



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Evaluación de la citotoxicidad del dimetilsulfóxido como agente infiltrante sobre la función ovárica y el ciclo estral: efectos del antagonismo sobre el receptor dopaminérgico DA2.

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Jasiel Evani Olvera Herrera

Co-directores

Dr. José Luis Morán Perales

Dr. Ángel Ismael Melo Salazar

Tlaxcala, Tlax.

Diciembre, 2019



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Evaluación de la citotoxicidad del dimetilsulfóxido como agente infiltrante sobre la función ovárica y el ciclo estral: efectos del antagonismo sobre el receptor dopaminérgico DA2.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Jasiel Evani Olvera Herrera

Comité Tutoral

Dra. Estela Cuevas Romero

Dr. Octavio Sánchez García

Co-diretores

Dr. José Luis Morán Perales

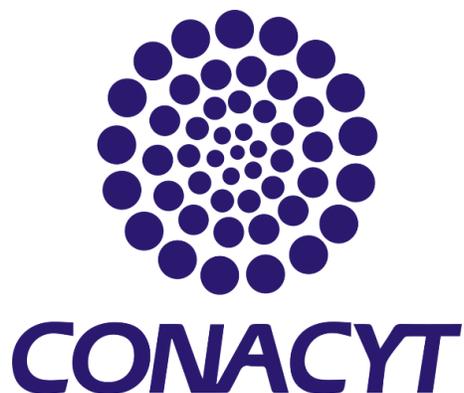
Dr. Ángel Ismael Melo Salazar

Tlaxcala, Tlax.

Diciembre, 2019



El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción (DBTR) del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla bajo la dirección del Dr. José Luis Morán Perales (ICUAP-BUAP) y el Dr. Ángel Ismael Melo Salazar (CIRA-CINVESTAV, IPN)



La realización de este trabajo contó con el apoyo económico recibido con la asignación de la beca CONACyT con número 859875/632785

OFICIO DE AUTORIZACIÓN



Posgrado en Ciencias Biológicas
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado

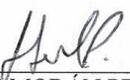


**COORDINACIÓN POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

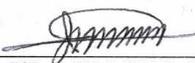
Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Jasiel Evani Olvera Herrera** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Evaluación de la citotoxicidad del dimetilsulfóxido como agente infiltrante sobre la función ovárica y el ciclo estral de la rata: efectos biológicos del antagonismo sobre el receptor dopaminérgico DA2”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., 8 DE NOVIEMBRE 2019



DR. JOSÉ LUIS MORÁN PERALES



DR. ANGEL ISMAEL MELO SALAZAR



DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO



DR. OCTAVIO SÁNCHEZ GARCÍA



DRA. LETICIA NICOLÁS TOLEDO



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala Biología de la Conducta, que tiene registro en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional. Padrón Nacional de Posgrado (PNP).

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca con número 859875/632785 que me fue otorgada y que permitió la realización del presente trabajo.

Agradezco a los miembros del Comité Tutorial:

Dr. Ángel Ismael Melo Salazar

Dr. José Luis Morán Perales

Dra. Estela Cuevas Romero

Dr. Octavio Sánchez García

Dra. Leticia Nicolás Toledo

AGRADECIMIENTO A TÍTULO PERSONAL

Agradezco al Doctor José Luis Morán Perales por el tiempo invertido en este trabajo, además de su apoyo durante mi formación académica y por el conocimiento que comparte con sus alumnos. Gracias a todas las personas que colaboran en el Departamento de Toxicología y Neuroendocrinología de la Reproducción del Instituto de Ciencias-BUAP y que de alguna forma estuvieron involucrados en el proceso de trabajo, en especial a la MVZ Karla Nallely González Quiroz quien colaboró durante todo el proyecto.

Agradecimientos al Bioterio “Claude Bernard” de la BUAP por haber proporcionado los animales utilizados en este proyecto y a los MVZ encargados de su cuidado.

DEDICATORIAS

A mis padres

A mis hermanos

A mis amigos

RESUMEN

El dimetilsulfóxido (DMSO) es un disolvente orgánico con propiedades anfipáticas capaz de transportar sustancias liposolubles a través de diferentes tejidos. Existe controversia acerca de la seguridad al aplicarlo en tejidos animales ya que algunos investigadores lo consideran potencialmente tóxico. Sin embargo, resultados de nuestro laboratorio lo postulan como un vehículo seguro cuando se aplica directamente en el tejido ovárico o en la piel.

En el presente estudio, se utilizaron 68 ratas hembra adultas de la cepa CII-ZV con libre acceso al agua y al alimento, alojadas en un cubículo de 14 horas luz/10 horas oscuridad. En todos los animales se realizó el registro del ciclo estral por medio de frotis vaginales diariamente y en todos los experimentos únicamente se utilizaron animales que cumplieron al menos tres ciclos estrales consecutivos de cuatro días (diestro-1, diestro-2, proestro y estro; animales cíclicos).

Entre las 13:00 y las 14:00h de cada día del ciclo estral, grupos animales cíclicos fueron sometidos a una laparotomía bilateral con el fin de exteriorizar los ovarios y realizar una microinyección con 20 μ L de DMSO puro dentro de cada bursa ovárica; como grupos testigo se utilizaron animales cíclicos que recibieron 20 μ L de agua destilada en los diferentes días del ciclo estral. Todos los animales con microinyección (DMSO: 20; Agua Destilada: 16) se sacrificaron en la mañana del siguiente estro vaginal observado. Como grupo control absoluto se utilizaron 8 animales cíclicos intactos que se sacrificaron en la mañana del estro vaginal. En ninguno de los casos, la microinyección del DMSO o agua destilada modificó la duración del ciclo estral (vehículos (n=40): 4.0 ± 0.0 días vs Intactos (n=8): 4.0 ± 0.0 días; n.s.) ni la cuota ovulatoria (vehículos (n=40): 12.7 ± 0.3 ovocitos vs Intactos (n=8): 12.4 ± 0.1 ovocitos; n.s.).

Con base en estos resultados, se realizó otro experimento para analizar los efectos de la microinyección local del antagonista dopaminérgico sulpirida (antagonista selectivo de los receptores DA₂) disuelto en DMSO puro y así, compararlos con otros hallazgos donde se emplea como vehículo de la sulpirida al ácido ascórbico 0.1%.

Entre las 13:00 y las 14:00h de los diferentes días del ciclo estral, en otros grupos de animales cíclicos, se realizó una microinyección a través de las bursas ováricas con 20 μ L de una solución de sulpirida (5 μ g/ μ L) diluida en DMSO puro en cada ovario. Estos animales se sacrificaron en la mañana del siguiente estro vaginal observado. Solo la microinyección con sulpirida realizada en el diestro-1 retrasó el estro vaginal 24 horas (Sulpirida (n=8): 4.8 ± 0.2 días vs DMSO (n=24): 4.0 ± 0.0 días y Agua Destilada (16): 4.0 ± 0.0 días) pero no ocurrió en los otros grupos tratados con el antagonista (DMSO + Sulpirida (n=12): 4.0 ± 0.0 días). Tampoco se observaron cambios en el número de ovocitos liberados entre los grupos.

Estos resultados permiten sugerir que el DMSO administrado directamente sobre el tejido ovárico no afecta las funciones primordiales de la gónada y que su uso como agente infiltrante para el estudio de los efectos fisiológicos de fármacos insolubles podría ser recomendable.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
<i>1.1 Estructura funcional del ovario</i>	2
<i>1.2 Ciclo estral</i>	8
<i>1.3 Eje hipotálamo-hipófisis-ovario</i>	12
<i>1.4 Ovulación</i>	17
2. ANTECEDENTES	18
<i>2.1 Propiedades físicas y químicas de DMSO</i>	18
<i>2.2 Usos potenciales del DMSO en biología y biomedicina experimental</i>	20
<i>2.3 Toxicología del DMSO</i>	22
<i>2.4 Efectos del uso de DMSO como vehículo de agentes teratógenos</i>	25
<i>2.5 Dopamina y receptores dopaminérgicos</i>	25
<i>2.6 Receptores dopaminérgicos y ovulación</i>	27
<i>2.7 Antagonistas de la dopamina</i>	28
<i>2.8 Propiedades farmacológicas de la sulpirida</i>	29
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. HIPÓTESIS	30
5. OBJETIVOS	30
<i>5.1 Objetivo general</i>	30
<i>5.2 Objetivos particulares</i>	30
6. METODOLOGÍA	31
<i>6.1 Objetivo particular 1</i>	31
<i>6.2 Objetivo particular 2</i>	32
<i>6.3 Análisis estadístico</i>	32
7. RESULTADOS	33
<i>7.1 Histología del ovario</i>	33
8. DISCUSIÓN	39
9. CONCLUSIONES	41
10. PERSPECTIVAS	41
11. REFERENCIAS	42

1. INTRODUCCIÓN

Las membranas biológicas se caracterizan por su extrema selectividad, por lo que diversos solutos no pueden atravesarla libremente e incluso, ni siquiera alcanzan a interactuar con los lípidos y proteínas que la integran (Alberts y cols. 2008).

Muchos fármacos experimentales y de uso clínico certificado, debido a sus propiedades polares, tienen dificultad para realizar sus acciones a nivel de la membrana lo que obliga al incremento de las dosis y a tiempos de espera prolongados para que estos fármacos tengan las acciones y efectos esperados (Brunton y cols. 2012). Por otra parte, se sabe que la matriz extracelular juega un papel preponderante en los mecanismos de reconocimiento y de inmunidad biológica (Alberts y cols. 2008).

De acuerdo con lo anterior ¿Cómo se puede resolver el problema de la acción rápida de un fármaco activo para resolver un problema de salud? El vehículo que se utiliza como medio de transporte del fármaco puede ser una solución.

El dimetilsulfóxido (DMSO; $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) es un líquido sin color, se ha usado como disolvente orgánico e industrial, criopreservador de órganos y tejidos (Pegg, 2007), como un medicamento en medicina veterinaria y humana (Pope y Oliver, 1966; Parkin y cols. 1997) y, en los últimos veinte años, en la innovación de tecnologías en biología molecular y celular (Chakrabarti y Schutt, 2001).

El DMSO fue descubierto por el científico ruso Alexander Saytzeff en 1866 se obtiene como subproducto durante el procesamiento de la pulpa de madera para la fabricación de papel (Shirley y cols. 1978).

El gran potencial del DMSO como agente infiltrante lo postula como una excelente opción para el uso experimental de un conjunto de fármacos activos cuya solubilidad en agua es difícil. Por ejemplo, los antagonistas de la dopamina son muy insolubles en agua y su uso en los sistemas *in vivo*, dificulta la interpretación de los datos experimentales cuando son utilizados como herramientas en el estudio de sus efectos en los sistemas biológicos.

Existe un creciente interés en analizar el papel funcional de este disolvente por sus propiedades anfipáticas y sus efectos al momento de interactuar directamente sobre la matriz extracelular en los tejidos donde es depositado como agente infiltrante.

Dado que existe información ambigua y contradictoria sobre los efectos supuestamente tóxicos del DMSO, en el presente trabajo se analizaron los efectos biológicos *in vivo* del disolvente aplicado como agente infiltrante en el tejido ovárico de la rata hembra adulta. Se analizaron sus efectos directos cuando se aplica en tejidos vivos buscando los signos de citotoxicidad por medio de histología convencional con microscopia de campo claro y registrando la duración del ciclo estral, así como el número de gametos liberados en el modelo de la rata adulta. Por otra parte, se probará su eficacia cuando se utilice como agente infiltrante de un antagonista dopaminérgico específico y selectivo del receptor a dopamina tipo 2.

1.1 Estructura funcional del ovario

Los ovarios de la rata son estructuras pares de forma oval que varían en apariencia y tamaño dependiendo de la etapa del ciclo reproductivo. La anatomía microscópica del ovario de roedor se muestra en la Figura 1. Cubriendo la superficie del ovario hay una capa única de mesotelio peritoneal modificado, el epitelio ovárico (OSE, por sus siglas en inglés) continúa con el ligamento ancho (*mesovarium*) que brinda soporte al ovario. El OSE del ovario puede variar de tipo de epitelio escamoso a cuboidal, columnar a pseudoestratificado; esta variación regional en la superficial morfología del OSE es acompañada con los cambios cíclicos que ocurren dentro del parénquima ovárico subyacente durante el ciclo estral (Erickson, 1995; Figuras 2 y 3).

En el ovario de los mamíferos se pueden distinguir tres zonas bien diferenciadas: 1) la corteza, que es la zona más dominante y que contiene los folículos en diferentes fases de maduración y los cuerpos lúteos, entre los folículos se encuentran el tejido conectivo de sostén y las células del estroma. 2) la médula, que contiene una rica red vascular y tejido conectivo; y 3) el hilio, donde se encuentra la arteria y vena ovárica, vasos linfáticos, las terminales nerviosas y las células intersticiales (Erickson, 1995) (Figura 1).

El ovario está recubierto por una sola capa de células epiteliales, llamada epitelio germinal. El ovario adulto está constituido por tres unidades funcionales diferentes: 1) el tejido intersticial, 2) los folículos y 3) los cuerpos lúteos. Estas estructuras están en constante transformación. Así, mientras alguna de ellas regresa (p.ej. los folículos atrésicos pasan a

formar parte del estroma), otros pueden formarse (el folículo tras la ovulación se transforma en cuerpo lúteo; Erickson, 1995).

Las futuras células intersticiales las encontramos en el hilio, se derivan de las células mesenquimales en el estroma del ovario. Las células intersticiales sintetizan y producen andrógenos los cuales son muy importantes en la regulación de un número de procesos reproductivos fundamentales y por lo tanto son de gran relevancia fisiológica (Erickson, 1995).

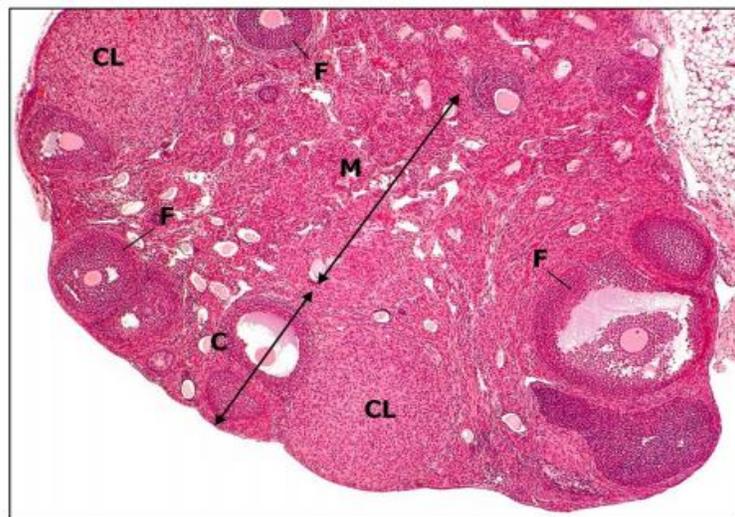


Figura 1. Anatomía microscópica del ovario de un roedor normal (ratón, 40X). La corteza (C) contiene numerosos folículos (F) en varias etapas de maduración y cuerpos lúteos (CL). La médula (M), que no siempre está presente en las secciones histológicas, contiene vasos linfáticos, nervios y vasos sanguíneos (Tomado de Cartwright y Moreland, 2008).

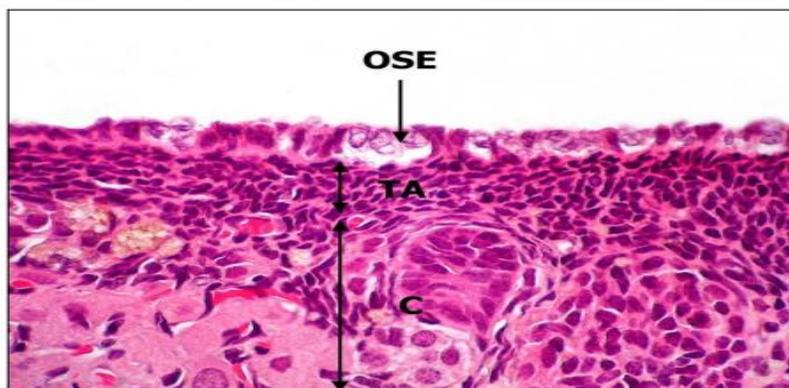


Figura 2. Epitelio superficial ovárico (OSE) – epitelio tipo columnar. Túnica albugínea (TA). Corteza (C). (rata, 400X) (Cartwright y Moreland, 2008).

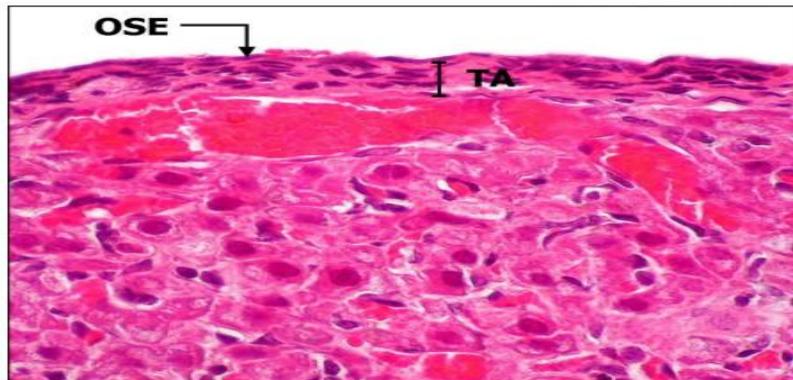


Figura 3. Epitelio superficial ovárico (OSE) – epitelio escamoso. Túnica albugínea (TA) (rata, 400X) (Cartwright y Moreland, 2008).

