Hormona luteinizante

Con respecto a la gonadotropina LH, los resultados muestran que esta hormona fue significativamente menor en el suero de las hembras expuestas a estrés crónico (10.3 ng/mL), en comparación con las hembras control no estresadas (18.3 ng/mL). Estas bajas concentraciones se observaron solamente en la etapa de proestro, no en el diestro (Figura 21).

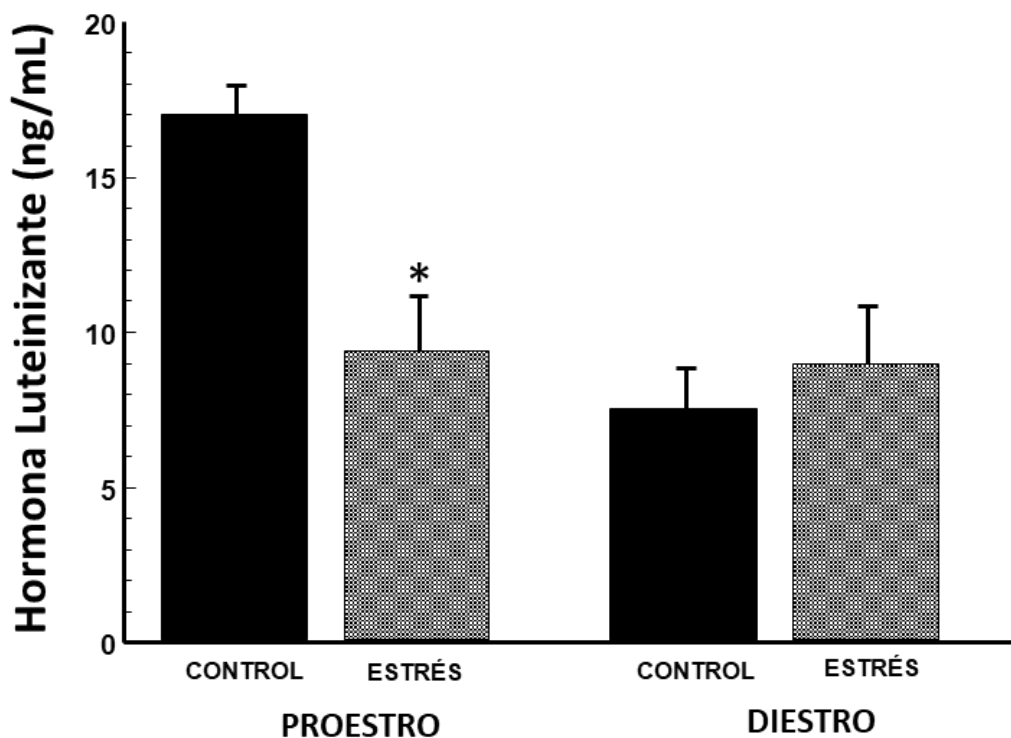


Figura 21. Concentraciones séricas de LH en ratas adultas en etapas de proestro y diestro. En las hembras del grupo de estrés, los niveles fueron menores que en las hembras de grupo control. Los datos se muestran como Media \pm E.E.M. * diferencia significativa con respecto al grupo control, $p = 0.01$.

Estradiol

Las concentraciones séricas de E₂ en las hembras estresadas de manera crónica fueron significativamente menores a los niveles observados en las hembras del grupo control. Se observa que los niveles se reducen a la mitad del control, tanto en la etapa de proestro como en la de diestro. En promedio en el grupo control muestra 84.04 pg/mL comparado con el grupo de estrés fue de 45.56 pg/mL durante el proestro. En la etapa de diestro el grupo control presentó 40.56 pg/mL, y el grupo estrés 22.9 pg/mL (Figura 22).

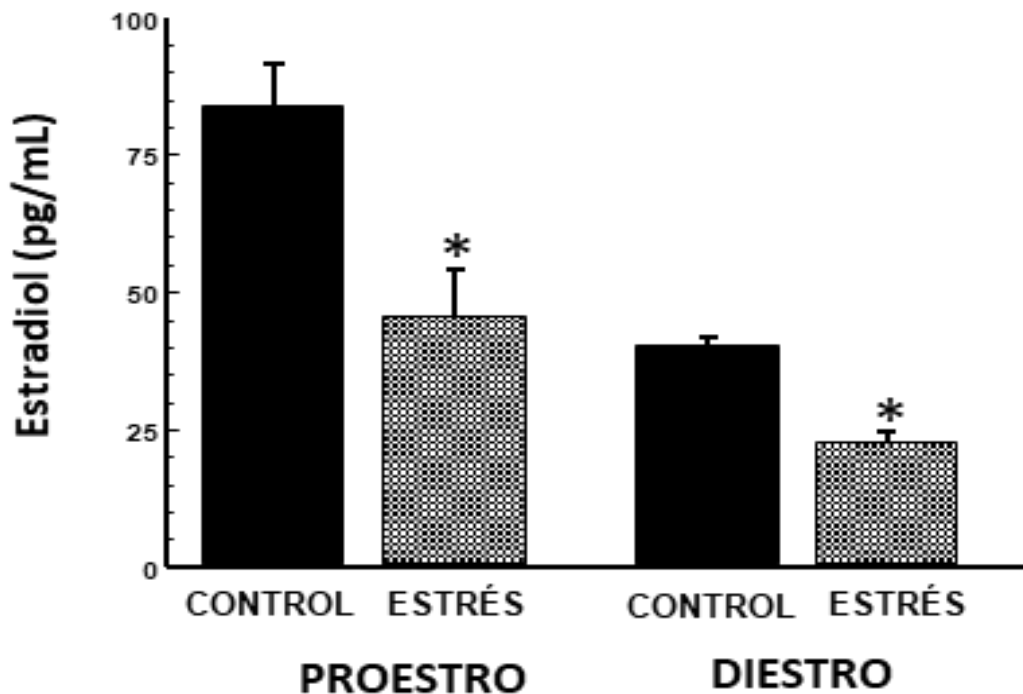


Figura 22. Concentraciones séricas de E₂ en ratas hembra adultas en las etapas de proestro y diestro. En ambas etapas del ciclo, las concentraciones de E₂ en las hembras del grupo de estrés fueron menores que en las hembras control. Los datos se muestran como Media \pm E.E.M, diferencia significativa con respecto al grupo control, $p = 0.01$.

Progesterona

Las concentraciones de P₄ en el suero de las hembras estresadas crónicamente fueron significativamente menores, aproximadamente la mitad, a las observadas en las hembras control, tanto en la etapa de proestro como en la de diestro (Figura 23).

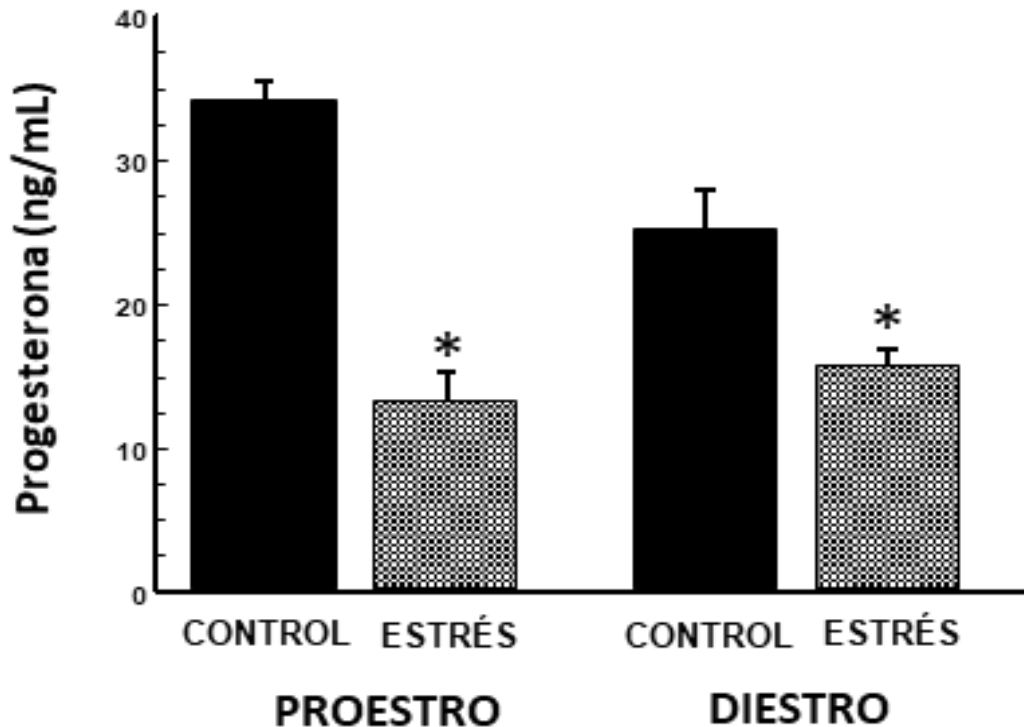


Figura 23. Efectos del estrés crónico sobre la concentración de P₄ en el plasma de las hembras adultas en etapas de proestro y diestro, se observaron diferencias significativas para ambos grupos en las dos etapas. Los datos se muestran como Media ± E.E.M. * diferencia significativa con respecto al grupo control, p = 0.01.

