



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EVALUACIÓN DE PARÁMETROS REPRODUCTIVOS Y ENDOCRINOS EN UN MODELO
DE SÍNDROME METABÓLICO INDUCIDO EN RATAS ADULTAS LONG EVANS**

Tesis para obtener el título de
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
BIÓL. JESSICA ROMERO ROMO

DIRECTORA: DRA. EN C. BERENICE VENEGAS MENESES
CO DIRECTOR: DR. EN C. ALFONSO DANIEL DÍAZ FONSECA



Facultad de Ciencias Biológicas
BUAP

ENERO 2026

H. Puebla de Z. a 21 de enero de 2026

Asunto: Voto Aprobatorio

**Comité Académico del Posgrado
PRESENTE**

Por medio de la presente se hace constar que se revisó y aprobó la tesis titulada:

**“EVALUACIÓN DE PARÁMETROS REPRODUCTIVOS Y ENDOCRINOS EN UN MODELO
DE SÍNDROME METABÓLICO INDUCIDO EN RATAS ADULTAS LONG EVANS”**

Que presenta la estudiante **Jessica Romero Romo** con número de matrícula **223470522**, aspirante al grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**, de la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: **“Estructura y Funcionamiento de los Seres Vivos”**, notificamos que la tesis reúne los requisitos y se aprueba para su réplica oral en el examen de grado.

Por lo tanto, emitimos los **VOTOS APROBATORIOS** como miembros del **Comité de Jurado de Examen de Grado** como a continuación se indica:

Tutor Interno: Dra. En C. Lorena Milflores Flores

Tutor Externo: Dra. En C. Angélica Trujillo Hernández

Revisor: Dr. En C. Fabián Galindo Ramírez

Agradecemos de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.



Asunto: CARTA DE NO PLAGIO

Yo, **Jessica Romero Romo**, con número de estudiante **223470522**, adscrita a la Maestría en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Biológicas perteneciente a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, declaro bajo protesta de decir verdad que el trabajo titulado:

“EVALUACIÓN DE PARÁMETROS REPRODUCTIVOS Y ENDOCRINOS EN UN MODELO DE SÍNDROME METABÓLICO INDUCIDO EN RATAS ADULTAS LONG EVANS”

es de mi autoría y constituye producto original de mi propio esfuerzo intelectual y académico.

En tal sentido, cuando por necesidades propias del trabajo desarrollado y para clarificar la redacción, ha sido conveniente utilizar textos, imágenes, datos, tablas, diseños o gráficas que pertenecen a otros autores, se han agregado las correspondientes citas y referencias bibliográficas para remitir a la fuente original de donde se tomaron.

Asimismo, certifico que he respetado en todo momento las normas éticas y académicas relacionadas con el uso de información ajena y la propiedad intelectual.

Estoy consciente de que, en caso de detectarse plagio o fraude académico en el contenido de mi tesis, la institución académica está facultada para invalidar mi trabajo y retirar cualquier grado o reconocimiento obtenido, además de aplicar las sanciones correspondientes, conforme a la normativa vigente.

Me responsabilizo completamente por el contenido del presente trabajo y reafirmo mi compromiso con la integridad académica.

Atentamente



Jessica Romero Romo

Matrícula: 223470522

Maestría en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Correo: rr223470522@alm.buap.mx

EVALUACIÓN DE PARÁMETROS REPRODUCTIVOS Y
ENDOCRINOS EN UN MODELO DE SÍNDROME METABÓLICO
INDUCIDO EN RATAS ADULTAS LONG EVANS

Sabremos cada vez menos
qué es un ser humano.

JOSÉ SARAMAGO

Contenido

AGRADECIMIENTOS	IX
ABREVIATURAS	XIII
RESUMEN	XV
1. Introducción	1
2. Marco Teórico.....	3
2.1 Definición y fisiopatología del Síndrome Metabólico	3
2.2 Insulina.....	5
2.3 Resistencia a la insulina e hiperinsulinemia.....	7
2.4 Dislipidemia, arterosclerosis e hipertrigliceridemia	10
2.5 Tejido adiposo y obesidad abdominal	12
2.6 Fisiología reproductiva del ovario	15
2.7 Esteroidogénesis ovárica en humano y rata	20
2.8 Regulación del eje H-H-G en ratas hembra	25
3. Antecedentes	29
3.1 Modelos animales de inducción del Síndrome metabólico.....	29
3.2 Síndrome metabólico en la fisiología reproductiva de la rata hembra	31
4. Justificación.....	33
5. Pregunta de investigación.....	35
6. Hipótesis	35
7. Objetivo.....	35
8. Diseño experimental	36
9. Metodología.....	37
10. Resultados	44
11. Discusión.....	58
12. Conclusión	64
13. Referencias	65
ANEXO A	76
ANEXO B	77
ANEXO C	79
ANEXO D	81

Índice de figuras

Figura 1. Representación de la obesidad en mujeres en edad reproductiva	4
Figura 2. Representación del mecanismo de acción de la insulina en los receptores a insulina en las células del tejido adiposo	8
Figura 3. Estado hiperinsulinémico en sangre	9
Figura 4. Características principales que se presentan en pacientes con obesidad como parte del SM	12
Figura 5. Anatomía del ovario	16
Figura 6. Vía esteroidogénica para la síntesis de hormonas esteroideas a partir de colesterol	23
Figura 7. Interacción retroactiva del eje Hipotálamo Hipófisis Gónada en la liberación de hormonas esteroideas ováricas	26
Figura 8. Resultados. Inicio de la pubertad en ratas DNG y DHG	44
Figura 9. Resultados. Parámetros zoométricos en ratas DNG y DHG	45
Figura 10. Resultados. Curva PTOG y PTOI	47
Figura 11. Resultados. Índices de resistencia a la insulina	48
Figura 12. Resultados. Parámetros bioquímicos del SM	49
Figura 13. Resultados. Índice de adiposidad disfuncional de los grupos DNG y DHG	50

Figura 14. Resultados. Representación gráfica de la ciclicidad total en el ciclo estral de las ratas ..	52
Figura 15. Resultados. Ovulación	53
Figura 16. Resultados. Hormonas y receptores gonadotrópicos.....	54
Figura 17. Resultados. Hormonas esteroideas estradiol y testosterona y sus enzimas limitantes p450 aromatasa y 17beta hidroxisteroide deshidrogenasa en el ovario	56

Palabras clave

Dieta hiperglúcida; Resistencia a la insulina; Hiperandrogenismo; Disfunción reproductiva; Desregulación

AGRADECIMIENTOS

A la comisión revisora de este trabajo, la doctora **Lorena Milflores Flores**, la doctora **Angélica Trujillo Hernández**, y el doctor **Fabian Galindo Ramírez**, por tomarse el tiempo y cuidado de revisar cada proceso de este trabajo y brindar valiosas aportaciones que ayudaron a la mejora de este trabajo. Por haberme dado clases que sirvieron para nutrir mis conocimientos y aplicarlos a lo largo de este proyecto.

A mis directores de tesis: la doctora **Berenice Venegas Meneses** y el doctor **Alfonso Daniel Díaz Fonseca**. Por haber revisado minuciosamente cada detalle de la realización de este trabajo y siempre haberme instruido, guiado y enseñado no solo a nivel académico sino a nivel personal, a ser una mejor alumna, una mejor investigadora y también, una mejor persona regalándome una porción de todo el gran conocimiento que tienen académicamente y en la vida en general. Por haberme abierto las puertas a sus laboratorios con mucho cariño y haberme brindado todas las atenciones desde el primer día. Por ayudarme a mantenerme curiosa y siempre querer aprender más. Y por demostrarme que se siempre se puede llegar un paso más allá y lograr lo que uno se propone.

A mi familia, **mis padres, mis hermanos, Denis y Twinky** que siempre estuvieron ahí inspirándome, dándome ánimos y ayudándome a sacar este proyecto adelante con mucho amor y paciencia. Por enseñarme que si se puede y que el potencial que uno tiene dentro se ve reflejado a través del esfuerzo que se realiza día con día para ser mejor que ayer. Por no dejarme sola en este proceso y por todas las alegrías que me dieron para motivarme. Por estar conmigo en cada paso que doy, darme

mucho amor y cariño, y ser incondicionales en mi vida. Y por ser el significado más puro de familia, que nunca te abandona ni te olvida, siendo el pilar más importante para la realización de este trabajo, que, sin ellos, no hubiera sido posible.

A todos mis **amigos** que he hecho a lo largo de mi vida, aquellos amigos de más de quince años, aquellos que he hecho a lo largo de este proceso dentro y fuera de la universidad, y también aquellos que ya no están. Por darle alegría a mi vida y mucho buenos momentos. Por todas las pláticas que me han hecho ver más perspectivas y me han servido de inspiración. Por todos sus apapachos y las risas que han compartido conmigo. Por sus personalidades que han sido tantas que me han ayudado a entender un poco más la vida.

A todo el Laboratorio de Interacciones Bioquímicas y Moleculares Aplicadas, el **lab 330** que fue mi casa por dos grandes años y me permitió conocer mucha gente que siempre me brindó su mano y que compartieron conmigo largas jornadas de trabajo que se hicieron más amenas con su compañía. Por ser un templo de estudio y experimentación, y a su vez estar lleno de personas tan alegres que me dieron grandes convivencias que me llevo como experiencia para saber que existen grandes equipos de trabajo que no necesitan ser de la misma línea de investigación para orientarte, ayudarte y hacer aportaciones importantes y valiosas a tu trabajo.

Agradezco a **La Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI)**, ya que, durante la realización del presente trabajo de investigación, se me brindó el apoyo de la beca con número **4000225** durante el periodo agosto 2023 – agosto 2025, para realizar mis estudios de maestría.



Agradezco a todos los laboratorios que me permitieron trabajar en sus instalaciones para asegurar que la realización y terminación de este proyecto fueran exitosas:

**LABORATORIO DE INTERACCIONES BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES APLICADAS DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA BUAP**

**LABORATORIO DE BIOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DEL INSTITUTO DE
CIENCIAS DE LA BUAP**

LABORATORIO DE NEUROQUÍMICA Y CONDUCTA DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA DE LA BUAP



ABREVIATURAS

SM: Síndrome Metabólico

SOPQ: Síndrome de Ovario Poliquístico

IMC: Índice de Masa Corporal

RI: Resistencia a la Insulina

IR (α y β): Receptor a la insulina α y β

TG: Triglicéridos

HDL: Lipoproteínas de alta densidad (por sus siglas en inglés High Density Lipoprotein)

LDL: Lipoproteínas de baja densidad (por sus siglas en inglés Low Density Lipoprotein)

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad (por sus siglas en inglés Very Low Density Lipoprotein)

DNG: Dieta Normo Glúcida

DHG: Dieta Hiper Glúcida

DHG O: Dieta Hiper Glúcida Ovulantes

DHG N O: Dieta Hiper Glúcida No Ovulantes

DAI: Índice de adiposidad disfuncional (por sus siglas en inglés Dysfunctional Adiposity Index)

HHG: Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada

GnRH: Hormona Liberadora de Gonadotropinas (por sus siglas en inglés Gonadotropin Release Hormone)

FSH: Hormona Foliculo-Estimulante (por sus siglas en inglés Follicular-Stimulating Hormone)

LH: Hormona Luteinizante (por sus siglas en inglés Luteinizing Hormone)

FSHR: Receptor a la Hormona Foliculo-Estimulante (por sus siglas en inglés Follicular-Stimulating Hormone Receptor)

LHR: Receptor a la Hormona Luteinizante (por sus siglas en inglés Luteinizing Hormone Receptor)

E₂: Estradiol

ER (α y β): Receptor a estrógenos α y β

T: Testosterona

P450aro: Enzima aromatasa de la familia P450

17 β HSD1: Enzima 17-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 1

RESUMEN

El Síndrome Metabólico (SM) es una entidad clínica caracterizada por la presencia de múltiples desregulaciones metabólicas, entre las que destacan la resistencia a la insulina, la dislipidemia, la hiperinsulinemia, la hiperglicemia y la obesidad central o abdominal. Su aparición está asociada a factores dietéticos, ambientales y genéticos, siendo las dietas hipercalóricas, especialmente altas en carbohidratos, uno de los principales detonantes en la población moderna.

La prevalencia del SM se ha relacionado con variables como el sexo, la edad y la raza, alcanzando cifras de hasta 54.2% en mujeres adultas en etapa reproductiva, lo que lo convierte en un problema de salud pública de gran relevancia.

Diversos estudios han demostrado que el SM no solo afecta parámetros metabólicos, sino que también se vincula con alteraciones endocrinas y reproductivas, tales como la desregulación de hormonas esteroideas, la anovulación, la formación de múltiples quistes ováricos y la infertilidad. En modelos animales, particularmente en la rata hembra Long-Evans, se ha observado que la inducción del SM mediante dietas hiperglucídicas provoca una desregulación en las concentraciones séricas de testosterona y estradiol, asociada a la pérdida de ciclicidad y a la anovulación. Sin embargo, aún se desconoce con precisión el nivel de la síntesis hormonal en el que ocurre esta alteración.

El objetivo del presente trabajo fue analizar si el síndrome metabólico altera el ciclo estral, la ovulación y las concentraciones de gonadotropinas (FSH/LH), así como la expresión de sus receptores en el ovario, y determinar su relación con la síntesis de testosterona y estradiol a través de sus enzimas limitantes en la rata adulta Long-Evans.

Los resultados obtenidos muestran que el SM se manifiesta con hiperglicemia, hiperinsulinemia en ayuno, resistencia a la insulina y dislipidemia. Además, el modelo de rata hembra adulta Long-Evans presenta un índice de adiposidad disfuncional incrementado en individuos no obesos con SM. También se observó que el SM altera el ciclo estral, generando aciclicidad y anovulación, así como las concentraciones de gonadotropinas (FSH/LH) y la expresión del receptor de FSH en el ovario. Finalmente se observó que el SM induce estados de hiperandrogenismo, asociados a una desregulación en la síntesis de testosterona y estradiol.

Estos hallazgos demuestran cómo el SM, más allá de ser un trastorno metabólico, tiene un impacto directo sobre la fisiología reproductiva. La alteración del ciclo estral y de la función gonadotrópica evidencia una conexión entre el metabolismo energético y la regulación endocrina del ovario. El hallazgo de hiperandrogenismo asociado a la desregulación de la síntesis de las hormonas esteroideas permite generar un modelo experimental que explica fenómenos clínicos observados en mujeres con SM, como la infertilidad, la irregularidad menstrual y la predisposición al síndrome de ovario poliquístico.

Este trabajo contribuye al conocimiento científico al establecer un vínculo entre las alteraciones metabólicas y la disfunción reproductiva, así como proporcionar evidencia experimental que respalda la hipótesis de que el SM afecta la expresión de receptores gonadotrópicos y la síntesis hormonal en el ovario. También plantea un modelo animal confiable para estudiar la interacción entre metabolismo y endocrinología reproductiva y con ello abrir nuevas líneas de investigación orientadas al desarrollo de estrategias terapéuticas que aborden tanto las complicaciones metabólicas como las reproductivas del SM para fortalecer la perspectiva de que la salud metabólica y la salud reproductiva están profundamente conectadas.

1. Introducción

A nivel mundial, la prevalencia de la obesidad y las patologías asociadas han aumentado a un ritmo de proporciones pandémicas. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), México ocupa el segundo lugar en prevalencia de sobrepeso y obesidad a nivel mundial, sólo después de Estados Unidos de América. Las razones derivan de una combinación entre la predisposición genética, los factores sociales y ambientales, que conducen a la aparición de padecimientos como la hipertensión, el hígado graso, la diabetes tipo II y una variedad de trastornos conocidos como Síndrome Metabólico (SM) (Villalobos, 2016; Valenzuela et al., 2023).

El SM es una entidad compleja compuesta por la presencia de tres o más de los siguientes factores: obesidad abdominal, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad con valores bajos, triglicéridos y glucosa séricas en ayunas con valores altos, así como presión arterial elevada, donde la obesidad abdominal es el componente más prevalente del SM que favorece a presentar resistencia a la insulina y un estado proinflamatorio y protrombótico, que conduce al riesgo de desarrollar diabetes tipo II, hipertensión y otras condiciones crónicas (Vryonidou et al., 2015). Dentro de la población mundial actual, existe una prevalencia del SM que va del 12.5 al 31.4% dependiendo de los criterios utilizados para el diagnóstico y de factores tales como la edad, el sexo, la raza y el origen étnico (Noubiap et al., 2022).

En mujeres adultas en edad reproductiva, consideradas el grupo con mayor prevalencia de SM, este se encuentra presente en un 15.7% según la OMS, mientras que la Declaración provisional conjunta, JIS por sus siglas en inglés (Joint Interim Statement) menciona un 54.2%, contra la población masculina con un 11.5% según la OMS y un 47.7% según la JIS (Vryonidou et al., 2015; Noubiap et al., 2022). Por ello, si bien se conocen los factores que se presentan en el diagnóstico de SM, poco se sabe de la respuesta del cuerpo de las mujeres ante este padecimiento.

En la población mundial femenina obesa se ha encontrado además una relación estrecha entre la presencia de SM y afecciones de tipo reproductivas donde el nexo fundamental es la resistencia a la insulina, siendo estas afecciones de gran importancia médica por la cantidad de pacientes que las presentan. Una de las más estudiadas que también es la más presente actualmente en la mujer en

edad reproductiva, es el síndrome de ovario poliquístico (SOPQ), donde aproximadamente el 62% de las mujeres lo presentan en conjunto con el síndrome metabólico (Otaghi et al., 2019).

El SOPQ trae consigo problemas como desequilibrio hormonal tanto de andrógenos como estrógenos, así como la presencia de quistes ováricos, resistencia a la insulina e incluso hipertensión (Hossain et al., 2022)

Si bien se conoce la relación que pueden tener el síndrome metabólico con padecimientos reproductivos como el SOPQ, poco o nada se ha estudiado a nivel experimental sobre el detonante de los desbalances que estos síndromes pueden provocar a nivel endócrino en las mujeres, especialmente a nivel de la síntesis esteroidea tanto de andrógenos como estrógenos ováricos (Otaghi et al., 2019).

Los modelos animales murinos, específicamente ratas, representan un buen simulador dentro de la inducción de SM, debido a su crecimiento rápido y su facilidad para alimentarse con dietas basadas en los componentes nutricionales de las dietas humanas. El desarrollo de un modelo adecuado de SM utilizando ratas puede contribuir a la aplicación exitosa de los hallazgos de la investigación al entorno clínico. Actualmente se utilizan varios métodos para inducir el SM mediante la administración de una dieta con diversas composiciones, productos químicos o una combinación de ambos (Gunawan et al., 2021). Por su naturaleza, resulta conveniente utilizar modelos de rata capaces de adquirir el SM por medio de la administración de dietas basadas en la alimentación humana y que además manifiesten la presencia de marcadores tal como las desregulaciones esteroideas presentes en humanos. Es por ello por lo que el presente trabajo propone analizar si el síndrome metabólico altera el ciclo estral, la ovulación y las concentraciones de gonadotropinas (FSH/LH), así como en la expresión de sus receptores en el ovario, y determinar su relación con la síntesis de testosterona y estradiol en la rata adulta Long-Evans.

2. Marco Teórico

2.1 Definición y fisiopatología del Síndrome Metabólico

El SM, también conocido como síndrome de Reaven, síndrome X o síndrome de la resistencia a la insulina, es un conjunto de condiciones, caracterizado por afecciones como la resistencia a la insulina (RI), la obesidad abdominal, la hiperglicemia, la dislipidemia y la hipertensión arterial (Silva-Ochoa et al., 2023). Este conjunto de entidades, son promotores importantes en el desarrollo de comorbilidades crónicas como la diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares e incluso diferentes tipos de cáncer (Stocks et al., 2015).

El término de “síndrome metabólico” ha sido utilizado desde el año 2001 gracias a su caracterización por parte del National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III). A partir de su planteamiento, este síndrome ha sido reestructurado por diversas instituciones a lo largo de décadas, dependiendo los parámetros que consideran más relevantes, o incluso los valores que se consideran intrínsecos del SM en sangre y en cuanto a las mediciones corporales. De hecho, se tienen indicios desde la década de los años 20's, cuando Kylin estableció la relación entre la hipertensión, la hiperglicemia y la artritis conocida como “gota” (Silva-Ochoa et al., 2023). Finalmente, en 1988 Gerald Reaven estableció la relación entre la obesidad visceral y la RI dentro del SM. El llamó “síndrome X” a la agrupación de resistencia a la insulina-hiperinsulinemia, dislipidemia e hipertensión, una “nueva” entidad nosológica que posteriormente se conocería como “síndrome metabólico” (Reaven, 1988; Cornier et al., 2008; Silva-Ochoa et al., 2023).

Dependiendo de la institución, actualmente se han determinado diversas caracterizaciones del SM. De acuerdo con la definición más utilizada, la NCEP-ATP III ha establecido los siguientes marcadores para determinar la presencia del SM, dentro de los cuales se encuentran la presión arterial superior a 130/85 mmHg, triglicéridos (TG) en ayunas nivel superior a 150 mg/dl ($\geq 1,70$ mmol/L) o que el paciente esté recibiendo tratamiento farmacológico para la hipertrigliceridemia, nivel de colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL) en ayunas inferior a 40 mg/dl ($< 1,04$ mmol/L) en hombres o 50 mg/dl ($< 1,29$ mmol/L) en mujeres, o que se encuentre en tratamiento farmacológico para la hipercolesterolemia y glucosa en sangre en ayunas superior a 100 mg/dl ($\geq 5,6$ mmol/L). Esta definición es una de las más usadas para el diagnóstico del SM ya que incorpora

características claves de hiperglucemia/RI, obesidad visceral, dislipidemia aterogénica e hipertensión (Nwankwo et al., 2022). Por el caso contrario, la OMS y el Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina (EGIR) y La Asociación Americana de Endocrinología Clínica (AACE) establecieron un papel fundamental en la tolerancia a la glucosa alterada (TGA), la glucosa alterada en ayunas (GAA), y la RI determinando esta última como la causa de la presencia definitiva de SM, siendo que en ausencia de RI no se establece SM aunque el resto de los marcadores se encuentren (Yudkin et al., 2004; Shin et al., 2013; von Frankenberg et al., 2014; Nwankwo et al., 2022).