En el estroma ovárico se encuentran cuatro clases de células intersticiales que se clasifican, por sus características y posición en el ovario, como: primarias, tecales, secundarias e hiliares.

Las células intersticiales tecales proceden del estroma y migran hacia la membrana basal del folículo donde se disponen en bandas para formar las tecas interna y externa. Ésta migración hacia la membrana basal tiene lugar cuando el ovocito está madurando y el folículo contiene dos o tres capas de células de la granulosa. Después de la ovulación, las células tecales se transforman en células teco luteínicas del cuerpo lúteo. Las células teco-intersticiales de los folículos atrésicos con antra pasan a formar parte de la glándula intersticial. En cambio, las células que rodean a los folículos preantrales en las que no se ha producido la diferenciación celular y que entran en atresia, no forman parte de la glándula intersticial ya que no poseen receptores a la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés). Lo mismo sucede en las células tecales de los folículos preovulatorios que entran en atresia, los que tampoco forman parte de la glándula intersticial. Las células tecales intersticiales tienen receptores a la hormona luteinizante LH, a prolactina, a la hormona adrenocorticotrópica (ACTH, por sus siglas en inglés), a la noradrenalina, hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés) y a los estrógenos (Domínguez, 1993).

Cuando los folículos no llegan a liberar sus óvulos consecuentemente se vuelven atrésicos, las células intersticiales tecales se transforman en células intersticiales secundarias

que mantienen la actividad esteroidogénica y son inervados por terminales adrenérgicas. Por último, las células intersticiales sintetizan y secretan testosterona en respuesta a la estimulación de la LH (Erickson, 1995).

El folículo ovárico es la unidad anatómica y funcional del ovario. La mayoría de los folículos se encuentran principalmente en la periferia de la corteza, inmediatamente por debajo de la túnica albugínea. El folículo está constituido por un ovocito, que está rodeado por células de la granulosa que a su vez forman las células de la corona radiada, *cumulus ooforo*, antro folicular, células de la granulosa, lamina basal, células de la teca interna, células tecointersticiales, tejido conectivo, teca externa (Van Voorhis, 1999; Zhang, 1999; Figura 4 y Tabla 1).

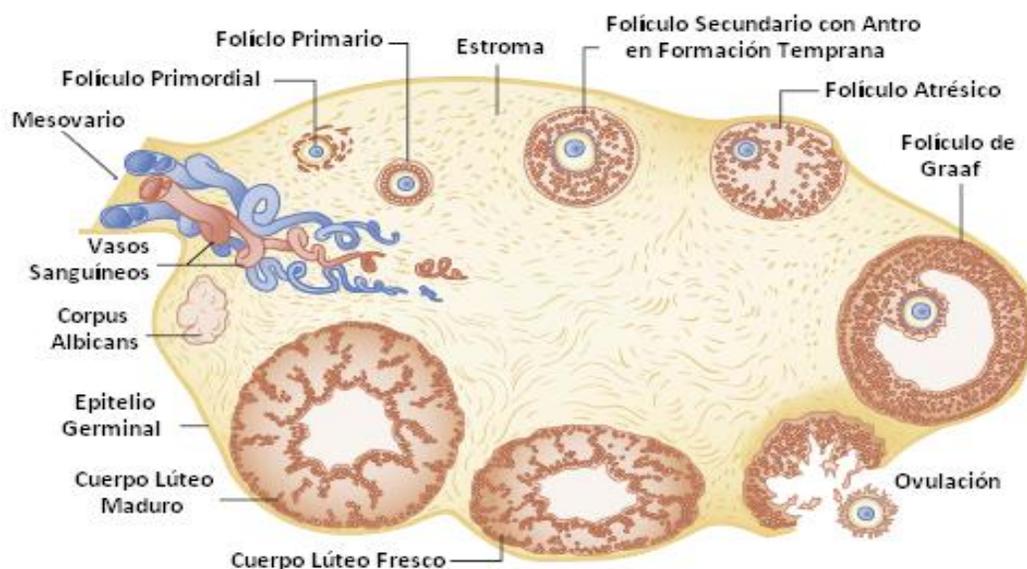


Figura 4. Esquema que muestra los principales compartimientos anatómicos y funcionales del ovario en los mamíferos (Modificado Strauss III y Williams, 2009).

El cuerpo lúteo es una glándula endócrina transitoria, formado por células foliculares que permanecen después de la ovulación (Juengel y cols. 1999). La formación de cuerpo lúteo es iniciada por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos en las células de la teca interna y la membrana granulosa del folículo preovulatorio. Esto es llamado luteinización. Estos cambios ocurren como resultado de un incremento de los niveles de LH en la sangre,

asociado con el aumento preovulatorio de esta hormona. Una descripción más completa de los cambios morfológicos asociados en la luteinización en la rata es la de Anderson y Little (1985). Después de la ovulación y de la eliminación folicular, la pared del folículo se colapsa y el estrato de las células de la granulosa queda dispuesto en pliegues. Se rompe la lámina basal que antes separaba las células de la granulosa y la teca interna, donde hay una cierta extravasación de sangre a partir de los capilares de la teca externa con lo que resulta la formación de un coágulo central que invaden la cavidad del folículo roto, el crecimiento de éstos nuevos vasos parece ser debido a un factor angiogénico que debe ser secretado pronto después de la ruptura del folículo (Erickson, 1995) (Figura 5)

Tabla 1. Clasificación de los Folículos Ováricos (Van Voorhis, 1999).

<p><i>Folículos primarios. El primer signo de maduración es el cambio de tamaño del ovocito el cual se agranda de 20 a 70 μm, a medida que el ovocito se agranda, las células foliculares se hacen cuboides o cilíndricas bajas y, por proliferación mitótica dan origen a un epitelio estratificado de células de la granulosa transformando así al folículo primordial unilaminar en folículo primario multilaminar. En estos folículos el ovocito empieza a crecer, se forma la zona pelúcida, las células de la granulosa proliferan formando dos o tres capas que rodean al ovocito y las células del estroma ovárico se organizan y se forman las capas de las células de la teca. Los folículos con estas características ya se conocen como secundarios.</i></p>
<p><i>Folículos secundarios. En el curso de la proliferación continua de las células foliculares, los folículos en crecimiento se hacen de forma oval con el ovocito en posición excéntrica. Cuando el folículo alcanza un diámetro de aproximadamente 200 μm y tiene de 6 a 12 capas de células, aparecen entre las células unos espacios irregulares llenos de líquido claro llamado líquido folicular, los espacios irregulares entre las células granulosas van confluyendo para formar una cavidad única de forma de media luna llamada antro.</i></p>
<p><i>Folículos maduros (folículo de Graaf). En los estadios tardíos del crecimiento folicular disminuye el número de figuras mitóticas entre las células de la granulosa. Los espacios intercelulares que hay entre las células de las capas más internas del epitelio se agrandan. Se va relajando la conexión de las células de la granulosa del cumulus ooforo que rodea el ovocito con el resto del epitelio, de este modo, el ovocito junto con su zona pelúcida y la corona radiada se va liberando de su inserción en el cumulus ooforo en preparación para la ovulación. La teca interna y externa del folículo alcanzan su desarrollo máximo en el folículo maduro. La teca interna está constituida por células grandes, fusiformes, con núcleos ovales y con gotitas de lípido en su citoplasma. En concordancia con la función endocrina de la teca interna está su rico plexo capilar. La teca externa está formada por fibras y células fusiformes, dispuestas concéntricamente, que no parecen tener ninguna función secretora.</i></p>

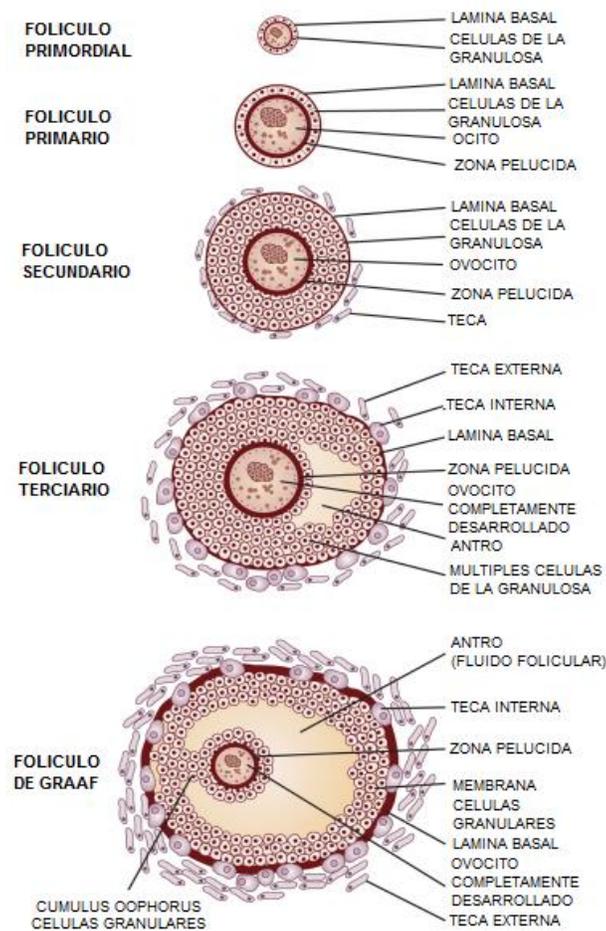


Figura 5. Esquema que muestra el desarrollo y las distintas etapas del crecimiento de los folículos ováricos; a lo largo del desarrollo folicular, los principales compartimentos sufren cambios graduales que se caracterizan por la proliferación de las células de la granulosa y de las células de la teca, además de la aparición del antro; al iniciarse el desarrollo, el ovocito abandona su estado en dictioteno de la profase I y continúa su diferenciación hasta culminar la segunda división meiótica si y sólo si es fertilizado por el espermatozoide (Tomado de Bulum y Adashi, 2003).

Las células de la granulosa y las de la teca interna sufren cambios citológicos. Se agrandan y acumulan lípidos y se transforman en células poligonales y pálidas, llamadas células luteínicas. En la rata el número de los espacios de las uniones entre las células de la granulosa incrementa cuando el folículo madura, pero disminuyen justo antes de la ovulación (Niswender y Nett, 1988).

El número de cuerpos lúteos presentes en el ovario depende del número de ovulaciones que, a su vez, varía según la especie. Después de la ovulación la transformación del folículo a

cuerpo lúteo es debida fundamentalmente a la hipertrofia de las células lúteas y al aumento de la vascularización. Puesto que las células lúteas derivan de las células de la granulosa y de la teca interna se pueden distinguir dos tipos de células lúteas: las del interior que constituyen la mayor parte del tejido luteínico que son células de mayor tamaño y las de la periferia, que son células de menor tamaño. Las células lúteas grandes (células granuloso-luteínicas, células de tipo II) son poliédricas y contienen todos los elementos de las células secretoras de esteroides (mitocondrias, retículo endoplásmico liso y gránulos de secreción); al contrario, las células lúteas pequeñas son irregulares y derivan de las células de la teca (célula de tipo I), contienen ribosomas unidos al retículo endoplásmico y no presentan gránulos de secreción (Niswender, 1988).

1.2 Ciclo Estral

Mucho de lo que se conoce de la ovulación espontánea está basado en el conocimiento del ciclo estral de la rata. El ciclo de la rata es único por su brevedad. La periodicidad de luz juega un papel importante en la duración de las etapas del ciclo estral. La palabra *estro* es una adaptación del latín de la palabra griega *oistros* que significa: accesorio, picadura o frenesí. Este término fue usado por W. Heape, para describir el periodo especial del deseo sexual de la hembra y se distingue del ciclo del macho (Freeman, 2006).

El ciclo estral de la rata tiene una duración de 4 a 5 días y es regulado por factores endógenos, particularmente por la interacción del eje Hipotalámico-Hipófisis-Ovario y puede ser influenciado por factores exógenos como la luz, temperatura y sustancias químicas percibidas por el epitelio olfativo (Kilen y Schwartz, 1999; Freeman, 2006).

A partir del análisis de los cambios del epitelio vaginal, el ciclo estral se divide en cuatro fases: diestro-1, diestro-2, proestro y estro, líneas abajo se indican los principales cambios del epitelio vaginal en relación con el ambiente hormonal.

El ciclo estral comprende un periodo de tiempo determinado y se divide en las siguientes fases:

Diestro-1. Esta fase tiene una duración de 6 a 8 h. Durante el diestro-1 la concentración plasmática de la LH, la hormona folículo estimulante (FSH) los estrógenos y progesterona son basales. En el ovario se observan folículos en todas etapas de crecimiento. La monta y la

cópula no se permiten. La secreción de progesterona por el cuerpo lúteo y la del estradiol por los folículos inhiben la secreción de gonadotropinas. La vascularización y motilidad del útero están disminuidas. En el frotis vaginal se aprecia infiltración leucocitaria junto con algunas células cornificadas. Los cuerpos lúteos de formación reciente son la principal fuente de secreción de progesterona. Durante este día comienza la regresión funcional del cuerpo lúteo siempre y cuando no haya habido cópula, que en algunos roedores estimula la liberación de prolactina (hormona lúteo trófica). La secreción de estradiol por los folículos en crecimiento sigue aumentando (Kilen y Schwartz, 1999; Freeman, 2006).

Diestro-2. Esta fase dura de 55 a 57 h. Al igual que la fase de diestro-1 los esteroides ováricos inhiben la secreción basal de gonadotropinas que a su vez mantienen el crecimiento folicular. Las concentraciones plasmáticas de estrógenos comienzan a aumentar en la tarde de este día resultado de la estimulación de la enzima aromatasa por la FSH. También la FSH estimula la división mitótica de las células de la granulosa lo que se traduce en el crecimiento y diferenciación de los folículos que ovularán en ese ciclo. El cuerpo lúteo continúa en proceso de regresión. El útero es pequeño, anémico y no contráctil (Kilen y Schwartz, 1999; Freeman, 2006).

Proestro. La fase de proestro tiene una duración de 12 a 14 h. Los folículos han adquirido el estadio de folículos preovulatorios y secretan grandes cantidades de estradiol. Esta hormona ejerce ahora un efecto estimulante (retroalimentación positiva) sobre la secreción de gonadotropinas. En la mañana de este día las concentraciones plasmáticas de los estrógenos suben bruscamente, alcanza un máximo (pico preovulatorio de estrógenos) y disminuye también en forma brusca hecho que estimula la actividad de las neuronas noradrenérgicas en el hipotálamo provocando la secreción preovulatoria de la GnRH. Este evento estimula la liberación preovulatoria de la FSH y de la LH, pero la liberación de FSH ocurre ligeramente antes que la descarga preovulatoria de la LH. En la tarde de este mismo día, se alcanzan las máximas concentraciones de estas hormonas. El pico en la concentración plasmática de la LH, estimula en el ovario la síntesis del plasminógeno que inicia los mecanismos celulares que llevan al rompimiento de la pared del folículo para que el ovocito pueda ser expulsado horas más tarde. La glándula intersticial secreta progesterona, la cual favorece la ovulación. La LH induce la ovulación y la luteinización del folículo después de la ovulación. El útero, por acción

del estradiol, se hace extremadamente contráctil y en la vagina aparecen células epiteliales nucleadas. La cópula es aceptada solo en el proestro tardío, con el comienzo de la fase oscura. La secreción de la FSH en la mañana del día estro, que es debido a la disminución de la secreción ovárica de inhibina, estimula el crecimiento folicular (Kilen y Schwartz, 1999; Sánchez-Criado, 1999; Freeman, 2006).

Estro. La fase de estro tiene una duración de 25 a 27 h. En este día se presenta el periodo de celo en que la hembra presentan los patrones de la conducta sexual. El acercamiento, la monta y la cópula son aceptados. Como en la madrugada de este día ocurre la ovulación los óvulos se encuentran en el oviducto en la mañana del día del estro. El folículo postovulatorio comienza a estructurarse como cuerpo lúteo mientras una nueva serie de folículos primarios comienzan a desarrollarse. En la mucosa vaginal se encuentran numerosas mitosis que desplazan a las capas más superficiales (epitelio escamoso y cornificado), que son exfoliados a la luz de la vagina. La presencia de estas células en el frotis vaginal es indicativa del estro y señal de probable ovulación (Freeman, 2006). La concentración plasmática de progesterona aumenta en el día del estro, mientras que los estrógenos y la LH son basales, excepto la FSH debido a que en la mañana de este día del ciclo ocurre un segundo *pico* en la concentración plasmática de la FSH, aunque de menor magnitud que en la tarde del proestro cuyo papel es el de reclutar los folículos que ovularan en el ciclo siguiente (Freeman, 2006) (Figura 6).

La FSH se une a su respectivo receptor en la membrana celular y estimula la síntesis de estrógenos por las células de la granulosa. El complejo hormona-receptor actúa sobre el sistema de la enzima *adenilato ciclasa* (AC), induce el aumento del 3,5 adenina-monofosfatocíclico (AMPC) y estimula la síntesis y la actividad de la enzima aromatasa, la cual transforma los andrógenos a estrógenos (Freeman, 2006).

La LH regula la síntesis de estrógenos por sus efectos sobre la producción de andrógenos por las células tecaes y por la estimulación de la síntesis y la actividad de la enzima aromatasa de las células de la granulosa que previamente han sido estimuladas por la FSH (Freeman, 2006).