Viabilidad de las células del cúmulo

La viabilidad de las células granulosas del cúmulo disminuyó en las ratas sometidas a estrés crónico, ésta fue significativamente menor a lo observado en el grupo control. El estrés crónico provocó un mayor número de CC muertas. Este efecto se presentó tanto en el proestro como en el diestro (Figura 24).



Figura 24. Viabilidad de las CC en los COCs. El número de CC muertas fue mayor en los COCs de las hembras estresadas. n= 60 COCs evaluados en total. Los datos son mostrados como Media \pm D.E, diferencia significativa con respecto al grupo control, p = 0.05.

Viabilidad de ovocitos

La viabilidad de los ovocitos fue evaluada también en los COCs. El porcentaje de ovocitos vivos obtenidos de las ratas estresadas crónicamente fue significativamente menor a lo observado en las ratas control, en proestro el porcentaje de las ratas control fue de 92.85% y para el grupo estrés 79.16%. Durante la etapa de diestro para el grupo control fue de 94.44%, mientras que el grupo estrés fue de 75% (Figura 25). Los ovocitos teñidos se consideraron vivos.

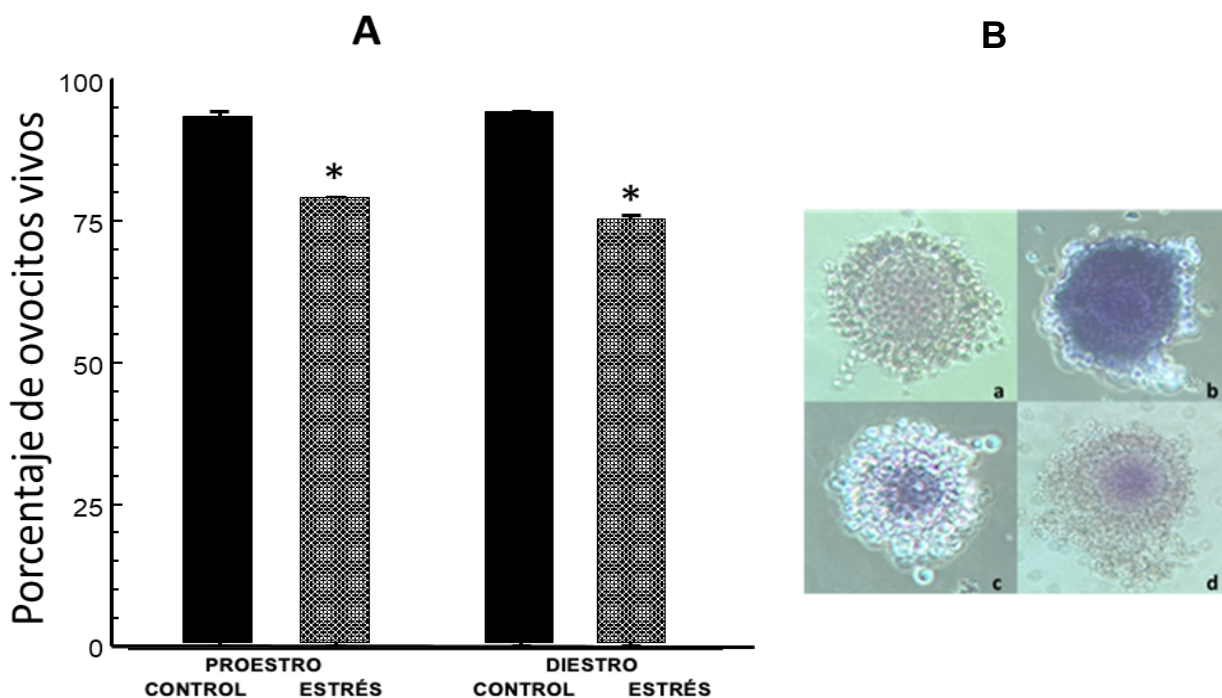
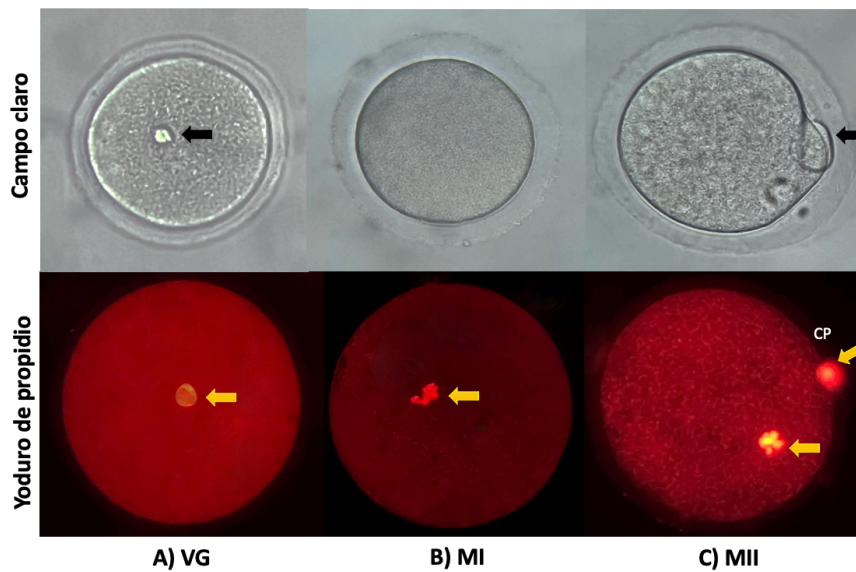


Figura 25. A) Porcentaje de viabilidad de los ovocitos en las etapas de proestro y diestro en ratas control y estrés. La viabilidad de los ovocitos fue menor en las hembras estresadas. B) (a) Ovocito y CC muertos; (b) ovocito y CC vivos; (c y d) ovocitos vivos, CC muertas. Los datos se muestran como Media \pm E.E.M. * diferencia significativa con respecto al grupo control, $p=0.0001$.

Maduración de ovocitos In Vivo

Los ovocitos desnudados de los COCs, fueron evaluados en cuanto a su grado de maduración *in vivo*, estas evaluaciones se realizaron para conocer el porcentaje de ovocitos maduros, ya que estos son necesarios para el inicio del proceso reproductivo. Los ovocitos en VG y metafase I (MI), fueron considerados inmaduros, los que se observaron en MII con la presencia del primer cuerpo polar se consideraron maduros. Los ovocitos se observaron en campo claro, con microscopio invertido, y con microscopio de fluorescencia, después de teñirlos con IP. En la etapa de proestro, el porcentaje de ovocitos del grupo control que alcanzaron la MII fue de 36.36%; en el caso de los ovocitos obtenidos de las ratas estresadas el porcentaje de maduración fue 0%, en la misma etapa. Con respecto a los ovocitos en VG en ratas control, durante el proestro se obtuvo un 43.58%, mientras que, en las ratas estresadas, el porcentaje fue significativamente mayor (80.58%). En la etapa de diestro no se observaron diferencias en la etapa de maduración de los ovocitos entre los grupos (Figura 26).