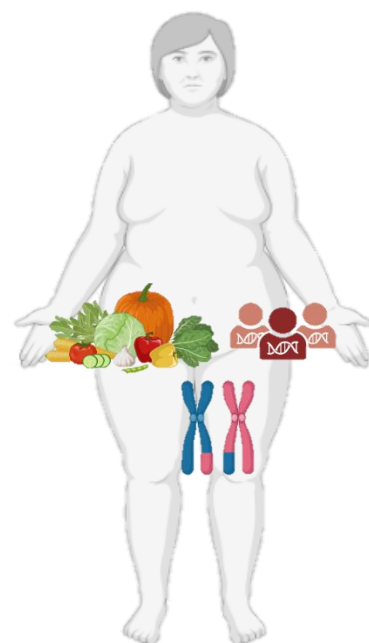
Si bien existen diferentes esquemas de diagnóstico para el SM, las vías metabólicas que conforman el mecanismo patogénico del SM aún no se han caracterizado del todo. Parte de los factores que pueden predisponer el desarrollo de este síndrome incluyen factores genéticos heredados, los hábitos de alimentación, el estilo de vida y la actividad física, así como el estado del microbiota intestinal (Fig. 1) (Niewiadomska et al., 2022).

De manera general, el SM se relaciona siempre con alteraciones en el metabolismo glucolipídico, estados proinflamatorios y protrombóticos, recordando que, entre alteraciones, siempre existirá la relación a través de la RI, que se favorece por la presencia de ácidos grasos elevados, derivados de una mala alimentación y muchas veces relacionado con el sobrepeso y obesidad. Esto causa la desregulación en la utilización de la glucosa y de su producción hepática (Laclaustra Gimeno et al., 2005; Silveira Rossi et al., 2022).

Asimismo, el metabolismo lipídico también se verá afectado por la presencia de la RI, causando la hipertrigliceridemia y las concentraciones bajas de HDL. Sorprendentemente el SM no deja de ser asociado a diversas patologías más que guardan una relación importante por la presencia del sobrepeso y la RI, tal como enfermedades del hígado graso, e incluso síndrome de ovario poliquístico (Silveira Rossi et al., 2022). Al ser un síndrome, este se relaciona inherentemente con

Figura 1 1

Representación de la obesidad en mujeres en edad reproductiva.



La prevalencia de la obesidad en pacientes con SM se debe a diversos factores ambientales, sociales y epigenéticos.

otras patologías o padecimientos, por ello, es complicado encontrar fisiopatologías individuales, debido a la sucesión de padecimientos donde uno desencadena a la otra (Laclaustra Gimeno et al., 2005; Silveira Rossi et al., 2022).

2.2 Insulina

Para poder comprender la fisiopatología del SM, es necesario conocer el estado de funcionalidad de cada uno de los componentes de dicho síndrome, tal como la insulina. Esta es una hormona peptídica liberada por los islotes β de Langerhans del páncreas. Esta hormona es producida en presencia de glucosa, pues se encarga de permitir el acceso de esta a las células y así ser aprovechada a manera de energía. La insulina permite el flujo y metabolismo de la glucosa en las células musculares y adipocitos, inhibiendo a su vez la gluconeogénesis en el hígado (Fu et al., 2013).

La insulina es un regulador fundamental del metabolismo. Esta se sintetiza como preproinsulina y se procesa a proinsulina. Posteriormente, la proinsulina se convierte en insulina y péptido C y se almacena en gránulos secretores para ser liberada cuando se requiera. La síntesis de insulina está regulada tanto a nivel transcripcional como traduccional. Las secuencias que actúan en cis dentro de la región 5' y los transactivadores que incluyen el gen de caja emparejada 6 (PAX6), el factor de transcripción homeobox-1 pancreática y duodenal (PDX-1) y MafA, y el gen de diferenciación neuronal 1 (NeuroD1) regulan transcripción de insulina, mientras que la estabilidad del ARNm de preproinsulina y sus regiones no traducidas controlan la traducción de proteínas (Fu et al., 2013). La secreción de insulina implica una secuencia de eventos en las células β que conducen a la fusión de los gránulos secretores con la membrana plasmática. Posteriormente se secretará principalmente en respuesta a la glucosa, mientras que otros nutrientes, como los ácidos grasos libres y los aminoácidos, aumentan la secreción de insulina inducida por la glucosa. Además, varias hormonas, como la melatonina, el estrógeno, la leptina, la hormona del crecimiento y el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1), también regulan la secreción de insulina. Por lo tanto, la célula β es un centro metabólico en el cuerpo que conecta el metabolismo de los nutrientes y el sistema endocrino (Fu et al., 2013; Saltiel, 2021; Violin et al., 2023).

La acción de la insulina es regulada a través del receptor a insulina (IR), una glicoproteína transmembranal con actividad proteica de tirosina quinasa. Los niveles de tirosina quinasa son reflejo de las concentraciones de insulina en suero, y aparentemente median la respuesta de la insulina a través de la fosforilación de la tirosina quinasa del receptor mismo y otros sustratos (Boucher et al., 2014).

El receptor de insulina es el prototipo de una familia de proteínas de membrana integrales homólogas compuestas por un dominio de unión a insulina extracelular que controla la actividad de una tirosina quinasa intracelular (Boucher et al., 2014). Este receptor se encuentra presente en prácticamente todos los vertebrados, donde la concentración de estos varía dependiendo el sitio, siendo unos 40 receptores presentes en eritrocitos circulantes, y más de 200,00 receptores en adipocitos y hepatocitos. Un gen de 150 kb en el cromosoma 19 compuesto por 22 exones codifica el prorreceptor humano para la insulina (Violin et al., 2023).

Durante la traducción, dos prorreceptores homólogos forman un dímero unido por puentes disulfuro que se divide para formar un tetrámero de dos dímeros. La insulina se une a las subunidades extracelulares para activar la tirosina quinasa en la porción intracelular de las subunidades transmembrana. El receptor activado recluta y fosforila sustratos celulares para iniciar la transducción de señales. Posteriormente la insulina presenta una unión selectiva que dirige la síntesis de dos isoformas del receptor de insulina (IR α e IR β), y por el ensamblaje postraduccion de híbridos entre estas isoformas y el receptor homólogo del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R). IR β se une a la insulina con alta afinidad, mientras que IR α se une a la insulina o al factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF2) con afinidad comparable (Fu et al., 2013; Boucher et al., 2014; Saltiel, 2021).

Las células β responden a muchos nutrientes de la circulación sanguínea, incluida la glucosa, otros monosacáridos, aminoácidos y ácidos grasos. La glucosa es evolutivamente el principal estímulo para la liberación de insulina en algunas especies animales, porque es un componente principal de los alimentos y puede acumularse inmediatamente después de la ingestión de alimentos. De hecho, en roedores y humanos, la amplitud de la secreción de insulina inducida por la glucosa es mucho mayor en comparación con la estimulada por proteínas o grasas (Suckale, 2008).

Si bien la glucosa es la fuente de combustible obligada para las neuronas, otras células, incluidas las células β , pueden utilizar fuentes de combustible alternativas durante breves períodos de inanición, una adaptación que podría predisponerlas a la gluco-lipotoxicidad. La glucotoxicidad implica daños estructurales y funcionales debidos a la hiperglicemia crónica, que se producen en las células β y en los tejidos periféricos donde actúa la insulina, estas alteraciones generan una menor secreción y acción de la hormona. Por otro lado, la lipotoxicidad se relaciona con daños similares a consecuencia de altos niveles de ácidos grasos libres (AGL), productos del catabolismo de los triglicéridos. Cuando las células β fallan crónicamente, entonces surgen padecimientos en los cuales se ve comprometida la eficiencia de la acción de la insulina (Schmitz et al., 2008).

2.3 Resistencia a la insulina e hiperinsulinemia

Un estado de insulinoresistencia se desencadena en la gran mayoría de los casos, cuando el estado hiperglucémico permanece por un tiempo prolongado. Cuando esto ocurre, las células musculares y del hígado dejan de responder a la acción de la insulina, por lo que ésta ya no cumple la función de metabolizar y promover la absorción y utilización de la glucosa. Al haber una cantidad excesiva de glucosa en sangre, las células β en un intento por disminuir estos niveles, producen más insulina, siendo esto contraproducente pues no cumple más su función en las células del hígado, músculos y tejido adiposo (Fernando Carrasco et al., 2013).

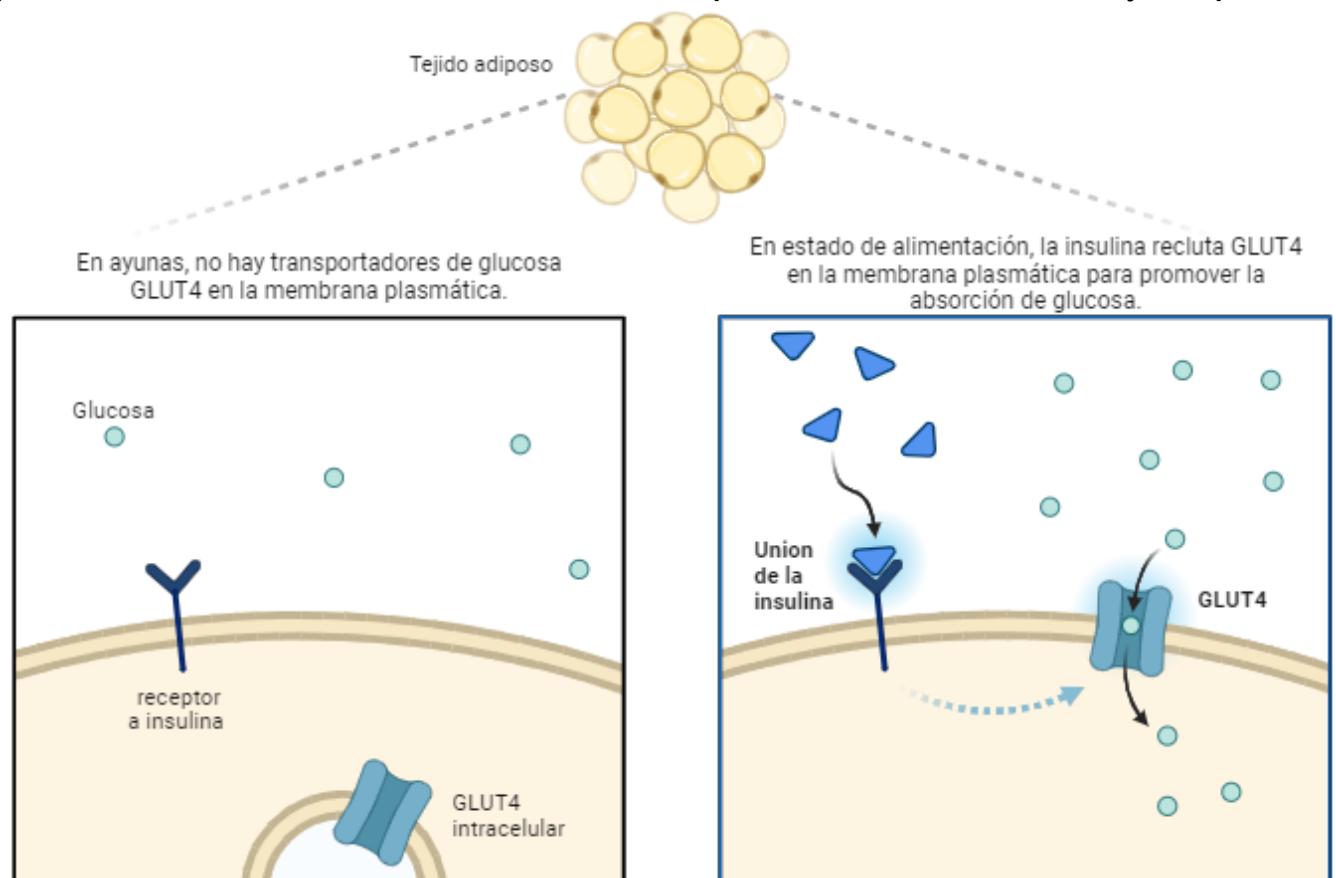
Los receptores a insulina $IR\alpha$ e $IR\beta$ presentes en las células musculares, del hígado o del tejido adiposo no responden adecuadamente al reconocimiento de la hormona insulina, por lo que la cascada de señalización que promueve el posicionamiento de los transportadores de glucosa 2 y 4 (GLUT2 y GLUT4) de las vesículas intracelulares a la membrana plasmática no ocurre, esto desencadena inevitablemente la no absorción de glucosa en la célula, y por ende la glucosa en sangre libre aumente sus concentraciones a niveles tales que el cuerpo tendrá que almacenar como glucógeno en el tejido adiposo (Galgani & Ravussin, 2012; Fernando Carrasco et al., 2013; Boucher et al., 2014).

Algunos de los factores que pueden estar desencadenando la falta de reconocimiento de los $IR\alpha$ e $IR\beta$ son la presencia de estrés oxidativo, es decir, una producción alta de especies reactivas de

oxígeno (ROS) a manera de radicales libres que afectan el funcionamiento directo de toda la célula desde el proceso de la producción a nivel transcripcional de los receptores a insulina, ocasionado por la alimentación, factores ambientales como el estrés o la falta de actividad física (Li et al., 2022). Los procesos inflamatorios crónicos tal como ocurre en presencia de sobrepeso y obesidad que pueden desencadenar a su vez mutaciones en las proteínas de la cascada de señalización que promueve el posicionamiento de GLUT 2 y GLUT 4 en la membrana plasmática (Fig. 2).

Figura 2 1

Representación del mecanismo de acción de la insulina en los receptores a insulina en las células del tejido adiposo.



En condiciones normales, la glucosa circundante en sangre induce la síntesis y secreción de insulina de las células beta-pancreáticas. Posteriormente se da el proceso de señalización y unión de la insulina a su receptor, que genera la cascada de señalización de las PI3K, ocurre un incremento en las concentraciones de calcio en el interior de la célula y esto induce la formación y posicionamiento de los transportadores de glucosa GLUT 4 hacia la membrana plasmática para poder transportar al interior de la célula la glucosa circundante. Este proceso se da siempre y cuando haya una correcta comunicación de la insulina con su receptor.

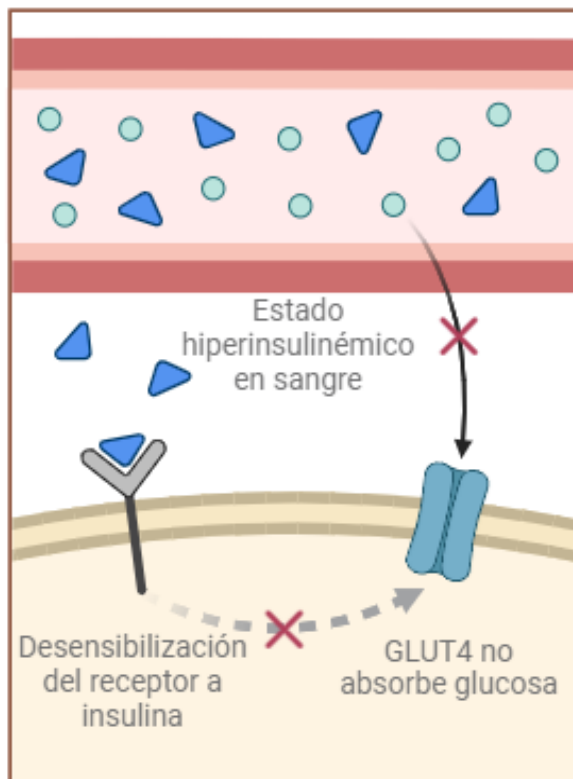
Otro factor importante es la mutación en los receptores a insulina ya sea por factores ambientales externos o por predisposición genética, o incluso el estrés en el retículo endoplásmico,

cuando existe una falla constante en la producción de la síntesis proteica, que puede afectar la integridad de cualquiera de las proteínas implicadas en la absorción de glucosa (Lee et al., 2022).

Si bien la RI es un factor determinante en la desregulación de la absorción de la glucosa, la resistencia a la insulina también puede provocar otro estado de desregulación como lo es la presencia de insulina abundante en el organismo por la falta de reconocimiento principalmente en las células del músculo y del tejido adiposo y su sobreexpresión ante una gran cantidad de glucosa en sangre. Esto puede derivar en otro padecimiento conocido como hiperinsulinemia (Nubiola et al., 2015).

Figura 3 1

Estado hiperinsulinémico en sangre



El receptor a insulina pierde sensibilidad a esta hormona, por lo que es incapaz de unirse, dejando libres grandes concentraciones de insulina en el suero sanguíneo. Esto consecuentemente altera el ingreso de la glucosa presente en suero sanguíneo hacia el interior de la célula al interrumpir la cascada de señalización que genera la formación y posicionamiento del transportador de GLUT 4 en la membrana plasmática. Esto genera un estado tanto de hiperinsulinemia como de hiperglicemia

La hiperinsulinemia derivada de la RI se conoce también como hiperinsulinemia compensatoria. Este estado de exceso de insulina en la sangre se relaciona completamente con el mal funcionamiento de los receptores a la insulina $IR\alpha$ e $IR\beta$, lo que conlleva al incremento en concentraciones de la hormona insulina en sangre, incapaz de promover la absorción de la glucosa por parte de las células. Este estado de hiperinsulinemia prolonga el estado de RI en el organismo, ocasionando un estado crónico de RI e hiperinsulinemia como si se tratara de un padecimiento cíclico (Fig. 3) (Madonna & De Caterina, 2012).

El almacenamiento de la glucosa en el tejido adiposo se debe a una constante alimentación alta en carbohidratos y su poca absorción por desregulaciones en el sistema de la absorción y utilización de la glucosa por parte de las células por acción de la unión de la insulina a sus receptores (Li et al., 2022). Sin embargo, la glucosa no es la única molécula capaz de almacenarse en el tejido adiposo y circular en cantidades abundantes en el organismo. Este almacenamiento

excesivo de glucosa en el tejido adiposo genera lipólisis aumentada a nivel de adipocito originando concentraciones elevadas de ácidos grasos libres. Este incremento de dichos ácidos causa una acumulación externa de grasa en el hígado, corazón, páncreas y músculo esquelético, entre otros. A nivel de hígado el influjo aumentado de ácidos grasos libres genera una producción y secreción aumentada de lipoproteínas de muy baja densidad, generando el nivel elevado de triglicéridos (Luengo Fernández et al., 2005).

2.4 Dislipidemia, arterosclerosis e hipertrigliceridemia

En el torrente sanguíneo circulan cuatro tipos principales de lípidos: colesterol, ésteres de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos. Dada la naturaleza hidrófuga de las grasas, es necesario un medio de transporte hasta los diferentes órganos, que son las lipoproteínas. Estas están compuestas por un núcleo que contiene triglicéridos y ésteres de colesterol, y una envoltura formada por colesterol libre, fosfolípidos y apolipoproteínas. Las apolipoproteínas sirven de interfase adicional entre el medio lipídico y acuoso, y participan como activadores o inhibidores de procesos enzimáticos del metabolismo de los lípidos (T. Zhang et al., 2019).

La dislipidemia es una patología en la cual se presenta una concentración elevada de lípidos en la sangre, dependiendo de los lípidos que se vean alterados, esta patología puede ser de naturaleza hipercolesterolemica o hipertrigliceridemia (“Consenso Multidisciplinar Sobre Dislipidemia Aterogénica,” 2013).

Por otro lado, la arteriosclerosis es un proceso inflamatorio en el que interactúan, a través de moléculas de adhesión, citoquinas, quimiocinas y factores protrombóticos, moléculas diferentes como las lipoproteínas, células del endotelio vascular, macrófagos, células del músculo liso, linfocitos T activados y plaquetas (Madonna & De Caterina, 2012).

Los triglicéridos son compuestos de glicerina unidos de forma covalente a tres cadenas de ácido grasos. Se almacenan en tejido adiposo y, cuando se necesita un aporte energético, experimentan lipólisis liberando ácidos grasos libres, que pasan a la circulación unidos a albúmina. Los ácidos grasos son transportados principalmente al hígado, músculo y corazón. El hígado es

también capaz de utilizarlos para sintetizar nuevos triglicéridos. Los ácidos grasos se diferencian entre sí por la longitud de su cadena y sus diferentes grados de saturación. Se distinguen dos tipos, ácidos grasos saturados y ácidos grasos poliinsaturados (Parhofer & Laufs, 2019; Packard et al., 2020).

Existe una relación fisiopatológica entre la elevación de los triglicéridos y la disminución de colesterol unido a HDL a través del metabolismo de las lipoproteínas que se desarrolla alrededor de la acción de las lipasas (lipoproteinlipasa LPL, lipasa hepática LH), de la lecitina-colesterol-aciltransferasa (LCAT), el cassette de enlace a adenosin trifosfato tipo A1 (ATP-binding-cassette-A1ABCA1), los receptores basureros del macrófago y del hígado (SR-A, SR-B1) y el receptor hepático de la lipoproteínas de baja densidad (LDL-r). Todos estos factores intervienen en el metabolismo de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), a través de su transformación a las de densidad intermedia (IDL) hasta las de baja densidad (LDL), y en el transporte principal de triglicéridos y colesterol a la periferia. La LCAT se encarga del transporte reverso del colesterol de nuevo al hígado gracias a las HDL. En este circuito, una proteína, la transportadora de éster de colesterol (CETP), tiene la capacidad de intercambiar triglicéridos por colesterol en las lipoproteínas (Luengo Fernández et al., 2005; Santos-Baez & Ginsberg, 2020; Vintimilla et al., 2023).