La prolactina inhibe la actividad aromatasa de las células de la granulosa y bloquea los efectos de la FSH sobre las células mismas lo que resulta la disminución de la producción de estrógenos. También actúa sobre las células de la teca donde bloquea la síntesis de andrógenos

al inhibir la formación del AMPc y las enzimas que inducen la escisión de la cadena lateral del colesterol.

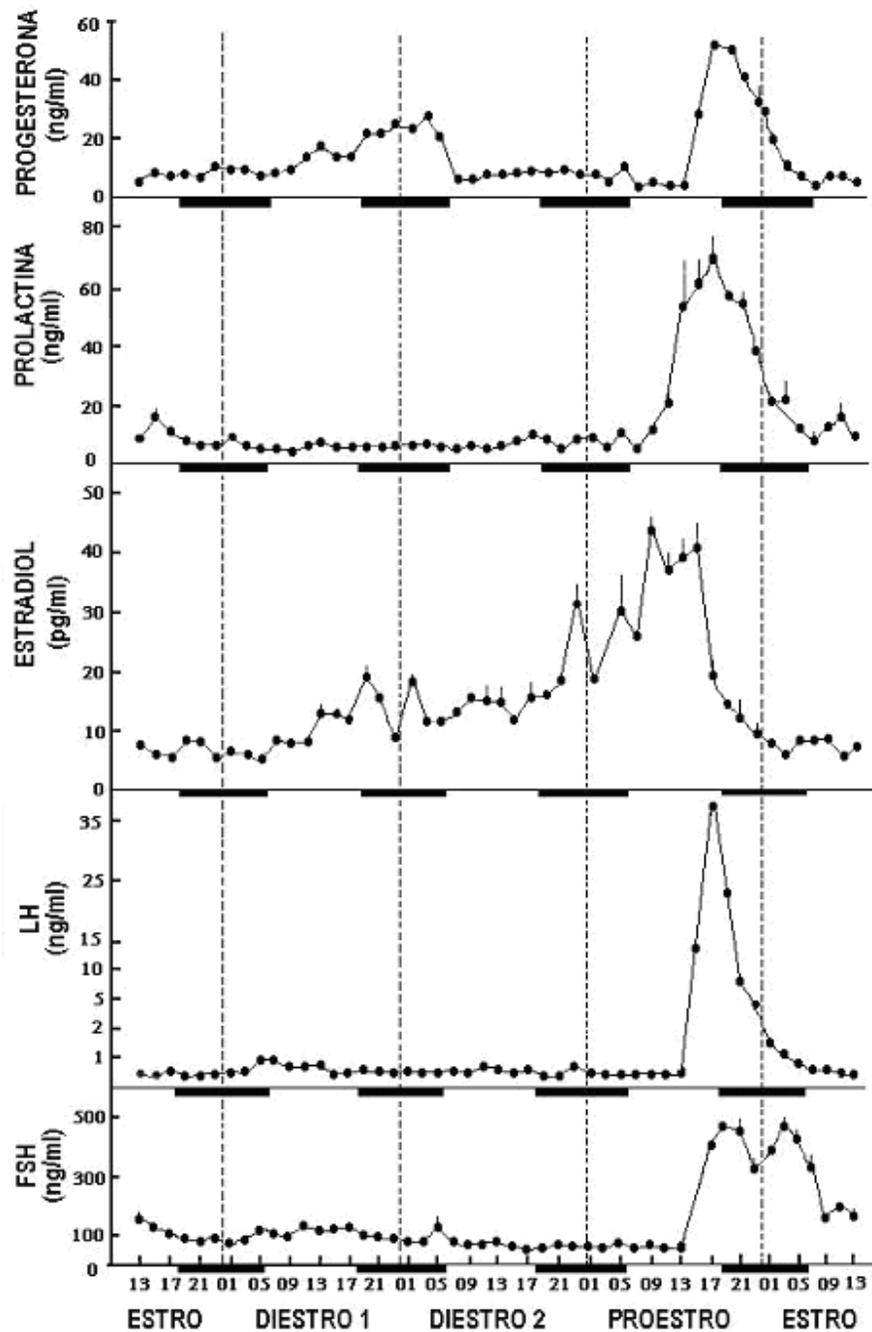


Figura 6. Concentraciones plasmáticas de progesterona, prolactina, estradiol, LH (Hormona Luteinizante) FSH (Hormona Folículo Estimulante) obtenidas a intervalos de dos horas durante los cuatro días del ciclo estral de la rata. Cada punto representa la concentración media \pm E.E.M. de las hormonas. Las barras negras representan la fase de oscuridad de las 18:00 a las 06:00 horas del día siguiente (Smith y cols. 1975; citado por Freeman, 2006).

La secreción de estrógenos por el folículo está regulada por la FSH, la LH, la prolactina y por otros factores y hormonas cuyos efectos están acoplados a su vez a las de la FSH y LH. Algunos de estos factores y hormonas son: GnRH, oxitocina, factor de crecimiento epidermal, vasopresina, estrógenos, los corticoides adrenales y la prostaglandina (Freeman, 2006).

1.3 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario

De todos los elementos implicados en la regulación de la función ovárica, el hipotálamo es el lugar de control e integración de todas las señales nerviosas y humorales procedentes del propio SNC, la hipófisis, los ovarios y el útero.

Al contrario de otros sistemas endocrinos, en el eje hipotalámico-hipófisis-ovario participan hormonas hipotalámicas (GnRH), varias hormonas tróficas adenohipofisarias (LH, FSH, prolactina), hormonas ováricas (estrógenos, andrógenos y progesterona), hormonas peptídicas y factores locales y hormonas producidas por el útero (prostaglandinas, opiáceos endógenos y neurotransmisores). La secreción de gonadotropinas depende de la acción de la GnRH sobre la adenohipófisis (Fink, 1999). La señal de salida de la hipófisis es, consecuentemente, la secreción pulsátil de la LH y FSH. Esta secreción hipofisaria está inhibida (retroalimentación negativa) por las hormonas ováricas (estradiol y progesterona) (Everett, 1988; Figura 7).

El ovario es una glándula de funcionamiento cíclico, lo que implica que sus componentes son efímeros. La señal de entrada son las gonadotropinas por un lado, los factores locales por otro, y en algunos casos, sustancias procedentes del útero (Speroff y cols. 1999). La FSH estimula el crecimiento y la maduración de los folículos ováricos, mientras que la LH causa la ruptura del folículo bajo la influencia de las concentraciones basales de la FSH y LH, las células de la granulosa secretan estrógenos y al momento de la ruptura folicular sufren transformaciones estructurales y bioquímicas que resultan en la formación del cuerpo lúteo (Niswender y Nett, 1988). La señal de salida, independientemente del óvulo maduro, incluye los esteroides ováricos y la inhibina que además de sus acciones periféricas regulan la secreción de GnRH, LH y FSH. Mientras la FSH solo actúa sobre las células de la granulosa,

la LH tiene múltiples lugares de acción en el ovario: las células tecales, las intersticiales, granulosa y luteínicas.

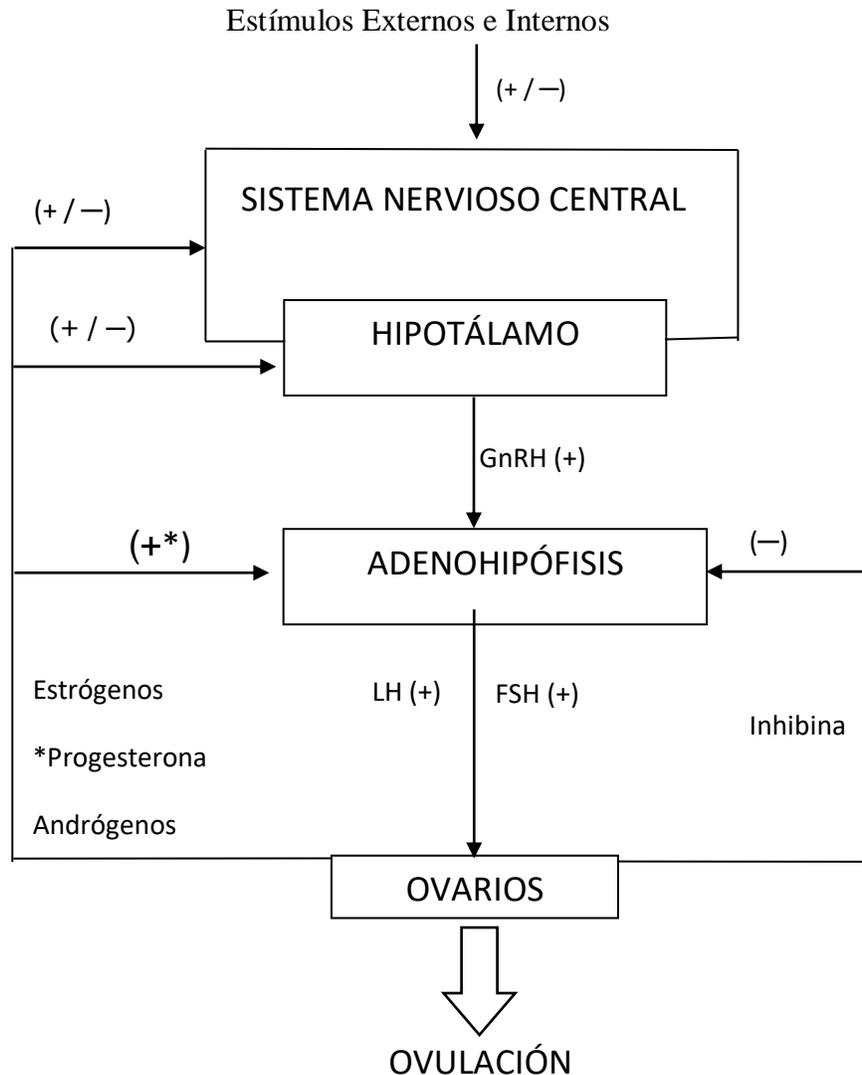


Figura 7. Representación esquemática de la interacción neuroendocrina y endocrina de los componentes del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario. La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) induce la secreción de las hormonas luteinizante (LH) y foliculo estimulante (FSH) que a su vez estimulan la secreción de hormonas ováricas de retrocontrol (esteroides sexuales: estrógenos, progestágenos y andrógenos; e inhibina) así como la maduración de los folículos y la ovulación. Las flechas indican las acciones estimulantes (+) o inhibitorias (-) sobre su órgano blanco (Tomado de Sánchez-Criado, 1999).

La FSH y la LH son glucoproteínas que constan de dos cadenas diferentes: subunidad α de 96 residuos y la subunidad β de 114 residuos de aminoácidos; y ambas subunidades se hayan unidas por enlaces no covalentes.

Las subunidades α y β son sintetizados a partir de precursores que experimentan maduración postraduccional que incluye la adición y modificación de oligosacáridos; está glucosilación ocurre tanto en la subunidad α como en la β . Se ha postulado que cada etapa del proceso de maduración representa un locus potencial para el control fisiológico de la formación de la hormona y su secreción (Fink, 1988; Counis, 1999).

Las gonadotropinas son sintetizadas en la adenohipófisis por células especializadas llamadas gonadotrópos. Son capaces de producir una o varias hormonas. La síntesis y liberación de gonadotropinas son estimuladas por la GnRH, un decapeptido secretado de manera pulsátil por neuronas localizadas en diferentes regiones del hipotálamo (Childs, 1999). Los estrógenos también estimulan la secreción de gonadotropinas en particular a la LH, por sus efectos sobre la hipófisis y sobre neuronas que regulan la liberación de GnRH (Fink, 1988; Blake, 1999; Weick y cols. 1971).

Si bien la GnRH estimula la liberación de ambas gonadotropinas, existen evidencias de la secreción de FSH y LH que son diferenciales y participan otros factores hipotalámicos específicos que estimulan e inhiben de la secreción de FSH (Domínguez, 1993).

La secreción de la FSH y LH está regulada por mecanismos de retrocontrol que involucra la participación del SNC, la adenohipófisis y las gónadas. Tanto en la hembra como en el macho, la secreción basal de las gonadotropinas se mantiene durante la mayor parte de su vida reproductiva, sin embargo en la hembra esta secreción basal es interrumpida por una liberación masiva de gonadotropinas que ocurre de manera periódica y precisa en forma de una intrincada cascada de retroalimentación positiva, que es inducida y promovida por los esteroides ováricos. Tanto en la hembra como en el macho, la secreción de las gonadotropinas ocurre de manera pulsátil. En la hembra, la secreción de LH y FSH es inhibida por los estrógenos (Fink, 1988; Aguilar, 1992).

La secreción de las gonadotropinas está regulada por varios sistemas de neurotransmisión, el más estudiado es el sistema catecolaminérgico (Vijayan y McCaan 1978), en particular la noradrenalina como regulador de la secreción de la GnRH y, por lo tanto, de la

FSH y LH. A partir de resultados obtenidos por estudios farmacológicos, se puede presumir que la participación de los diversos sistemas de neurotransmisión en la regulación de la secreción de las gonadotropinas varía durante el ciclo estral (Domínguez, 1993).

Al igual que la LH, la FSH es liberada en respuesta al estímulo de la GnRH y presenta una liberación máxima cuando se incrementan las concentraciones plasmáticas de la GnRH en el sistema portal-hipotálamo-hipofisiario. En la rata, las tasas de liberación de la FSH se mantienen relativamente elevadas aún después de la caída de la secreción preovulatoria de la LH (Fink, 1988).

La secreción preovulatoria de la FSH y la LH es el resultado de dos eventos simultáneos: 1) el aumento en la frecuencia y la amplitud de los pulsos de secreción de las neuronas GnRH-érgicas en el sistema portal-hipotalámico-hipofisiario y, 2) el aumento progresivo de la sensibilidad de los gonadotrópos a dicha hormona (Fink, 1988; Childs, 1999).

La cascada de eventos que desemboca en la liberación preovulatoria de la LH es iniciada por el incremento de la secreción de 17β -estradiol (Fink, 1988). El aumento de las concentraciones de estradiol permite la expresión de una señal neural para la liberación de la LH: la secreción preovulatoria de la GnRH, así como el incremento progresivo en la respuesta de los gonadotrópos a la GnRH (Fink, 1988; Childs, 1999).

En la rata, la secreción preovulatoria de la FSH ocurre aproximadamente 11 horas después que la de la LH. Se ha sugerido que este desfase entre ambos picos preovulatorios puede ser resultado de los siguientes factores: que exista una hormona que estimule en forma específica la secreción de FSH; que las hormonas esteroides, la inhibina u otros factores regulando de manera diferencial la respuesta de los gonadotrópos a la GnRH, o que la secreción de la LH de la adenohipófisis esté continuamente expuesta a la GnRH, mientras que la FSH sea desencadenada por la GnRH pero que luego sea independiente de ella (Fink, 1988). Otra hormona adenohipofisiaria importante en la regulación del ciclo estral es la prolactina. La prolactina tiene una sola cadena polipeptídica de 198 aminoácidos, se sintetiza como prohormona y al momento de liberarse sufre una escisión proteolítica, por lo que se forma la estructura molecular que se encuentra normalmente en el plasma. Los análisis por electroforesis y cromatografía de la prolactina muestran que esta hormona no es una molécula

única, sino una familia compuesta por cuatro variedades moleculares, que están codificadas por clones de ADN diferentes (Devesa y cols. 1992; Nagy y cols. 1999; Freeman, 2006).

En la rata, el estradiol estimula la liberación de la prolactina al actuar directamente sobre la adenohipófisis e indirectamente al actuar sobre neuronas blanco en el cerebro (Freeman, 2006).

La prolactina desempeña un papel fundamental sobre el desarrollo de la glándula mamaria y el inicio y mantenimiento de la lactancia. Asimismo, modula la secreción de gonadotropinas de la hipófisis anterior y, por tanto, de la función gonadal de ambos sexos (Weiner y cols. 1988; Devesa y cols. 1992; Nagy y cols. 1999). Durante el ciclo estral de la rata las concentraciones plasmáticas de la prolactina son bajas respecto a las que registran durante la tarde y noche del proestro, lo que se correlaciona con los perfiles de secreción de los estrógenos por parte de los folículos preovulatorios durante dicho periodo (Freeman, 2006).

La prolactina es capaz de regular la síntesis y secreción de GnRH. El control de la secreción de prolactina se establece por un mecanismo de retroalimentación corto de forma similar a lo que se ha descrito para las gonadotropinas (Weiner y cols. 1988).

La regulación de la secreción de la prolactina está dada por dos tipos fundamentales de sustancias hipotalámicas estimulantes (factores liberadores de la prolactina o PRF's, por sus siglas en inglés) e inhibidoras (factores inhibidores de la prolactina o PIF's, por sus siglas en inglés). La prolactina estimula directamente las neuronas hipotalámicas productoras de PIF. Este se vierte al plexo portal y alcanza la hipófisis anterior, inhibiendo la secreción de prolactina. Si disminuye los niveles de prolactina, disminuye también el PIF, y se restablece la biosíntesis y secreción de prolactina por la hipófisis. Uno de los factores inhibidores de la secreción de prolactina es la dopamina (Devesa y cols. 1992; Nagy, 1999; Freeman, 2006).

Al igual que para la FSH y la LH, la secreción de prolactina se produce de manera pulsátil, la que depende del modo de secreción de la dopamina y que proviene del sistema tuberoinfundibular (A_{14}) ubicado en el hipotálamo medial basal. En los lactotropos se han detectado receptores estereoespecíficos a la dopamina de alta afinidad cuya densidad varía durante el ciclo estral. Los fármacos que incrementan los niveles hipotalámicos de dopamina disminuyen los niveles circulantes de prolactina, al igual con las drogas con efecto agonista de

la dopamina (p.e., bromocriptina) y por el contrario, todos los fármacos antagonistas de dopamina (p.e., haloperidol) producen un incremento en sus niveles circulantes (Devesa y cols. 1992; Freeman, 2006; Fitzgerald y Dinan, 2008).