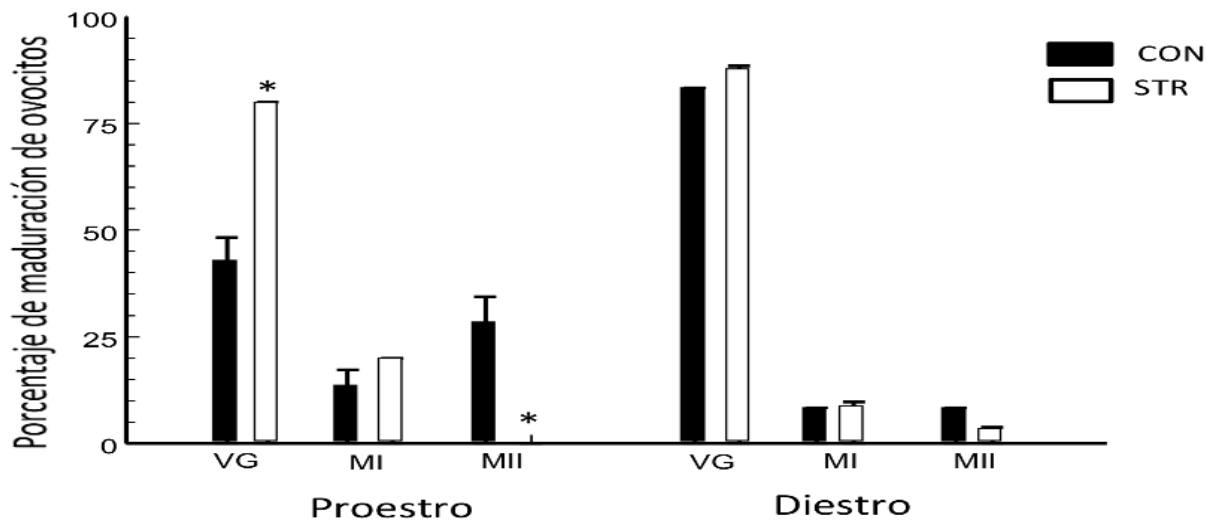


Figura 26. Maduración in vivo de ovocitos en el proestro y el diestro del ciclo estral en los grupos control y estrés. El porcentaje de ovocitos en VG fue mayor en el grupo de estrés en proestro, en comparación con el control. El porcentaje de ovocitos en MI fue similar en ambos grupos. El porcentaje de ovocitos maduros en MII fue significativamente menor en el grupo de estrés, durante el proestro. En el diestro no se observaron diferencias en la etapa de maduración entre los grupos. Los datos se muestran como Media \pm E.E.M. * $p = 0.05$, con respecto al control. (A) las flechas indican al nucléolo la etapa VG, B) las flechas indican etapa MI, C) las flechas indican el primer cuerpo polar y la MII.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con la hipótesis planteada acerca de que el estrés crónico es un factor que altera diversos parámetros de la reproducción femenina. La activación continua del eje HHA generó una concentración constantemente elevada de corticosterona sérica en las hembras estresadas, alterando algunos procesos metabólicos relacionados con la ingesta de alimentos y, en consecuencia, generar una menor ganancia de peso corporal, lo que repercutió en los pesos relativos de los órganos reproductivos femeninos. Además, el estrés crónico alteró los eventos reproductivos clave como son la concentración sérica de hormonas esteroides, la maduración *in vivo* de ovocitos y la viabilidad de las CC.

Un aspecto metabólico determinante para el éxito reproductivo es la alimentación, la cual es regulada por mecanismos neuroendocrinos que pueden verse influenciados negativamente por acontecimientos estresantes. Si bien la ingesta de alimentos durante el estrés puede variar entre los individuos, aumentando en algunos y disminuyendo en otros por efecto del estrés (Spencer, 2013), esto se debe a los neuropéptidos que se liberan en el centro que regula la ingesta de alimentos. La regulación del equilibrio energético está controlada por los núcleos hipotalámicos que incluyen el ARC en el hipotálamo medio basal, el cual recibe señales endócrinas periféricas circulantes, que regulan el metabolismo y el estrés. Las neuronas del ARC que secretan el neuropéptido Y (NPY) son potentes estimuladores de la ingesta de alimentos y la adiposidad, pero también son reguladores importantes del eje HHA (Andrews y Abizaid, 2014). Las hormonas metabólicas como el glucagón, la grelina y el péptido similar al glucagón-I (GLP-I), así como factores centrales, como el NPY y el péptido relacionado con Agouti (AgRP) estimulan la ingesta de alimento en los animales, mientras que la leptina, la insulina circulante, así como la proopiomelanocortina (POMC), el transcrito relacionado con amfetamina y cocaína (CART) y la CRH inhiben la ingesta de alimento (Keen-Rhinehart *et al.*, 2013). En este estudio se observó que las hembras del grupo de estrés ganaron menor peso corporal que los animales control, lo que confirma lo reportado anteriormente por nuestro grupo de investigación (Retana-Márquez *et al.*, 2003). Esto puede deberse a que, en el hipotálamo, la ingesta de alimentos está regulada por vías neuroanatómicas en el hipotálamo, en las que el NPY y el POMC tienen un papel clave. El NPY hipotalámico en el ARC se ve alterado por factores estresantes. La menor ingesta de alimentos inducida por estrés se asocia a una menor expresión de NPY, por lo que un animal expuesto a estrés crónico disminuye su ingesta de alimentos (Reichmann y Holzer, 2016). El menor aumento de peso corporal en las ratas expuestas a estrés crónico podría explicarse por la liberación mayor o prolongada de CRH durante el estrés (Heinrichs *et al.*, 2001), ya que se ha demostrado que esta hormona, además de activar al eje HHA, reduce la ingesta de alimentos mediante la inhibición de algunos neuropéptidos hipotalámicos, como la GHRH y la somatostatina, o mediante la interacción con circuitos sensibles a la leptina (Cone, 2000). Otro neuropéptido que podría estar involucrado en la baja ingesta de alimentos es la POMC del ARC, el cual también tiene efecto anorexigénico, al disminuir la ingesta de alimento, así como la actividad de las neuronas dopaminérgicas que se encuentran en el área ventral tegmental (VTA), uniéndose a su receptor opioide m (MOR).

Durante el estrés crónico, las neuronas POMC, que proyectan hacia el VTA, donde se localizan neuronas dopaminérgicas, causa la disminución de dopamina en esa estructura cerebral, induciendo anhedonia y comportamientos depresivos en ratas, que refuerzan la baja ingesta de alimento (Qu *et al.*, 2020).

Con respecto al aspecto reproductivo, el eje neuroendocrino que controla la reproducción femenina requiere de la coordinación adecuada de varias hormonas para su correcto funcionamiento, las alteraciones en este eje tienen implicaciones en órganos blanco como el útero y la vagina. En relación con el control endocrino de la reproducción femenina, en este trabajo se observaron menores concentraciones séricas de LH, E₂ y P₄, lo cual repercutió en la progresión del ciclo estral, ya que éste se encuentra bajo el control de las hormonas ováricas E₂ y P₄. La producción de estas hormonas depende de la secreción de las gonadotropinas hipofisarias, por lo que cualquier alteración en este eje de regulación neuroendocrina puede afectar la función ovárica, que repercute en la progresión del ciclo estral. Durante la respuesta de estrés, el eje HHA se activa de manera importante, generando la liberación de grandes cantidades de glucocorticoides, los cuales pueden alterar la síntesis de las hormonas del eje HHO a todos los niveles de regulación. Los altos niveles de corticosterona observados en las hembras estresadas podrían inhibir la liberación de gonadotropinas, ya que se ha reportado que los glucocorticoides son capaces de inhibir la liberación de Kiss1 mediante la reducción de la expresión del ARNm para Kiss1 en el AVPV (Luo *et al.*, 2016), esto causa que el contenido de Kiss1 en este núcleo disminuya, como se ha observado en estudios previos del grupo de investigación (Retana Márquez *et al.*, 2020). Esto repercute en un menor contenido de GnRH (Retana-Márquez *et al.*, 2020) y, por ende, su liberación, lo que causa menor liberación de gonadotropinas y, consecuentemente, menor estimulación de la esteroidogénesis ovárica y bajas concentraciones de E₂ en el ovario (Michael *et al.*, 1993; Whirledge y Cidlowski, 2010). La disminución de Kiss1 resulta en un estro persistente y en la abolición del pico preovulatorio de LH (Wiegand *et al.*, 1980), como se observó en el proestro en este trabajo, lo que ocasiona alteración en la ovulación, la fertilidad y el tamaño de la camada (Popa *et al.*, 2013; Retana-Márquez *et al.*, 2020).

Durante la respuesta de estrés, la CRH liberada del PVN puede también inhibir la secreción hipotalámica de GnRH, mientras que los glucocorticoides, además de disminuir la secreción hipofisaria de LH y la síntesis de E₂ y P₄ en el ovario, también inducen resistencia de los tejidos

blanco del E₂, como es el epitelio vaginal (Kalantaridou *et al.*, 2004). Los resultados de este trabajo concuerdan con lo anterior, ya que los ciclos estrales de las hembras estresadas crónicamente presentaron alteraciones, como alargamiento en las etapas de proestro y estro en menor medida, así como menor número de días en diestro. Estas alteraciones se explican por las bajas concentraciones séricas de E₂ durante el proestro, lo que provoca una menor retroalimentación positiva en el núcleo AVPV, dando como resultado la disminución de los niveles de Kiss1 y de GnRH, teniendo como consecuencia, una menor liberación de LH (Retana-Márquez *et al.*, 2020; Ozawa, 2022). Los resultados en las concentraciones de LH, E₂ y P₄ obtenidos el trabajo presente, coinciden con lo reportado previamente por el grupo de investigación. La baja concentración de LH en suero durante el proestro pudo causar menor tasa de ovulación, con la consecuente formación de menos cuerpos lúteos en los ovarios. Sin embargo, estos parámetros no fueron analizados en el presente trabajo, por lo que esto puede ser motivo de futuros estudios. A pesar de las bajas concentraciones de E₂ observadas durante el proestro, éstas pudieron favorecer la proliferación del epitelio vaginal, mostrada por la presencia de células nucleadas en los frotis vaginales; sin embargo, dichas concentraciones no son suficientes para estimular el pico preovulatorio de LH, mostrado por las bajas concentraciones de esta gonadotropina. En consecuencia, el ciclo estral no progresa normalmente, debido a la ausencia de ovulación, causando aumento en el número de días en proestro y en menor medida en estro. En apoyo a lo anterior, se ha reportado que cuando se aplica algún estresor en la mañana del proestro, se interrumpe el aumento de LH por E₂ y es capaz de alargar el ciclo en ratones hembra, esto se atribuye a que el eje HHA altera al HHO mediante la liberación de la hormona inhibidora de gonadotropinas (GnIH), conocido también como neuropéptido RF relacionado con amida (RFRP-3) en los mamíferos, cuyos somas neuronales se localizan en el núcleo dorsomedial (DMN) del hipotálamo y que proyectan hacia los núcleos POA, AVPV y ARC y a la eminencia media. Dicho neuropéptido inhibe la secreción de Kiss1 (Whirledge y Cidlowski, 2010) y de GnRH (Han *et al.*, 2017; Ducret *et al.*, 2009; Wagenmaker y Moenter, 2017) en el hipotálamo, así como la liberación de LH en la hipófisis (Murakami *et al.*, 2008). Estos efectos son mediados a través de sus receptores GPR147 en esas células (Hu *et al.*, 2019), afectando en última instancia la función ovárica y por tanto la ciclicidad. La expresión de RFRP-3 se incrementa por efecto de la corticosterona a través de los receptores para glucocorticoides en las neuronas del núcleo dorsomedial DMN (Kirby *et al.*,