Las HDL aumentan sus triglicéridos, perdiéndolos después vía lipasas. Las HDL son más fácilmente eliminadas por vía renal, lo que disminuye su concentración en sangre y reduce la capacidad del organismo para lavar el colesterol de las lesiones arteriales. Por ello, en el SM se explica la presencia de elevaciones de triglicéridos asociados a HDL bajo y a la presencia de LDL que, si bien no se encuentran necesariamente en mayor cantidad, sí son más pequeñas y densas. Las personas con triglicéridos elevados al menos moderadamente son más obesas, tienen menores concentraciones de HDL y mayores de insulina, abundantes partículas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y más del triple de riesgo cardiovascular que los que tienen los triglicéridos normales (Luengo Fernández et al., 2005; Mosztabacher et al., 2020; Tang et al., 2022).

Parte de la problemática que implica la hiperinsulinemia, dislipidemia y un estado de aterosclerosis, es el almacenamiento excesivo de lípidos en los adipocitos. Un tejido adiposo con almacenamiento excesivo de triglicéridos genera un estado de inflamación crónico que desencadena

la obesidad, y esta a su vez representa un factor de riesgo en la aparición de enfermedades cardiovasculares, metabólicas y la aparición de diferentes tipos de cáncer (Busebee et al., 2023a).

2.5 Tejido adiposo y obesidad **Figura 4 1**

abdominal

El tejido adiposo, también conocido como tejido graso, es un tejido conectivo que se extiende a lo largo de todo el organismo y se compone principalmente de células llamadas adipocitos (Fig. 4) (Siiteri, 1987). Estas células también llamadas células grasa, se encargan principalmente del almacenamiento, así como mantenimiento de la homeostasis de los lípidos y el balance energético (Kershaw & Flier, 2004). Si bien se encargan de almacenar triglicéridos, también son capaces de liberar ácidos grasos libres en respuesta a los cambios

en la demanda energética (Boesch et al., 2023). Por su naturaleza de almacenamiento, estas células son capaces de crecer considerablemente dependiendo la cantidad de triglicéridos que almacenen, por lo que se asocian al crecimiento del tejido adiposo y con ello un estado inflamatorio ante un exceso de almacenamiento derivando en padecimientos como el sobrepeso y obesidad (Kershaw & Flier, 2004; Luengo Fernández et al., 2005).

El tejido adiposo es considerado como un órgano metabólico y endócrino muy activo con funciones complejas y esenciales. Si bien este tejido antes era considerado sólo como almacén de energía, actualmente se sabe que es un sitio importante para el metabolismo de esteroides sexuales, así como la producción de factores endócrinos que regulan la obesidad, tal como la adipsina (Flier et al., 1987; Siiteri, 1987). El descubrimiento de la proveniencia de la leptina, una hormona ligada directamente con la estimulación de la ingesta de alimentos y promoción del gasto energético

Características principales que se presentan en pacientes con obesidad como parte del SM



Características:

- ↑ Adiposidad
- ↑ Inflamación
- ↓ Función del tejido adiposo
- ↑ Resistencia a la insulina

Distribución de tejido adiposo:

- ↓ Grasa subcutánea
- ↑ Grasa visceral

Almacenamiento lipídico:

- ↓ Capacidad de almacenamiento lipídico
- ↑ Hígado
- ↑ Músculo esquelético

Algunos de los marcadores se enlistan: adiposidad principalmente abdominal, estados inflamatorios, resistencia a la insulina y la disfunción del tejido adiposo.

sinetizada en este tejido fue lo que estableció al tejido adiposo como un órgano endócrino (Y. Zhang et al., 1994; Ahima & Flier, 2000)

De acuerdo con su morfología, ubicación y función, el tejido adiposo se puede clasificar en dos tipos: tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón. En el caso de los humanos, el tejido adiposo blanco se encuentra distribuido a lo largo de todo el organismo, con depósitos especialmente en la zona intraabdominal que rodea los intestinos y las áreas perirrenales, así como depósitos subcutáneos en glúteos, muslos y abdomen. Gracias a sus características de suministro de energía, las células del tejido adiposo blanco son capaces de liberar energía a través de la hidrólisis de triglicéridos almacenados en pequeñas gotas de lípidos de las células (Kershaw & Flier, 2004).

En el caso del tejido adiposo marrón, este se encuentra en los fetos y bebés recién nacidos, ya sea en las regiones axilares, cervicales, perirrenales y peri adrenales. Este tejido disminuye conforme el individuo crece y se desarrolla, al punto de casi desaparecer, esto debido a que dan paso al crecimiento del tejido adiposo blanco que es más grande y por tanto tiene más capacidad de almacenaje de lípidos (Kwok et al., 2020).

Actualmente, se sabe que el tejido adiposo expresa y secreta múltiples péptidos bioactivos que pueden actuar a nivel autocrino o paracrino, así como endócrino, tal como las adipocinas (T. Zhang et al., 2019). Además, este tejido es capaz de expresar receptores que responden a señales aferentes directas de los sistemas hormonales y hasta del sistema nervioso central. Es por ello por lo que el tejido adiposo no sólo se considera un reservorio y proveedor de energía, sino una maquinaria metabólica que permite la comunicación entre diferentes órganos, incluso entre sistemas lejanos como el sistema nervioso central. De esta manera, el tejido adiposo se ve involucrado en procesos metabólico-energéticos, neuroendocrinos e inmunes (Kershaw & Flier, 2004; Lakka & Bouchard, 2007).

La función endócrina del tejido adiposo resulta de gran importancia debido a las consecuencias metabólicas que pueden desencadenarse ya sea por una deficiencia o un exceso de este tejido. El exceso de tejido adiposo, que desencadena obesidad, especialmente al almacenarse en los compartimentos viscerales, tiene una asociación importante con la dislipidemia, hipertrigliceridemia, RI, estados proinflamatorios y protrombóticos (von Frankenberg et al., 2014).

Cuando se presenta este estado de obesidad, la disfunción de los adipocitos del tejido adiposo blanco ocurre cuando el exceso de ácidos grasos que circulan en el organismo dirigidos hacia el tejido adiposo excede la capacidad de los adipocitos para almacenar el exceso de energía a manera de triglicéridos. Por consecuencia, esta disfuncionalidad en los adipocitos blancos promueve la liberación de más ácidos grasos debido al aumento de los ácidos grasos libres circulantes, conduciendo al desarrollo de hipertrigliceridemia y RI en los órganos adyacentes (Kershaw & Flier, 2004; Lakka & Bouchard, 2007; Busebee et al., 2023b).

La obesidad es un padecimiento crónico multifactorial y mórbido. Este padecimiento se encuentra influenciado por factores genéticos, neurológicos, metabólicos, entéricos y conductuales (Kwok et al., 2020; Busebee et al., 2023b). Sigue siendo un factor de riesgo modificable clave para muchas enfermedades comórbidas, incluidas las enfermedades cardiovasculares, metabólicas, y otras más como la diabetes tipo 2 y el cáncer (Nubiola et al., 2015).

En humanos, existen diversas formas de clasificar la obesidad en pacientes que presentan un almacenamiento evidente de grasa abdominal excesiva. De acuerdo con el índice de masa corporal (IMC) introducido por Quetelet en 1832, y con modificaciones actuales basadas en las dinámicas sociales, hay tres valores que pueden estar indicando el estado del paciente adulto: $18.5 <$ es un rango de peso insuficiente; entre 18.5 y 24.9 es un rango de peso normal o saludable; entre 25 y 29.9 es un rango de sobrepeso, y finalmente si el $IMC > 30$ es un rango de obesidad (OMS, 2023).

En modelos animales tal como los roedores, existen algunos indicadores similares que permiten establecer si se presenta un estado de almacenamiento de grasa abdominal y con ello la probable existencia de obesidad. Uno de estos indicadores es el índice de Lee, cuya formula consiste en dividir la raíz cúbica del peso en gramos por la longitud naso-anal en milímetros multiplicada por 1000. El resultado fija la de medición de la obesidad que debe estar correlacionado con otros parámetros medidos (Rogers & Webb, 1980).

Si bien la obesidad se extiende a lo largo de todo el organismo, es de gran relevancia la presencia de grasa abdominal como parte de las caracterizaciones de diversas enfermedades, principalmente las metabólicas y cardiovasculares. Esta grasa almacenada en el tejido adiposo

abdominal puede ser de gran relevancia al hablar de problemas a nivel endócrino relacionados con la aparición del SM.

En mujeres, alrededor del 40% de la población en etapa reproductiva sufren de sobrepeso y obesidad (Johnson et al., 2023). En México la prevalencia de sobrepeso es del 39.1%, de obesidad del 36.1%, y la adiposidad abdominal del 81.6%, donde las mujeres adultas de >30-50 años presentan la mayor prevalencia (Barquera S et al., 2020). La obesidad afecta específicamente algunos aspectos diferentes de la salud de la mujer: fertilidad, ya que las mujeres obesas tienen más probabilidades de tener problemas para quedar embarazadas que las mujeres que tienen un peso saludable, cambios hormonales a lo largo de la vida, pues la obesidad cambia los niveles de hormonas reproductivas a medida que las mujeres envejecen, el SOPQ que es el trastorno hormonal más común entre las mujeres en edad fértil (entre los 15 y los 45 años aproximadamente) y el riesgo de enfermedades cardíacas, diabetes y cáncer de mama que las mujeres contrario a las mujeres sin obesidad (Azarbad & Gonder-Frederick, 2010; Johnson et al., 2023).

Parte de la problemática que se busca comprender en años recientes, es la prevalencia de entidades tal como el síndrome metabólico en mujeres obesas que puede derivar en problemas de su fisiología reproductiva. Para ello primero es necesario comprender el funcionamiento normal de esta.

2.6 Fisiología reproductiva del ovario

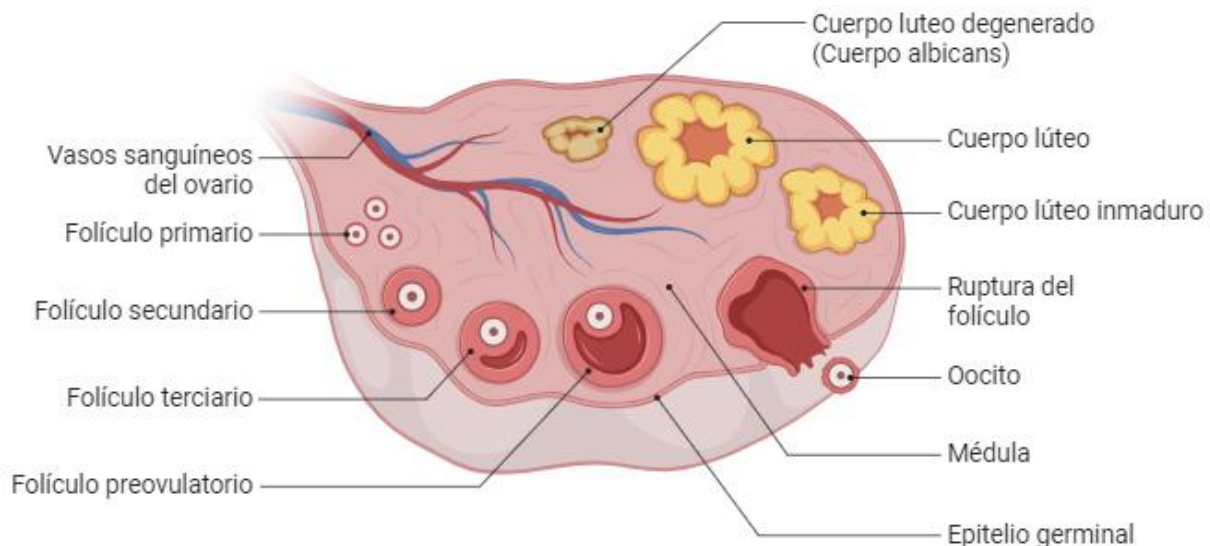
El ovario es un órgano par dinámico dispuesto uno de cada lado del útero compuesto de una cubierta de epitelio germinal a manera de una cápsula densa de tejido conectivo conocido como túnica albugínea (Fig. 5) (Williams & Erickson, 2000). El ovario se caracteriza por cumplir diversas funciones dentro de la fisiología de la hembra, destacando dos principales: la producción y el almacenamiento de los ovocitos y la secreción de hormonas esteroideas y peptídicas (Richards & Pangas, 2010). Este órgano par regula ambas funciones a través de señales endócrinas por medio del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada (H-H-G) y por señales nerviosas provenientes del nervio ovárico superior, el nervio vago y el nervio del plexo ovárico (Rocks & Kundakovic, 2023).

El contenido de este órgano es dividido en tres regiones dependiendo de sus características, la primera es la corteza externa dentro de la cual se encuentra la zona albugínea que contiene el tejido conjuntivo denso, el estroma y los folículos, además de ser granular debido a la cantidad tan grande de folículos ováricos en diferentes estados de desarrollo; la segunda es la médula que es más bien un tejido laxo con múltiples vasos sanguíneos, vasos linfáticos y fibras nerviosas que continua con el meso ovario a través del hilio, y el tercero es el hilio o red ovárica que contiene vasos sanguíneos y linfáticos donde se pueden observar células productoras de andrógenos (Fig. 5) (Plant & Zeleznik, 2015).

Las células que componen el ovario se dividen en germinales (ovocitos en diferentes estados de desarrollo) y somáticas (células de la granulosa, células de la teca y células estromales). La interacción entre estas células determina la formación y el desarrollo de los folículos en diferentes estadios que contienen a los ovocitos, la formación del cuerpo lúteo (estructura endócrina formada a partir del folículo ovárico posterior a la ovulación y necesaria para el establecimiento y mantenimiento del embarazo) y el proceso de ovulación (Fig. 5) (Ottolenghi et al., 2004).

Figura 5 1

Anatomía del ovario



Se observan las capas que componen el ovario, de afuera hacia adentro: corteza, donde distinguimos la zona albugínea, que contiene tejido conjuntivo denso subyacente al epitelio germinal; además de estroma y folículos. La médula que contiene al tejido conectivo laxo muy vascularizado e innervado que se continúa con el meso ovario a través del hilio, y el hilio o red ovárica que contiene vasos sanguíneos y linfáticos. Se observan además Los folículos en diferentes etapas de crecimiento, la representación del evento de ovulación por parte del folículo, y la formación del cuerpo lúteo después de la liberación del ovocito.

Dentro del ovario se orquestan diversos eventos mediante la acción de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), secretadas por la adenohipófisis a través de los pulsos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) proveniente del hipotálamo (Becú-Villalobos & Libertun, 1995). Los pulsos de baja frecuencia se encargan de estimular un ligero aumento en los niveles de FSH al principio del ciclo menstrual en las mujeres y estral en ratas, promoviendo el crecimiento del folículo, mientras que los pulsos de alta frecuencia provocan un aumento considerable en los niveles de LH durante la mitad del ciclo menstrual, es decir a los 15 días, y durante la tarde noche del proestro en ratas, que desencadena el proceso de ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Becú-Villalobos & Libertun, 1995).

Estos procesos esenciales dentro de la función de los ovarios ocurren en la corteza externa del ovario. El desarrollo folicular que sucede dentro de un folículo ovárico se compone de un ovocito primordial en desarrollo rodeado por una o más capas de células foliculares (Hsueh et al., 2000). Conforme el ovocito comienza su proceso de maduración mediante meiosis, el folículo atraviesa por diversos cambios estructurales en cuanto a composición y estructura celular, por lo que se habla de diferentes folículos ováricos (Plant & Zeleznik, 2015). Los folículos primordiales que se componen del ovocito primario rodeado de una pequeña capa de células aplanadas es el primer estadio de los folículos, y su estado basal desde el desarrollo fetal hasta la pubertad (Plant & Zeleznik, 2015).

Durante la pubertad, la FSH promueve el cambio en los folículos primarios. Las células previamente planas se vuelven cúbicas, mientras que el ovocito primordial aumenta de tamaño convirtiéndose en un ovocito primario (Richards & Pangas, 2010).

Este proceso estimulado por la FSH hace que los folículos continúen creciendo y las células foliculares proliferen para dar paso a más capas celulares alrededor del ovocito primario (Richards & Pangas, 2010). La formación y proliferación de las células de la granulosa y las células de la teca interna y la teca externa permite que éstas funcionen para continuar con el desarrollo del folículo. Las células de la granulosa secretan estrógeno, lo que permite la formación de una cavidad conocida como antro, que no es más que un espacio relleno de líquido que contiene esteroides sexuales, hormonas glucoproteínas, proteínas plasmáticas, mucopolisacáridos y enzimas (Hsueh et al., 2000). Este espacio que comienza a desarrollarse da paso a la maduración de un folículo primario a un

folículo secundario. Las células de la granulosa además son capaces de secretar sustancias glucoproteicas que forman una membrana transparente conocida como la zona pelúcida alrededor del ovocito (Hsueh et al., 2000).

Finalmente, el folículo adquiere su forma más madura que es como folículo terciario o de Graff, que forma una especie de ampolla en la superficie del ovario que contiene al ovocito secundario listo para el proceso de ovulación (Williams & Erickson, 2000).

Aunado a ello, el ovario también participa en el proceso de liberación de ovocitos fertilizables y el mantenimiento de la función de las células lúteas mediante la regulación de mecanismos de feedback al hipotálamo y la hipófisis. En este sentido, la fertilidad y su importancia en la reproducción depende de estos eventos endócrinos en los que se involucran múltiples órganos (Wang et al., 2013).

Dentro de las funciones ováricas, se da un proceso altamente especializado e importante en la biología reproductiva de todas las hembras, que es la oogénesis, es decir, el desarrollo de los gametos femeninos mediante un proceso meiótico (Ottolenghi et al., 2004). Es durante la pubertad que muchos de los ovocitos primarios comienzan a crecer; gracias a la influencia de la liberación de FSH, uno de los ovocitos primarios pareciera supera a los demás para reanudar meiosis I, que permite que este se convierta en un ovocito secundario. Este a su vez empieza su segunda división meiótica que se detiene en la metafase y promueve la ovulación, que de ser exitosa la fertilización, reanuda el proceso de meiosis II (Plant & Zeleznik, 2015).

La otra función básica del ovario dentro de la reproducción de la hembra es la ovulación. Este proceso provocador por la hormona LH de la hipófisis anterior ocurre cuando el folículo maduro en la superficie del ovario se rompe para liberar al ovocito secundario de la cavidad peritoneal. El ovocito secundario liberado en el proceso de ovulación, listo para la fertilización, se encuentra aún rodeado por la zona pelúcida y unas pocas capas de células de la corona radiada (Richards & Pangas, 2010). En este proceso pueden ocurrir dos escenarios, si el ovocito no es fecundado, este se degenera en cuestión de días. De lo contrario, si un espermatozoide es capaz de atravesar la corona radiada y la zona pelúcida ingresando al citoplasma del ovocito secundario, la segunda división meiótica se reanuda de manera que se forma un cuerpo polar y un óvulo maduro que desencadenará la formación de un nuevo individuo (Plant & Zeleznik, 2015).

Una vez que termina la ovulación, por acción de la LH, la porción del folículo que queda en el ovario donde se encontraba el ovocito aumenta de tamaño y da paso a un cuerpo lúteo. Este cuerpo lúteo es una estructura glandular que secreta progesterona y pequeñas cantidades de estrógeno (Richards & Pangas, 2010). Si la fertilización no ocurre, el cuerpo lúteo permanecerá funcional sólo durante diez días, posterior a ello dará paso a un cuerpo albicans que es tejido cicatricial e inhibe su producción hormonal. Si la fertilización ocurre, el cuerpo lúteo continúa con sus funciones de liberación hormonal hasta que la placenta se desarrolla lo suficiente para secretar las hormonas necesarias para el desarrollo embrionario (Williams & Erickson, 2000).

Estos procesos orquestados por las hormonas FSH y LH se encuentran a su vez regulados por sus receptores: Receptor a la hormona folículo estimulante (FSHR) y receptor a la hormona luteinizante (LHR) (Kishi et al., 2018).

El FSHR es un receptor acoplado a proteína G localizado principalmente en células granulosas del ovario. La unión de FSH a FSHR activa la cascada de señalización por cAMP/PKA, promoviendo la proliferación de células granulosas, expresión de enzimas esteroideogénicas y producción de estrógenos. En el ovario, la presencia de FSHR es esencial para estimular el crecimiento y maduración de los folículos en crecimiento, así como incrementar la producción de estrógenos, necesarios para la retroalimentación positiva previa a la ovulación (Clark et al., 2022).

De igual manera, el LHR es un receptor acoplado a proteína G, que se expresa en células teca interna y células de la granulosa de folículos grandes pre-ovulatorios y después en el cuerpo lúteo. La activación del LHR por LH induce la producción de andrógenos en células tecales, que son aromatizados a estrógenos en la granulosa, la ovulación y formación del cuerpo lúteo y la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo (Bakhtyukov et al., 2023).

En ratas, estos receptores presentan una variación en su expresión dependiendo del día del ciclo estral ya que también varían las necesidades hormonales a lo largo del ciclo. Durante el proestro, la expresión y sensibilidad del receptor FSHR al FSH en las células de la granulosa incrementa temprano para promover la selectiva maduración de folículos y producción de estrógenos que facilitan el pico pre-ovulatorio de LH; esta elevada expresión de FSHR en proestro dirige la producción de estrógenos que, por retroalimentación positiva, aumentan la secreción de LH (Kishi et al., 2018;

Hernández López et al., 2023). Por otro lado, el receptor LHR se induce en folículos pre-ovulatorios en respuesta a FSH y altos niveles de estrógenos, preparando a estos folículos para responder al pico de LH que desencadena la ovulación. Este incremento de LHR posibilita que la oleada de LH resulte en ruptura folicular y ovulación (MARCONDES et al., 2002).

A lo largo del diestro, FSHR disminuye su expresión tras el pico pre-ovulatorio, pues la función principal de FSH en el reclutamiento folicular ha culminado. Mientras que la expresión de LHR alcanza un máximo funcional en células granulosa de folículos dominantes justo antes de ovulación, permitiendo la respuesta a la surge de LH (Kishi et al., 2018). Esta fuerte señalización a través de LHR en estró media la ovulación y el inicio de la formación del cuerpo lúteo.