1.4 Ovulación

Uno de los procesos con que culmina el crecimiento y la diferenciación folicular es la expulsión del ovocito maduro y recibe el nombre de ovulación (Domínguez, 1993).

La ovulación es considerada como el resultado de un proceso inflamatorio localizado, ya que antes de que se produzca la salida del ovocito hay edema en la teca interna y muerte celular y aumento de las prostaglandinas en el área. Para que se produzca la ovulación, son necesarios varios cambios en la pared del folículo y en las relaciones entre las células de la granulosa y las tecaes. Durante la última etapa del crecimiento y diferenciación folicular se produce la desaparición de los desmosomas que presentan las células de la granulosa y de la teca, así como la degradación de las fibras colágenas, provocada por la fibrinolisis sintetizada por las células de la granulosa. Esta enzima es activada por el plasminógeno, producto de las células de la granulosa. La desaparición de los desmosomas y los nexos entre las células de la granulosa es consecuencia de la disminución de la concentración de estrógenos en el licor folicular, producido inmediatamente antes de la ovulación, contiene más agua que el que se forma antes y parece que se secreta a una velocidad más alta ya que después del pico de LH la capacidad de síntesis de estrógenos por las células de la granulosa disminuye rápidamente, mientras que aumenta la de la progesterona (Domínguez y cols. 1991; Domínguez, 1993; Espay y Lipner, 1994).

La ovulación depende de una compleja sucesión de fenómenos endocrinos en los que participan el hipotálamo, la hipófisis y el ovario. El control central del ciclo reside en la región arqueada del hipotálamo medio basal. Las neuronas de esta región tienen una actividad de la liberación pulsátil de la GnRH, que es transportada por los vasos del sistema portal-hipotalámico-hipofisiario al lóbulo anterior de la hipófisis (Domínguez y cols. 1991; Domínguez, 1993).

La regulación de la ovulación es el resultado de un conjunto de eventos neuroendocrinos que modulan el crecimiento y la diferenciación de los folículos ováricos. En éstos eventos intervienen: las gonadotropinas (FSH) estimula el desarrollo, la maduración y la

diferenciación de los folículos ováricos, y la (LH) que causa la ruptura del folículo maduro y la liberación del ovocito (Fink, 1988). También participan las hormonas secretadas por el ovario, en particular los estrógenos; las hormonas de las glándulas suprarrenales y del timo; las hormonas tróficas y reguladoras de la energía como son las hormonas secretadas por la tiroides y la hormona de crecimiento; y los neurotransmisores clásicos y peptidérgicos que llegan al ovario por los nervios o que son sintetizados en dicho órgano (Domínguez y cols. 1991; Cruz y cols. 1992; Espey y Lipner, 1994).

2. ANTECEDENTES

Muchos fármacos y diversas sustancias usadas como herramientas farmacológicas en pruebas y bioensayos biológicos que tienen una actividad fisiológica y fisioterapéutica comprobada presentan problemas en su administración, debido particularmente a su insolubilidad. Frecuentemente deben ser administrados en un vehículo irritante o tóxico. El DMSO es un solvente apropiado para esta clase de agentes insolubles en agua y que además presenta propiedades biológicas aún no estudiadas que podrían colocarlo como un disolvente adecuado para infiltrar fármacos que actúen directamente a nivel de la matriz extracelular.

¿Por qué aparentemente el DMSO que es significativamente menos tóxico y que puede ser utilizado como reemplazo de otros disolventes, ya sea puro o en mezclas de disolventes seguros, es infrautilizado? Quizás la utilidad del DMSO no ha sido totalmente comunicada a aquellos en posiciones capaces de tomar decisiones sobre la selección de disolvente comercial, o tal vez se debe a "mitos de bioseguridad" que han rodeado DMSO durante varios años (Vignes, 2000).

Las dosis más altas, soluciones más concentradas, una mayor frecuencia de exposición, o un período de exposición más largo pueden producir uno o más de los efectos tóxicos observados en algunos estudios de laboratorio y clínicos (Smith y cols. 1983). Sin embargo, los límites de tolerancia del DMSO, no se han establecido para todas las condiciones de exposición. Además, existen documentos y reportes científicos que muestran datos que recomiendan su uso terapéutico en animales domésticos e incluso en humanos.

2.1 Propiedades Físicas y Químicas del DMSO

El DMSO es una molécula anfipática con un dominio altamente polar y dos grupos metilo apolares, por lo que es soluble tanto en los medios acuosos como en los orgánicos (Santos y cols. 2003) (Tabla 2).

El DMSO disuelve diversas sustancias orgánicas, incluyendo carbohidratos, polímeros y péptidos, así como también sales inorgánicas y gases. Por lo general no tienen ningún efecto biológico grave, por lo tanto, las soluciones de DMSO-agua de compuestos orgánicos se pueden utilizar en diversos bioensayos (Balakin y cols. 2006).

Tabla 2. Algunas propiedades físicas y químicas del dimetilsulfóxido (DMSO) (Tomado y simplificado de Borgioli, 2007).

Nombre	Formula	Temperatura de ebullición (°C)	Volatilidad (BuAc=1)	Toxicidad ⁽²⁾		parámetro de Solubilidad ⁽³⁾		
				TLV/TWA (mg/m ³)	DL ₅₀ (mg/kg)	f _d	f _p	f _n
Dimetilsulfoxido		189	* ⁽¹⁾	/	14.500	41	36	23

⁽¹⁾ No determinada: son muy poco volátiles
⁽²⁾ Al aumentar los valores disminuyen la toxicidad. Ejemplo: n-Butilamina TLV/TWA 15 mg/m³ DL₅₀= 366 mg/kg
⁽³⁾ Los parámetros interpretan los contributos de las fuerzas de dispersión (f_d), de las fuerzas polares (f_p), de las fuerzas de unión a hidrógeno (f_n).

El DMSO es un solvente polar, fuertemente higroscópico, que muestra capacidad de solubilidad en agua y lípidos. La aplicación de esta sustancia a la piel resulta en la hiperhidratación de la capa córnea con el subsiguiente aumento de la permeabilidad. Mientras que no tiene efectos conocidos sobre las membranas plasmáticas, puede causar cambios en los filamentos de queratina, sus efectos in vivo son de corta duración (Brisson, 1974).

La mayoría de las propiedades fisiológicas de DMSO parecen estar relacionadas con sus propiedades de penetración, su potencial para inhibir o estimular enzimas, y actuar como un capturador de radicales libres, entre otras.

Éstas cualidades se basan en gran medida en las características químicas de DMSO, incluyendo su afinidad a las uniones de hidrógeno, afinidad por el agua, la capacidad de intercambio de agua entre las membranas celulares, y la capacidad de reaccionar con moléculas orgánicas (Wexler y cols. 2005).

Por su propiedad de atravesar rápidamente la epidermis y las membranas celulares, el DMSO se ha propuesto como excelente acarreador de drogas o venenos, lo cual podría

representar múltiples ventajas para el ensayo de los efectos de fármacos insolubles o hidrofóbicos, además se ha reportado que DMSO es menos tóxico que otros disolventes anfipáticos usados en la industria farmacéutica y de servicios, tales como dimetilformamida, dimetilacetamida, N-metil-2-pirrolidona, entre otros (Baker, 1968).

2.2 Usos Potenciales del DMSO en Biología y Biomedicina Experimental

Se han documentado numerosos estudios de laboratorio que versan sobre las acciones farmacológicas primarias del DMSO, entre las que cabe mencionar: la penetración de la membrana celular, efectos sobre tejido conectivo, acción antiinflamatoria, analgesia, diuresis, mejora o reducción de la eficacia de otros medicamentos, inhibición de la colinesterasa, vasodilatación, relajación muscular, el antagonismo a la agregación plaquetaria, entre otras (Jacob y Herschler, 1986).

El DMSO es uno de los disolventes más comunes para la administración in vivo de varias sustancias insolubles en agua. No está claro cómo la respuesta a una sustancia particular se ve alterada por el DMSO, pero en general se cree que actúa como un portador penetrante de sustancias a través de las membranas en todos los niveles de organización biológica.

Las propiedades más importantes de DMSO como portador penetrante implican la capacidad para cambiar la conformación de las proteínas y para reemplazar el agua (Rammier y Zaffaroni, 1967).

El DMSO se absorbe fácilmente por vía cutánea y oral en animales y seres humanos y mejora la absorción de muchos productos químicos por esas rutas, el DMSO en altas concentraciones es mejor absorbido que en diluciones en combinación con agua. (Wexler y cols. 2005).

Hay cuatro variables principales que influyen en la penetración de un soluto a través de cualquier membrana: 1) el coeficiente de difusión a través de la membrana, 2) la concentración del agente en el vehículo, 3) el coeficiente de partición entre la membrana y el vehículo, y 4) el espesor de la barrera de membrana. Los agentes de penetración están diseñados para afectar una o más de estas variables sin causar una modificación estructural o química permanente de la barrera fisiológica. La alteración del grosor de la membrana es menos práctica para la administración de fármacos (es difícil concebir agentes no tóxicos que

podrían disminuir reversiblemente el grosor del estrato córneo), por lo que la mayoría de los agentes de penetración, incluyendo el DMSO, se cree puede alterar reversiblemente los principios 1 a 3. Existe alguna evidencia que sugiere que el DMSO puede aumentar la difusión a través del estrato córneo al interrumpir la función de la barrera.

Algunas pruebas sugieren que el DMSO puede aumentar la difusión a través del estrato córneo por interrupción de la función de barrera, esto probablemente se produce a través de interacciones apróticas con lípidos intercelulares así como también puede incluir la distorsión reversible de cabezas de lípidos que producen una disposición de embalaje más permeable.

Además de lo anterior, se sabe puede tener efecto en agentes menos solubles en combinación con una variedad de vehículos ya que favorece un incremento de la penetración mediante el transporte de una concentración más alta de la sustancia a través de la barrera de membrana (Capriotti y Capriotti, 2012)

El DMSO es comúnmente usado en medicina veterinaria como bálsamo, sólo o en combinación con otros ingredientes, en este último caso el DMSO es usado como solvente para acarrear los otros ingredientes a través de la piel. Además, en caballos DMSO es usado vía intravenosa sin combinación o en combinación con otras drogas, para el tratamiento en el incremento de la presión intracraneal y/o edema cerebral. (Schleining y Reinertson, 2007a; 2007b).

Numerosos estudios han demostrado que el DMSO aumenta la permeabilidad de la piel en los seres humanos y animales (Sweeney y cols. 1966; Astley y Levine, 1976; Malten y Den Arend, 1978). La concentración de DMSO determina el grado de cambio en la permeabilidad y la eliminación del disolvente en la recuperación parcial o completa (Astley y Levine, 1976)

El DMSO se ha utilizado en varias situaciones terapéuticas en humanos. En 1978 recibió la aprobación por la *Food and Drug Administration* (FDA) de Estados Unidos de América para su uso en el tratamiento de la cistitis intersticial, mediante instilación intravesical (Parkin y cols. 1997). Sus efectos no parecen estar relacionadas con una liberación de histamina a partir de mastocitos (Stout y cols. 1995). Se ha utilizado con éxito en tratamiento: dermatológico (Hsieh y cols. 1987; Burgess y cols. 1998), urinario (McCammon y cols. 1998), pulmonar (Iwasaki y Haman, 1994), en amiloidosis (Morassi y Massa, 1989), enfermedades gastrointestinales (Salim, 1992), el DMSO atraviesa la barrera hematoencefálica

(Broadwell y cols. 1982) y ha sido eficaz en el tratamiento de edema cerebral traumático (Ikeda y Long, 1990). Se ha utilizado también en el tratamiento de trastornos musculoesqueléticos (Rosenstein y cols. 1999; Zuckner y cols. 1967) adenocarcinoma pulmonar (Goto y cols. 1996), enfermedades reumatológicas (Abdullaeva y Shakimova, 1989), prostatitis crónicas (Shirley y Stewart, 1978), enfermedades dermatológicas (Guerrey cols. 1999), esquizofrenia (Smith, 1992) y como un analgésico tópico (Kingery, 1997). Adicionalmente, se ha sugerido para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Regelson y Harkins, 1997).

2.3 Toxicología del DMSO

Además de todo lo mencionado anteriormente para aplicaciones farmacológicas en el tratamiento de diferentes patologías, cabe mencionar que también se han reportado varios efectos secundarios sistémicos adversos por la utilización del DMSO, como náuseas, vómitos (Davis y cols. 1990), diarrea (O'Donnell y cols. 1981), hemólisis (Samoszuk y Reid, 1983), reacciones anafilácticas que se manifiestan con erupciones cutáneas, enrojecimiento y ocasionalmente broncoespasmo (Stroncek y cols. 1991), insuficiencia renal (Smith y cols. 1987), hipertensión diastólica y sistólica (Hameroff y cols. 1983), bradicardia, bloqueo cardíaco (Styler y cols. 1992); rara vez, edema pulmonar o paro cardíaco (Baum y cols. 1992).

Otros efectos secundarios de DMSO incluyen; aliento con olor a ajo y sabor en la boca debido a la excreción pulmonar de un pequeño porcentaje de DMSO como dimetil sulfuro (Jacob y Herschler, 1983); su aplicación tópica, aunque bien tolerada, puede causar leve ardor local temporal (Bertelli y cols. 1995), erupciones en la piel y prurito (Swanson, 1985). Se ha informado de un caso de sulfohemoglobinemia después de la aplicación dérmica de DMSO en el tratamiento de la cistitis intersticial con fatiga, cianosis y disnea con ejercicio leve (Burgess y Hamner, 1998).

El efecto secundario mejor documentado de tratamiento con DMSO es la hemólisis intravascular después de la infusión intravenosa de solución al 40% o mayor que puede resultar en la excreción urinaria de hemoglobina (Waller y cols. 1983). A pesar de una hemólisis transitoria dependiente de la dosis y que presenta hemoglobinuria, no se ha reportado ninguna alteración en la función renal (Muther y Bennett, 1980).

También se ha descrito hiperosmolalidad sérica en el control del aumento de la presión intracraneal con DMSO administrado por vía intravenosa (Wolf y Simon 1983); el mismo efecto también se observó en estudios *in vitro* en sangre humana (Santos y cols. 2002); sin embargo, el DMSO penetra la membrana celular y causa un aumento en la osmolaridad dentro y fuera de la célula, impidiendo cualquier hemólisis significativa debido a la formación de un gradiente osmótico (Franco y cols. 1983).

Una de las preguntas más importantes acerca de cualquier terapia medicinal, es la seguridad. Las reacciones adversas del DMSO son relativamente leves y pueden producirse en relación con su concentración y su modo de administración (Jacob y De la Torre, 2009).

La toxicidad aguda de DMSO es baja en los animales. La DL50 en humanos es de 1800 mg/kg en piel y de 606 mg/kg por vía intravenosa. La DL50 por vía oral en la Rata va desde 14.5 a 28 g/kg y la DL50 dérmica por encima de 40 g/kg, por vía intraperitoneal e intravenosa la DL50 en ratones, ratas y perros supera los 15 g/kg. Se ha demostrado que dosis letales agudas en animales de experimentación pueden producir taquipnea, inquietud, coma, hipertermia, y muerte súbita, también puede ocasionar la muerte después de varios días causada por insuficiencia renal (Jacob y Herschler, 1983).

El DMSO es un teratógeno experimental y también causa otros efectos reproductivos en animales de experimentación (Wexler y cols. 2005) sin embargo, hasta ahora no existe antecedentes que puedan explicar la influencia de DMSO en acción como agente teratogénico debido a la diversidad en los procedimientos experimentales empleados y los tipos de anomalías que esos estudios indican (Smith y cols. 1983).

Existe controversia sobre el aparente papel tóxico del DMSO en la rata, que se sabe puede tener efectos teratogénicos cuando se administra durante la primera semana de gestación induciendo anomalías fetales.

Sin embargo, el DMSO no se considera directamente embriotóxico y ha demostrado ser un crioprotector exitoso para semen y embriones de mamíferos (Pegg, 2007)

Investigaciones han reportado los efectos teratogénicos en varias especies de animales de experimentación. Caujolle y colaboradores (1967), observaron anomalías del desarrollo que incluyen: malformaciones de las extremidades, pico, ojos y celosomia en embriones de pollo inyectados con una solución de DMSO al 50%. Otros autores describieron anomalías como

exencefalia, microftalmia, costillas fusionadas y labio leporino en embriones de hámster cuyas madres fueron tratadas con una inyección de 2,5 g/kg o más de DMSO en el día 8° día de gestación (Gill, 1981).

Tanto Caujolle y colaboradores (1967) como Staples y Pecharo (1973) encontraron evidencias de embriones anormales (anencefalia, extremidades malformadas, y celosomia) en ratones inyectados intraperitonealmente con 5 g/kg/día o más de DMSO durante la segunda semana de gestación. Juma y Staples, (1967) reportaron un aumento en las resorciones de embriones de ratas que en los días 8° - 10° de la gestación fueron tratadas con 10.25 g/kg/día de DMSO al 90% sin embargo no causó efectos teratogénicos. Caujolle, (1967) observó un aumento en anomalías del desarrollo cuando administró diariamente DMSO (5-10 g/kg) desde el 6° hasta el 12° día de gestación. Caujolle, (1967) documentó que dosis orales diarias o dosis subcutáneas de 4 a 5 g/kg de DMSO administrados a conejas en los días 6° al 14° de gestación no causaron mortalidad embrionaria ni teratogenicidad; y según Staples y Pecharo, (1973) la mortalidad embrionaria aumenta con dosis subcutáneas de 3 g/kg en los días 8° al 11°, pero no tiene efectos teratogénicos.