2009), por lo que es probable que los elevados niveles de corticosterona observados estimulen la expresión de RFRP-3, el cual disminuye la liberación de Kiss1 en el AVPV, de GnRH en el POA y la liberación de LH desde la adenohipófisis (Hu *et al.*, 2019), alterando así la función del eje HHO.

Con respecto a la baja maduración de los ovocitos, ésta puede explicarse por las bajas concentraciones de LH observadas durante el proestro, ya que esta gonadotropina es la responsable de estimular la reanudación de la meiosis en los ovocitos (Minkowicz, 2018). El mayor porcentaje de ovocitos inmaduros en las hembras estresadas en comparación con las hembras control, durante el proestro, observado en este trabajo, podría explicarse por las alteraciones neuroendocrinas causadas por el estrés en el eje HHO, mediante la disminución de Kiss1 en el AVPV y de GnRH en el POA del hipotálamo, además de menor concentración sérica de LH, E₂ y P₄ (Retana-Márquez *et al.*, 2020). El pico preovulatorio de LH en respuesta a la GnRH durante el proestro es responsable de la reanudación meiótica hasta detenerse nuevamente en MII y culmina en el momento de la fecundación del ovocito (Pan y Li, 2019). Las CC que rodean al ovocito responden directamente al incremento de LH (Khamisi *et al.*, 2001) durante la ovogénesis y el desarrollo folicular, ya que presentan receptores para esta gonadotropina y, a través de las uniones comunicantes que establecen las células de la granulosa con el ovocito, se produce una disminución de los niveles de AMPc y GMPc, favoreciendo así la reanudación de la meiosis (Pei *et al.*, 2023). Dado que el estrés provoca la disminución de GnRH y LH (Retana-Márquez *et al.*, 2020), esto impide la reanudación meiótica, lo que explica el elevado porcentaje de ovocitos en VG, así como la ausencia de ovocitos en MII, lo que demuestra que el estrés altera el proceso de maduración de los ovocitos a través de disminuir el estímulo gonadotrópico hacia los ovarios. Durante el desarrollo folicular, las CC protegen al ovocito contra el daño causado por las ERO; sin embargo, el estrés crónico es capaz de generar estrés oxidante en las células foliculares (Yang *et al.*, 2017), lo que causa la activación de la caspasa 3, misma que induce la fragmentación del ADN en las CC, como se ha reportado anteriormente por el grupo de investigación en ratas hembras sometidas a estrés crónico (Casillas *et al.*, 2023). La muerte de las CC puede causar alteraciones importantes en el ovocito, debido a que la presencia de estas células es necesaria para que el ovocito alcance la maduración citoplásmica y nuclear (Turathum *et al.*, 2021). Dichos efectos inhibitorios pueden deberse al incremento en las concentraciones de corticosterona, que inhiben la liberación de

GnRH desde el hipotálamo, la secreción de LH desde la adenohipófisis, así como la síntesis de E_2 en los folículos ováricos. Todo ello confluye en la disminución de la viabilidad y la maduración de los ovocitos (Bhaumik *et al.*, 2023). La baja tasa de maduración de los ovocitos podría deberse también a procesos de muerte celular de las CC causados por la corticosterona, ya que se ha reportado que la administración de cortisol en ratonas induce apoptosis en las células de la granulosa murales y las CC, además de la síntesis del ligando Fas (FasL) en esas células, lo que activa la vía extrínseca de la apoptosis, tanto en los ovocitos como en las células de la granulosa, esto asociado con bajos niveles de LH y E_2 . Asimismo, el cortisol administrado a las ratonas también deteriora el potencial de desarrollo de los ovocitos a través de la alteración del potencial de membrana mitocondrial, llevando a la generación de estrés oxidante (Yuan *et al.*, 2016). Asimismo, activa al sistema TNF- α en las células de la granulosa murales y CC, causando apoptosis, alterando así la competencia de los ovocitos (Yuan *et al.*, 2020). La CRH también puede tener un papel, ya que altera el crecimiento folicular en ratonas, produciendo la sobre activación de folículos primarios, a través de la vía PI3K e inhibiendo al homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), el cual regula la proliferación celular, lo que lleva a una activación de folículos primordiales en los ovarios, afecta la ovulación y retrasa el desarrollo folicular, disminuyendo así el número de folículos maduros (Xu *et al.*, 2018).

Aunado a las bajas tasas de maduración y viabilidad observadas en los ovocitos de las ratas estresadas crónicamente, se observó también un mayor porcentaje de ovocitos anormales en la etapa de proestro (11.76%), en comparación con el grupo control, en el que no se observaron anomalías en esas células, estos datos coinciden con lo reportado anteriormente (Casillas *et al.*, 2021). Al no progresar el ciclo estral hacia la etapa de diestro y permanecer varios días consecutivos en proestro o estro, es posible que la falta de estimulación por LH haya generado un ambiente folicular adverso, impidiendo su estabilidad y generando anomalías en los ovocitos. Las anomalías observadas fueron alteraciones en la zona pelúcida, citoplasma granular y con vacuolizaciones, ausencia de la forma esférica característica de estas células. Es probable que estas alteraciones morfológicas sean debidas a que el estrés genera incremento en las ERO, las cuales pueden causar alteraciones en el huso meiótico, desalineación de la cromatina y disfunción mitocondrial. El incremento en las ERO generado por el estrés crónico puede a su vez inducir apoptosis en los folículos antrales (Guo *et al.*, 2020). Por tanto, el incremento de las ERO puede afectar a la competencia de los ovocitos en

diferentes niveles, alterando la maduración nuclear e inhibiendo la extrusión del cuerpo polar en ovocitos maduros (Chaube *et al.*, 2005). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que puede generar ERO, induce errores en la formación del huso meiótico y alterando la función mitocondrial disminuyendo el ATP (Zhang *et al.*, 2006). Asimismo, las ERO inducen eventos apoptóticos en los ovocitos, como es la formación de cuerpos apoptóticos y la fragmentación del ADN.

Los glucocorticoides causan un incremento en la producción de ERO y disminuyen la actividad de las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPX) y la glutatión reductasa (GR) (Zafir y Banu, 2009). El aumento de H_2O_2 intracelular, puede extraer electrones de las macromoléculas en una célula, lo que produce un daño extenso a la membrana celular o puede servir como sustrato para la generación de radicales hidroxilos altamente reactivos. Los radicales intracelulares inducen la fragmentación del ADN, la ruptura de la membrana plasmática y, en última instancia, causan la muerte celular (Chaube *et al.*, 2005). Las ERO pueden dañar la membrana celular, atacando a los lípidos y a las proteínas membranales y, en el núcleo, dañar a los ácidos nucleicos. Todo ello puede inducir la producción de ovocitos anormales con un bajo potencial de desarrollo (Khazaei y Aghaz, 2017). De manera similar, el estrés por frío durante 24 h causa incremento de la CRH en el suero, en los ovarios y en los ovocitos, induciendo apoptosis en las células del cúmulo y disminuyendo la capacidad del ovocito para generar embriones tras su fertilización (Wang *et al.*, 2020). En su conjunto, los resultados reportados en este trabajo aportan información sobre los efectos que el estrés crónico causa en las CC y sus consecuencias en la maduración y viabilidad de los ovocitos, disminuyendo su capacidad de ser fertilizados y la posibilidad de generar embriones viables.