Finalmente, en el diestro y meta estró (o diestro 2) FSHR disminuye considerablemente porque la función folicular activa termina tras la ovulación. Y por su lado, LHR permanece funcional en el cuerpo lúteo para sostener la secreción de progesterona, esencial para preparar posibles gestaciones. La señalización de LHR regula la función lútea y la secreción de progesterona. La baja expresión de FSHR coincide con la finalización del reclutamiento de folículos (Kishi et al., 2018; Clark et al., 2022).

La segunda función del ovario es la secreción de hormonas esteroideas y peptídicas. Para ello, es necesario comprender de donde provienen estas hormonas esteroideas más específicas.

2.7 Esteroidogénesis ovárica en humano y rata

La biosíntesis de las hormonas esteroideas permite mantener una función reproductiva estable dentro del ovario además de la homeostasis general del organismo (Wierman, 2007).

Las hormonas esteroideas se clasifican en las sexuales que incluyen los andrógenos, estrógenos y progesterona, los glucocorticoides como el cortisol, y los mineralocorticoides como la aldosterona, sintetizados en las glándulas suprarrenales, las gónadas, la placenta y el sistema nervioso central (Wierman, 2007). Dependiendo del tejido y bajo el control de ciertos factores, este proceso de esteroidogénesis puede encontrarse regulado a corto o a largo plazo, por ejemplo, en el caso de las gónadas y las glándulas suprarrenales, la regulación es aguda, mientras que, en el cerebro y placenta, es crónica (Jiang et al., 2014).

La cascada de señalización más estudiada en la esteroidogénesis es la mediada por la cinasa de proteínas dependiente del adenosín monofosfato cíclico/AMPC (proteína cinasa de tipo A: PKA). El efecto agudo de las hormonas tróficas incrementa el contenido intracelular de AMPC activando a la PKA, la cual fosforila proteínas involucradas en el transporte de colesterol hacia la mitocondria, como tal como la proteína de regulación aguda de la esteroidogénesis StAR por sus siglas en inglés (Steroidogenic Acute Regulatory protein) de 30 kDa, cuya expresión aumenta por el efecto hormonal que promueve la esteroidogénesis en gónadas y corteza suprarrenal (Cato et al., 2002).

Por otro lado, la respuesta crónica se inicia en el transcurso de horas por el estímulo de hormonas tróficas e involucra también la participación de PKA a través de la fosforilación de factores de transcripción relacionados con la activación de genes que codifican para enzimas esteroidogénicas, además de la proteína StAR (Cato et al., 2002).

Dentro de la cascada de señalización activada, son de suma importancia los eventos de fosforilación o desfosforilación de sustratos específicos por proteínas cinasas y fosfatasas, respectivamente, con efectos pleiotrópicos sobre diferentes funciones celulares como son el metabolismo, crecimiento, diferenciación y la esteroidogénesis (Bourque et al., 2012).

Tanto en forma aguda como crónica, la esteroidogénesis se inicia por el estímulo de mensajeros primarios que pueden ser de naturaleza hormonal. Estos efectos se traducen en eventos de fosforilación o desfosforilación de proteínas e incluso de factores de la transcripción que participan en la regulación diferencial de la esteroidogénesis (Bourque et al., 2012).

La principal respuesta de las células esteroidogénicas a la secreción de hormonas esteroideas es la activación de receptores acoplados a proteínas G por la unión del primer mensajero, con la consecuente estimulación del adenilato ciclasa y el incremento en las concentraciones intracelulares de AMPC (Cato et al., 2002). En las gónadas y las glándulas suprarrenales, la respuesta aguda mediada por la vía AMPC-PKA involucra la fosforilación de enzimas como la hidrolasa de ésteres del colesterol o de proteínas que participan en el transporte de colesterol hacia la mitocondria como es el caso de la StAR (Fuller, 1991).

El proceso de síntesis de mineralocorticoides, glucocorticoides, andrógenos, progestinas y estrógenos a partir del colesterol se lleva a cabo por diversas enzimas entre las cuales se encuentran

diferentes tipos de citocromo P450, deshidrogenasas de esteroides y reductasas (Drummond, 2006). El colesterol es el pilar básico de la esteroidogénesis, siendo sintetizado a partir del acetato o tomado directamente de la circulación general. La fuente principal de colesterol utilizado por el ovario deriva de la captación del colesterol lipoproteico, concretamente de las LDL (Jiang et al., 2014).

Existen receptores para las LDL en las células ováricas y también hay sistemas enzimáticos capaces de sintetizar el colesterol dentro de las células de la teca (Jiang et al., 2014). El colesterol, independientemente de su origen, se transporta después a las membranas mitocondriales de las células de la teca del folículo, donde comienza la biosíntesis esteroidea. Este proceso tiene como elemento limitante precisamente la producción de pregnenolona catalizada por el enzima desramificante del colesterol (citocromo P450 CYP desramificante), que utiliza como cofactores a la adrenodoxina y flavoproteínas para dar paso a la pregnenolona (Wierman, 2007).

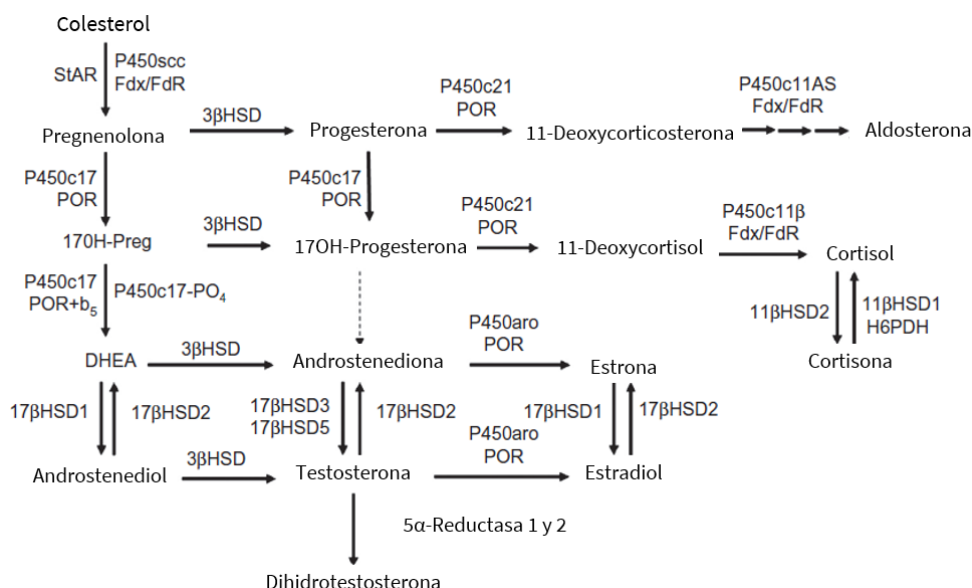
Subsecuentemente a la pregnenolona, la síntesis de esteroides sigue dos vías: la delta 5-3 hidroxilo la vía de delta 4-3 cetona. La primera vía sigue con la 17-04-pregnenolona y dehidroepiandrosterona (DHEA), hasta llegar a androstenediona. Se considera que esta vía es característica de los tejidos no luteinizados, como la teca y el estroma. La segunda vía sigue con la formación de progesterona y la 17-04- progesterona, intersectándose ambas vías en la androstenediona. Aparentemente esta vía predomina en el tejido lúteo, como son las células de la granulosa (Jiang et al., 2014).

La producción de estrógenos por las células de la teca del ovario requiere de la síntesis de precursores androgénicos (androstenediona) a partir del colesterol, bajo el mecanismo de la LH (Cato et al., 2002). La enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 5 en humanos (17 β HSD5) actúa sobre la androstenediona catalizando la deshidrogenación para obtener testosterona (Fig. 6). En los ovarios de modelos murinos como las ratas que son las más utilizadas para observar el proceso esteroidogénico, la enzima que cataliza la producción de andrógenos, entre ellos convirtiendo androstenediona a testosterona es la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (17 β HSD1) (Tetsuka et al., 1998).

Posteriormente los andrógenos difunden hacia el compartimento avascular de las células de la granulosa. A este nivel, y por efecto de la FSH que estimula la expresión de la enzima p450 aromatasa mediante señalización por AMPc-PKA, activación de factores de transcripción y regulación específica del promotor ovárico del gen CYP19A1, los andrógenos son bio transformados a estrógenos por acción de dicha enzima, hidroxilándolos y posteriormente aromatizándolos para dar paso a los estrógenos como el estradiol. En la fase lútea, el compartimento ocupado por las células de la granulosa se vasculariza, permitiendo así el aporte de colesterol, aunado a un incremento en la expresión de enzimas esteroidogénicas que resulta en el aumento de la producción de progesterona y estrógenos derivados de los andrógenos de la teca (Cato et al., 2002).

Figura 6 1

Vía esteroidogénica para la síntesis de hormonas esteroideas a partir de colesterol



El esquema muestra la ruta descrita en humanos similar a modelos murinos, con la variación en la enzima 17beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (17betaHSD1) descrita como de tipo 5 en ratas que cumple la misma función de hidroxilar androstenediona para generar testosterona.

granulosa luteinizadas se encargan de la producción de progesterona, hormona responsable de los cambios durante la fase lútea del ciclo menstrual y esencial para el mantenimiento del embarazo (Bakhtyukov et al., 2023).

Una vez ocurrida la ovulación, las células del folículo ovárico van a constituir el cuerpo lúteo, el cual sintetiza predominantemente progesterona en respuesta a la LH, a través de la vía AMPc/PKA.

En el ovario, las células de la granulosa, por acción de la FSH, constituyen la principal fuente de estrógenos requeridos para el crecimiento, la ovulación y el desarrollo de las características sexuales secundarias, entre otras.

Durante la fase lútea o pregestacional del ciclo ovárico, las células de la

Como en otras células esteroideogénicas, existen otras vías de señalización que se activan en forma dependiente de AMPc, pero independiente de PKA, como en las células de la granulosa, donde a través de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (dependientes de AMPc) se activan también las vías de la quinasa activada por mitógenos (MAPK), fosfatidil-inositol 3 kinasa (PI3-K) y de la proteína cinasa B (PKB) (Cato et al., 2002).

En la rata, las glándulas adrenales y los ovarios constituyen las fuentes principales de los andrógenos circulantes. En estos últimos, las células tecaes en respuesta a la LH producen androstenediona y testosterona. Una de las funciones más importantes desempeñadas por los andrógenos sobre el ovario consiste en dar lugar a los estrógenos, con la colaboración de la aromatasa. Cuanto mayor es la cantidad de testosterona circulante más importante es la formación de estrógenos en los tejidos diana periféricos (Bakhtyukov et al., 2023).

En cuanto a los estrógenos, sintetizados en su mayoría en el ovario, tejido adiposo y una pequeña cantidad en otros tejidos como hueso y cerebro, promueven las características sexuales secundarias, entre otras cosas. Por otra parte, elevan los niveles de las HDL, los de la antitrombina III y los del plasminógeno, mientras disminuyen los de las LDL, reducen la motilidad intestinal incrementan el cortisol e intervienen en las funciones cerebrales (Wierman, 2007).

La interacción entre el estrógeno y el dominio de interacción del receptor a estrógenos (ER) con la hormona induce un cambio conformacional del ER, que hace que éste pierda afinidad por sus proteínas reguladoras (Plant & Zeleznik, 2015). En este nuevo estado conformacional, el ER puede interaccionar con otras proteínas correguladoras (coactivadoras y correpresoras), y especialmente lo hace con otro complejo estrógeno-ER, formándose así un dímero, que es la forma activa. Esta forma activa será la responsable de interaccionar, a través de sus “dedos de zinc”, con los ER presentes en los promotores o en los amplificadores de los genes diana específicos, induciendo la activación o la represión de la transcripción de dichos genes (Al-Shahat et al., 2022).

Hasta la fecha, se han descrito dos subtipos de ER, denominados ER α y ER β , los cuales presentan gran analogía y el mismo mecanismo de acción, aunque se diferencian tanto en su distribución tisular como en algunas de sus propiedades (Bakhtyukov et al., 2023).

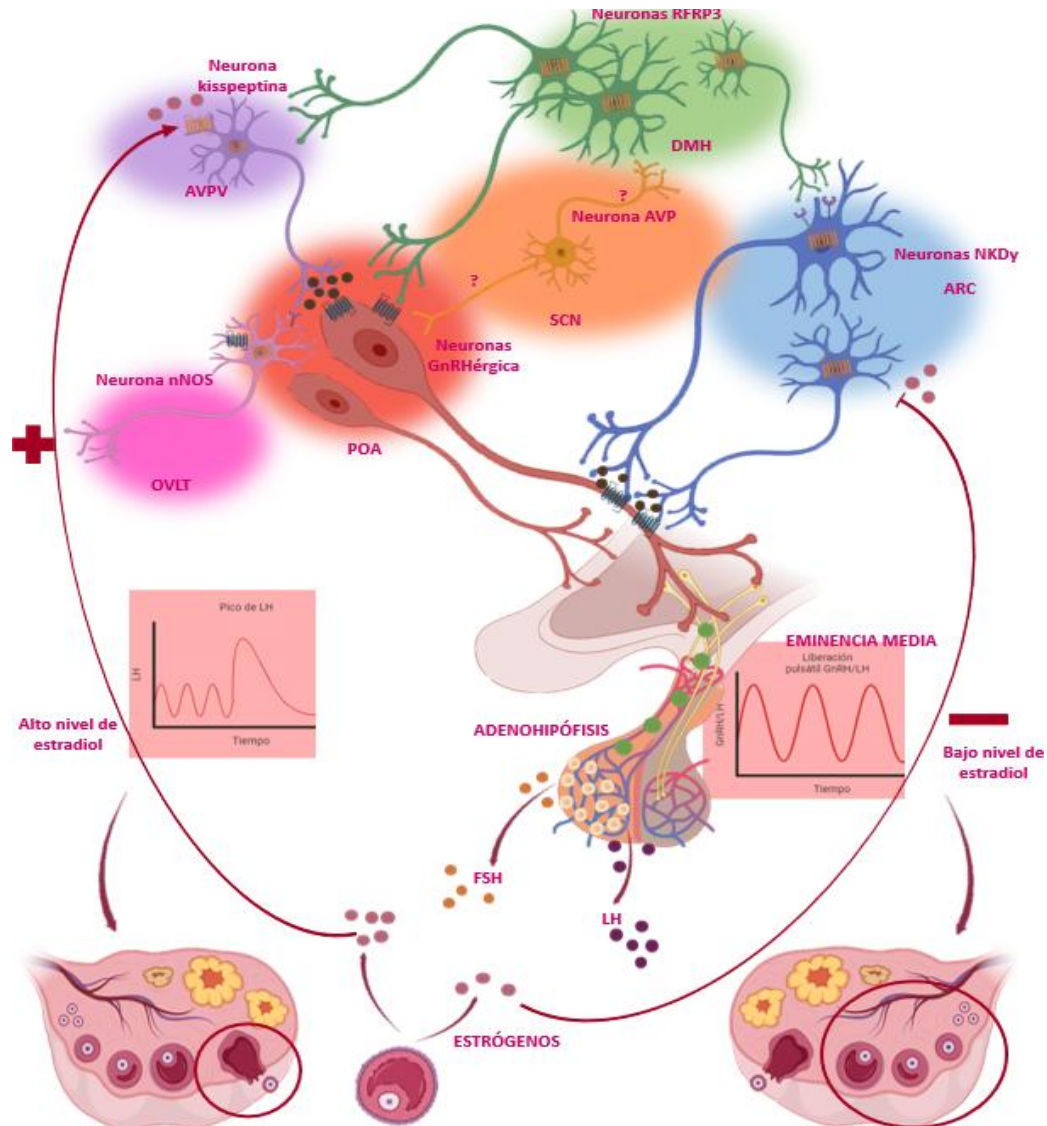
La esteroidogénesis ovárica es un proceso indispensable dentro de las funciones ováricas. Al igual que la producción y almacenamiento de ovocitos, la generación de hormonas esteroideas regula de manera constante el funcionamiento fisiológico y reproductivo adecuado en hembras. Este proceso se orchestra gracias a un gran complejo conocido como eje hipotálamo-hipófisis-gónada, el cual es el responsable de la señalización de las hormonas desde su síntesis hasta su transporte.

2.8 Regulación del eje H-H-G en ratas hembra

El eje hipotálamo hipófisis gónada, como su nombre lo indica, es un complejo de conexiones entre tres principales estructuras, el hipotálamo en conjunto con la hipófisis, y el ovario. Este se encarga de regular las funciones ováricas (Fig. 7) (Ahmad et al., 2019). Esto ocurre cuando el hipotálamo secreta GnRH, un decapeptido que se libera de manera pulsátil por acción del neuropéptido kisspeptina, liberado por las neuronas kisspeptidérgicas del Núcleo Periventricular Anteroventral (AVPV), y es producido por un número relativamente pequeño de neuronas que concentran sus somas en el área preóptica (Rocks & Kundakovic, 2023).

Figura 7 1

Interacción retroactiva del eje Hipotálamo Hipófisis Gónada en la liberación de hormonas esteroideas ováricas



Dentro del cerebro se encuentran participando diferentes áreas con diferentes poblaciones neuronales. Las neuronas encargadas de la estimulación de la liberación pulsátil de GnRH durante el sistema de retroalimentación positiva son las neuronas kisspeptidérgicas del área AVPV, mientras que aquellas neuronas kisspeptidérgicas del área del núcleo arcuato también conocidas como kisspeptina, neuroquinina B y dinorfina (KNDy) parecieran establecer funciones inhibitorias en la liberación de GnRH debido al sistema de retroalimentación negativa. Estos sistemas generan el pico de LH durante la fase ovulatoria, y un mantenimiento bajo de concentraciones de LH durante el periodo de crecimiento folicular.

En el modelo de rata, las neuronas GnRHérgicas se encuentran en el septum medial, el hipotálamo rostral, el núcleo arcuato y especialmente en el área preóptica (Becú-Villalobos & Libertun, 1995). Cuando se sintetiza la GnRH, esta es liberada para llegar a los gonadotropos ubicados

en la adenohipófisis, esto gracias a la conexión existente entre el hipotálamo y adenohipófisis a través del sistema portal de vasos sanguíneos ubicado en la eminencia media. Las gonadotropinas FSH y LH secretadas por la adenohipófisis que tienen como órgano blanco al ovario, llegan a través la circulación sanguínea (Becú-Villalobos & Libertun, 1995). Esta característica pulsátil de la secreción de la GnRH resulta en la liberación pulsátil de la FSH y la LH. La FSH estimula el proceso de esteroidogénesis ovárica, crecimiento y la maduración folicular, mientras que, la LH estimula la esteroidogénesis ovárica, ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Herbison, 2018).

El ciclo estral se presenta a partir de la pubertad y durante la vida reproductiva de las ratas hembra, y se encuentra regulado por este eje HHG (Adeniyi, 2019). En la rata hembra, la duración promedio del ciclo estral es de cuatro a cinco días durante el cual se presentan cambios conductuales, morfofisiológicos, histológicos y bioquímicos del aparato genital. Este ciclo se caracteriza por dos fases, la fase folicular y la fase luteínica. La fase folicular consta a su vez de dos fases: proestro y estro, y la fase luteínica de metaestro, llamado también diestro-1 y el diestro-2 (Adeniyi, 2019).

La observación de la citología vaginal mediante la toma de frotis vaginal permite de manera efectiva monitorear estas fases con el ciclo estral de la rata, pues el epitelio de la vagina presenta diferentes características celulares dependiendo de las concentraciones de progesterona y estrógenos en suero que se presentan durante el ciclo estral. La observación y determinación de cada fase del ciclo estral se rige a partir de los tres tipos de células vaginal: células epiteliales, las células cornificadas y leucocitos (Krentzel et al., 2022)

Para la identificación del ciclo estral por medio de su citología se observa la presencia de células escamosas (células cornificadas), células epiteliales nucleadas y leucocitos, la proporción de estas células determina la fase en la que se encuentra. En el proestro predominan las células epiteliales nucleadas pueden estar en grupos o individuales, en el estro predominan las células epiteliales escamosas aparecen en grupo, en el metaestro hay una mezcla de células donde predominan los leucocitos, pero existe presencia de células epiteliales nucleadas o escamosas y en el diestro predominan los leucocitos (Adeniyi, 2019).

En la etapa del proestro las células de la granulosa comienzan a secretar grandes cantidades de estradiol, por lo que se ha observado que en la tarde de esta fase sus concentraciones son muy elevadas y declinan rápidamente a lo largo de la tarde del proestro hasta alcanzar concentraciones basales en la mañana del estro (Adeniyi, 2019). Esta elevación en las concentraciones plasmáticas de estradiol es el estímulo que permite la secreción de GnRH hipotalámica, así como las de gonadotropinas hipofisiarias (Rocks & Kundakovic, 2023). La secreción de LH y FSH incrementa simultáneamente entre las 14:00 y 15:00 h del proestro y llegan a concentraciones máximas entre las 17:00 y 19:00 h, para finalmente comenzar su descenso. En la madrugada del estro, la LH se secreta en concentraciones basales desde las primeras horas de la fase, mientras que la FSH presenta un segundo incremento y comienza a disminuir en la tarde de este día (Adeniyi, 2019). El resto del ciclo estral permanecen con concentraciones basales. El incremento de FSH que se presenta en la mañana del estro, estimula la selección de los folículos que crecen hasta la etapa preovulatoria en el próximo ciclo (Ajayi & Akhigbe, 2020). En la etapa del proestro, la concentración de progesterona aumenta posterior a la fase preovulatoria llena de actividad importante de las gonadotropinas, regresando a concentraciones basales en la mañana del estro. Esto evita que las concentraciones de LH y FSH vuelvan a incrementar al siguiente día e induce el comportamiento de apareamiento en la noche del proestro, relaja el cérvix uterino y permite que el líquido uterino sea liberado (Ajayi & Akhigbe, 2020).