Se han realizado varios estudios con el objeto del reconocer anomalías teratogénicas embrionarias y fetales en roedores (Tabla 3).

Tabla 3. Efectos teratogénicos y embriotóxicos en la rata (Smith y cols. 1983).

Dosis/concentración	Vía de administración	Efectos	Referencia
5-10 g/kg/d del 6°-12° día de gestación (50% DMSO)	Po. Ip.	Malformaciones del sistema nervioso, extremidades, mandíbula, celosomia y edema.	Caujolle, 1967
10.25 g/kg/d del 8°-10 ° día de gestación (90% DMSO)	Sc.	Disminuye el número de crías vivas, incremento de resorciones, ningún tipo de malformación grave.	Juma y Staples, 1967
10.25 g/kg/d del 8°-10° día de gestación (90% DMSO)	Ip.	No teratogénico.	Staples y Pecharo, 1973

Algunos estudios teratológicos sugieren que DMSO no es un teratógeno en mamíferos cuando se administra por vía oral y dérmica a dosis que no producen toxicidad materna

manifiesta, el DMSO no es un teratógeno en dosis bajas, independientemente de la vía de administración.

2.4 Efectos del Uso de DMSO como Vehículo de Agentes Teratógenos

Los efectos teratogénicos provocados por una única inyección del agente antimalárico pirimetamina o del agente antitumoral 6-mercaptopurina en ratas el día 13° de gestación se redujo por el pretratamiento con DMSO (Barilyak y cols. 1978). Sin embargo, en otro estudio el DMSO no intervino en la acción teratogénica de la pirimetamina (Anderson y Morse, 1966). Inyecciones del insecticida dieldrina (días 6° -14°) en ratones preñados resultó en toxicidad materna y fetal que se incrementó cuando se utilizó DMSO como vehículo (Dix y cols. 1977). La toxicidad embrionaria y fetal inducida por el metabolito fúngico (ácido secalónico) se redujo cuando se utilizó DMSO como vehículo (Reddy y cols. 1981). La mortalidad fetal y anomalías en hámsteres tratados con el insecticida tiram o disulfiram por vía oral en el día 7° u 8° de gestación se incrementaron cuando se usaron junto con DMSO (Robens, 1969).

Se evaluaron siete sustancias con capacidad teratogénica en embriones de pollo para determinar los efectos que podría tener el DMSO sobre el desarrollo y mortalidad. Los productos químicos probados en embriones de cuatro días de edad fueron: 3-acetilpiridina, 6-aminonicotinamida, bidrin, sulfanilamida, 3-amino-1, 2, 4-triazol, fisostigmina, y nicotina.

El DMSO no tuvo ningún efecto sobre la mortalidad de los embriones, sin embargo, hubo un aumento en los efectos teratogénicos cuando se usó en conjunto con sulfanilamida, una disminución cuando se utilizó junto a 3 acetilpiridina, 6-aminonicotinamida, 3-amino-1, 2, 4-triazol y no se registraron cambios en la combinación con fisostigmina y nicotina. (Landauer y Salam, 1972).

No hay antecedentes que puedan explicar la influencia del DMSO en acción como agente teratogénico debido a la diversidad en los procedimientos experimentales empleados y los tipos de anomalías que esos estudios indican (Smith y cols. 1983).

2.5 Dopamina y Receptores Dopaminérgicos

Las catecolaminas se caracterizan por un grupo catecol: un anillo bencénico con dos grupos hidroxilo al que está unido un grupo amina. Entre las catecolaminas está la dopamina,

la norepinefrina (noradrenalina) y la epinefrina (adrenalina). Todas las catecolaminas se sintetizan a partir del aminoácido L-Tirosina. Las catecolaminas se sintetizan principalmente en el cerebro, en la médula suprarrenal y en algunas fibras nerviosas simpáticas (Tresguerres, 2008).

La dopamina es sintetizada por neuronas específicas que tienen sólo las dos primeras enzimas de la ruta de biosíntesis: Tirosina Hidroxilasa (TH) y L-Dopa-descarboxilasa que actúan secuencialmente para la producción exclusiva de dopamina: las neuronas dopaminérgicas, que tras su estimulación química o eléctrica liberan dopamina en la sinapsis (García Sevilla y Meana, 1988).

Las catecolaminas juegan un papel clave en el metabolismo de nutrientes y la generación de calor corporal, estimulan no sólo el consumo de oxígeno sino también el consumo de combustibles, como la glucosa y los ácidos grasos libres, generando así calor. Estimulan la glucogenólisis y la degradación de los triglicéridos a los ácidos grasos libres (lipólisis). También tienen un papel en la regulación de la secreción de múltiples hormonas. Por ejemplo, la dopamina inhibe la secreción de prolactina, la norepinefrina estimula la secreción de GnRH y la epinefrina inhibe la secreción de insulina por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas (García Sevilla y Meana, 1988).

La dopamina es un neurotransmisor ampliamente distribuido en el sistema nervioso central y algunas zonas periféricas incluyendo el sistema cardiovascular y el sistema renal. En el cerebro la dopamina está involucrada en el control de los movimientos, la cognición, las emociones, la memoria, la recompensa y el mecanismo de la regulación de la secreción de prolactina por la hipófisis. Varias enfermedades se han relacionado con alteraciones de la transmisión dopaminérgica como trastornos neuropsiquiátricos y enfermedades neurodegenerativas, principalmente (Hoffmann y Lefkowitz, 1996). Los efectos fisiológicos de la dopamina son mediados por proteínas membranales que funcionan como receptores de señales químicas específicas, denominados receptores dopaminérgicos (RDA), que tienen expresión generalizada en todo el cerebro de los mamíferos (Rangel-Barajas y cols. 2015).

De acuerdo con Rangel y colaboradores (2015), los RDA pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G. Hay cinco subtipos de receptores de mamíferos que se dividen en dos familias según su estructura y de la respuesta biológica. La familia RDA1

incluye a los receptores RDA1 y RDA5, la familia RDA2 consiste en RDA2, RDA3 y RDA4. Los subtipos RDA1 están acoplados positivamente a la AC para inducir la acumulación intracelular del AMPc y la activación de la proteína quinasa (PKA) dependiente de AMPc (Rangel-Barajas y cols. 2015). En contraste, los RDA2 están acoplados negativamente a la AC, como resultado de su activación disminuye la acumulación de AMPc y ocurre la modulación de la actividad de PKA y sus efectores. La activación de este receptor está asociada también con otras vías de señalización e incluso, podría actuar de forma diferente dependiendo del área cerebral o bien, de acuerdo con las condiciones fisiológicas (Cooper y cols. 1995) (Figura 8).

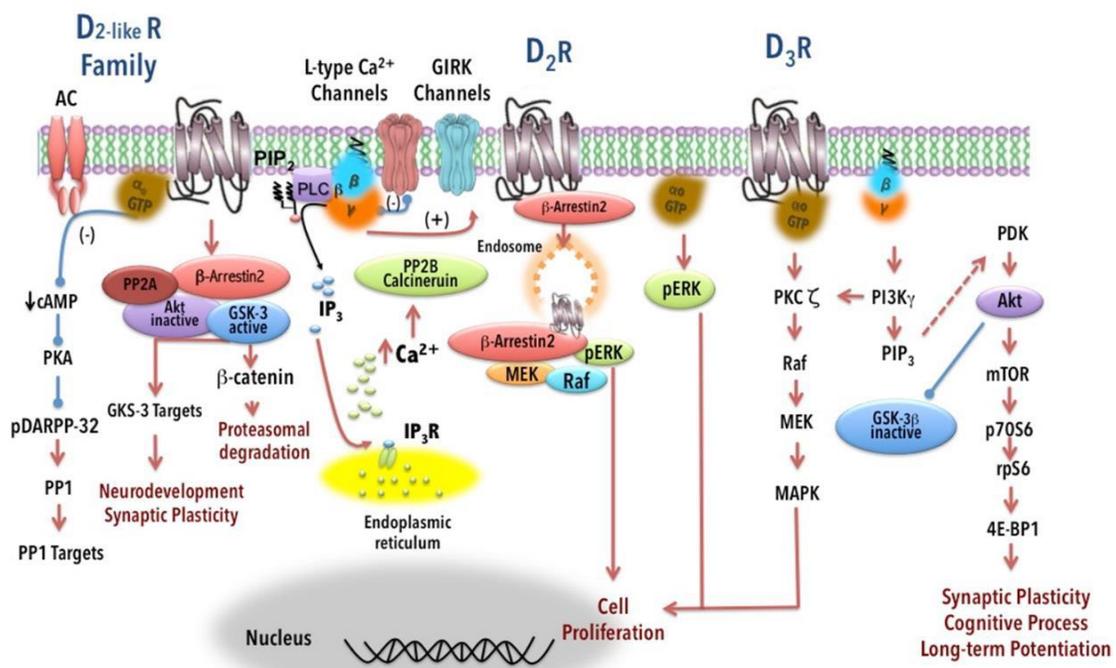


Figura 8. Señalización intracelular de los RDA2. Se producen por una activación compleja de señales intracelulares que están relacionadas con eventos como el neurodesarrollo, la degradación proteosomal, la proliferación celular y el proceso cognitivo. Efectos estimulantes se indican con flechas rojas, las flechas discontinuas rojas indican la activación plausible y los efectos inhibitorios en líneas azules indican el final con un círculo (Tomado y modificado de Rangel-Barajas y cols. 2015).

2.6 Receptores Dopaminérgicos y Ovulación

Recientemente se ha demostrado la importancia del sistema dopaminérgico ovárico, confirmando las observaciones de Domínguez y colaboradores (1987). Años atrás, se

comprobó que en ratas adultas el día del diestro-1 del ciclo estral, el sistema de *receptores dopaminérgicos* (RDA) es indispensable para que se presente la ovulación el día del estro esperado. Este estudio se realizó al administrar tres diferentes antagonistas dopaminérgicos: haloperidol antagonista inespecífico, sulpirida antagonista del *receptor tipo 2* (RDA2) y SCH23390 antagonista del *receptor tipo 1* (RDA1) dentro de la bursa ovárica en diferentes horarios a lo largo del ciclo estral. De manera interesante, el sulpirida y el haloperidol se comportaron de manera semejante “bloqueando” la ovulación cuando se administraba en la noche del estro, todo el diestro 1 y la mañana del diestro-2 en contraste al SCH23390, el cual tenía efectos solo en la mañana y noche del diestro-1. También se pudo mostrar el aumento en la expresión de TH en los animales administrados con haloperidol, lo que podría indicar un aumento en la síntesis de dopamina, mientras que la expresión de la fosfoproteína regulada por la dopamina y AMPc (DARPP-32) incrementó de igual manera, proteína que se activa por la interacción de la DA y el RDA1 (Venegas y cols. 2015).

La DA ha sido encontrada en el líquido folicular de folículos preovulatorios humanos en altas concentraciones y en cultivo de células de la granulosa de folículos humanos se ha mostrado la presencia de cuatro de los cinco subtipos de RDA, estando el receptor tipo 3 ausente. En el ovario de rata se encontró el ARNm de los receptores tipo I y tipo de II en cuerpos lúteos y tejido intersticial mientras que en los folículos ováricos su presencia es moderada (Rey-Ares y cols. 2007).

El ovario cuenta también con el sistema de recaptura de DA, en células de la granulosa humana se encuentra el transportador de dopamina (DAT), la catecol-O-metiltransferasa (COMT), las monoaminoxidasa A y B, además del transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2), mientras que en cepas de ratas Wistar y Sprague-Dawley se demostró que expresan tanto DAT como VMAT (Greiner y cols. 2008; Saller y cols. 2014).

2.7 Antagonistas de la dopamina

Los antagonistas dopaminérgicos juegan un papel importante como tratamiento contra diversos padecimientos psiquiátricos y neurológicos, pero también como herramienta de investigación, para entender el origen y desarrollo de estas enfermedades o para crear y mejorar las terapias que involucren a la dopamina (Bahena y cols. 2000).

2.8 Propiedades farmacológicas de la sulpirida

La *sulpirida*: (RS)-N-[(1-etilpirrolidin-2-il)-metil]-2-metoxi-5-sulfamoilbenzamida, es un neuroléptico y antipsicótico de la clase de las benzaminas, se utiliza en el tratamiento de una amplia gama de trastornos psicóticos. Es un antagonista dopaminérgico selectivo post sináptico de los receptores de la familia RDA2. No produce efectos secundarios extrapiramidales como otras benzaminas de uso clínico (Martín y cols. 1996).

El efecto de la *sulpirida* ocurre sobre estructuras límbicas, no interactúa significativamente con receptores de otros neurotransmisores. Se presenta como polvo cristalino casi blanco, insoluble en agua, ligeramente soluble en alcohol y cloruro de metilo y puede disolverse en ácidos minerales e hidróxidos alcalinos (Palomo, 1991).

Debido a la insolubilidad y baja afinidad a sus receptores, se dificulta el uso de algunos antagonistas dopaminérgicos en diferentes bioensayos, en ese aspecto el DMSO puede resultar de gran utilidad para infiltrar este tipo de agentes poco solubles.

3. JUSTIFICACIÓN

Se desconocen los efectos biológicos del DMSO aplicado en el tejido ovárico de la rata adulta. Muchos fármacos y herramientas farmacológicas con actividad fisiológica y fisioterapéutica comprobadas presentan problemas en su administración debido a su insolubilidad y frecuentemente deben ser administrados en un vehículo irritante o tóxico. El DMSO es un solvente que ha demostrado gran capacidad para disolver agentes insolubles en agua y además presenta propiedades biológicas aún no estudiadas que podrían colocarlo como un disolvente adecuado para infiltrar fármacos que actúen directamente a nivel de la matriz extracelular. Por tanto, se analizaron sus efectos directos cuando se aplica en tejido vivo buscando los signos de citotoxicidad por medio de histología convencional con microscopia de campo claro, además de analizar los efectos que pueden alterar la secreción de gonadotropinas o incidan sobre la ovulación, registrando para esto la duración del ciclo estral, así como el número de ovocitos liberados en el modelo de la rata adulta. Por otra parte, se probó su eficacia usándolo como vehículo de un antagonista dopaminérgico tipo 2 (*sulpirida*), con

actividad probada sobre esos parámetros y comparando los efectos del DMSO con estudios similares en donde se han usado otros vehículos para la administración del antagonista.

4. HIPÓTESIS

- 1) La administración local del DMSO en las bolsas ováricas de la rata adulta en los diferentes días del ciclo estral no tiene efectos citotóxicos, por lo que no induce cambios en el ciclo estral ni en la ovulación espontánea.

- 2) La administración local del DMSO como vehículo infiltrante del antagonista dopaminérgico sulpirida en las bolsas ováricas de la rata adulta en los diferentes días del ciclo estral no modifica los efectos reportados de sulpirida sobre el ciclo estral y la ovulación espontánea.

5. OBJETIVOS

5.1 General:

Evaluar los efectos del DMSO aplicado localmente en el tejido ovárico de la rata adulta sobre el ciclo estral y la ovulación espontánea.

5.2 Particulares:

- 1) Evaluar la citotoxicidad del DMSO administrado localmente dentro de las bolsas ováricas, en los diferentes días del ciclo estral de la rata adulta, sobre la duración del ciclo estral y la ovulación espontánea.

- 2) Probar el efecto del antagonismo específico sobre los receptores a dopamina tipo 2 con el antagonista sulpirida sobre la duración del ciclo estral y la ovulación espontánea utilizando al DMSO como vehículo infiltrante.

6. METODOLOGÍA

Se utilizaron 68 ratas hembras adultas de la cepa CII-ZV, con edades de 90-120 días y con peso corporal de 200-250 g, mantenidas en condiciones de iluminación controlada (14 h luz/10 h oscuridad; luces de las 05:00 h a las 19:00 h) y con libre acceso al agua y al alimento balanceado.

Con el fin de controlar las fases del ciclo reproductor, se realizaron los registros del ciclo estral por medio de frotis vaginales que se tomaron diariamente entre las 09:00 y las 10:00 h. Una vez que los animales presentaron tres ciclos consecutivos de cuatro días de duración (diestro-1, diestro-2, proestro y estro; ratas cíclicas) fueron asignados a los diferentes grupos experimentales. Todos los experimentos se ajustaron a la NOM-062-ZOO-1999.

6.1 Objetivo Particular 1: Evaluación de la citotoxicidad del DMSO administrado localmente dentro de las bursas ováricas, en los diferentes días del ciclo estral de la rata adulta, sobre la ovulación espontánea y la duración del ciclo estral.

Entre las 13:00-14:00 del Diestro-1, Diestro-2, Proestro o Estro, se formaron grupos de 6 animales cíclicos que fueron sedados con vapores de isoflurano y sometidos a una laparotomía dorso-bilateral a nivel de la región inguinal con el fin de exteriorizar los ovarios y realizar una microinyección dentro de cada bursa ovárica con 20 μ l de DMSO 100%. De modo semejante, un grupo sham recibió la microinyección con solución de agua destilada.