La muerte de las CC por efecto del estrés crónico observada durante el proestro el diestro puede deberse también al aumento de ERO, como se ha observado en ratonas sometidas a estrés psicológico, en las que se reportó fragmentación del ADN y muerte por necroptosis o apoptosis tanto en las células de la granulosa como en los ovocitos (Zhai *et al.*, 2020) La necroptosis es un tipo de muerte celular regulado, distinto de la apoptosis, que se caracteriza por aumento del volumen celular, inflamación de los organelos, rotura de la membrana plasmática (Stringer *et al.*, 2023). El estrés incrementa la liberación de cortisol y la producción extracelular de ERO por los macrófagos que se encuentran en el fluido folicular, causando estrés oxidante y aumento de

citocinas en las células de la granulosa. El estrés oxidante genera aumento del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el cual se une a su receptor en la membrana de las células de la granulosa e induce cambios conformacionales que resultan en la unión de la proteína asociada con el dominio de muerte a TNFR1 (TRADD). TRADD recluta a otras dos proteínas, la cinasa que interactúa con serina/treonina en el receptor (RIPK1) y con el factor asociado a TNFR 2 (TRAF2), que forman el complejo 1, la cilindromatosis (CYLD) desubiquitina a RIPK1 y ayuda a la disociación del complejo 1 de la membrana. El complejo 1 se mueve al citoplasma y se asocia con la proteína Fas con dominio de muerte (FADD) y la caspasa 8 formando el complejo II. La caspasa-8 escinde RIPK1 y RIPK3, lo que genera señales apoptóticas, por otra parte, la heterodimerización de la proteína C-Flip produce la inhibición de la caspasa 8, lo que permite la formación de un necrosoma y la asociación con RIPK1 con RIPK3, que induce la autofosforilación de RIPK1 y RIPK3. Esos dos forman un complejo que fosforila a la proteína parecida a la mezcla de dominio de linaje cinasa (MLKL), la cual desencadena la rotura de la membrana celular y la necroptosis. La muerte de las células de la granulosa priva al ovocito de los factores de sobrevivencia, nutrientes y nucleótidos cíclicos que llevan a la generación de ERO y estrés oxidante. A su vez, el estrés oxidante, junto con el aumento de calcio intracelular dispara la necroptosis de los ovocitos, de manera similar a lo que ocurre en la necroptosis de las células de la granulosa en ratonas y humanos (Chaudhary *et al.*, 2019). El estrés también puede inducir apoptosis, que es la muerte programada y controlada de una célula, implica la degradación y fragmentación de proteínas y ADN, la absorción de la célula colapsada por fagocitos de forma no inflamatoria (Stringer *et al.*, 2023). La acumulación de ERO y estrés oxidante, tanto en los ovocitos como en las células de la granulosa, da como resultado la disminución de la síntesis de E₂, menor tasa ovulatoria y menor calidad de los ovocitos (Tripathi *et al.*, 2013). La apoptosis en las células de la granulosa debida al estrés oxidante reduce la comunicación granulosa-ovocito, alterando el aporte de nutrientes y los factores que favorecen la maduración, lo que disminuye la calidad de los ovocitos preovulatorios. Además, el estrés oxidante induce acortamiento de las secuencias de ADN localizadas en los extremos de los cromosomas conocidas como telómeros, segregación cromosómica y fragmentación del ovocito (Prasad *et al.*, 2016). Los niveles altos de ERO también pueden activar la vía extrínseca de la apoptosis, activando a los receptores de muerte transmembrana como al receptor de FAS, al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAIL- R), localizados en la membrana lo que libera al

factor apoptogénico citocromo C desde el espacio intermembrana de la mitocondria hacia el citosol, se forma el apoptosoma con citocromo C/Apaf-1/Caspasa 9, aumentan las proteínas proapoptóticas p53 y BAX, al mismo tiempo que disminuye la proteína antiapoptótica Bcl2 (Saadeldin *et al.*, 2018) y activa las caspasas efectoras 7 y 3, las cuales activan a la ADNasa, que induce la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN, rompiendo el ADN en los sitios enlazadores entre los nucleosomas, con la consecuente generación de fragmentos de 180pb de ADN y múltiplos de los mismos (Eskandari y Eaves, 2022; Larsen y Sørnsen, 2017), induciendo así la apoptosis (Abdelnour *et al.*, 2019).

Con respecto a los pesos relativos de los órganos reproductivos, en este estudio se observó menor peso ovárico relativo durante el proestro en las hembras, posiblemente causado por bajos niveles de FSH, ya que esta hormona favorece la maduración cíclica de los folículos ováricos secundarios. Los niveles bajos de LH observados podrían ser la causa de que no ocurra la ovulación y esto cause menor número de CL, dando como resultado baja concentración de P₄ durante el diestro (Bhaumik *et al.*, 2023). Adicionalmente, las células foliculares de la teca, de la granulosa murales y las CC, así como las del CL presentan receptores para CRH, la cual es capaz de inducir apoptosis en esas células (Liang *et al.*, 2013), contribuyendo así a una baja esteroidogénesis. La corticosterona también tendría un papel en esto, ya que se ha demostrado que la administración intraperitoneal (i.p.) de corticosterona en ratonas causa menor expresión de los genes que codifican para las enzimas esteroidogénicas como son la 3 β -HSD, la citocromo 450, enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol, la 17 α -hidroxilasa/17-20 liasa, la aromatasa y la proteína StAR, la cual transporta el colesterol hacia la membrana interna mitocondrial para su conversión en pregnenolona (Wei *et al.*, 2019). Estos efectos pueden ser de largo plazo y afectar también la función de los cuerpos lúteos, disminuyendo así la síntesis de P₄.

Tanto el útero como la vagina son órganos blanco de las hormonas ováricas. El E₂ estimula la proliferación del endometrio uterino, incrementando la mitosis en el epitelio y en tejido estromal, así como la formación de las glándulas uterinas, y del epitelio vaginal, aumentando la proliferación de las células epiteliales y su posterior cornificación. Además, tiene un efecto angiogénico, favoreciendo la formación de vasos sanguíneos en el útero. Por su parte, la P₄

favorece la secreción de las glándulas uterinas para generar un ambiente nutritivo del que pueda nutrirse un embrión antes de implantarse en el útero. En condiciones de estrés y, como muestran los resultados, los niveles de LH, E₂ y P₄ disminuyen por efecto de la activación del eje HHA. Las hembras son más sensibles al estrés que los machos, dado que el incremento de glucocorticoides es mayor (González *et al.*, 2010). Además, se han identificado receptores para CRH en la mayoría de los tejidos reproductivos femeninos, incluidos los ovarios, el útero y la placenta (Kalantaridou *et al.*, 2004). En el ovario, la CRH y sus receptores se localizan en las células de la teca foliculares y lúteas, donde inhiben la esteroidogénesis (Caruso *et al.*, 2022), lo que sugiere que, la CRH podría potenciar el efecto de los glucocorticoides en el ovario.

La disminución en el peso de los órganos reproductivos de las hembras estresadas crónicamente se debe a las bajas concentraciones de E₂ y P₄ debidas al incremento de los glucocorticoides, los cuales también disminuyen la cantidad de receptores para dichas hormonas (Rabin *et al.*, 1990), generando resistencia a las hormonas sexuales femeninas.

Los bajos pesos uterinos observados durante el proestro en las hembras estresadas, se puede explicar por un menor desarrollo del epitelio y el estroma del endometrio, así como de las glándulas uterinas, debido a los bajos niveles de E₂. Como se mencionó, el desarrollo del epitelio uterino depende de la unión de E₂ a su receptor para estrógenos alfa (ER α). Este receptor podría verse disminuido por efecto de los glucocorticoides sobre la transcripción, procesamiento y la traducción del ARNm o bien por modificaciones postraduccionales (Rabin *et al.*, 1990). Esto sería una perspectiva de este trabajo.

El peso vaginal relativo también disminuyó en las hembras del grupo de estrés en proestro, estos efectos también pueden atribuirse a los bajos niveles de E₂. Los receptores para estrógenos, principalmente ER α y, en menor grado ER β , están presentes en el epitelio vaginal y cambian durante el ciclo estral, con máxima expresión durante el proestro (Winuthayanon *et al.*, 2010). A pesar de los bajos niveles de E₂ encontrados en hembras estresadas, éstos indujeron la proliferación epitelial y cornificación, observadas como etapas prolongadas de proestro y estro. Sin embargo, la progresión alterada del ciclo estral indica que no se presenta la ovulación, por causa del estrés. El peso vaginal relativo en la etapa de diestro no mostró diferencias significativas entre el grupo control y el grupo estrés, esto puede ser debido a que

de forma regular el epitelio vaginal pasa por un proceso de delaminación donde se pierden las capas de células del epitelio vaginal formadas durante el proestro (Bertolin y Murphy, 2014).

CONCLUSIONES

En esta tesis, los resultados obtenidos muestran que el estrés crónico altera los eventos neuroendocrinos que regulan la función ovárica, disminuyendo la esteroidogénesis y la ovogénesis, principalmente durante el proestro, que es una etapa clave en la reproducción de la rata hembra, ya que se presentan los eventos neuroendocrinos cruciales para la estimulación de la ovulación y la fertilidad.

El estrés causa menores concentraciones de LH, lo que disminuye la estimulación de la síntesis de E₂ y P₄ durante el proestro y el diestro del ciclo estral. Las bajas concentraciones de E₂ estimulan la proliferación del epitelio vaginal, pero no favorecen el incremento de LH, lo que causa el alargamiento de la duración de los ciclos estrales.