La elevación de LH también tiene una función importante como sistema de retroalimentación estimulante sobre la prolactina, que posteriormente inhibe su secreción (Herbison, 2018). La prolactina se libera por la tarde del proestro y participa en la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior. Durante la mañana del estro, los estrógenos se encuentran en concentraciones basales (Adeniyi, 2019).

Posterior al estro se observa la siguiente fase, el metaestro o diestro-1. En el frotis vaginal se identifica al observar leucocitos que se acompañan de un número considerable de células epiteliales nucleadas. En el ovario se observan folículos en crecimiento con antro pequeño. Esta etapa se caracteriza por el desarrollo del cuerpo lúteo en el ovario (Adeniyi, 2019).

La última etapa se llama diestro-2 y en el frotis vaginal se observa con una presencia alta de leucocitos, y algunas células epiteliales nucleadas, en forma similar al metaestro. Durante esta etapa

los folículos ováricos se siguen desarrollando y aumenta el número de folículos con antro grande. La secreción de estrógenos incrementa, mientras que las concentraciones plasmáticas de FSH y LH son semejantes a las que se observan en el metaestro. Las concentraciones séricas de progesterona disminuyen progresivamente hasta alcanzar una concentración relativamente baja (Adeniyi, 2019; Blair et al., 2022).

3. Antecedentes

3.1 Modelos animales de inducción del Síndrome metabólico

A medida que incrementa la prevalencia del SM en todo el mundo, es menester comprender su patogénesis y sus modalidades de tratamiento con el fin de reducir la prevalencia de este padecimiento.

Los modelos animales deben permitir una representación adecuada de las manifestaciones clínicas de las condiciones humanas, esto debido a la asequibilidad y la rapidez del análisis de un tratamiento. Las ratas son los animales de experimentación más utilizados para el estudio, variando la especie, la cepa, el sexo y la dieta administrada como método de inducción de SM. El desarrollo de un modelo adecuado de SM utilizando ratas puede contribuir a la aplicación exitosa de los hallazgos de la investigación al entorno clínico. Se utilizan varios métodos de intervención para inducir el SM mediante la inducción de una dieta con diversas composiciones, productos químicos o una combinación de ambos (Lutsey et al., 2008; Ressler et al., 2014, 2015; Gunawan et al., 2021).

Se han realizado numerosos estudios relacionados con trastornos metabólicos utilizando modelos animales (Hsieh et al., 2016; Marques et al., 2016; Niewiadomska et al., 2022; Preguiça et al., 2020; Qi et al., 2025; Rakic et al., 2023; Ressler et al., 2014, 2015; Rosini et al., 2012; Treviño et al., 2015). En estos estudios se han utilizado diversos tipos de dieta y su composición específica, ya sea en forma de monodietas, como dieta alta en fructosa, dieta alta en sacarosa, dieta alta en grasas, o las respectivas combinaciones de una dieta alta en fructosa y alta en grasas, o una dieta rica en sacarosa y grasas (Rosini et al., 2012; Myles et al., 2023).

Las ratas Wistar y Sprague-Dawley (SD) son los roedores más comunes utilizados para desarrollar modelos de SM, ya que son susceptibles a la obesidad inducida por la dieta y a la

resistencia con características individuales. Además de la facilidad de manejo, su tamaño mayor que el de los ratones simplifica la medición de algunos parámetros metabólicos, como la presión arterial (Marques et al., 2016). Sin embargo, es posible que algunas cepas no desarrollan todos los componentes del SM (Preguiça et al., 2020).

La fructosa presente en muchos alimentos de consumo humano ha dado resultados interesantes en los modelos murinos. En 2016, Hsieh y colaboradores alimentaron ratas macho SD con una dieta alta en fructosa al 60% durante 16 semanas para inducir el SM. La inducción del SM se confirmó mediante un examen de bioquímica sanguínea y determinaron con los resultados proteómicos que el SM inducido por fructosa inducía cambios en las vías metabólicas de la glucosa y los ácidos grasos. Además, el estrés oxidativo y las proteínas relacionadas con el estrés del retículo endoplásmico fueron modulados por la alimentación rica en fructosa (Hsieh et al., 2016).

Por su parte, en 2017, Chen y colaboradores demostraron que las ratas SD macho alimentadas con una dieta rica en grasas (60% kcal) durante 8 semanas produjeron un fenotipo completo de SM, observando aumento de peso corporal, masa grasa, glucosa plasmática en ayunas, hipertrigliceridemia, esteatosis hepática e hipertensión. Las ratas se indujeron a la edad del destete (3 semanas). Además, las manifestaciones ocurrieron más rápidamente (4 semanas frente a 6 semanas) que la inducción realizada en ratas adultas (8 semanas de edad) (Cheng et al., 2017).

También se han utilizado diferentes tipos de dietas ricas en grasas para desarrollar modelos de SM, ya sea a partir de grasas o de aceites vegetales, como el aceite de maíz, el aceite de soja y el aceite de oliva o de coco así como grasa animal, como la manteca de cerdo o el sebo de res, tal como los trabajos realizados por Yao y colaboradores en 2017, donde la dieta administrada con hasta un 70% de grasa en ratas macho adultas SD aumentó el peso corporal variablemente en los animales, además que presentaron hiperglucemia, resistencia a la insulina y dislipidemia y un aumento en los ácidos grasos libres en la sangre (Yao et al., 2017).

Si bien estas dietas y el tiempo de administración han promovido e inducido el síndrome metabólico, existen factores dentro de la utilización de modelos animales a tomar en consideración para su extrapolación en el humano. Las dietas altas en carbohidratos representan perfectamente la alimentación humana especialmente observada en países del continente americano. En 2015,

Treviño y colaboradores utilizaron ratas macho Wistar recién destetadas para alimentarlas por 90 días con una dieta hiperglúcida (Patente: MX/E/2013/047377), que se diseñó con 71,4% de carbohidratos. El porcentaje de su composición se dividió en 80% contenido de glucosa y el 20% a fructosa. La grasa correspondió al 5,8% y se dividió en ácidos grasos monoinsaturados y saturados principalmente, así como en ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y 6. La dieta diseñada no contenía fibra porque los productos fueron desarrollados con reactivos altamente refinados y en consecuencia no tienen fibra cruda. Este trabajo encontró que 90 días eran suficientes para que los animales presentaran un aumento de la glucosa en sangre en ayunas, en los niveles de insulina y de los lípidos séricos elevados, que son características del SM (Treviño et al., 2015).

3.2 Síndrome metabólico en la fisiología reproductiva de la rata hembra

Si bien se tiene registro de un uso tan amplio de diversas dietas con diversos modelos animales para la inducción del SM y con ello el análisis de diversas patologías provenientes de la presencia de este síndrome, en modelos de ratas hembra hay poca información al respecto.

En 2015, Hevener y colaboradores se encargaron de revisar el efecto de la desregulación de los receptores a estrógeno en presencia de SM a diferentes niveles. Como ya se sabe, en el tejido adiposo se encuentran estos receptores en cantidades importantes. La literatura arroja que está demostrado que los agonistas específicos del estradiol y del ER α promueven la homeostasis energética, mejoran la distribución de la grasa corporal y disminuyen la resistencia a la insulina, la disfunción de las células β y la inflamación (Hevener et al., 2015). Sin embargo, si bien el uso terapéutico de suplementación estrogénica puede tener complicaciones a la larga por su uso crónico, si bien en los modelos murinos se plantea como una buena opción, es difícil extrapolarlo al entorno de la medicina humana.

Uno de los problemas observados más frecuentemente en modelos de SM es la presencia de otros síndromes que convergen en algún aspecto, tal como el SOPQ (Otaghi et al., 2019). En 2014 Ressler y colaboradores indujeron SOPQ mediante la administración crónica de exposición a dihidrotestosterona (DHT) para analizar la capacidad de la cirugía bariátrica gastrectomía en manga vertical (VSG), para mejorar las anomalías metabólicas, de comportamiento y reproductivas

invocadas por este modelo de SOPQ. Encontraron que el tratamiento con DHT combinado con la exposición a una dieta rica en grasas dio como resultado un aumento del peso y la grasa corporal, deterioro de la glucosa en ayunas, hirsutismo, ansiedad y ciclos irregulares. VSG dio como resultado una reducción de la ingesta de alimentos, el peso corporal y la adiposidad con una mejora de la glucosa y los triglicéridos en ayunas. Una vez que los niveles de DHT disminuyeron a la normalidad, también se restauró la ciclicidad del celo (Ressler et al., 2014). En mujeres con esta patología que se han sometido a una pérdida de peso inducida quirúrgicamente han informado de un gran beneficio, no solo con la pérdida de peso, sino también con la mejora del hiperandrogenismo y la ciclicidad menstrual (Fauser et al., 2012).

Un año después, en 2015, Ressler y colaboradores implantaron en ratas jóvenes Long-Evans el andrógeno DHT no aromatizable o gránulos de placebo antes de la pubertad. La mitad de cada grupo se mantuvo ad libitum con una dieta alta en grasas (HFD por sus siglas en inglés high fat diet; 40% de calorías de grasa de mantequilla) o una dieta baja en grasas (LFD por sus siglas en inglés low fat diet) con nutrientes equivalentes. Independientemente de la dieta, los animales tratados con HFD ganaron más peso corporal, tuvieron ciclos irregulares, presentaron resistencia a la insulina e hiperinsulinemia en comparación con los controles con ambas dietas. Los animales HFD/DHT tuvieron los niveles más altos de masa grasa y resistencia a la insulina (Ressler et al., 2015). Se concluyó que mientras que el hiperandrogenismo típico de modelos con SOPQ impulsó el aumento general de peso corporal, la intolerancia a la glucosa, las conductas de ansiedad y la capacidad de respuesta al estrés, el consumo de HFD promovió el efecto de los andrógenos sobre la adiposidad, la resistencia a la insulina y las conductas depresivas.

Por otro lado, en 2019 Estienne y colaboradores establecieron la relación entre la resistencia a la insulina presente en el SM con el SOPQ, demostrado que los niveles séricos y ováricos de quemerina están elevados en un modelo de SOPQ en ratas inducido por dihidrotestosterona (DHT). Por otro lado, actúa como un importante regulador negativo de la esteroidogénesis ovárica, inhibiendo la secreción de progesterona y estradiol inducida por el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) en células de la granulosa humana y suprimiendo la expresión de aromatasa y P450scc inducida por FSH en folículos preantrales de rata en cultivo y células de la granulosa (Estienne et al., 2019).

Estudios recientes que se están llevando a cabo en el grupo de trabajo sobre la inducción del SM mediante una dieta hiperglúcida (Patente: MX/E/2013/047377) en ratas hembra de la cepa Long Evans a los 24 días postnatales (PND por sus siglas en inglés Post Natal Days) y durante tres meses han arrojado que las ratas tienden a presentar niveles elevados de testosterona y de estradiol en suero, sin embargo, no se sabe aún cuál es el factor que se está viendo alterado dentro de la función ovárica a raíz del SM que ocasiona estos picos de andrógenos y estrógenos (León Figueredo, datos no publicados).

La falta de información de los efectos que ocasiona las dietas hiperglúcidas para desarrollar SM en la mujer, específicamente en la regulación y secreción hormonal de testosterona y estrógenos, puede ser un desencadenante de desarrollar ovarios poliquísticos. El síndrome de ovario poliquístico (SOPQ) afecta al 12-21% de las mujeres. Las mujeres con SOPQ exhiben un agrupamiento de características metabólicas, incluida la obesidad, el estado de los andrógenos y la resistencia a la insulina, donde ésta última pareciera ser el nexo directo entre la aparición de SOPQ en una paciente con síndrome metabólico (Ranasinha et al., 2015)

Comprender este síndrome desde un enfoque particular, como lo es la alteración de la esteroidogénesis ovárica para la liberación de andrógenos y estrógenos a nivel enzimático, podría dilucidar vías de acción para tratar el SM e incluso para comprender la relación que existe entre padecimientos metabólicos y endocrinopatías, dentro de las cuales se encuentra principalmente el SOPQ.

4. Justificación

El SM es una condición clínica definida por anomalías morfológicas y bioquímicas derivadas de asociaciones metabólicas como la obesidad abdominal, hipertensión arterial y alteraciones de la glucemia por RI (Lutsey et al., 2008). Su prevalencia mundial varía entre el 10 y el 84 %, dependiendo de factores como la edad, el género, la raza y el origen étnico. En mujeres adultas, se estima que entre el 20 y el 25 % del mundo lo padece (Laclaustra Gimeno et al., 2005).

El SOPQ es uno de los trastornos más investigados que se ha asociado fuertemente con la presencia de SM (Kokkoris & Pi-Sunyer, 2003). Afecta aproximadamente al 12-21 % de las mujeres en

edad reproductiva a nivel mundial. Este síndrome presenta un cuadro clínico variado que incluye características reproductivas como hiperandrogenismo, irregularidad menstrual, anovulación, infertilidad y complicaciones en el embarazo, así como metabólicas, como resistencia a la insulina, mayor prevalencia de diabetes tipo 2 y riesgo de enfermedades cardíacas, y psicológicas, como aumento de ansiedad y depresión (Merino P et al., 2009).

Dentro de los factores presentes en el SOPQ que afectan a la salud reproductiva de la mujer, derivados de la presencia del SM, se encuentra el desequilibrio hormonal, principalmente de testosterona y estrógenos (Vryonidou et al., 2015). La testosterona es producida por la acción de la enzima 17β HSD5 (17β HSD1 en rata) que cataliza la reducción de androstenediona a testosterona, mientras que los estrógenos son producidos por la aromatización de los andrógenos, incluyendo aquellos que se producen por la glándula adrenal, mediante una serie de reacciones complejas que se catalizan por una sola aromatasa microsomal, P450 aromatasa (Bremer & Miller, 2014).

En los ovarios, los folículos se componen, entre otras estructuras, de células de la teca interna y externa y células de la granulosa que recubren al ovocito. Este par de células expresan receptores a las hormonas LH y a FSH respectivamente, que se sabe que son las gonadotropinas encargadas de la síntesis de andrógenos y estrógenos. Es posible que se presente una alteración en la unión de estas gonadotropinas con su receptor, tal como la sobreexpresión o sobre activación de los receptores, o por el lado contrario, la desensibilización, que estén provocando este desequilibrio hormonal (Bakhtyukov et al., 2023).

Si bien se sabe que la concentración sérica de la testosterona y el estradiol tienden a incrementar en ratas sometidas a dieta hiperglicémica, se desconoce cuál es el factor determinante que desencadena este desbalance en los andrógenos y estrógenos (León, datos no publicados). Para dar respuesta a esta interrogante, se realizará un estudio experimental de corte transversal en un modelo de rata inducida con SM a partir de una dieta hiperglicémica desde la etapa infantil para evaluar en la etapa adulta el ciclo estral, la ovulación, la concentración de gonadotropinas y sus receptores, así como la concentración de las enzimas 17β HSD1 y P450aro responsables de la síntesis de andrógenos y los estrógenos.

5. Pregunta de investigación

¿Qué efectos produce el síndrome metabólico en la ovulación, en las concentraciones de gonadotropinas y en la expresión de los receptores FSH/LH, así como en la expresión de enzimas esteroideogénicas y la síntesis de testosterona y estradiol en ovarios de ratas adultas Long-Evans?

6. Hipótesis

El síndrome metabólico altera el ciclo estral y la ovulación, además de modificar las concentraciones de gonadotropinas y la expresión de los receptores FSH/LH, lo que altera la expresión de las enzimas limitantes que promueven la síntesis de testosterona y estradiol en ovarios de ratas adultas Long-Evans.

7. Objetivo

Objetivo general:

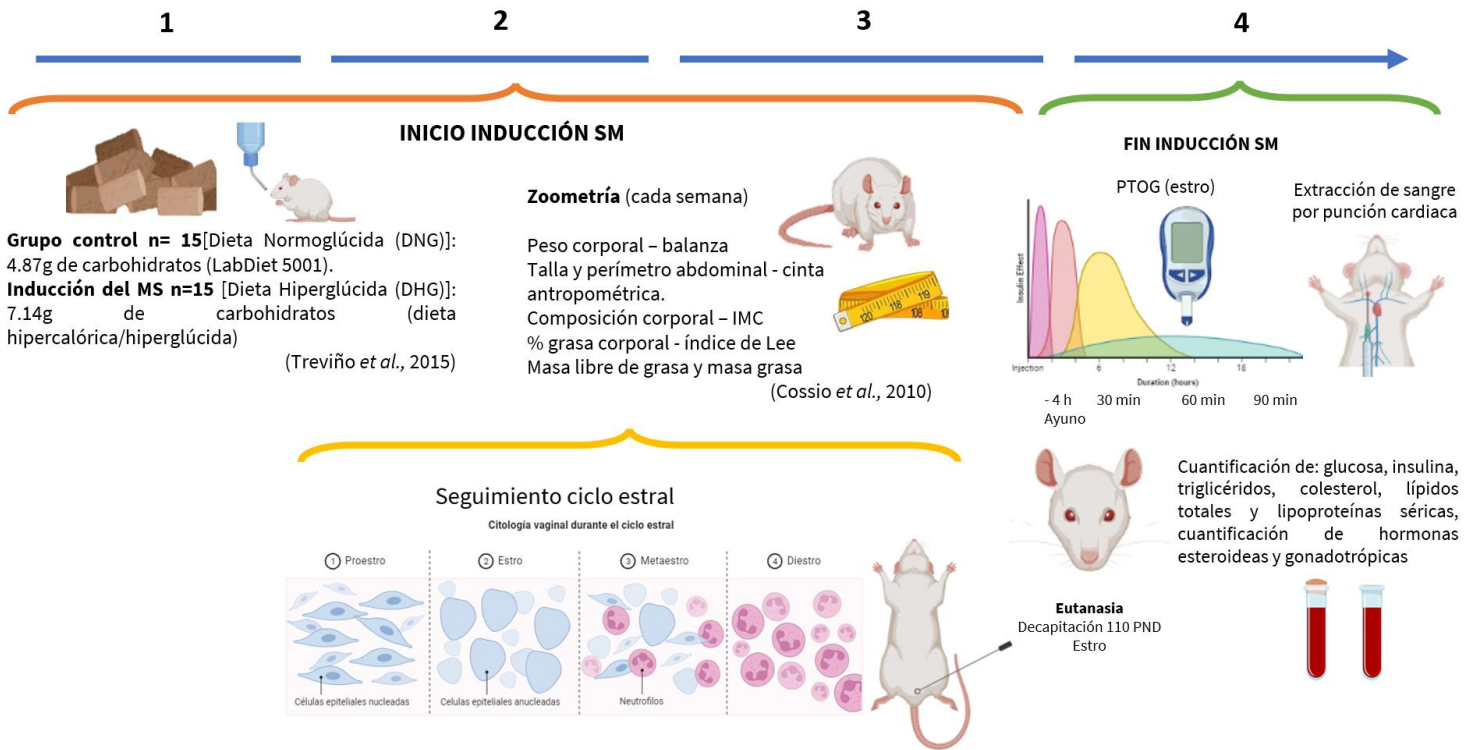
Analizar si el síndrome metabólico altera el ciclo estral, la ovulación y las concentraciones de gonadotropinas (FSH/LH), así como en la expresión de sus receptores en el ovario, y determinar su relación con la expresión de las enzimas esteroideogénicas que participan en la síntesis de testosterona y estradiol en la rata adulta Long-Evans.

Objetivos específicos:

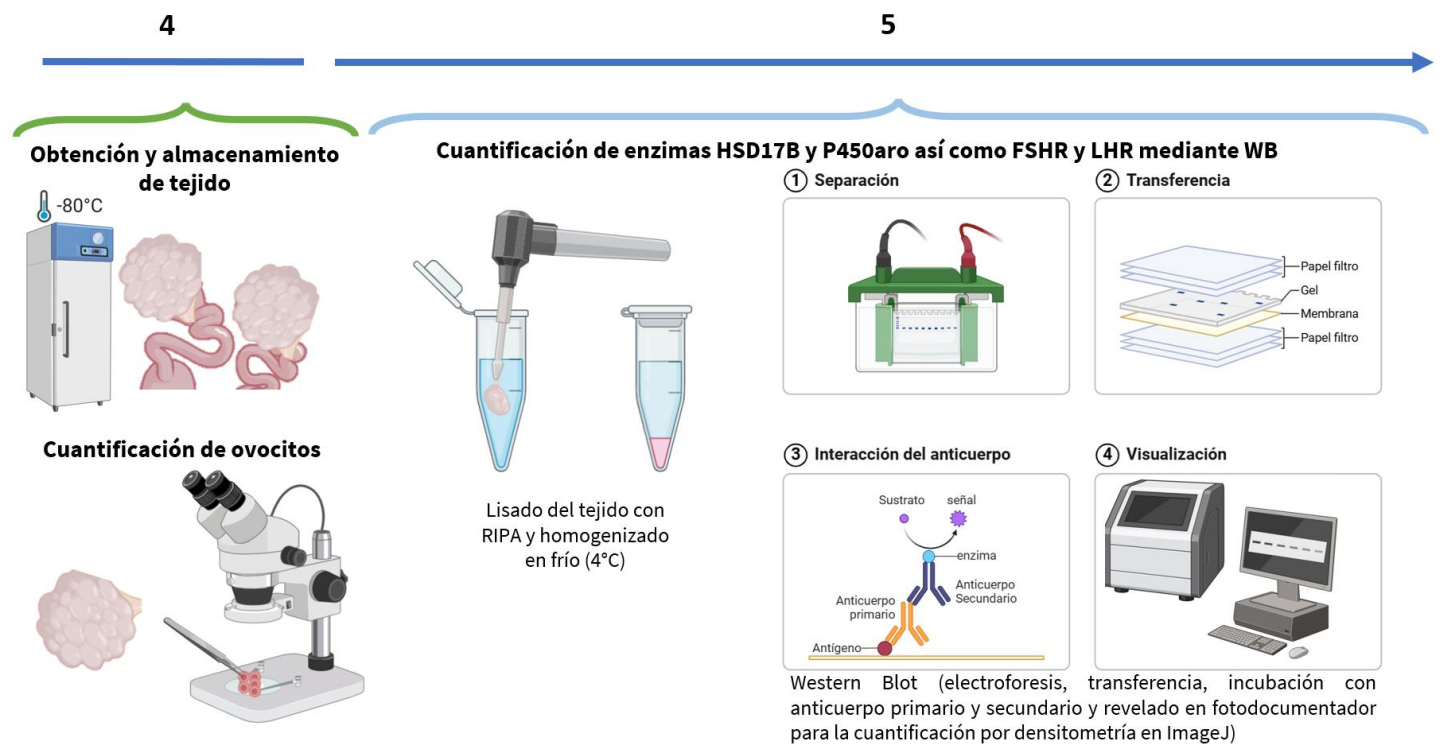
1. Establecer en las ratas hembra adultas el SM inducido por dieta hiperglúcida y analizar los parámetros zootécnicos en respuesta al tipo de dieta consumida.
2. Identificar el inicio de la pubertad y analizarla ciclicidad y la respuesta ovulatoria en las ratas hembra con SM.
3. Determinar las concentraciones de las gonadotropinas FSH/LH, testosterona y estradiol en el suero sanguíneo de ratas adultas Long Evans con SM.
4. Analizar la expresión de los receptores a FSH y LH y las enzimas 17 β HSD y P450aro en el ovario de la rata adulta con SM.