En todos los animales, el registro del ciclo estral se reanuda al día siguiente. Los animales fueron sedados con vapores de isoflurano y sacrificados entre las 09:00 y 10:00h de la mañana del siguiente estro vaginal (estro vaginal observado) se registró la duración del ciclo estral en cada grupo, se disecaron los ovarios y los oviductos donde se buscaron los signos de ovulación y se contó el número de ovocitos liberados. Como grupo control absoluto, se utilizaron 8 animales cíclicos que se sacrificaron en la mañana del estro esperado, luego de preentgar al menos tres cicloes estrales consecutivos de cuatro días (Control Intacto).

Los ovarios de todos estos animales fueron procesados para histología en campo claro, se incluyeron en bloques de parafina, se cortaron en micrótomos a 10 μ m de grosor (Gaviño y cols. 1992) y fueron teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina (Luna, 1975).

Se registraron los signos de inflamación o necrosis en los tejidos ováricos de acuerdo con la metodología propuesta por Yoshida y colaboradores (2009).

6.2 Objetivo Particular 2: Análisis del efecto del antagonismo específico del receptor a dopamina sobre la duración del ciclo estral y la ovulación espontánea utilizando al DMSO como vehículo infiltrante.

Otros grupos de 8 y 4 animales cíclicos respectivamente, fueron distribuidos en grupos experimentales para realizar la microinyección dentro de las bursas ováricas de un antagonista de los receptores dopaminérgicos tipo 2: sulpirida, usando DMSO como vehículo.

Entre las 13:00-14:00 del diestro-1, diestro-2, proestro y estro se formaron grupos de animales cíclicos que fueron sedados con vapores de isoflurano y sometidos a laparotomía dorso-bilateral a nivel de la región inguinal para exteriorizar los ovarios y realizar una microinyección dentro de cada bursa ovárica con 20 μ l de solución sulpirida (5 μ g/ μ L) en DMSO 100%.

De igual forma que en el experimento anterior, en todos los animales el registro del ciclo estral se reanuda al día siguiente. Los animales fueron sedados con vapores de isoflurano y sacrificados entre las 09:00 y 10:00h de la mañana del siguiente estro vaginal (estro vaginal observado) se registró la duración del ciclo estral en cada grupo, se diseccionaron los ovarios y los oviductos donde se buscaron los signos de ovulación y se contó el número de ovocitos liberados. Los ovarios de los animales fueron procesados para histología en campo claro para su posterior análisis y se registraron los signos de inflamación o necrosis en los tejidos ováricos.

6.3 Análisis Estadístico.

La duración del ciclo estral y el número de ovocitos liberados fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Los signos de alteración tisular o de citotoxicidad en los tejidos ováricos fueron registrados en tablas de contingencia y analizados con la prueba de Probabilidad Exacta de Fisher, según el caso. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias iguales o menores a $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

El peso corporal entre los grupos testigo y los grupos tratados con el DMSO o sulpirida fue semejante (Control Intacto (n=8): 218±5 gramos vs Agua Destilada (n=16): 247±4 gramos vs DMSO (n=24): 235±4 gramos vs Sulpirida (n=20): 235±4, n.s.). Por tal motivo, el peso de los ovarios y del útero se expresó en mg/100g peso corporal.

No se encontraron diferencias significativas en el peso de los ovarios ni del útero entre los diferentes grupos experimentales (Masa ovárica: Control Intacto (n=8): 26.3±1.6 mg vs Agua Destilada (n=16): 23.3±0.8 mg vs DMSO (n=24): 26.5±1.2 mg vs Sulpirida (n=20): 24.2±0.9, n.s. // Útero: Control Intacto (n=8): 163±7 mg vs Agua Destilada (n=16): 180±7 mg vs DMSO (n=24): 177±7 mg vs Sulpirida (n=20): 183±10, n.s.) (Tabla 4).

El análisis de la duración del ciclo estral entre los grupos tratados con agua destilada y DMSO no mostró ninguna alteración ni tampoco en el número de ovocitos liberados (Tabla 5). Sin embargo, el tratamiento con sulpirida indujo el retraso en la presencia del estro vaginal de casi 24 horas, pero no modificó el número de ovocitos liberados en este grupo respecto al grupo testigo tratado con DMSO o agua destilada (Tablas 6 y 7).

7.1 Histología del Ovario

No se observaron alteraciones significativas en la histología de los principales compartimentos de la corteza ovárica. Los folículos y cuerpos lúteos mostraron una apariencia normal, sin signos de necrosis u otra alteración que comprometiera su funcionamiento. La microinyección del DMSO mostró algunos signos de distensión vascular en la zona medular del ovario que son semejantes a los efectos de la microinyección con solución salina 0.9%, agua destilada o solución de ácido ascórbico 0.1% (Figuras 9 y 10).

Tabla 4. Peso relativo de los ovarios (mg/100 g peso corporal) \pm e.e.m. y peso relativo del útero (mg/100 g peso corporal) en los animales cíclicos que recibieron una microinyección de DMSO dentro de las bursas ováricas a las 13:00h de uno de los días del ciclo estral. Los animales fueron sacrificaron en la mañana del siguiente estro vaginal observado.

	Agua Destilada		DMSO (n=6)		Sulpirida	
	OI	OD	OI	OD	OI	OD
Estro	12.0 \pm 0.8	12.1 \pm 0.8	12.1 \pm 1.1	12.0 \pm 1.2	12.3 \pm 1.3	12.0 \pm 1.3
Diestro-1	10.2 \pm 0.3	10.4 \pm 0.5	12.0 \pm 0.7	12.4 \pm 0.8	11.1 \pm 0.6	12.3 \pm 0.6
Diestro-2	10.7 \pm 0.6	11.2 \pm 0.8	13.2 \pm 0.5	12.7 \pm 0.9	11.2 \pm 1.1	12.6 \pm 0.7
Proestro	13.2 \pm 1.5	15.2 \pm 0.6	16.5 \pm 1.6	14.9 \pm 1.9	12.3 \pm 1.9	13.9 \pm 1.4
	Masa Ovárica					
	Agua Destilada		DMSO		Sulpirida	
Estro	24.1 \pm 0.6 (n=4)		24.2 \pm 2.1 (n=6)		24.3 \pm 3.2 (n=4)	
Diestro-1	20.5 \pm 0.4 (n=4)		24.3 \pm 1.4 (n=6)		23.4 \pm 1.0 (n=8)	
Diestro-2	21.7 \pm 1.4 (n=4)		25.9 \pm 1.4 (n=6)		23.8 \pm 0.8 (n=4)	
Proestro)	28.4 \pm 1.6 (n=4)		31.4 \pm 3.4 (n=6)		26.3 \pm 3.2 (n=4)	
	Peso del Útero					
	Agua Destilada		DMSO		Sulpirida	
Estro	187 \pm 16 (n=4)		168 \pm 18 (n=6)		175 \pm 29 (n=4)	
Diestro-1	173 \pm 10 (n=4)		181 \pm 21 (n=6)		187 \pm 16 (n=8)	
Diestro-2	163 \pm 4 (n=4)		179 \pm 10 (n=6)		191 \pm 29 (n=4)	
Proestro	195 \pm 18 (n=4)		180 \pm 6 (n=6)		174 \pm 9 (n=4)	

Tabla 5. Duración el ciclo estral (días) $m \pm e.e.$ y del número de ovocitos totales liberados $\pm e.e.m.$ en los animales cíclicos que recibieron una microinyección de DMSO dentro de las bursas ováricas a las 13:00h de uno de los días del ciclo estral. Los animales fueron sacrificaron en la mañana del siguiente estro vaginal observado.

	Duración del Ciclo Estral		No. de Ovocitos Liberados	
	Agua Destilada	DMSO	Agua Destilada	DMSO
Estro	4.0 \pm 0.0 (n=4)	4.0 \pm 0.0 (n=6)	13.5 \pm 0.9 (n=4)	12.2 \pm 1.4 (n=6)
Diestro-1	4.0 \pm 0.0 (n=4)	4.0 \pm 0.0 (n=6)	14.8 \pm 1.0 (n=4)	12.0 \pm 0.9 (n=6)
Diestro-2	4.0 \pm 0.0 (n=4)	4.0 \pm 0.0 (n=6)	12.8 \pm 0.9 (n=4)	12.0 \pm 0.6 (n=6)
Proestro	4.0 \pm 0.0 (n=4)	4.0 \pm 0.0 (n=6)	12.8 \pm 0.6 (n=4)	11.8 \pm 1.0 (n=6)
			13.4 \pm 0.4 (n=16)	12.0 \pm 0.5 (n=24)

Tabla 6. Duración el ciclo estral (días) $m \pm e.e.$ y del número de ovocitos liberados $\pm e.e.m.$ en los animales cíclicos que recibieron una microinyección de DMSO + sulpirida dentro de las bursas ováricas a las 13:00h de uno de los días del ciclo estral. Los animales fueron sacrificaron en la mañana del siguiente estro vaginal observado.

	Duración del Ciclo Estral	No. de Ovocitos Liberados
	DMSO + Sulpirida	
Estro	4.0 \pm 0.0 (n=4)	11.5 \pm 0.5 (n=4)
Diestro-1	4.8 \pm 0.2* (n=8)	10.6 \pm 0.7 (n=8)
Diestro-2	4.0 \pm 0.0 (n=4)	11.0 \pm 0.4 (n=4)
Proestro	4.0 \pm 0.0 (n=4)	11.2 \pm 0.7 (n=4)
		11.0 \pm 0.3 (n=20)

Tabla 7. Número de ovocitos liberados izquierdos y derechos de cada uno de los grupos de animales cíclicos que recibieron una microinyección de agua destilada, DMSO o DMSO + sulpirida dentro de las bolsas ováricas a las 13:00h de uno de los días del ciclo estral. Los animales fueron sacrificados en la mañana del siguiente estro vaginal observado.

	Agua Destilada		DMSO	
	NOL OI	NOL OD	NOL OI	NOL OD
Estro	7.3±0.5 (n=4)	6.3±0.9 (n=4)	6.0±0.7 (n=6)	6.0±1.2 (n=6)
Diestro-1	8.2±0.8 (n=4)	6.8±0.5 (n=4)	5.6±0.4 (n=6)	6.5±0.6 (n=6)
Diestro-2	6.3±0.5 (n=4)	6.5±0.5 (n=4)	5.8±0.3 (n=6)	6.5±0.5 (n=6)
Proestro	6.8±0.9 (n=4)	6.0±0.4 (n=4)	6.3±0.7 (n=6)	5.5±0.6 (n=6)
	DMSO + Sulpirida			
	OI		OD	
Estro	6.0±0.4 (n=4)		5.7±0.5 (n=4)	
Diestro-1	5.1±0.6 (n=8)		5.2±0.3 (n=8)	
Diestro-2	5.7±0.5 (n=4)		5.2±0.5 (n=4)	
Proestro	5.5±0.3 (n=4)		5.7±0.7 (n=4)	

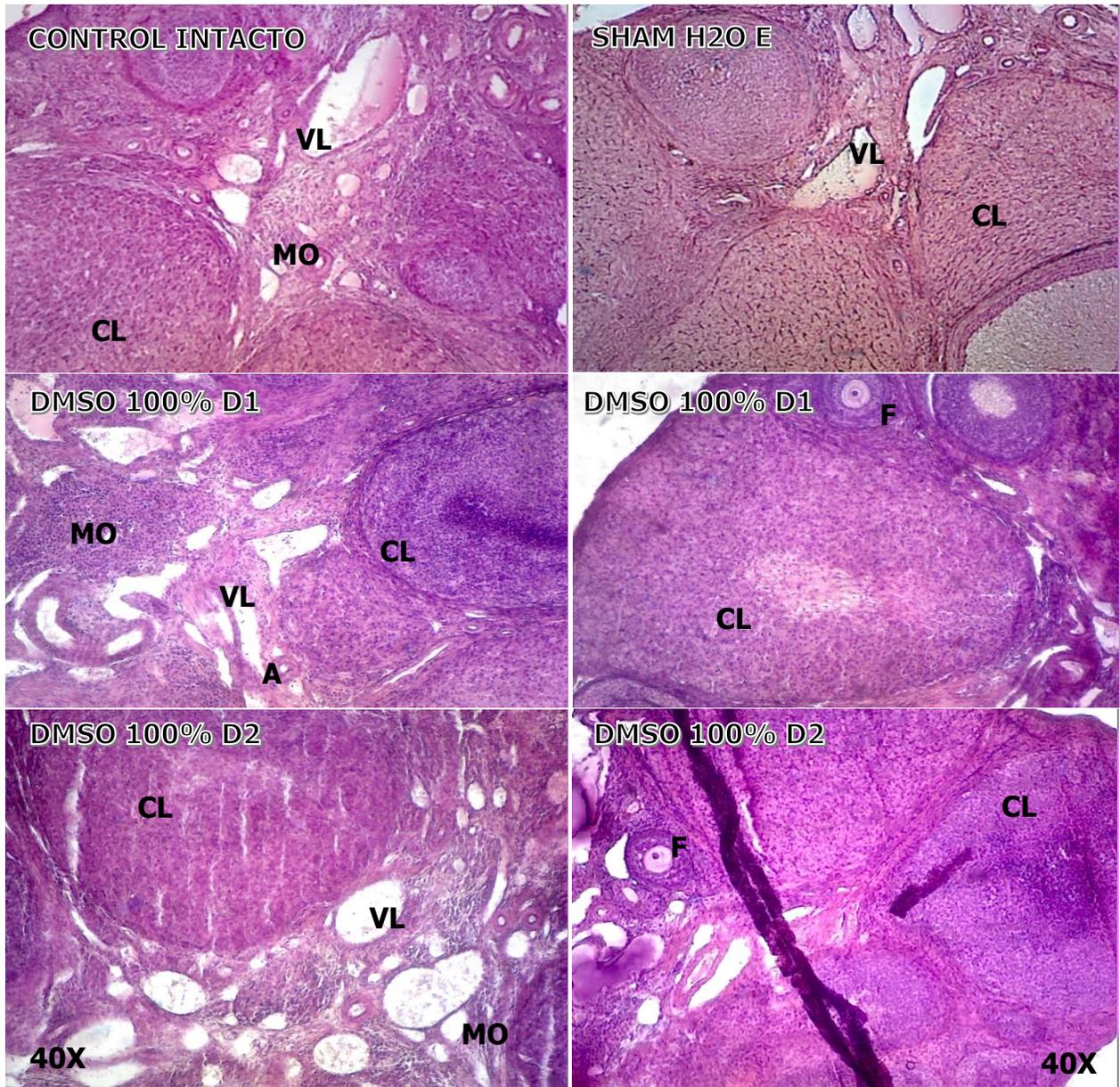


Figura 9. Imágenes que muestran el efecto de la MI con 20 μ L de DMSO 100%; 20 μ L SHAM (H2O) en el tejido ovárico de ratas que recibieron tratamiento en los diferentes días del ciclo estral. Aparentemente, los tejidos corticales no mostraron signos de alteración estructural; MO: médula ovárica; VL: vaso linfático; A: arteriola; CL: cuerpo lúteo; F: folículo; D1: diestro 1; D2: diestro2; E: estro.

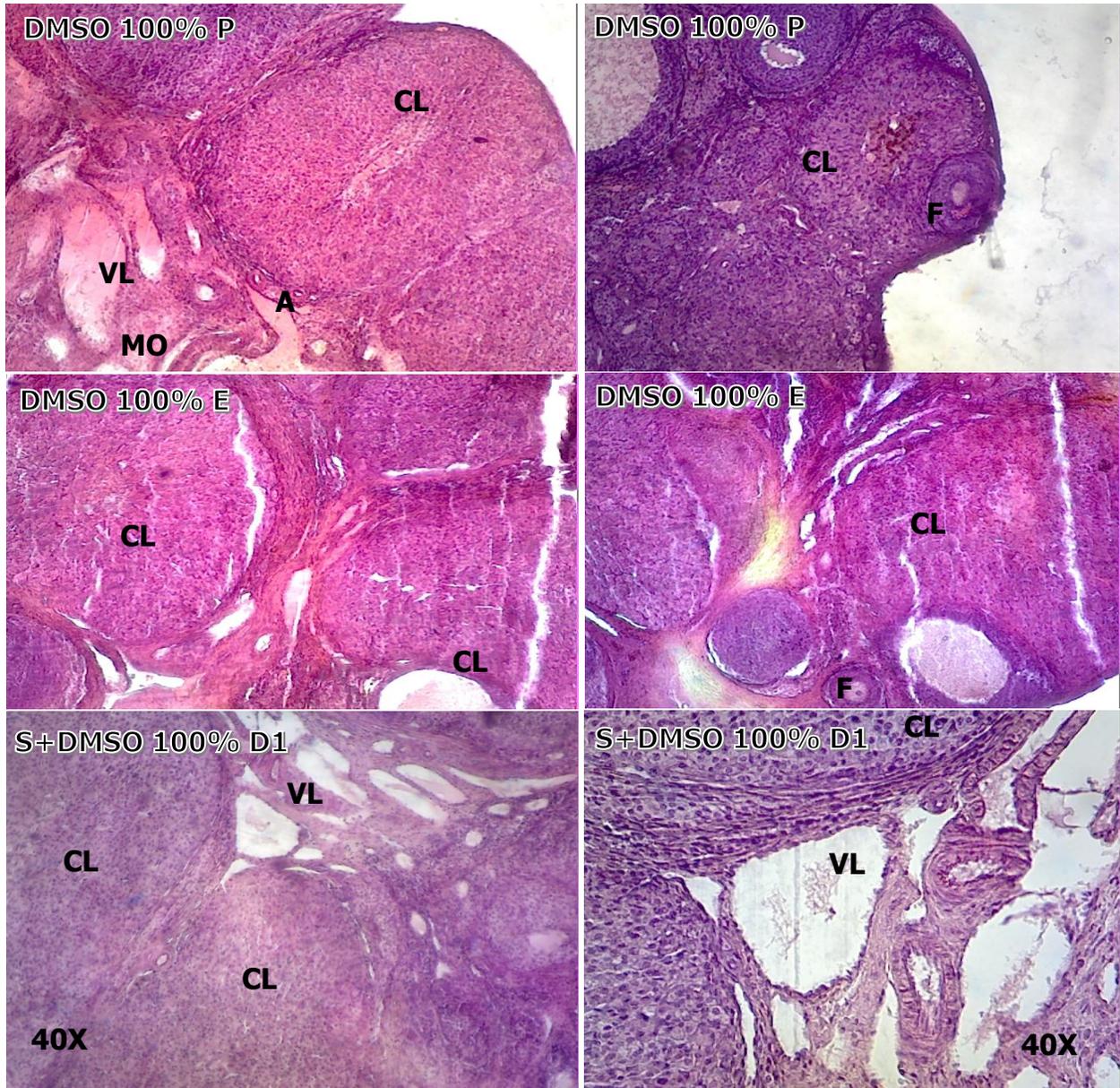


Figura 10. Imágenes que muestran el efecto de la MI con 20 μ L de DMSO 100%; 20 μ L de DMSO 100% + sulpirida en el tejido ovárico de ratas que recibieron tratamiento en los diferentes días del ciclo estral. Apparently, the cortical tissues did not show signs of structural alteration; MO: médula ovárica; VL: vaso linfático; A: arteriola; CL: cuerpo lúteo; F: folículo; D1: diestro 1; P: proestro; E: estro; S: sulpirida.

8. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que el DMSO no indujo cambios significativos en la estructura cortical de los ovarios. Aparentemente, la infiltración del disolvente a través de las bursas ováricas no tuvo efectos citotóxicos que comprometieran las funciones primordiales del ovario.

Se ha visto que el DMSO aplicado en terapias contra inflamación (Parkin y cols. 1997; Dujovny y col. 1983), infecciones virales (Aliaga y col. 1992) o bacterianas (Pottz y col. 1967) analgésicas (Kingery, 1997; Gaspar y col. 2011) y como un criopreservante (Pegg, 2007) ha mostrado efectos bastante seguros. Nuestros resultados al aplicarlo directamente a un órgano dentro de la cavidad corporal muestran que sus efectos son fácilmente controlables por los mecanismos naturales de detoxificación y eliminación de sustancias de desechos, donde el sistema linfático participa. Como se sabe, los sistemas linfáticos comprenden un sistema de transporte unidireccional para líquidos y proteínas al recolectarlos del espacio intersticial y devolverlos a la circulación sanguínea (Swartz, 2001).

Es un hecho notable que la técnica quirúrgica y la aplicación del DMSO administrado directamente sobre el tejido ovárico no modificara la secreción de gonadotropinas ni afectara las funciones primordiales de las gónadas. Es decir, el organismo de la rata se reajustó a sus funciones sustantivas de modo rápido. La aparente no alteración de las funciones ováricas, son un reflejo de la incidencia correcta de los esteroides sexuales en los centros superiores que controlan la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas.

Con base a lo anterior, el uso del DMSO como agente infiltrante pudiera ser ampliamente recomendado para analizar el papel fisiológico o farmacológico de sustancias químicas experimentales. En el presente trabajo, fue utilizado como vehículo para la infiltración del antagonista dopaminérgico sulpirida, su empleo indujo los mismos efectos a los observados en otros trabajos cuando se emplea ácido ascórbico 0.1% como vehículo (Venegas y col., 2015; Letras Luna, 2016; González Quiroz, comunicación personal) y se especula que tendría efectos semejantes a los vehículos utilizados para administrar otros antagonistas de la dopamina, por ejemplo, mezclas de alcohol agua, solución salina o agua destilada (Venegas y cols. 2015; González y cols. 2016., Venegas y cols. 2017; Guzmán y cols. 2018).

Con la finalidad de utilizarlo como un vehículo inocuo, es claro que falta realizar estudios complementarios que profundicen sobre el conocimiento del margen de bioseguridad con el que se puede emplear. Por ejemplo, se podrían comparar sus efectos respecto a otros vehículos convencionales apoyados con técnicas inmunohistoquímicas para analizar la presencia de indicadores de apoptosis, de expresión de proteínas clave en las cascadas de señalización intracelular que conducen a la biosíntesis de receptores a gonadotropinas, de los propios receptores a la dopamina, factores íntimamente ligados a la angiogénesis, por mencionar algunos. Así mismo, con técnicas simples de Biología Molecular, se podría realizar un análisis comparativo del eventual daño o alteración de la expresión génica de dichas proteínas.

Existen múltiples alternativas de trabajo científico en el campo de la Biología de la Reproducción y la Endocrinología Reproductiva Experimental donde este agente infiltrante pudiera ser utilizado. En nuestro caso, profundizar en el análisis de las funciones ováricas y de sus órganos (cuerpo lúteo y el folículo ovárico) o tejidos clave (células de la teca, de la granulosa, el ovocito o las células lúteas), requerirían del uso de un vehículo inocuo, que permita la solubilización de sustancias liposolubles y, lo más importante, en concentraciones mínimas que produzcan efectos fisiológicos claros y no artificiosos. El DMSO podría ser empleado como un vehículo eficaz para estudiar los efectos de fármacos bioactivos a menores dosis e incluso, en tiempos de reacción menores. De acuerdo con información novedosa sobre las funciones que realizan los diferentes compartimentos anatómico-funcionales del ovario, sería interesante probar sus efectos como agente infiltrante y la producción de especies reactivas al oxígeno y sus indicadores de estrés oxidativo, ya que se sabe que dichas sustancias están implicadas en la ovulación, pero también en diversas patologías ováricas.

Por otra parte, los efectos del antagonismo dopaminérgico en el tejido ovárico utilizando al DMSO como vehículo, reprodujeron hallazgos previos sobre la alteración de las señales neuroendocrinas y endocrinas que conducen a la ovulación espontánea. De este modo, Venegas y colaboradores (2015) estudiaron los efectos de la microinyección de la sulpirida y de otros antagonistas de la dopamina, a través de la bursas ováricas sobre la ovulación espontánea en ratas con ciclo estral regular de cuatro días de duración y sus resultados mostraron un desfasamiento del estro con un retraso neto de un día, lo que coincide con

nuestros datos, incluso comparado con el modelo del animal hemicastrado (Letras y cols. 2016).

Las causas del retraso del estro vaginal pueden ser explicadas por la alteración o interrupción de los esteroides sexuales que actúan al nivel del sistema nervioso central y del hipotálamo. De algún modo, en los animales con el antagonismo del receptor dopaminérgico tipo 2, la vida del cuerpo lúteo se mantiene veinticuatro horas más de lo esperado, es decir, la progesterona mantiene sus efectos inhibitorios sobre los centros que conducen a la descarga fásica de la GnRH y en consecuencia, la descarga preovulatoria de las gonadotropinas se retiene hasta que el sistema acumula suficientes estrógenos para que ejerzan sus efectos estimulantes sobre la secreción fásica de la GnRH y hasta ese momento, el ovario estará en condiciones de liberar a los ovocitos cuando se presenten los picos preovulatorios de las gonadotropinas.

Venegas y colaboradores (2015) demostraron que la inyección de GnRH en la tarde del proestro esperado induce la ovulación en el 100% en los animales con antagonismo dopaminérgico, aunque en el modelo del presente estudio no lo comprobamos.

9. CONCLUSIONES

- 1) La administración directa del DMSO sobre el tejido ovárico no afecta las principales funciones ováricas, estimadas por la duración del ciclo estral (indicador de la secreción de gonadotropinas y esteroides sexuales) ni la ovulación espontánea (número de ovocitos liberados).
- 2) La administración del DMSO como vehículo de la sulpirida indujo efectos semejantes a los observados en otros modelos experimentales donde se han utilizado otros vehículos, es recomendable como agente infiltrante de antagonistas de la dopamina.

10. PERSPECTIVAS

Con base en los hallazgos del presente estudio sobre el margen de seguridad que el DMSO como vehículo infiltrante para el uso experimental de antagonistas de la dopamina, y quizá otros fármacos, que por su naturaleza química son escasamente solubles en disoluciones

acuosas, hace falta realizar más pruebas experimentales para promover su utilización. Es muy probable que su uso como vehículo permita facilitar el manejo, calcular y/o economizar reactivos, utilizar dosis biológicamente óptimas para analizar el efecto de sustancias químicas administradas en tejidos u organismos vivos y prevenir la instalación de artificios experimentales que pudieran enmascarar los verdaderos efectos de las manipulaciones farmacológicas en los modelos experimentales.

En lo particular, a nuestro grupo de trabajo le interesa profundizar en el conocimiento del papel funcional que la dopamina ovárica y del hipotálamo desempeña tanto en la función de la gónada como a otros niveles del eje hipotálamo-adenohipófisis-ovario. Por tanto, sería interesante realizar un estudio profundo sobre los efectos agudos o a largo plazo que ocurren cuando el DMSO entra en contacto con los tejidos de la corteza ovárica o en el cerebro de la rata, mismos que forman parte esencial de la regulación de la función reproductiva. También se ha comenzado a explorar la función de la dopamina en el tejido testicular de la rata, debido a que tienen receptores a dopamina y aparentemente desempeñan un papel importante en la función testicular. En este contexto los posibles usos del DMSO como un vehículo infiltrante abren un amplio panorama para realizar diferentes estudios en el campo de Neuroendocrinología de la Reproducción.

11. REFERENCIAS

- Abdullaeva GK y Shakimova BS. (1989). An evaluation of the efficacy of treating rheumatoid arthritis with preparations for local use. *Reumatologiya (Mosk)* 4: 35-39.
- Aguilar E. (1992). Integración Neuroendocrina. En: *Fisiología Humana*. Capítulo 71. J.A.F. Tresguerres. (eds.) Editorial. Interamericana / McGraw-Hill. Madrid. Pp. 887-902.
- Alberts B, Jhonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walter P. (2008). Membran Estructure. En: *Molecular Biology of the Cell*. 5th Edition. Alberts B, Jhonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walter P (eds.) Editorial. Garland Science, New York. Pp. 617-650.
- Aliaga A, Armijo M, Camacho F, Castro A, Cruces M, Díaz JL, Fernández JM, Iglesias L, Ledo A y Mascaró, JM. (1992). A topical solution of 40% idoxuridine in dimethyl sulfoxide compared to oral acyclovir in the treatment of herpes zoster. A double-blind multicenter clinical trial. *Med Clin (Barc)* 98 (7): 245-9.
- Anderson E y Little B. (1985). The ontogeny of the rat granulose cell. En: *Proceedings of the Fifth Ovarian Workshop*. Toft DO y Ryan RJ. (eds.) Pp. 203-225.
- Anderson I y Morse LM. (1966). The influence of solvent on the teratogenic effect of folic acid antagonist in the rat. *Exp. Mol. Patho* 5: 134-145.

- Astley JP y Levine M. (1976). Effect of dimethyl sulfoxide on permeability of human skin in vitro. *J. Pharm. Sci* 65: 210-215.
- Bahena-Trujillo R, Flores G y Arias-Montaña J. (2000). Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central. *Biomed* 11 (1): 39-60.
- Baker H. (1968). The effects of dimethyl sulfoxide, dimethyl formamide, and dimethylacetamide on the cutaneous barrier to water in human skin. *J. Invest. Dermatol* 50: 283-288.
- Balakin KV, Savchuk P y Tetko V. (2006). In silico approaches to prediction of aqueous and DMSO solubility of drug-like compounds: trends, problems and solutions. *Curr. Med. Chem* 13: 223-241.
- Barilyak IR, Nemerzhitskaya LV y Turkevich AN. (1978). Antimutagenic and antiteratogenic properties of dimexide (DMSO). *Cytol. Genet* 12: 45-50.
- Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM y Peault B. (1992). Isolation of a candidate human hematopoietic stem cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89: 2804 - 2808
- Bertelli G, Gozza A, Forno GB, Vidili MG, Silvestro S, Venturini M, Del Mastro L, Garrone O, Rosso R y Dini D. (1995). Topical dimethyl sulfoxide for the prevention of soft tissue injury after extravasation of vesicant cytotoxic drugs: a prospective clinical study. *J. Clin. Oncol* 13: 2851-2855.
- Blake AC. (1999). Gonadotropin secretion, control of. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Tomo 2. Knobil E y Neill JD. (eds). Editorial. Raven Press, New York. Pp. 528-552.
- Borgioli L. (2007). Disolventes de baja toxicidad. Relación Técnica redactada por n.s. Responsable Técnico Científico de Productos y Equipos para la Restauración. CTS España. Getafe, Madrid. Reporte de Revisión 19/11/07. Pp. 1-7.
- Brisson P. (1974). Percutaneous absorption. *CMA Journal* 110: 1182-1185.
- Broadwell RD, Salzman M y Kaplan RS. (1982). Morphologic effect of dimethyl sulfoxide on the blood-brain barrier. *Science* 217: 164 -166.
- Brunton L, Chabner B y Knollman B. (2012). Transportadores de membrana y respuesta a los fármacos. En: *Goodman y Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 12th Edition. Giacomini KM y Sugiyama Y. (eds.) Editorial. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México, D.F. Pp. 89-123.
- Bulum SE y Adashi EY. (2008). The physiology and pathology of the female reproductive axis: Ovary. En: *Williams Text Book Of Endocrinology*. Section 5. Chapter 16. Kronenberg, M. (eds.) Pp. 541-614.
- Burgess JL, Hamner AP y Robertson WO. (1998). Sulfhemoglobinemia after dermal application of DMSO. *Int. J. Dermatol* 37: 949-954.
- Cartwright J y Moreland S. (2008). Female reproductive system. En: *Endocrine Disruption: A Guidance Document For Histologic Evaluation Of Endocrine And Reproductive Tests*. Part 3. Odum. J. (eds.) OECD Guidelines for the testing of chemicals Deraft13, May 8 2008. <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/43754782.pdf>
- Caujolle FME, Caujolle DH, Cros SB y Calvet MMJ. (1967). Limits of toxic and teratogenic tolerance of dimethyl sulfoxide. *Ann.N.Y. Acad. Sci* 141: 10-126.
- Chakrabarti R y Schutt E. (2001). The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides. *Nucleic Acids Research* 29: 2377-2381.

- Childs GV. (1999). Gonadotropes. En: Encyclopedia of Reproduction. Tomo 2. Knobil E y Neill JD. (eds.) Editorial. Raven Press, New York. Pp. 498-506.
- Cooper DM, Mons N y Karpen JW. (1995). Adenyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature*. 374: 421-424.
- Counis R. (1999). Gonadotropin biosynthesis. En: Encyclopedia of Reproduction. Tomo 2. Knobil E y Neill JD. (eds.) Editorial. Raven Press, New York. Pp. 507-520.
- Cruz ME, Castro J y Domínguez R. (1992). A comparative analysis of the neuroendocrine mechanisms regulating ovulation, affected by a unilateral implant of atropine in the preoptic-anterior hypothalamic area, in intact and hemiovariectomized adult rats. *J Endocrinology* 133: 205-210.
- Davis JM, Rowley SD, Braine HG, Piantadosi S y Santos GW. (1990). Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusión. *Blood* 75: 781-786.
- Devesa J, Esquifino A y Tresguerres JAF. (1992). Hormonas adenohipofisarias. En: *Fisiología Humana*. Capítulo 73. Tresguerres JAF. (eds.) Editorial. Interamericana/McGraw-Hill, Madrid. Pp. 913-927.
- Dix KM, Van der Pauw CL y McCarthy WV. (1977). Toxicity studies with dieldrin: teratological studies in mice dosed orally with HEOD. *Teratology* 16: 57-62.
- Domínguez CR, Chávez R y Cruz ME. (1991). La regulación del crecimiento y del desarrollo folicular. En: *Tópicos Selectos en Biología de la Reproducción*. UNAM-Porrúa. Mexico. Pp. 161-192.
- Domínguez CR, Gaitán CM, Méndez SA y Ulloa-Aguirre A. (1987). Effects of catecholaminergic blockade by haloperidol or propranol at different stages of the oestrous cycle on ovulation and gonadotrophin levels in the rat. *J Endocr* 113: 37-44.
- Domínguez R. (1993). Las secreciones periódicas y la regulación de la ovulación. En: *Comunicación Neuroendocrina: Bases Celulares y Moleculares*. SMCF A.C. y CONACYT, México. Pp 251-258.
- Dujovny M, Rozario R, Kossovsky N, Diaz FG y Segal R. (1983). Antiplatelet effect of dimethyl sulfoxide, barbiturates, and methyl prednisolone. *Ann NY Acad Sci* 411: 234-244.
- Erickson GF. (1995). The ovary: basic principles and concepts. En: *Endocrinology Metabolism*. Chapter 17. Felig, P. Boxtor, J.D y Frohman, L.A. 3th Edition. McGraw-Hill. New York. Pp. 973-1013
- Espey LL y Lipner TM. (1994). Ovulation. En: *The Physiology of Reproduction*. Chapter 13 Knobil, E. y Neill, J.D. (eds.) Editorial. Raven Press, New York. Pp. 725-780.
- Everett JW. (1988). Pituitary and hypothalamus: perspectives and overview. En: *The Physiology of Reproduction*. Chapter 26. Knobil E y Neill JD. (eds.) Editorial. Raven Press, New York. Pp. 1143-1160.
- Fink G. (1988). Gonadotrophins secretion and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. Chapter 32. Knobil E y Neill JD. (eds.) Editorial. Raven Press, New York. Pp. 1349-1377.
- Fink G. (1999). Neuroendocrine regulation of pituitary function: General principles. En: *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Conn, P. M. y Freeman, M.E. (eds.) Editorial. Totowa. Pp 107-134.
- Fitzgerald PL y Dinan TG. (2008). Prolactin and dopamine: what is the connection? A review article. *J Psychopharmacol* 22 (Suppl 2): 12-9.