Las bajas concentraciones de LH durante el proestro, causadas por el estrés repercuten en bajas tasas de maduración de los ovocitos, deteniéndose en la etapa de VG y no progresar a la MII, lo que es un efecto que afecta la fertilidad de la hembra.

La baja viabilidad y maduración de los ovocitos se debe también a la muerte de las CC, a causa de la activación del eje HHA y las elevadas concentraciones de corticosterona, la cual echa a andar procesos que derivan en la muerte celular.

Por lo tanto, se considera que el estrés crónico es un factor importante que altera la reproducción y la fertilidad femenina.

Estos resultados son importantes porque muestran las consecuencias del estrés crónico en la reproducción de las hembras, lo que podría considerarse en otros ámbitos como es la producción animal, ya que el estrés acarrea problemas en la reproducción y por ende en la producción animal.

PERSPECTIVAS

Entre las perspectivas que se derivan de este trabajo, en futuros estudios se podría evaluar el estrés oxidante mediante la evaluación de ERO y enzimas antioxidantes en el ovocito y en las CC, en las diferentes etapas del ciclo estral, bajo condiciones de estrés crónico.

Asimismo, se puede evaluar, en futuros estudios, apoptosis y necroptosis en ovocitos y en la CC, mediante técnicas moleculares.

BIBLIOGRAFÍA

Abu, M.S., Yakubu, O.E., Udeh, S.M.C., Imadojemu, O.G., Ogar R.A. (2020). Effects of Heat Stress on Reproduction and Survival Rate of Wistar Rats. *Journal of Biochemistry and Analytical Studies*. 4(2), 1-4.

Alam, M. H., Miyano, T. (2019). Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro. *Reproductive Medicine and Biology*. 19(1), 13–23.

Abdelnour, S. A., Yang, C. Y., Swelum, A. A., Abd El-Hack, M. E., Khafaga, A. F., Abdo, M., Shang, J. H., Lu, Y. Q. (2019). Molecular, functional, and cellular alterations of oocytes and cumulus cells induced by heat stress and shock in animals. *Environmental Science and Pollution Research International*. 27(31), 38472–38490.

Álvarez, L. (2008). Efectos negativos del estrés sobre la reproducción en animales domésticos. *Archivos de Zootecnia*. 57, 39-59.

Andrews, Z. B., Abizaid, A. (2014). Neuroendocrine mechanisms that connect feeding behavior and stress. *Frontiers in neuroscience*. 8 (312), 1-2.

Aréchiga-Flores, C., Cortés-Vidauri, Z., Hernández-Briano, P., Flores-Flores, G., Rochín-Berumen, F., Ruiz-Fernández, E. (2019). Review: Function and regression of the corpus luteum during the estrous cycle. *Abanico veterinario* 9, e924.

Baumgarten, S., Stocco, C. (2018). Granulosa Cells. *Encyclopedia of Reproduction* 2, 8-13.

Bertolin K., Murphy B.D. (2014). Reproductive Tract Changes During the Mouse Estrous Cycle. Elsevier. 85–94.

Bhaumik, S., Lockett, J., Cuffe, J., Clifton, V.L. (2023). Glucocorticoids and their receptor isoforms: roles in female reproduction, pregnancy, and fetal development. *Biology* 12(8), 1104-1131.

Boron W.F., Boupaep E.L. (2009). Human Physiology Medical Physiology. A Cellular and Molecular Approach. (3), 585-595.

Brañes O., Sáez R., Villalón B., Sáez C. (2004). Uniones en hendidura y su papel funcional en el tracto reproductor femenino. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*. 69(1), 60-66.

Carlton M., Voisey J., Parker T. J., Punyadeera C., Cuttle L. (2021). A review of potential biomarkers for assessing physical and psychological trauma in paediatric burns. *Burns & trauma*, 9, 1-21.

Caruso, A., Gaetano, A., Scaccianoce, S. (2022). Corticotropin-Releasing Hormone: Biology and Therapeutic Opportunities. *Biology* 2022, 11(12), 1785.

Casillas, F., Betancourt, M., Juárez-Rojas, L., Ducolomb, Y., López, A., Ávila-Quintero, A., Zamora, J., Ommati, M. M., & Retana-Márquez, S. (2021). Chronic Stress Detrimentally Affects In Vivo Maturation in Rat Oocytes and Oocyte Viability at All Phases of the Estrous Cycle. *Animals*. 11(9), 2478.

Casillas, F., Flores-González, A., Juárez-Rojas, L., López, A., Betancourt, M., Casas, E., Bahena, I., Bonilla, E., Retana-Márquez, S. (2023). Chronic stress decreases fertility parameters in female rats. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 69(3), 234-244.

Chaudhary, G. R., Yadav, P. K., Yadav, A. K., Tiwari, M., Gupta, A., Sharma, A., Pandey, A. N., Pandey, A. K., & Chaube, S. K. (2019). Necroptosis in stressed ovary. *Journal of Biomedical Science*. 26(1), 11.

Charmandari, E., Tsigos, C., Chrousos, G. (2005). Endocrinology of the stress response. *Annual Review of Physiology*. (67), 259-84.

Chaube S.K., Prasad P.V., Thakur S.C., Shrivastav T.G., 2005. Hydrogen peroxide modulates meiotic cell cycle and induces morphological features characteristic of apoptosis in rat oocytes cultured in vitro. *Apoptosis*. 10, 863–874.

Chrousos, G., Gold, P. (1992). The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *Journal of American Medicine Association*. 267, 1244-1252.

Chrousos G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*. 5, 374-381.

Cone R. D. (2000). The corticotropin-releasing hormone system and feeding behavior a complex web begins to unravel. *Endocrinology*. 141(8), 2713–2714.

Cortés-Vidauri Z, Aréchiga-Flores C, Rincón-Delgado M, Rochín-Berumen F, López-Carlos M, Flores- Flores G. (2018). Revisión: El Ciclo Reproductivo de la Yegua. *Abanico Veterinario*. 8(3), 14-41.

Cunningham, F., Leveno, K.J., Dashe J.S., Hoffman, B.L., Spong, C.Y., Casey, B.M. (2015). Eds. *Williams Obstetricia*, 26e. McGraw-Hill Education.

De Kloet, E.R., Joels, M., Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*. (6); 463–475.

Demiray, S.B., Goker, E.N.T., Tavmergen, E., Yilmaz, O., Calimlioglu, N., Soykam, H.O., Oktem, G., Sezerman, U. (2019). Differential gene expression analysis of human cumulus cells. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. 46, 76–86.

Ducret, E., Anderson, G.M., Herbison, A.E. (2009). RFamide-related peptide-3, a mammalian gonadotropin-inhibitory hormone ortholog, regulates gonadotropin-releasing hormone neuron firing in the mouse. *Endocrinology*. 150:2799–804.

Edson, M., Nagaraja, A., Matzuk, M. (2009). *The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation*. *Endocrine Reviews*. 30, 624-712.

Eppig, J.J., Vivieros, M.M., Marin-Bivens, C., De La Fuente, R. (2004). Regulation of mammalian oocyte maturation (2004). Regulation of mammalian oocyte maturation. In *The Ovary*. (71), 113–129.

Eskandari, E., Eaves, C. J. (2022). Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *The Journal of Cell Biology*. 221(6), 1-94.

Espinoza J. A., Navarrete M. I., Linares R., Chaparro-Ortega A., Ramírez, D. A., Rosas G., Vieyra, Domínguez, R., Morales-Ledesma L. (2023). Effects of chronic exposure to cold stress on ovarian functions in prepubertal rats. *Reproductive Biology*. 23(2), 301-310.

Fortune, J. E., Rivera, G. M., Yang, M. Y. (2004). Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science*. 82-83, 109–126.

Gigli, I., Russo, A., Agüero, A. (2006). Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *InVet*. 8(1), 183-204.

Gómez-Chang, E., Larrea, F., Martínez-Montes, F. (2012). Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 15(1), 24-36.

González R., Ruiz-León Y., Gomendio M., Roldan E. R. (2010). The effect of glucocorticoids on mouse oocyte in vitro maturation and subsequent fertilization and embryo development. *Toxicology in Vitro*. 24(1), 108–115.

Guo, Y., Sun, J., Bu, S., Li, B., Zhang, Q., Wang, Q., Lai, D. (2020). Melatonin protects against chronic stress-induced oxidative meiotic defects in mice MII oocytes by regulating SIRT1. *Cell Cycle*. 19(13), 1677–1695.

Han, X., He, Y., Zeng, G., Wang, Y., Sun, W., Liu, J., Sun, Y., Yu, J. (2017). Intracerebroventricular injection of RFRP-3 delays puberty onset and stimulates growth hormone secretion in female rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 15(1), 1-10.

Hansen P. J. (2009). Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. (364), 3341–3350.