8. Diseño experimental

Meses



Meses



9. Metodología

Obtención de animales e inducción del síndrome metabólico

Ratas hembra de la cepa Long Evans recién destetadas, proporcionadas por el bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, fueron mantenidas en condiciones controladas de iluminación con 14 h de luz por 10 h de oscuridad (luces encendidas de las 05:00 a las 19:00) y temperatura (22 ± 2 °C). El manejo de los animales se realizó siguiendo las normas establecidas por la Ley Mexicana de Protección Animal para el Uso de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio). Los animales se colocaron en camadas de cuatro hembras por caja, teniendo acceso a la madre hasta los 24 días de edad y a partir de este momento alimento y agua ad libitum. Se asignaron al azar en alguno de los siguientes grupos experimentales, cada uno de ellos formado de 15 animales (N=30).

Grupo control n= 15 [Dieta Normoglúcida (DNG)]: Animales intactos recién destetados que fueron alimentados durante tres meses con dieta balanceada de aporte energético de 4.87g de carbohidratos (LabDiet 5001).

Inducción del SM n=15 [Dieta Hiperglúcida (DHG)]: Animales intactos recién destetados que fueron alimentados durante tres meses con una dieta con aporte energético de 7.14g de carbohidratos (dieta hiperglúcida/ hiperglicémica) durante tres meses, tiempo necesario para inducir el síndrome metabólico. Patente: MX/E/2013/047377 (Treviño et al., 2015).

Zoometría

Se realizó la evaluación zoométrica, en donde una vez por semana se determinaron los siguientes parámetros en el animal: peso corporal, talla y perímetro abdominal.

Peso corporal: Se utilizó una balanza con capacidad y precisión de 5000 g x 1 g/ 177 oz x 0.1 oz y se registró el peso en gramos. El procedimiento se realizó según las recomendaciones de Cossio - Bolaños y colaboradores (Cossio-Bolaños et al., 2010).

Talla (Longitud total): Se utilizó una cinta métrica antropométrica marca Lufkin modelo W606PM de acero flexible. El procedimiento se realizó según las recomendaciones de Cossio - Bolaños y colaboradores, tomando como puntos de referencia la base de la cola a la punta de la nariz (Cossio-Bolaños et al., 2010).

Perímetro abdominal: Se utilizó una cinta métrica antropométrica marca Lufkin modelo W606PM de acero flexible. Para la medición, el animal se sujetó con el método de pinzamiento, posteriormente se colocó la cinta métrica en la parte media del abdomen o bien la más voluminosa de la región abdominal del animal y se tomó como límites de referencia la zona del diafragma (límite superior) y el pliegue de las piernas (límite inferior).

Con los parámetros zoométricos obtenidos se estimó la composición corporal de un modelo bicompartimental mediante:

Índice de masa corporal (IMC): Se calculó mediante el índice de Quetelet (OMS, 2023):

$$IMC = \frac{peso}{talla^2}$$

Porcentaje de grasa corporal: Se calculó de acuerdo con el índice de Lee para modelos murinos (Rogers & Webb, 1980):

$$\% \text{ grasa corporal: } \left(\frac{peso \text{ corporal}^{0.33}(g)}{talla \text{ (cm)}} \right) \times 100$$

Masa libre de grasa: Se realizó una estimación de los componentes músculo y hueso. Se determinó mediante la fórmula sugerida por Cossio-Bolaños y colaboradores (Cossio-Bolaños et al., 2010):

$$MLG = 19.9 + (0.453 \times peso \text{ corporal (g)}) + (0.114 \times edad(días))$$

Masa grasa: Se realizó una estimación del tejido adiposo. Se determinó mediante la fórmula sugerida por Cossio-Bolaños y colaboradores (Cossio-Bolaños et al., 2010):

$$MG = -31.6 + (0.361 \times peso \text{ corporal (g)}) - (0.345 \times edad \text{ (días)})$$

Índice de adiposidad disfuncional (DAI): Se estimó el índice DAI como marcador de los cambios previos en la morfo funcionalidad del tejido adiposo antes de las manifestaciones clínicas. Se realizó utilizando la fórmula sugerida por Reyes-Barrera y colaboradores (Reyes-Barrera et al., 2021):

$$\left(\frac{\text{Circunferencia abdominal}}{24.02 + (2.37 * IMC)}\right) \left(\frac{\text{Triglicéridos}}{1.32}\right) \left(\frac{1.43}{\text{Lipoproteínas de alta densidad HDL}}\right)$$

Apertura vaginal y seguimiento del ciclo estral.

En los animales del grupo DNG y DHG se realizó el monitoreo de la apertura vaginal a partir de los 30 días de vida y posteriormente el seguimiento del ciclo estral con un descanso de 3 ciclos estrales por cada 3 ciclos tomados. El ciclo estral de los animales se evaluó mediante el análisis de la citología vaginal, siguiendo el protocolo modificado de Marcondes y colaboradores, (MARCONDES et al., 2002). Cada mañana, entre las 9 y las 10 am, se obtuvieron frotis vaginales con un asa de inoculación estéril de 3 mm. El asa de inoculación se empapó en agua destilada, se colocó en un portaobjetos estándar, se tiñó con hematoxilina-eosina y se observó bajo un microscopio óptico.

Eutanasia y obtención de tejidos.

Los animales se sacrificaron a los 110 días de edad al estro vaginal observado. La autopsia fue por decapitación entre las 10:00 y las 11:00 h. El día de la eutanasia, se suspendió el alimento cuatro horas antes para realizar una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) siguiendo la metodología de Treviño y colaboradores (Treviño et al., 2015) (Véase anexo A). Se obtuvieron muestras sanguíneas mediante punción cardiaca para la evaluación de los parámetros bioquímicos característicos del SM: glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol, lípidos totales y lipoproteínas séricas, los índices HOMA-I, HOMA-S y HOMA-B, y muestra sanguínea del tronco para la cuantificación de hormonas esteroides (Véase anexo A).

Se obtuvieron los ovarios y se conservaron a -80°C para posteriormente realizar un macerado y por medio de la técnica Western Blot detectar la presencia y cantidad de las enzimas 17βHSD1 y P450aro en tejido ovárico, así como de los receptores a FSH y LH en ovario.

Protocolo de Western Blot

Previo a la realización del Western Blot, las muestras de ovario fueron colocadas en 750μL de tampón de radioinmunoprecipitación (RIPA por sus siglas en inglés) [50 mM de tampón hidroximetilaminometano con ácido clorhídrico (Tris-HCl por sus siglas en inglés) pH 8.0, 250 mM de cloruro de sodio (NaCl), 2 mM de tampón de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA por sus siglas en inglés)] que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas [Halt Protease Inhibitor Cocktail (100X) Thermo Scientific] y se lisaron con ayuda de un homogeneizador de tejidos DAIHAN-brand® Homogenizing Stirrer, “HS-30E” a 2,000 rpm a 4°C. Posteriormente se centrifugó la muestra a 4°C durante 15 minutos a 14,000 rpm utilizando la centrífuga de la Eppendorf™ Centrifuge 5420000016, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C. Se estableció la concentración de proteína por muestra de ovario lisado mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) (Véase anexo B). Los valores arrojados fueron en promedio de 4208 μg de proteína total por cada 1000 μL de muestra, de los cuales se utilizaron 30 μg de proteína total por pozo para la realización del Western Blot.

Para el Western Blot se siguió el protocolo con modificaciones de De los Reyes y colaboradores (De los Reyes et al., 2017) (Véase anexo C). La separación de las proteínas se realizó en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10%. Se aplicaron 30 μg de proteína por carril en un Mini Protean Tetra (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) y las proteínas se separaron a 110 voltios durante 120 minutos. Las proteínas se transfirieron a una membrana de poli-vinilideno difluoruro (PVDF) Immobilon® -P (Merk Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). Las membranas fueron bloqueadas con albúmina al 5% en tampón de solución salina con tris y Tween 20 (TBST por sus siglas en inglés) durante dos horas para poder incubar posteriormente los anticuerpos. Para el receptor a FSH, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario policlonal de conejo IgG FSHR PA5-50963 (dilución 1:1500) (Thermo Fisher Scientific - Invitrogen™) durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron tres lavados de 10 minutos en tampón de fosfatos (PBS por sus siglas en inglés) a pH 7.4

y las membranas se incubaron [con el anticuerpo secundario IgG (H+L) anti-conejo HRP conjugado dilución 1:20,000] (Thermo Fisher Scientific - Invitrogen™) durante 1 hora y finalmente se realizaron tres lavados más en PBS de 10 minutos cada uno. Para el receptor a LH, las membranas se incubaron a 0.25µg de anticuerpo/mL con el anticuerpo primario policlonal de conejo IgG LHR PA5-79598 (Thermo Fisher Scientific - Invitrogen™) durante toda la noche. De igual manera, se realizaron tres lavados de 10 minutos en PBS y las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario IgG (H+L) anti-conejo HRP conjugado producto #31460 (dilución 1:20,000) (Thermo Fisher Scientific - Invitrogen™) durante una hora, para finalmente realizar tres lavados más en PBS.

Para la enzima p450 aromatasas, las membranas se incubaron a una concentración de 1µg/mL con el anticuerpo primario policlonal de conejo IgG Anti-Aromatasas ab18995 (abcam) durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron tres lavados de 10 minutos en PBS y las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario IgG (H+L) anti-conejo HRP conjugado producto #31460 (dilución 1:20,000) (Thermo Fisher Scientific - Invitrogen™) durante 1 hora y finalmente se realizaron tres lavados más en PBS de 10 minutos cada uno. Finalmente, para la enzima 17βHSD1, las membranas se incubaron a una concentración 0.3µg/mL con el anticuerpo primario policlonal de conejo IgG HSD17B1 PA5-79400 (Thermo Fisher Scientific - Invitrogen™) durante toda la noche. De igual manera, se realizaron tres lavados de 10 minutos en PBS y las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario IgG (H+L) anti-conejo HRP conjugado producto #31460 (dilución 1:20,000) (Thermo Fisher Scientific - Invitrogen™) durante una hora, para finalmente realizar tres lavados más en PBS.

Finalmente, para la proteína control que fue actina, se incubó a una concentración 1:1000 con el anticuerpo primario policlonal de cabra IgG actin (1-19) sc-1616 (Santa Cruz Biotechnology, inc) durante una hora. Posterior a ello se realizaron tres lavados en PBS para incubar (concentración 1:10,000) con el anticuerpo secundario IgG (H+L) peroxidase-conjugated AffinPure™ F(ab')₂ Fragment Conejo Anti- cabra producto 305-036-003 (Jackson ImmunoResearch) durante una hora, para finalmente realizar tres lavados más en PBS de 10 minutos cada uno.

Las bandas de proteínas se visualizaron con el reactivo Western Blotting Luminol Reagent sc-2048 en un fotodocumentador de la marca UVItec Ltd. Cambridge - Alliance Q9 Advanced.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de este trabajo fueron analizados en el software GraphPad Prism Software (Versión 9.01, GraphPad Software, Inc.; La Jolla, CA, USA). La zoometría analizada por la prueba ANOVA de 2 vías seguida de una prueba Bonferroni post hoc para observar las diferencias de cada grupo a lo largo de los 3 meses de inducción del modelo de SM. La concentración de los marcadores bioquímicos y las hormonas esteroideas en suero, se analizaron por la prueba de “t” de Student donde se compararon ambos grupos para cada variable.

Las bandas de los receptores a FSH y LH, así como de las enzimas P450 aromatasa y HSD17β1 obtenidas para la medición por la técnica de western blot se analizaron por densitometría usando cuatro diferentes softwares: NineAlliance x64 (v18.16c.x64), ImageJ (bundled with 64-bit Java 8.), Microsoft® Excel 2408 (Build 17932.20540) y GraphPad Prism Software (Versión 9.01, GraphPad Software, Inc.; La Jolla, CA, USA). Para ello se utilizó el protocolo modificado de Gassmann y colaboradores, (Gassmann et al., 2009) (Véase anexo D). Se obtuvo la imagen de cada membrana con el programa NineAlliance x64 (v18.16c.x64) con una exposición que iba desde los 15 segundos hasta los 90 segundos por membrana. Una vez obtenida la imagen, esta fue procesada en el software ImageJ (bundled with 64-bit Java 8.), donde se ajustó la rotación, brillo, contraste y saturación de las bandas para posteriormente medir la amplitud de cada valor de la curva de cada banda.

Una vez obtenidos los valores proporcionados en píxeles por el software ImageJ (bundled with 64-bit Java 8.), estos datos fueron procesados en una hoja del software Microsoft® Excel 2408 (Build 17932.20540), en donde se realizó el análisis por densitometría con las siguientes fórmulas:

$$\text{Normalización del control: } \frac{\text{Intensidad de la banda de proteína de interés}}{\text{Intensidad de las bandas de proteína control}}$$

$$\text{Valor normalizado de la banda de la proteína control: } \frac{\text{suma de los controles}}{\text{suma de los duplicados}}$$

$$\text{Normalización al control experimental: } \frac{\text{Normalización del control}}{\text{Valor normalizado de la banda de la proteína control}}$$

La banda de control utilizada fue la actina. Una vez que se obtuvieron los valores, estos fueron procesados en el software GraphPad Prism Software (Versión 9.01, GraphPad Software, Inc.; La Jolla,

CA, USA) para obtener el análisis estadístico de los valores obtenidos, así como la representación gráfica de los mismos.

Los valores obtenidos se analizaron por la prueba “t” de Student donde se compararon ambos grupos para cada proteína analizada. Para todos los resultados obtenidos en el presente trabajo, se realizó una prueba de normalidad de Shapiro para determinar el tipo de análisis estadístico al que se someterían, y una vez obtenidos los resultados, las diferencias cuya probabilidad fue menor o igual a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas.

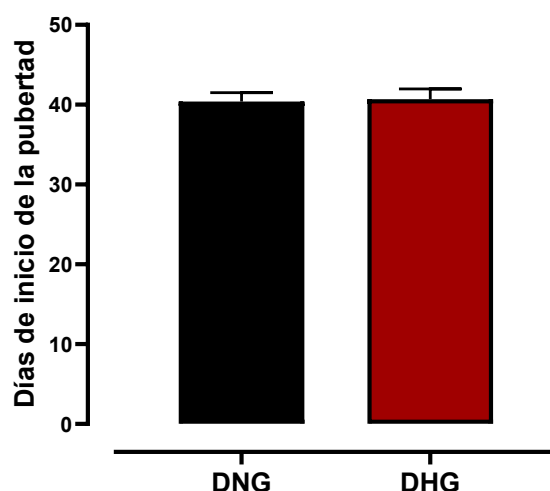
10. Resultados

El consumo de dietas hiperglúcidas no altera el inicio de la pubertad y apertura vaginal en ratas Long Evans.

A lo largo de los días que transcurrieron antes del inició la pubertad que se corroboró con la apertura vaginal, se obtuvieron los datos de los días que había tomado este proceso, para determinar si la dieta que consumieron los animales recién destetados podía afectar dicho inicio de la pubertad. En la figura 8 se presentan los resultados del inicio de la pubertad. La apertura de la vagina para el grupo DNG se presentó a los 40.41 ± 0.23 días y la del grupo con DHG a los 40.68 ± 0.25 días. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 0.4438$ *t student*).

Figura 8 1

Inicio de la pubertad en ratas DNG y DHG



Prueba t-student $p \leq 0.05$. No se encontraron diferencias significativas

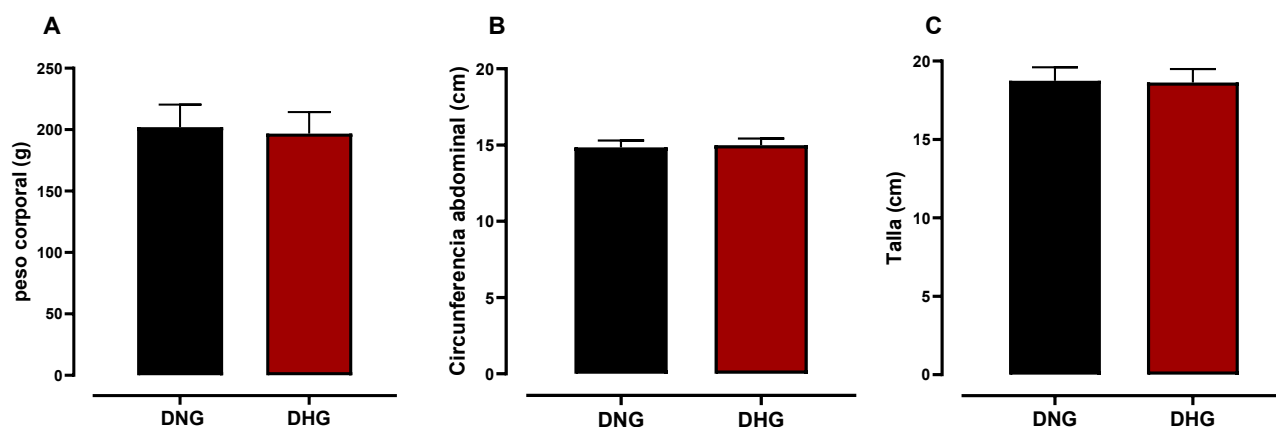
La dieta hiperglúcida no modifica los parámetros zoométricos en ratas Long Evans.

Una vez que se midió la zoometría de los animales de los dos grupos DNG y DHG (Fig. 9), al día del sacrificio, el grupo DNG presentó pesos de 273.3 ± 4.00 g, mientras que el grupo DHG mostró pesos de 266.6 ± 2.70 g, sin presentar diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 0.8380$, *t student*), en cuanto a la circunferencia, en el grupo DNG fue de 16.25 cm mientras que en el grupo DHG fue de

16.23 $\pm$ 0.07 cm encontrando que tampoco existían diferencias significativas ($p = 0.8259$, *t student*) y finalmente, en el grupo DNG hubo una talla de 21.92 $\pm$ 0.16 cm mientras que en el grupo DHG la talla fue de 22.03 $\pm$ 0.16 cm, demostrando que tampoco en este parámetro existió una diferencia significativa entre ambos grupos experimentales ($p = 0.6696$, *t student*) concluyendo así que los individuos con dietas hiperglúcidas no presentan diferencias significativas en cuanto a los parámetros zoométricos después de una dieta hiperglúcida administrada durante las 13 semanas de inducción del SM.

Figura 9 1

Parámetros zoométricos en ratas DNG y DHG



Se representa la media $\pm$ EEM. **A)** Peso corporal (g); **B)** Circunferencia abdominal (cm); **C)** Talla naso-anal (cm) Prueba *t-student* $p \leq 0.05$. No se muestran diferencias significativas.

En la tabla 1 se muestran los resultados de los índices zoométricos de los grupos DNG y DHG. Los animales del grupo DHG presentaron un índice de Lee disminuido con respecto al grupo DNG (8%, $p = 0.0105$, *t student*); el grupo DHG presentó un índice de masa corporal disminuido con respecto al grupo DNG (5%, $p = 0.0124$ *t student*). Mientras que en la masa magra se encontraron valores de 154.4 $\pm$ 1.76 en individuos DHG, mientras que en los DNG se encontraron valores de 158.0 $\pm$ 2.480 ($p = 0.2378$ *t student*) y en la masa grasa valores de 57.35 $\pm$ 1.41 contra valores en DNG de 60.21 $\pm$ 1.976 ($p = 0.2378$ *t student*), demostrando que no existen diferencias significativas entre los dos grupos DNG y DHG en ninguno de los índices calculados y en las mediciones tanto de masa magra como masa grasa.

Tabla 1

Índices obtenidos con los parámetros zoométricos.

	DNG	DHG
	n=12	n=15
Índice de Lee	29.20 ± 0.20	28.54 ± 0.14
IMC	0.58 ± 0.01	0.54 ± 0.01
Masa magra	158.0 ± 2.480	154.4 ± 1.76
Masa grasa	60.21 ± 1.976	57.35 ± 1.41

Los valores presentados son la media ± EEM de los grupos DNG (n=12) y DHG (n=15). Prueba t-student $p \leq 0.05$. No se muestran diferencias significativas.