- Franco RS, Weiner M, Wagner K y Martelo OJ. (1983). Incorporation of inositol hexaphosphate into red blood cells mediated by dimethyl sulphoxide. *Life Sci* 32: 2763-2768.
- Freeman ME. (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction: Reproductive Processes and Their Control*. 3th Edition. Volume. 2. Chapter 43 Neill JD. (eds.) Elsevier Academic Press. London. Pp. 2327-2387.
- García-Sevilla JA y Meana JJ. (2008). Transmisión catecolaminérgica. Fármacos agonistas catecolaminérgicos. En: *Farmacología Humana*. García-Sevilla JA y Meana JJ. (eds.) Editorial. Barcelona. Pp. 295-320.
- Gaspar M, Bovaira M, Carrera-Huesoc FJ, Querol M, Jiménez A y Moreno L. (2012). Efectividad de un protocolo de tratamiento tópico con dimetilsulfóxido al 50% en el síndrome de dolor regional complejo. *Elsevier, Farm Hosp* 36 (5): 385-391
- Gaviño G, Juárez J y Figueroa THH. (1992). Estudios Postmortem. En: *Técnicas Biológicas Selectas de Laboratorio y de Campo*. Capítulo 8. LIMUSA. México. Pp. 57-80.
- González K, Morán JL, Handal A y Reynoso A. (2016). El bloqueo farmacológico de los receptores ováricos a la dopamina altera el ciclo estral y la ovulación en la rata adulta. *Revista de Sistemas Experimentales* 3 (7): 27-45
- Goto I, Yamamoto-Yamagushi Y y Honma Y. (1996). Enhancement of sensitivity of human lung adenocarcinoma cells to growth-inhibitory activity of interferon α by differentiation inducing agents. *Br. J. Cancer* 74: 546-554.
- Greiner M, Paredes A, Rey-Ares V, Saller S, Mayerhofer A y Lara H. (2008). Catecholamine uptake, storage, and regulated release by ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 149: 4988-4996
- Guerrey P, Burgat V y Casali F. (1999). Le diméthylsulfoxyde (DMSO) usages experimentaux et toxicité. *Rev. Méd. Vét* 150: 391-412.
- Guzmán H, Nataly S, García O, Handal A y Morán JL. (2018). Antagonismo del receptor dopaminérgico tipo 1 en el tejido ovárico de la rata: efectos sobre la ovulación y la hipertrofia compensadora del ovario. *Journal Interdisciplinary Science UTSOE* 10: 12-27
- Hameroff SR, Otto CW, Kanel J, Weinstein PR y Blitt CD. (1983). Acute cardiovascular effects of dimethyl sulfoxide. *Ann. N.Y. Acad Sci* 411: 94-99.
- Hoffmann BB y Lefkowitz RJ. (1996). Catecolaminas, fármacos simpatomiméticos y antagonistas de los receptores adrenérgicos. En: "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica Goodman & Gilman". Capítulo. 10. 9th Edition Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW y Goodman Gilman A. (eds.) Editorial. McGraw-Hill/Interamericana. México. Pp 211-264.
- Hsieh SD, Yamamoto R, Saito K, Iwamoto Y, Kuzuya T, Ohba S, Kobori S y Saito K. (1987). Amyloidosis presented with whitening and loss of hair which improved after dimethyl sulfoxide (DMSO) treatment. *Jpn. J. Med* 26: 393-395.
- Ikeda Y y Long DM. (1990). Comparative effects of direct and indirect hydroxyl radical scavengers on traumatic brain edema. *Acta Neurochir. Suppl. (Wien)* 51: 74-76.
- Iwasaki T, Hamano T, Aizawa K, Kobayashi K y Kakishita E. (1994). A case of pulmonary amyloidosis associated with multiple myeloma successfully treated with dimethyl sulfoxide. *Acta Haematol* 91: 91-94.

- Jacob S y De la Torre C. (2009). Pharmacology of dimethyl sulfoxide in cardiac and CNS damage. *Pharmacological Reports* 61: 225-235.
- Jacob SW y Herschler R. (1983). Dimethyl sulfoxide after twenty years. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 411: 13-17.
- Jacob SW y Herschler R. (1986). Pharmacology of DMSO. *Cryobiology* 23: 14-27.
- Juengel JL, Melntush E y Niswender GD. (1999). The corpus luteum. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Tomo 1. Knobil E y Neill JD. (eds.) Editorial. Raven Press, New York. Pp. 703-708.
- Lawrence IE y Burden HW. (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the ovary. *Anat Rec* 196: 51-59.
- Juma MB y Staples RE. (1967). Effect of maternal administration of dimethylsulfoxide on the development of rat fetuses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 125: 567-569.
- Capriotti K y Capriotti JA. (2012) Dimethyl Sulfoxide. *J Clin Aesthet Dermatol* 5 (9): 24–26
- Kilen SM y Schwartz NB. (1999). Estrous cycle. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Tomo 2. Knobil E y Neill JD. (eds.) Editorial. Raven Press, New York. Pp. 127-135.
- Kingery WS. (1997). A critical review of controlled clinical trials for peripheral neuropathic pain and complex regional pain síndromes. *Pain* 73: 123-139.
- Landauer W y Salam N. (1972). Aspects of dimethyl sulfoxide as solvent for teratogens. *Dev. Biol* 28: 35-46.
- Letras D, Handal A, Díaz A y Morán JL. (2016). La Sulpirida reduce la ovulación compensadora pero incrementa la hipertrofia compensadora del ovario derecho en la rata hemi-ovariectomizada. *Revista de Sistemas Experimentales* 3 (7): 46-59.
- Luna LG. (1975). *Manual of histology staining methods of the Armed Forces Institute of Phatology*. McGraw-Hill Book Company. New York. Pp. 21 y 52.
- Malten KE y Den Arend J. (1978). Topical toxicity of various concentrations of DMSO recorded with impedance measurements and water vapor loss measurements. Recording of skin's adaptation to repeated DMSO irritation. *Contact Dermat* 4: 80-92.
- Martín LM, Caño A y Navarro JF. (1996). Efectos de la administración de dosis altas de sulpiride sobre la conducta agonista en ratones machos. *Psicothema* 8 (1): 161-166.
- McCammon KA, Lentzner NA, Moriarty RP y Schellhammer PF. (1998). Intravesical dimethyl sulfoxide for primary amyloidosis of the bladder. *Urology* 52: 1136-1138.
- Morassi P, Massa F, Mesesnel E, Magris D y D'Agnolo B. (1989). Treatment of amyloidosis with dimethyl sulfoxide (DMSO). *Minerva Med* 80: 65-70.
- Muther RS y Bennett WM. (1980). Effects of dimethyl sulfoxide on renal function in man. *JAMA* 244: 2081–2083.
- Nagy MG, Góóz P, Horvath MK y Toth EB. (1999). Prolactin secretion. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Tomo 4. Knobil E y Neill JD. (eds.) Editorial. Raven Press, New York. Pp. 60-66.
- Niswender GD y Nett TM. (1988). The corpus luteum and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. Chapter 13. Knobi E y Neill JD. (eds.) Editorial. Raven Press, New York. Pp 489-526.

- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Senasica, Dirección General de Salud Animal. SAGARPA.
- O'Donnell JR, Burnett AK, Sheehan T, Tansey P y McDonald GA. (1981). Safety of dimethyl sulphoxide. *Lancet* 1: 498.
- Palomo T. (1991). Bases neuroquímicas de la esquizofrenia. *Farmacología del SNC* 5: 5-16.
- Parkin J, Shea C y Sant GR. (1997). Intravesical dimethyl sulfoxide (DMSO) for interstitial cystitis a practical approach. *Urology* 49: 105-107.
- Pegg E. (2007). Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol* 368: 39-57.
- Pope DC y Oliver T. (1966). Dimethyl Sulfoxide (DMSO). *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci* 30: 3-8.
- Pottz GE, Rampey JH y Benjamin F. (1967) The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on antibiotic sensitivity of a group of medically important microorganisms: preliminary report. *Ann N Y Acad Sci* 141(1): 261-72
- Rammier D y Zaffaroni A. (1967). Biological implications of DMSO based on a review of its chemical properties. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 141: 13-23.
- Rangel-barajas C, Coronel I y Florán B. (2015). Dopamine Receptors and Neurodegeneration. *Aging and Disease* 6 (5): 349-68.
- Reddy CS, Reddy RV, Hayes AW y Ciegler A. (1981). Teratogenicity of secolonc acid D in mice. *J. Toxicol. Environ. Health* 7: 445-456
- Regelson W y Harkins SW. (1997) "Amyloid is not a tombstone" a summation. The primary role for cerebrovascular and CSF dynamics as factors in Alzheimer's disease (AD): DMSO, fluorocarbon oxygen carriers, thyroid hormonal, and other suggested therapeutic measures. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 826: 348-374.
- Rey-Ares V, Lazarov N, Berg D, Berg U, Kunz L y Mayerhofer A. (2007). A dopamine receptor repertoire of human granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol* 5: 40-49.
- Robens JF. (1959). Teratologic studies of carbaryl, diazinon, nores, disulfiram, and thiram in small laboratory animals. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 15: 152-163.
- Rosenstein ED. (1999). Topical agents in the treatment of rheumatic disorders. *Rheum. Dis. Clin. North Am* 25: 899-918.
- Salim AS. (1992). Allopurinol and dimethyl sulfoxide improve treatment outcomes in smokers with peptic ulcer disease. *J. Lab. Clin. Med* 119: 702-709.
- Salim AS. (1992). Oxygen-derived free-radical scavengers prolong survival in colonic cancer. *Chemotherapy* 3: 127-134.
- Salim AS. (1992). Role of oxygen-derived free radical scavengers in the management of recurrent attacks of ulcerative colitis: a new approach. *J. Lab. Clin. Med* 119: 710-717.
- Saller S, Kunz L, Berg D, Berg U, Lara H, Urra J, Hecht R, Pavlik R, Thaler CJ y Mayerhofer A. (2014). Dopamin in human follicular fluid is associated with cellular uptake and metabolism-dependent generation of reactive oxygen species in granulosa cells: implications for physiology and pathology. *Human Reproduction* 9 (3): 555-567
- Samoszuk M, Reid ME y Toy PT. (1983). Intravenous dimethyl sulfoxide therapy causes severe hemolysis mimicking a hemolytic transfusion reaction. *Transfusion* 23: 405.

- Sánchez-Criado JE. (1999). Fisiología del Ovario. Capítulo 75. Tresguerres JAF. (eds.) Editorial. Interamericana/McGraw-Hill, Madrid. Pp. 1020-1031.
- Santos NC, Figueira-Coelho J, Saldanha C y Martins-Silva J. (2002). Biochemical, biophysical and haemorheological effects of dimethyl sulphoxide on human erythrocyte calcium loading. *Cell Calcium* 31: 183-188.
- Schleining JA y Reinertson EL. (2007a). Evidence for dimethyl sulfoxide (DMSO) use in horses. Part 1: DMSO as a topical and intra-articular anti-inflammatory agent. *Equine Veterinary Education* 19: 545-546.
- Schleining JA y Reinertson EL. (2007b). Evidence for dimethyl sulfoxide (DMSO) use in horses. Part 2: DMSO as a parenteral anti-inflammatory agent and as a pharmacological carrier. *Equine Veterinary Education* 19: 598-599.
- Shirley SW, Steward BH y Mirelman S. (1978). Dimethyl sulfoxide in treatment of inflammatory genitourinary disorders. *Urology* 11: 215-220.
- Smith LH, Opresko DM, Holleman JW y Ross RH. (1983). Problem definition study of dimethyl sulfoxide (DMSO) and interactive health effects with other chemicals. En: "Oak Ridge National Laboratory (ORNL)". Union Carbide Corporation for the United States Department Energy / U.S. Army Medical Research and Development Command. Fort Detrick, Frederick. MD. Pp. 1-164.
- Smith DM, Weisenburger DD, Bierman P, Kessinger A, Vaughan WP y Armitage J. (1987). Acute renal failure associated with autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2: 195-201.
- Speroff L, Glass RH y Kase NG. (1999). The uterus. En: *Clinical, Gynecologic, Endocrinology and Infertility*. 6th Edition Speroff L, Glass R y Kase NG. (eds.) Pp. 123-158.
- Staples RE y Pecharo IM. (1973). Species differences in DMSO induced teratology. *Acta Univ. Carol. Med. Monogr* 61: 131-133.
- Stout L, Gerspach JM, Levy SM, Yun SK, Lad PM, Leach GE y Zimmern PE. (1995). Dimethyl sulfoxide does not trigger urine histamine release in interstitial cystitis. *Urology* 46: 653-656.
- Strauss II JF y Williams CJ. (2009). The synthesis and metabolism of steroid hormones. En: *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management*. 6 Ed. Jerome FD y Barbieri RL. (eds.) Editorial. Saunders Elsevier, Philadelphia. Pp. 155-190.
- Stroncek DF, Fautsch SK, Lasky LC, Hurd DD, Ramsay NKC y McCullough J. (1991). Adverse reactions in patients transfused with cryopreserved marrow. *Transfusion*. 31: 521-526.
- Styler MJ, Topolsky DL, Crilley PA, Covalesky V, Bryan R, Bulova S y Brodsky I. (1992). Transient high grade heart block following autologous bone marrow infusion. *Bone Marrow Transplant* 10: 435-438.
- Swanson BN. (1985). Medical use of dimethyl sulfoxide (DMSO). *Rev. Clin. Basic Pharm* 5: 1-33.
- Swartz AM. (2001). The physiology of the lymphatic system. *Elsevier* 50 (1-2): 3-20
- Sweeney TM, Downes AM y Matoltsy AG. (1966). The effect of dimethyl sulfoxide on the epidermal water barrier. *J. Invest. Dermatol* 46: 300-302.

- Tresguerres JAF, Lopez-Calderon A y Martín AI. (2008). Estructura y función de la corteza suprarrenal. En: Fisiología humana 4Ed. Cap. 76. Dieguez C y Yturriaga R (eds.) Editorial.Madrid: McGraw-Hill. Interamericana. Pp. 20-33
- Van Voorhis BJ. (1999). Follicular development. En: Encyclopedia of Reproduction. Tomo 2. Knobil E y Neill JD. (eds.) Editorial. Raven Press, New York. Pp. 376-388.
- Venegas B, Juárez CE, Handal A y Morán JL. (2017). Efectos del bloqueo irreversible de los receptores dopaminérgicos del ovario sobre la ovulación espontánea de la rata adulta. Revista de Ciencias de la Salud 4 (11): 11-23.
- Venegas B, Padilla JF, Juárez CE, Morán JL, Morán C, Rosas-Murrieta NH, Handal, A y Domínguez R. (2015). Effects of ovarian dopaminergic receptor on ovulation. Endocrine 50: 783-96
- Vignes R. (2000). Dimethyl sulfoxide (DMSO) A “new” clean, unique, superior solvent. ASC Presentation National Meeting 8/20-8/24/00. Memories of Annual Meeting for American Chemical Society annual. August 20-24, Washington, DC.
- Vijayan E y McCann S. (1978). Re-evaluation of the role of catecholamines in the control of gonadotrophin and prolactin release. Neuroendocrinology 25: 150-165.
- Waller FT, Tanabe CT y Paxton HD. (1983). Treatment of elevated intracranial pressure with dimethyl sulfoxide. Ann NY Acad Sci 411: 286–292.
- Weick RF, Smith ER, Dominguez R, Dhariwal AP y Davidson JM. (1971). Mechanism of stimulatory feedback effect of estradiol benzoate on the pituitary. Endocrinology 8 (2): 293-301.
- Weiner IR, Findell RP y Kordon C. (1988). Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of LH and prolactin. En: Physiology of Reproduction. Chapter 28. Knobil E y Neill JD. (eds.) Editorial. Raven Press, New York. Pp. 1235-1282.
- Wexler P, Anderson B, Peyster A, Gad S, Hakkinen PJ, Kamrin M, Locey B, Mehendale H, Pope C y Shugart L. (2005). Dimethyl Sulfoxide. En: Encyclopedia of toxicology. 2th Edition. Gad, S.E. (eds.) Editorial. Academic Press. Pp. 51-52.
- Wolf P y Simon M. (1983). Dimethyl sulfoxide (DMSO) induced serum hyperosmolality. Clin. Biochem 16: 261-262.
- Yoshida M, Sanbuissyo A, Hisada S, Takahashi M, Ohno Y y Nishikawa A. (2009). Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. The Journal of Toxicological Sciences 34: 189-197.
- Zhang S. (1999). Female reproductive system. En: An Atlas of Histology. Chapter 13. Zhang S y Shu-xin. (eds.) Editorial. Springer. New York. Pp. 297-310.
- Zuckner, J. Uddin, J. y Ganter, Jr.G.E. (1967). Local application of dimethyl sulfoxide and DMSO combined with triamcinolone acetone in rheumatoid arthritis. Ann. N.Y. Acad. Sci 141: 555-559.