- Heinrichs, S. C., Li, D. L., Iyengar, S. (2001). Corticotropin-releasing factor (CRF) or CRF binding-protein ligand inhibitor administration suppresses food intake in mice and elevates body temperature in rats. *Brain research*. 900(2), 177–185.
- Hewitt, S., Korach, K., (2003). Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors and in reproductive tissues. *Reproduction (Cambridge, England)*. 125, 143-9.
- Hu, K-L., Changa, H-M., Li, R., Yu, Y., Qiao, J. (2019). Regulation of LH secretion by RFRP- 3 from the hypothalamus to the pituitary. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 52, 12–21.
- Huang, Z., Wells, D. (2010). The human oocyte and cumulus cells relationship: New insights from the cumulus cell transcriptome. *Molecular Human Reproduction*. 16, 715–725.
- Jamnongjit, M., Hammes, S. R. (2006). Ovarian steroids: the good, the bad, and the signals that raise them. *Cell Cycle*. 5(11), 1178–1183.
- Kalantaridou, S. N., Makrigiannakis, A., Zoumakis, E., Chrousos, G. P. (2004). Stress and the female reproductive system. *Journal of reproductive immunology*. (62)1, 61–68.
- Keen-Rhinehart, E., Ondek, K., Schneider, J. E. (2013). Neuroendocrine regulation of appetitive ingestive behavior. *Frontiers in Neuroscience*. (7), 1-11.
- Kidder, G.M., Mhawi, A.A. (2002). Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*. 123, 613–620.
- Kinsey-Jones, J.S., Li, X.F., Knox, A.M.I., Wilkinson, E.S., Zhu, X.L., Chaudhary, A.A., Milligan, S.R., Lightman, S.L., O’Byrne, K.T. (2009), Down-Regulation of Hypothalamic Kisspeptin and its Receptor, Kiss1r, mRNA Expression is Associated with Stress-Induced Suppression of Luteinising Hormone Secretion in the Female Rat. *Journal of Neuroendocrinology*. 21, 20-29.
- Kirby, E. D., Geraghty, A. C., Ubuka, T., Bentley, G. E., Kaufer, D. (2009). Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(27), 11324–11329.
- Khamsi, F., Yavas, Y., Roberge, S., Wong, J. C., Lacanna, I. C., Endman, M. (2001). Intracytoplasmic sperm injection increased fertilization and good-quality embryo formation in patients with non-male factor indications for in vitro fertilization: a prospective randomized study. *Fertility and Sterility*. 75(2), 342–347.
- Khazaei, M. Aghaz, F. (2017). Reactive Oxygen Species Generation and Use of Antioxidants during In Vitro Maturation of Oocytes. *International journal of fertility & sterility*. 11(2), 63–70.

Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., De, Boer S.F., Flügge, G., Korte, S.M., E, F. (2011). Stress Revisited: A Critical Evaluation of the Stress Concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 35 (5) 1291–1301.

Lamb, G. C., Smith, M. F., Perry, G. A., Atkins, J. A., Risley, M. E., Busch, D. C., Patterson, D. J. (2010). Reproductive Endocrinology and Hormonal Control of the Estrous Cycle. *The Bovine Practitioner*. 44(1), 18–26.

Larsen, B. D., Sørensen, C. S. (2017). The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*. 284(8), 1160–1170.

Laryea, G., Muglia, L., Arnet, M., Muglia, L.J. (2015). Dissection of glucocorticoid receptor-mediated inhibition of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis by gene targeting in mice. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 36, 150-164.

Li M, Zhou T, Gao Y, Zhang N, Li J. (2007). Ultrastructure an estrogen Regulation the lymphatic stomata of ovarian bursa in mice. *The anatomical Record*. 290, 1195-1202.

Li, J., Gao, H., Tian, Z., Wu, Y., Wang, Y., Fang, Y., Lin, L., Han, Y., Wu, S., Haq, I., Zeng, S. (2016). Effects of chronic heat stress on granulosa cell apoptosis and follicular atresia in mouse ovary. *Journal of animal science and biotechnology*. 57 (7), 1-10.

Liang B., Wei D., L., Cheng N., Yuan J., Lin, J., Cui X., Tan J.H. (2013). Restraint Stress Impairs Oocyte Developmental Potential in Mice: Role of CRH- Induced Apoptosis of Ovarian Cells. *Biology of Reproduction*. 89 (3), 64.

Liu L., Kong N., Xia G., Zhang M. (2013). Molecular control of oocyte meiotic arrest and resumption. *Reproduction, fertility, and development*. 25(3), 463–471.

Luo, E., Stephens, S. B., Chaing, S., Munaganuru, N., Kauffman, A. S., Breen, K. M. (2016). Corticosterone Blocks Ovarian Cyclicity and the LH Surge via Decreased Kisspeptin Neuron Activation in Female Mice. *Endocrinology*. 157(3), 1187–1199.

Mastorakos, G., Pavlatou, M.G., Mizamtsidi, M. (2006). The hypothalamic-pituitary- adrenal and the hypothalamic- pituitary-gonadal axes interplay. *Pediatric Endocrinology Reviews*. (3)1, 172–181.

McGee E.A., Hsueh A.J.W. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*. 21, 200-214.

Meduri, G., Bachelot, A., Cocca, M. P., Vasseur, C., Rodien, P., Kuttann, F., Touraine, P., Misrahi, M. (2008). Molecular pathology of the FSH receptor: new insights into FSH physiology. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 282(1-2), 130–142.

Michael, A.E., Pester, L.A., Curtis, P., Shaw, R.W., Edwards, C.R., Cooke, B.A. (1993). Direct inhibition of ovarian steroidogenesis by cortisol and the modulatory role of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Clinical Endocrinology*. 38, 641–644.

Mihm, M., Austin, E. J., Good, T. E., Ireland, J. L., Knight, P. G., Roche, J. F., Ireland, J. J. (2000). Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biology of reproduction*. 63(3), 811–819.

Mihalas, B. P., Redgrove, K. A., McLaughlin, E. A., Nixon, B. (2017). Molecular Mechanisms Responsible for Increased Vulnerability of the Ageing Oocyte to Oxidative Damage. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017, 1-22.

Minkowicz, C. (2018). By What Mechanism Does Stress Affect Ovulation? *The Science Journal of the Lander College of Arts and Sciences*. 11(2), 34-39.

Murakami, M., Matsuzaki, T., Iwasa, T., Yasui, T., Irahara, M., Osugi, T., Tsutsui, K. (2008). Hypophysiotropic role of RFamide-related peptide-3 in the inhibition of LH secretion in female rats. *The Journal of Endocrinology*. 199(1), 105–112.

Najafabadi, A. (2015). Elucidation of the Biological Roles of Wnt5a Signaling in Follicle Development. Doctoral Dissertation, The University of Montreal, Montreal, BC, Canada, August 2015.

Ozawa, H. (2022). Kisspeptin neurons as an integration center of reproductive regulation: Observation of reproductive function based on a new concept of reproductive regulatory nervous system. *Reproductive Medicine Biology*. 21(1), 1-9.

Pacák, K., & Palkovits, M. (2001). Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine Reviews*. 22(4), 502–548.

Pan B., Li, J. (2019). The art of oocyte meiotic arrest regulation. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 17(1), 1-12.

Pei Z., Deng K., Xu C., Zhang S. (2023). The molecular regulatory mechanisms of meiotic arrest and resumption in Oocyte development and maturation. *Reproductive biology and endocrinology*. 21(1), 90.

Popa, S.M., Moriyama, R.M., Caligioni, C.S., Yang, J.J., Cho, C.M., Concepcion, T.L., Oakley, A.E., Lee, I.H., Sanz, E., Amieux, P.S., Caraty, A., Palmiter, R.D., Navarro, V.M., Y-M., Seminara, S.B., Clifton, D.K., Steiner, R.A. (2013). Redundancy in Kiss1 expression safeguards reproduction in the mouse. 154(8), 2784–2794.

Prasad, S., Tiwari, M., Pandey, A.N., Shrivastav, T.G., Chaube, S.K. (2016). Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome. *Journal of Biomedical Science*. 23:36, 1-5.

Qu, N., He, Y., Wang, C., Xu, P., Yang, Y., Cai, X., Liu, H., Yu, K., Pei, Z., Hyseni, I., Sun, Z., Fukuda, M., Li, Y., Tian, Q., Xu, Y. (2020). A POMC-originated circuit regulates stress-induced hypophagia, depression, and anhedonia. *Molecular psychiatry*. 25(5), 1006–1021.

Rabin, D. S., Johnson, E. O., Brandon, D. D., Liapi, C., Chrousos, G. P. (1990). Glucocorticoids inhibit estradiol-mediated uterine growth: possible role of the uterine estradiol receptor. *Biology of reproduction*. 42(1), 74–80.

Reichmann, F., Holzer, P. (2016). Neuropeptide Y: A stressful review. *Neuropeptides*. (55), 99–109.

Retana-Márquez, S., Bonilla-Jaime, H., Vázquez-Palacios, G., Domínguez-Salazar, E., Martínez-García, R., Velázquez-Moctezuma, J. (2003). Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 28(2), 207–227.