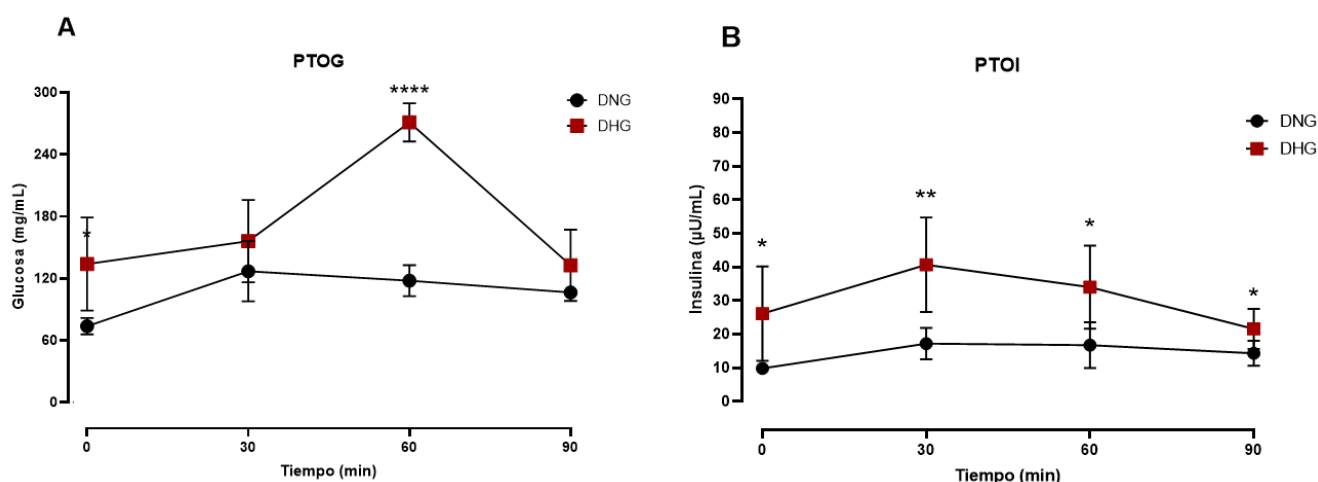
El síndrome metabólico se manifiesta con la presencia de hiperglicemia e hiperinsulinemia en ayuno, resistencia a la insulina (índice de resistencia a la insulina HOMA-IR) y dislipidemia

Una vez obtenidas las muestras sanguíneas, se analizaron los parámetros bioquímicos para determinar la presencia del SM. En la figura 10 se muestran las curvas de glucosa e insulina entre los grupos con DNG y DHG. En la prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) los animales del grupo DHG se elevaron las concentraciones de glucosa hasta 134.0 ± 20.17 mg/mL de manera significativa ($p = 0.0188$ t student) con respecto al grupo DNG con concentraciones de glucosa de hasta 73.80 ± 3.569 durante el tiempo cero. El tiempo 30 no presentó diferencias significativas entre las concentraciones de glucosa del grupo DNG (127.0 ± 13.03 mg/mL) con respecto al grupo DHG (156.2 ± 17.82 mg/mL) ($p = 0.2224$ t student). Posteriormente en el tiempo 60 se presentó la mayor diferencia significativa entre las concentraciones de glucosa del grupo DHG con 271.3 ± 9.259 mg/mL con respecto al grupo DNG con 117.8 ± 6.763 mg/mL ($p = <0.0001$ t student). Finalmente, en el último tiempo de toma de muestra de la PTOG, el grupo DNG presentó concentraciones de glucosa de 106.4 ± 2.008 mg/mL mientras que el grupo DHG presentó concentraciones de 132.8 ± 15.48 mg/mL sin mostrar diferencias significativas ($p = 0.1295$ t student). En cuanto a la curva de tolerancia oral a la insulina (PTOI) el comportamiento fue similar al de la PTOG con valores significativos durante todas

las tomas de muestra a lo largo del tiempo. En el tiempo 0, el grupo DHG tuvo concentraciones de insulina de hasta $26.12 \pm 6.28 \mu\text{U/mL}$, significativamente más elevadas que en el grupo DNG con $9.840 \pm 0.5391 \mu\text{U/mL}$ ($p = 0.0325$ *t student*). En el tiempo 30, el grupo DHG tuvo concentraciones de insulina de $40.68 \pm 6.314 \mu\text{U/mL}$, significativamente más elevadas que en el grupo DNG con $17.18 \pm 2.074 \mu\text{U/mL}$ ($p = 0.0077$ *t student*). En el tiempo 60, el grupo DHG tuvo concentraciones de insulina de $33.98 \pm 5.542 \mu\text{U/mL}$, significativamente más elevados que en el grupo DNG con $16.72 \pm 3.058 \mu\text{U/mL}$ ($p = 0.0260$ *t student*). Finalmente, en el tiempo 90, el grupo DHG tuvo concentraciones de insulina de hasta $21.60 \pm 2.667 \mu\text{U/mL}$, significativamente más elevados que en el grupo DNG con $14.32 \pm 1.686 \mu\text{U/mL}$ ($p = 0.0499$ *t student*).

Figura 10 1

Curva PTOG y PTOI



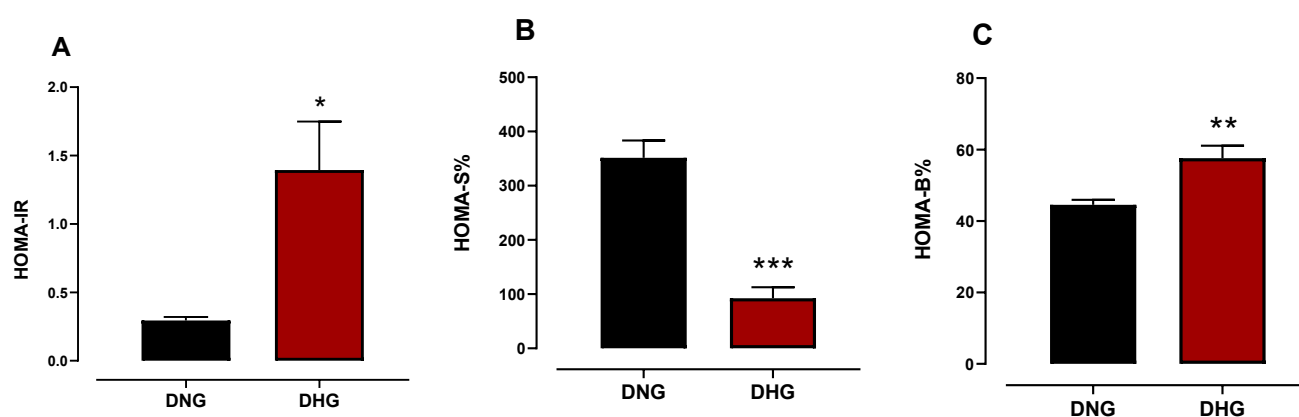
Representación gráfica de **A)** curva de tolerancia oral a la glucosa y **B)** curva de tolerancia oral a la insulina, *t-student* * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos de los índices de resistencia a la insulina. En los tres índices se presentó una diferencia significativa en el grupo DHG con respecto al DNG. El primer índice, HOMA-IR para determinar el riesgo de resistencia a la insulina mostró valores mayormente significativos en el grupo DHG de 1.394 ± 0.3544 con respecto al grupo DNG con 0.2940 ± 0.0261 ($p = 0.0148$ *t student*). En el índice HOMA-S%, que permite analizar la posible estimulación de las células β -pancreáticas para liberar insulina, el grupo DHG presentó valores significativamente

menores con 92.29 ± 20.61 con respecto al grupo DNG con 351.4 ± 31.83 ($p = 0.001$ *t student*). Finalmente, en el índice HOMA-B% que permite determinar el estado disfuncional de las células β -pancreáticas se presentaron en el grupo DHG valores de 57.59 ± 3.482 significativamente más elevados con respecto al grupo DNG con 44.52 ± 1.421 ($p = 0.0084$ *t student*). Con ello se determinó que los animales presentaron resistencia a la insulina, una de las características principales del síndrome metabólico.

Figura 11 1

Índices de resistencia a la insulina



Se representa la media $\pm$ EEM de las ratas de los grupos DNG y DHG. **A)** Índice de resistencia a la insulina HOMA-IR; **B)** Índice de estimulación de las células beta-pancreáticas para liberar insulina HOMA-S%; **C)** Índice de disfuncionalidad de las células beta-pancreáticas. T-student * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

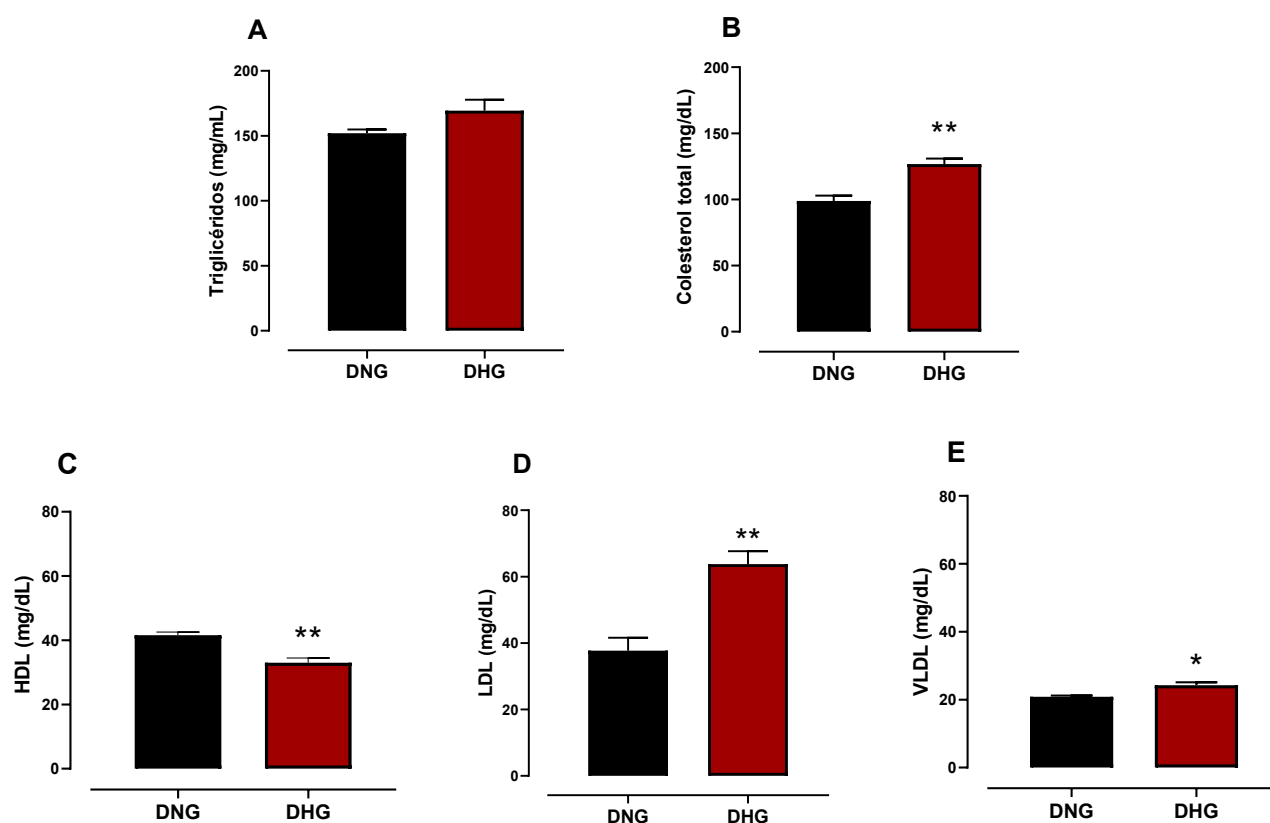
En la figura 12 se muestra la bioquímica sanguínea que caracteriza el SM. Los valores de los triglicéridos no presentaron diferencias significativas entre el grupo DHG (169.3 ± 8.511 mg/mL) y el grupo DNG (152.0 ± 2.887 mg/mL) ($p = 0.1260$ *t student*). El grupo DHG presentó concentraciones significativamente más elevadas en el colesterol de hasta 126.7 ± 4.158 mg/dL con respecto al grupo DNG con valores de 98.88 ± 3.993 mg/dL ($p = 0.0013$ *t student*). En cuanto a los diferentes tipos de lipoproteínas también se encontraron diferencias significativas, con valores significativamente menores del grupo DHG de HDL 33.00 ± 1.468 mg/dL contra el grupo DNG con 41.55 ± 0.9921 mg/dL ($p = 0.0029$ *t student*) y valores significativamente más elevados en el grupo DHG de LDL (63.80 ± 3.873

mg/dL) y de VLDL (24.23 ± 0.8686 mg/dL) con respecto al grupo DNG de LDL (37.60 ± 3.905 mg/dL) ($p = 0.0090$ *t student*) y VLDL (20.87 ± 0.3480 mg/dL) ($p = 0.0228$ *t student*).

Con estos resultados se encontró que los animales presentaron hipercolesterolemia y dislipidemia, conformando más de tres características que definen el síndrome metabólico, por lo que se pudo demostrar la inducción de dicho síndrome a los tres meses de alimentación con una dieta hiperglúcida.

Figura 12 1

Parámetros bioquímicos del SM



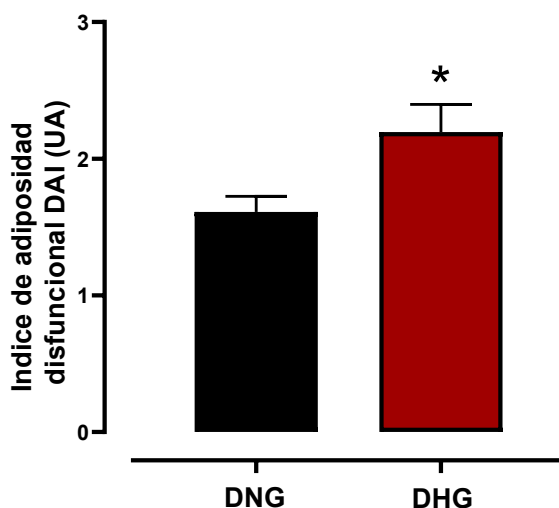
Se representa la media $\pm$ EEM de las ratas de los grupos DNG y DHG. **A)** Triglicéridos mg/mL; **B)** Colesterol total (mg/dL); **C)** Lipoproteínas de alta densidad HDL (mg/dL); **D)** Lipoproteínas de baja densidad LDL (mg/dL); **E)** Lipoproteínas de muy baja densidad VLDL (mg/dL). Prueba *t student*, donde * indica diferencias significativas $p \leq 0.05$, ** indica diferencias significativas $p \leq 0.01$, *** indica diferencias significativas $p \leq 0.001$.

El índice de adiposidad disfuncional incrementa en individuos no obesos con síndrome metabólico

Debido a que el modelo no presentó diferencias en los parámetros zoométricos, se determinó el estado de funcionalidad del tejido adiposo, por lo que se obtuvieron los valores del índice de adiposidad disfuncional de cada individuo ($n=6$) tomando en cuenta la circunferencia abdominal, el IMC, el valor de TG en sangre, y las HDL en sangre. En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos de los animales de cada grupo experimental. El grupo DHG (1.7 UA) presentó valores significativamente mayores con respecto al grupo DNG (1.28 UA) ($p=0.0456$ *t student*).

Figura 13 1

Índice de adiposidad disfuncional de los grupos DNG y DHG



Se representa la media $\pm$ EEM. El grupo DHG presentó un índice significativamente más elevado que el grupo control. Prueba *t-student* $p \leq 0.05$.

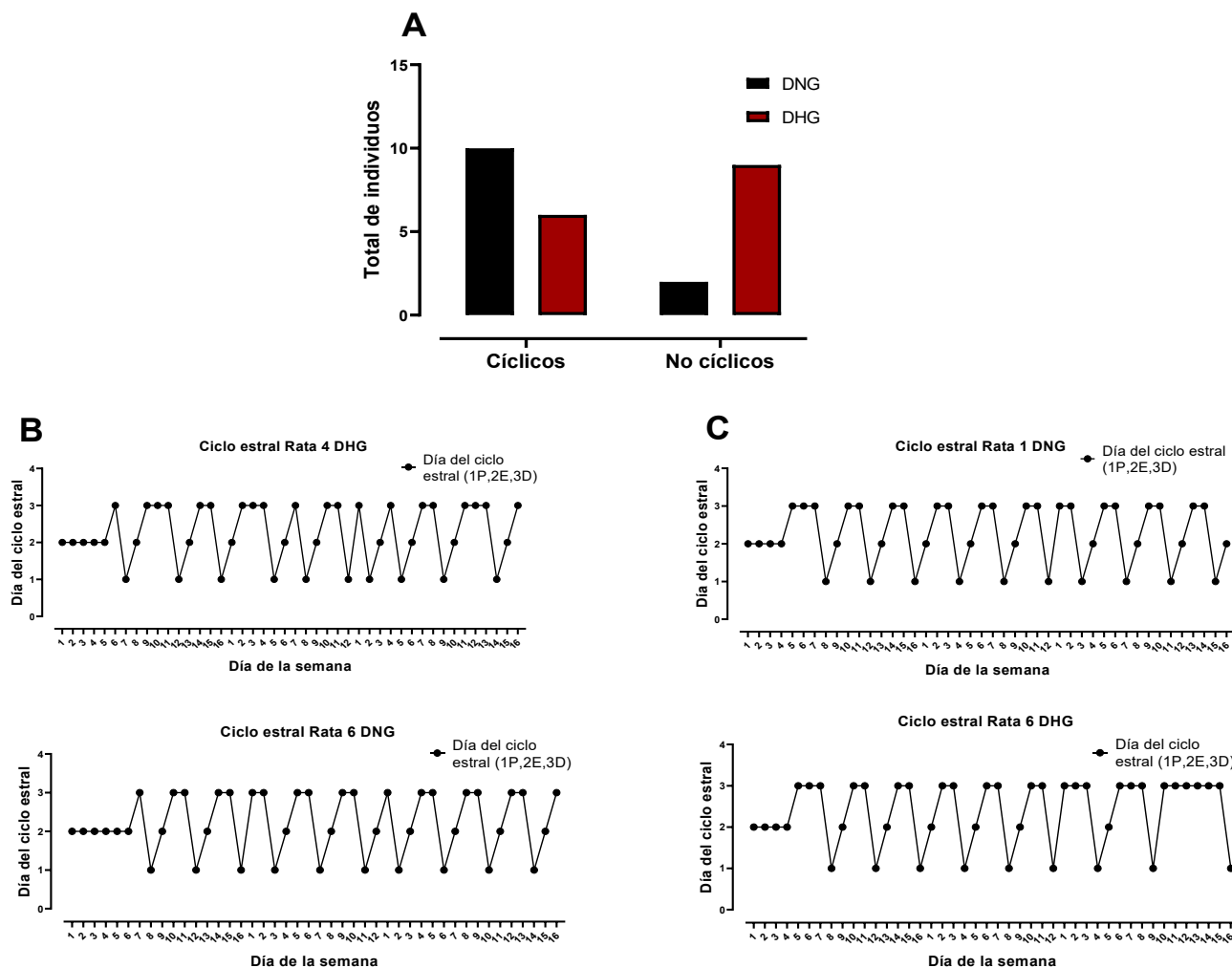
El síndrome metabólico altera el ciclo estral

Considerando que la dieta administrada al grupo DHG generó hiperglicemia e hiperinsulinemia en ayuno, dislipidemia y disfuncionalidad adiposa, y con ello estableció el modelo de síndrome metabólico, se investigó si éste tenía efectos a nivel reproductivo en los animales. Del total de los animales pertenecientes al grupo DNG, dos presentaron aciclicidad (16.6%), mientras que de los

animales pertenecientes al grupo DHG, nueve presentaron ciclos irregulares (60%) con un alargamiento durante el diestro por más de tres ciclos. En la figura 14 se muestra la representación gráfica del total de ratas cíclicas contra los acíclicos entre cada grupo experimental. Existen diferencias significativas entre cada grupo experimental ($p= 0.0473$), un 62.50% de ratas totales cíclicas pertenecen al grupo DNG mientras que 37.50% de ratas totales cíclicas pertenecen al grupo DHG. Del total de ratas acíclicas, un 18.18% es representado por ratas del grupo DNG, contra un 81.82% representado por ratas del grupo DHG, siendo el grupo DHG el que presenta mayor cantidad de ratas irregulares con respecto al grupo DNG. En A se observa la representación del comportamiento de los ciclos estrales en ratas cíclicas del grupo DNG, mientras que en B se observan los ciclos estrales de las ratas acíclicas del grupo DHG, presentando una persistencia de diestros, e incluso la ausencia de estros entre ciclos.

Figura 14 1

Representación gráfica de la ciclicidad total en el ciclo estral de las ratas



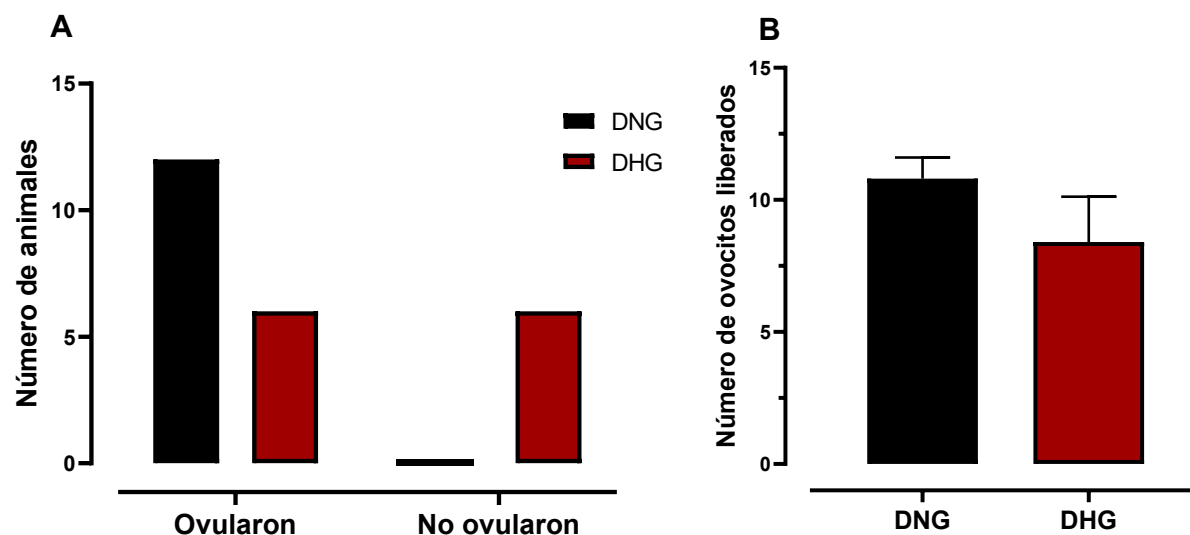
A: Las ratas DHG presentaron un mayor porcentaje de individuos con aciclicidad con respecto a las del grupo DNG. **B:** Ciclo estral de dos ratas representativos del grupo DNG. **C:** Ciclo estral de dos ratas representativos del grupo DHG.