Retana-Márquez, S., Juárez-Rojas, L., Ávila-Quintero, A., Rojas-Maya, S., Perera, G., Casillas, F., Betancourt, M., Gómez-Quiroz, L. (2020). Neuroendocrine disruption is associated to infertility in chronically stressed female rats. *Reproductive Biology*. 20(4), 474–483.

Richards, J. S., Ascoli, M. (2018). Endocrine, paracrine, and autocrine signaling pathways that regulate ovulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 29(5), 313–325.

Robker, R. L., Hennebold, J. D., Russell, D. L. (2018). Coordination of ovulation and oocyte maturation: a good egg at the right time. *Endocrinology*. 159(9), 3209–3218.

Russell, D.L. Robker, R.L. (2007). Molecular mechanisms of ovulation: coordination through the cumulus complex. *Human Reproduction Update*. 13(3), 289–312.

Russell, D. L., Gilchrist, R. B., Brown, H. M., Thompson, J. G. (2016). Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: old hands and new players. *Theriogenology*. 86(1), 62–68.

Saadeldin, I.M., Swelum A.A., Elsafadi M., Mahmood A., Alfayez, M., Alowaimer, A.N. (2018) Differences between the tolerance of camel oocytes and cumulus cells to acute and chronic hyperthermia. *Journal of Thermal Biology*. 74, 47–54.

Smith, R., S. Ghuman, N. Evans, F. Karsch, H. Dobson. (2003). Stress and the control of LH secretion in the ewe. *Reproduction. Supplement*. 61,267- 282.

Soyal, S. M., Amleh, A., Dean, J. (2000). FIG alpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development*. 127:4645-4654

Spencer S. J. (2013). Perinatal programming of neuroendocrine mechanisms connecting feeding behavior and stress. *Frontiers in Neuroscience*. 7, 109.

Stringer J. M., Alesi L. R., Winship A. L., Hutt, K. J. (2023). Beyond apoptosis: evidence of other regulated cell death pathways in the ovary throughout development and life. *Human reproduction update*. 29(4), 434–456.

Navarro, V. M., Castellano, J. M., García-Galiano, D., Tena-Sempere, M. (2007). Neuroendocrine factors in the initiation of puberty: the emergent role of kisspeptin. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*. 8(1), 11–20.

Tabarowski, Z., Szoltys, M., Bik, M., Słomczyńska, M. (2005). Atresia of large ovarian follicles of the rat. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 43(1), 43–50.

Tilbrook, A. J., Turner, A. I., Clarke, I. J. (2000). Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Reviews of reproduction*, 5(2), 105–113.

Tripathi, A., Shrivastav, T. G., Chaube, S. K. (2013). An increase of granulosa cell apoptosis mediates aqueous neem (*Azadirachta indica*) leaf extract-induced oocyte apoptosis in rat. *International Journal of Applied & Basic Medical Research*. 3(1), 27–36.

Turathum B., Gao E. M., Chian, R. C. (2021). The Function of Cumulus Cells in Oocyte Growth and Maturation and in Subsequent Ovulation and Fertilization. *Cells*. 10(9), 1-18.

Vanhoutte, L., De Sutter, P., Nogueira, D., Gerris, J., Dhont, M., Van der Elst, J. (2007). Nuclear and cytoplasmic maturation of in vitro matured human oocytes after temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor. *Human Reproduction*. 22(5), 1239–1246.

Vantman, B.D., Vega, B. (2010). Fisiología reproductiva y cambios evolutivos con la edad de la mujer. *Revista Médica Clínica Las Condes*. (21), 348-362.

Wagenmaker, E. R., Moenter, S. M. (2017). Exposure to Acute Psychosocial Stress Disrupts the Luteinizing Hormone Surge Independent of Estrous Cycle Alterations in Female Mice. *Endocrinology*. 158(8), 2593–2602.

Wang, D., Cheng, X., Fang, H., Ren, Y., Li, X., Ren, W., Xue, B., Yang, C. (2020). Effect of cold stress on ovarian & uterine microcirculation in rats and the role of endothelin system. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 18(1), 29.

Whirledge, S., Cidlowski, J.A. (2010). Glucocorticoids, stress, and fertility. *Minerva Endocrinology*. 35(2), 109–25.

Wiegand, S. J., Terasawa, E., Bridson, W. E., Goy, R. W. (1980). Effects of discrete lesions of preoptic and suprachiasmatic structures in the female rat. Alterations in the feedback regulation of gonadotropin secretion. *Neuroendocrinology*. 31(2), 147–157.

Wei, Y., Li, W., Meng, X., Zhang, L., Shen, M., Liu, H. (2019). Corticosterone Injection Impairs Follicular Development, Ovulation and Steroidogenesis Capacity in Mice Ovary. *Animals*. 9(12), 1-10.

Wdowiak A., Raczkiewicz D., Janczyk P., Bojar I., Makara-Studzińska M., Wdowiak-Filip A. (2020). Interactions of Cortisol and Prolactin with Other Selected Menstrual Cycle Hormones Affecting the Chances of Conception in Infertile Women. *International journal of environmental research and public health*. 17(20), 7537.

Williams, C. J., Erickson, G. F. (2012). Morphology and Physiology of the Ovary. *Endocrinology of female reproduction*, Endotext. MDText.com, Inc.

Winterhager, E., Kidder, G. M. (2015). Gap junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health. *Human Reproduction Update*. 21(3), 340–352.

Winuthayanon, W., Hewitt, S. C., Orvis, G. D., Behringer, R. R., Korach, K. S. (2010). Uterine epithelial estrogen receptor α is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(45), 19272–19277.

Xu, M., Sun, J., Wang, Q., Zhang, Q., Wei, C., Lai, D. (2018). Chronic restraint stress induces excessive activation of primordial follicles in mice ovaries. *PLOS ONE*. 13(3), 1-17.

Yang, J. A., Song, C. I., Hughes, J. K., Kreisman, M. J., Parra, R. A., Haisenleder, D. J., Kauffman, A. S., & Breen, K. M. (2017). Acute Psychosocial Stress Inhibits LH Pulsatility and Kiss1 Neuronal Activation in Female Mice. *Endocrinology*. 158(11), 3716–3723.

Yen, S.S.C., (2001). Neuroendocrinología de la reproducción. En: *Endocrinología de la reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. Capítulo 2, 31-85.

Yuan, H. J., Han, X., He, N., Wang, G. L., Gong, S., Lin, J., Tan, J. H. (2016). Glucocorticoids Impair Oocyte Developmental Potential by Triggering Apoptosis of Ovarian Cells via Activating the Fas System. *Scientific Reports*. 6, 24-36.

Yuan, H-J., Li, Z-B., Zhao, X-Y., Sun, G-Y., Wang, G-Y., Zhao, Y-Q., Zhang, M., Tan, J-H. (2020). Glucocorticoids impair oocyte competence and trigger apoptosis of ovarian cells via activating the TNF- α system. *Reproduction*. 160, 129–140

Yoon, H., Chung, W. S., Park, Y. Y., Cho, I. H. (2005). Effects of stress on female rat sexual function. *International journal of impotence research*. 17(1), 33–38.

Zafir, A., Banu, N. (2009). Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. *Stress*. 12(2), 167–177.

Zeydabadi, S., Ramezani, F., Zadeh-Vakili, A. (2017). The Role of Kisspeptin in Female Reproduction. *International journal of Endocrinology and Metabolism*. 15(3), 1-11.

Zhai, Q.Y., Wang, J.J., Tian, Y., Liu, X., Song, Z. (2020). Review of psychological stress on oocyte and early embryonic development in female mice. *Reproductive Biology and Endocrinology* 18(1), 1– 10.

Zhang, X., Wu, X.Q., Lu, S., Guo, Y.L., Ma, X., 2006. Deficit of mitochondria-derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles. *Cell Research*. (16)10, 841–850.

Zhuo, L., Kimata, K. (2001). Cumulus Oophorus Extracellular Matrix: Its Construction and Regulation. *Cell Structure and Function*. 26, 189–196.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 20127

Matrícula: 221380841

Efectos del estrés crónico en la viabilidad de las células del cuerpo durante el ciclo estral.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD AUTÓNOMA IZTAPALAPA

17 OCT 2024

DIVISIÓN DE SISTEMAS ESCOLARES

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 17 del mes de octubre del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. ADRIANA LIZBETH JUAREZ ROJAS
DRA. ALMA GUADALUPE LOPEZ LOPEZ
DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA
DRA. IRMA JIMENEZ MORALES



SARA ALEJANDRA VAZQUEZ MADRID
ALUMNA

Bajo la presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: SARA ALEJANDRA VAZQUEZ MADRID

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

REVISÓ
MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, se fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. ADRIANA LIZBETH JUAREZ ROJAS

VOCAL

DRA. ALMA GUADALUPE LOPEZ LOPEZ

VOCAL

DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA

SECRETARIA

DRA. IRMA JIMENEZ MORALES