Se obtuvo la tasa de ovulación y la cantidad de ovocitos liberados por ambos ovarios de cada animal en el caso de aquellos que si ovularon. En la figura 15 se presentan los datos de la ovulación. En A el total de animales que ovularon y que no ovularon de cada grupo. El grupo DHG presentó un total de 50% de individuos ovulantes, contra un 100% de animales ovulantes en el grupo DNG. En B se presentan el número de ovocitos liberados por cada grupo. Se observa una tendencia a la disminución en la cantidad de ovocitos liberados de los animales DHG (8.400 ± 1.720 ovocitos) que si

ovularon con respecto a los animales que ovularon de DNG (10.80 ± 0.800 ovocitos) sin diferencias significativas ($p = 0.2415$ *t student*).

Figura 15 1

Ovulación



A: Tasa de animales ovulantes TAO. Las del grupo DNG presentaron un 100% en la tasa de ovulación, mientras que las ratas del grupo DHG presentaron una tasa del 50% de ovulación. **B:** Respuesta ovulatoria de ratas DNG con respecto a ratas DHG. Prueba *t-student* $p \leq 0.05$. No se encontraron diferencias significativas

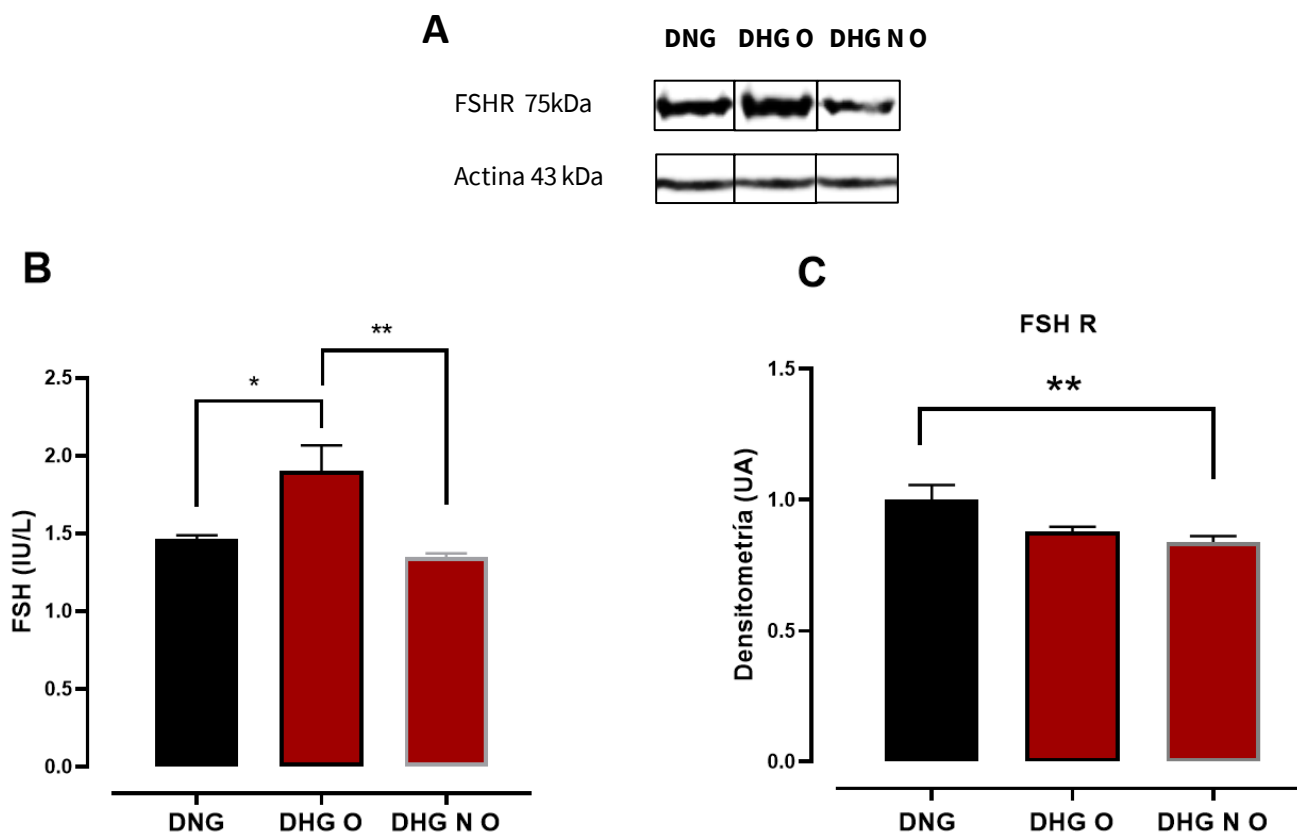
El síndrome metabólico causa una alteración en la concentración de hormonas gonadotrópicas y el receptor a FSH.

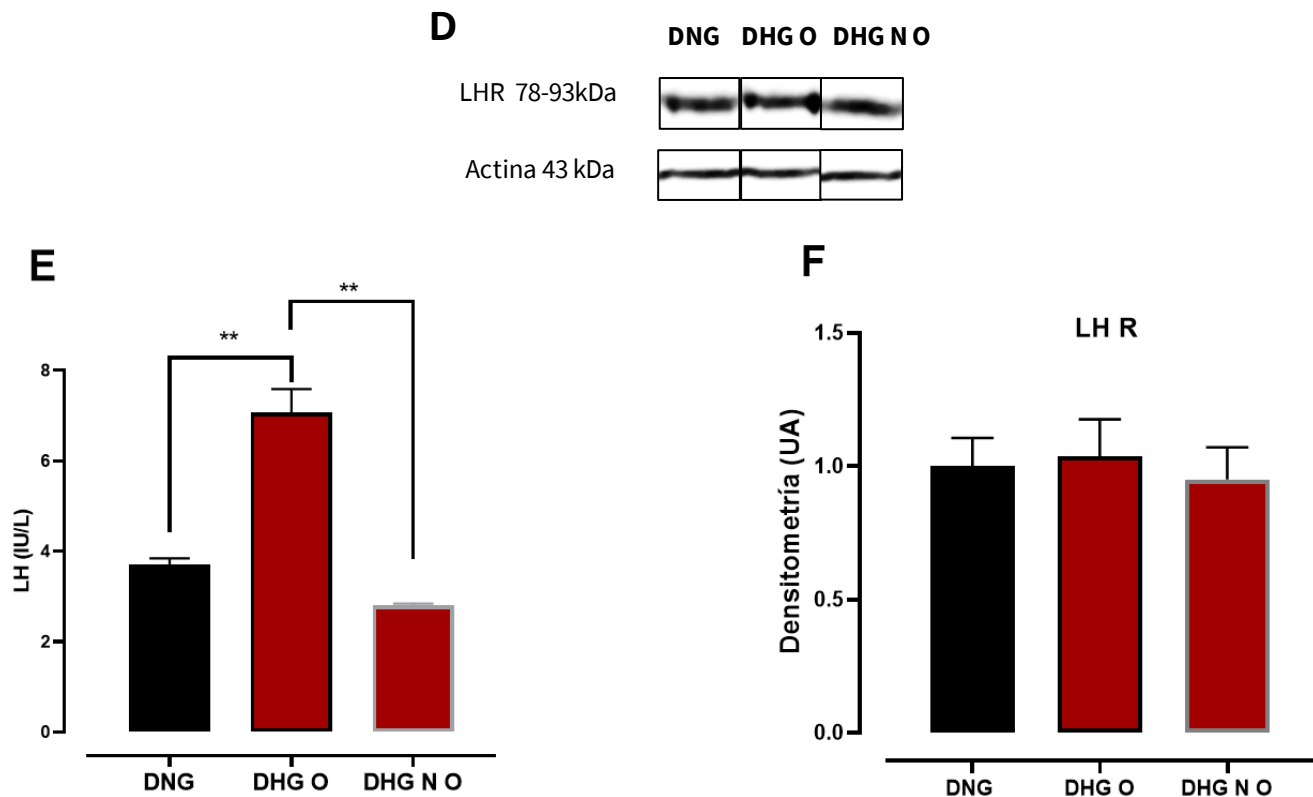
En la figura 16 se presentan las hormonas gonadotrópicas con sus respectivos receptores en ovario. La medición se realizó en los individuos DNG ($n=6$) y en el grupo DHG se dividió en aquellos ovulantes (DHG O $n=6$) y no ovulantes (DHG N O $n=6$). Los resultados obtenidos muestran que la hormona FSH tiene un incremento significativo en los individuos DHG O (1.900 ± 0.1673 IU/L) en comparación con aquellos DNG sanos (1.467 ± 0.021 IU/L) ($p = 0.0195$ ANOVA de dos vías), y una disminución significativa en aquellos DHG N O (1.350 ± 0.022 IU/L) con respecto a los DHG ovulantes ($p = 0.0047$ ANOVA de dos vías), además, los receptores a FSH se encuentran expresados

significativamente menos en las ratas del grupo DHG no ovulantes (0.8401 ± 0.0223 UA) con respecto al grupo DNG (1.00 ± 0.0574 UA) ($p=0.0321$ ANOVA de dos vías), mientras que, si bien la hormona LH se encuentra en concentraciones significativamente más altas en los individuos DHG ovulantes (7.067 ± 0.522 IU/L) en comparación con el grupo DNG (3.700 ± 0.1461 IU/L) ($p = < 0.0001$ ANOVA de dos vías) y significativamente menor en individuos DHG no ovulantes (2.800 ± 0.044 IU/L) ($p = < 0.0001$ ANOVA de dos vías). Mientras que en el receptor a LH no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (DHG ovulantes 1.036 ± 0.1390 UA, DHG no ovulantes 0.9503 ± 0.1207 UA, DNG 1.00 ± 0.1060 UA) ($p = 0.1252$ ANOVA de dos vías).

Figura 16 1

Hormonas y receptores gonadotrópicos





Se representa la media $\pm$ EEM de las ratas de los grupos DNG y DHG. **A:** Bandas proteicas obtenidas por la técnica de western blot, correspondientes al peso molecular de FSHR y actina, utilizada como control de carga. **B:** Niveles de la hormona folículo estimulante (FSH) en ratas ovulantes y no ovulantes. **C:** Receptor a FSH (75kDa) expresado significativamente menos en el grupo DHG. **D:** Bandas proteicas obtenidas por la técnica de western blot, correspondientes al peso molecular de LHR y actina, utilizada como control de carga. **E:** Niveles de la hormona luteinizante (LH) en ratas ovulantes y no ovulantes. Existe un incremento significativo en las concentraciones de LH en individuos ovulantes con SM. **F:** Receptor a LH (78-93kDa) no muestra diferencias significativas entre los tres grupos. Prueba ANOVA de dos vías donde * indica diferencias significativas $p \leq 0.05$, ** indica diferencias significativas $p \leq 0.005$

El síndrome metabólico genera estados de hiperandrogenismo.

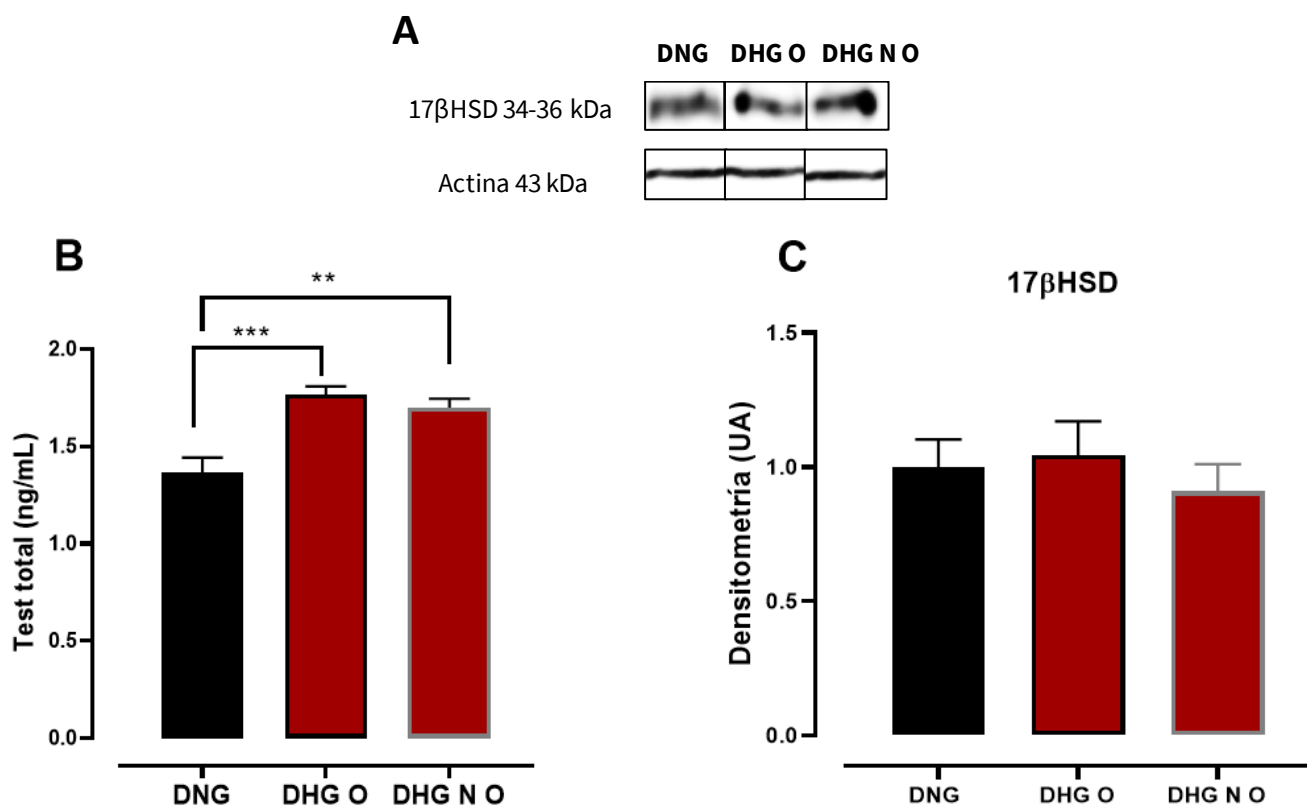
Finalmente, se evaluó la concentración de las hormonas esteroideas y se estimó la concentración de las enzimas limitantes para la síntesis de estas hormonas dentro del ovario, la p450 aromatasa y la 17β hidroxisteroide deshidrogenasa para analizar si existe un efecto en la concentración en presencia de síndrome metabólico.

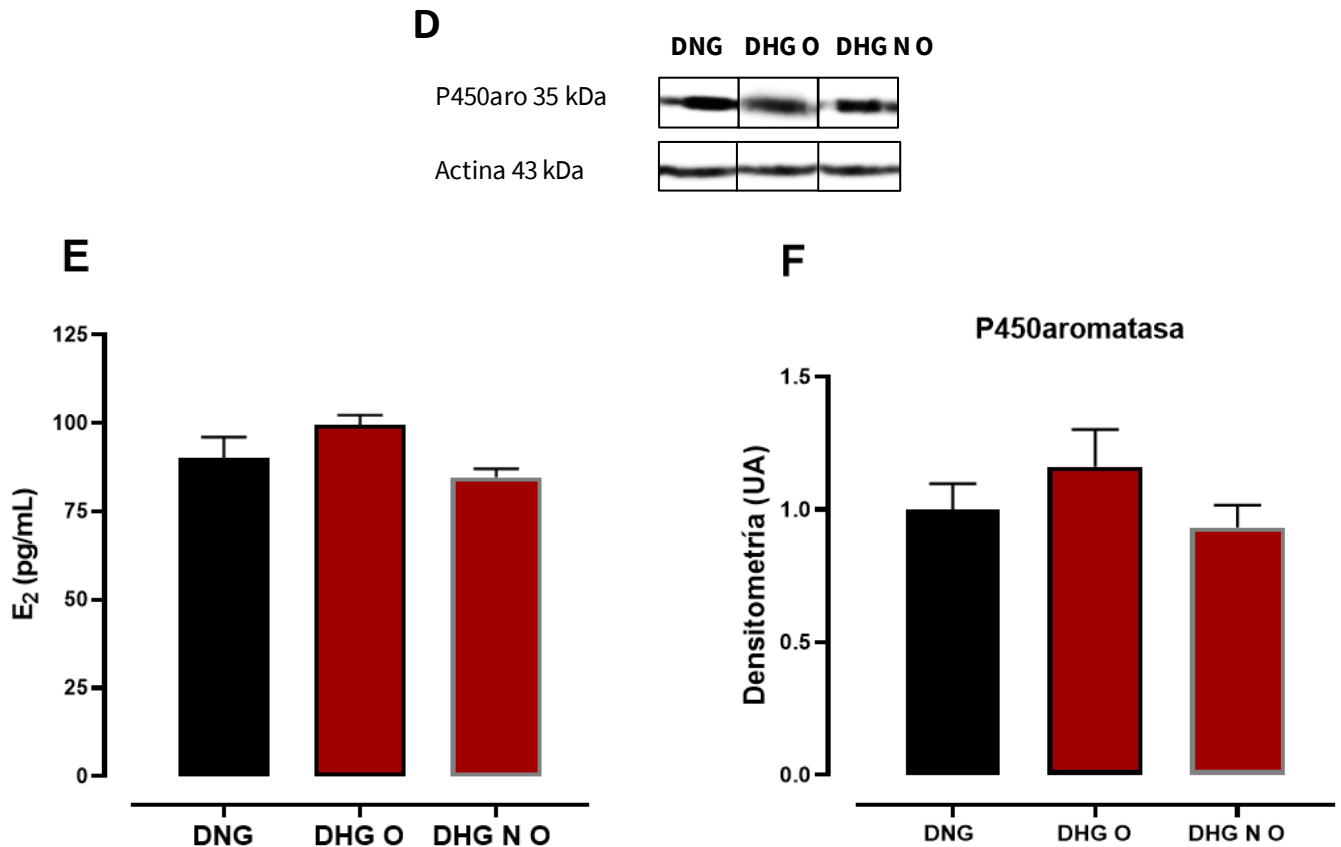
En la figura 17 se observan estados de hiperandrogenismo tanto en los individuos DHG ovulantes (1.767 ± 0.042 ng/mL) ($p = 0.0019$ ANOVA de dos vías) como aquellos DHG no ovulantes (1.700 ± 0.044 ng/mL) ($p = 0.0065$ ANOVA de dos vías) comparado con los individuos DNG (1.367 ± 0.076 ng/mL), sin embargo, no existen diferencias significativas en la concentración del estradiol (individuos DHG ovulantes (99.40 ± 0.042 pg/mL), DHG no ovulantes (84.60 ± 2.460 pg/mL) e individuos DNG (90.00 ± 6.017 pg/mL) ($p = 0.4265$ ANOVA de dos vías)

Tampoco se encontraron diferencias significativas en ambas enzimas 17BHSD1 (individuos DHG ovulantes (1.043 ± 0.1272 UA), DHG no ovulantes (0.9086 ± 0.1017 UA) e individuos DNG (1.00 ± 0.1030 UA) ($p = 0.1261$ ANOVA de dos vías) y P450 aromatasa (individuos DHG ovulantes (1.161 ± 0.1400 UA), DHG no ovulantes (0.9325 ± 0.0839 UA) e individuos DNG (1.00 ± 0.0966 UA) ($p = 0.2339$ ANOVA de dos vías)

Figura 17 1

Hormonas esteroideas estradiol y testosterona y sus enzimas limitantes p450 aromatasa y 17beta hidroxisteroide deshidrogenasa en el ovario





Se representa la media $\pm$ EEM de las ratas de los grupos DNG y DHG. **A:** Bandas proteicas obtenidas por la técnica de western blot, correspondientes al peso molecular de la enzima 17beta hidroxisteroide deshidrogenasa y actina, utilizada como control de carga **B:** Niveles de testosterona total, existe un incremento en la concentración de testosterona en individuos con síndrome metabólico. **C:** Enzima 17 beta hidroxisteroide deshidrogenasa (78-93kDa) no muestra diferencias significativas $p \leq 0.05$. **D:** Bandas proteicas obtenidas por la técnica de western blot, correspondientes al peso molecular de la enzima p450 aromatasa y actina, utilizada como control de carga. **E:** Niveles de estradiol (E₂), no existen diferencias significativas, $p \leq 0.05$. **F:** Enzima p450 aromatasa (35kDa), no existen diferencias significativas $p \leq 0.05$. Prueba ANOVA de dos vías donde * indica diferencias significativas $p \leq 0.05$, ** indica diferencias significativas $p \leq 0.005$, *** indica diferencias significativas $p \leq 0.001$.

11. Discusión

El presente trabajo establece un modelo de ratas hembra de la cepa *Long Evans* con alteraciones ováricas a nivel hormonal inducidas por el desarrollo del síndrome metabólico (SM) tras la administración de una dieta hiperglúcida (DHG) durante tres meses. Los resultados obtenidos evidencian que, a pesar de no observar cambios significativos en los parámetros zoométricos, las ratas desarrollaron un perfil bioquímico característico del SM, acompañado de disfunción ovárica y alteraciones hormonales que afectan directamente la dinámica del ciclo estral.

De acuerdo con lo reportado por Myles y colaboradores en 2023, quienes compararon los efectos de una dieta occidental, una dieta alta en carbohidratos y una dieta estándar en ratas *Long Evans* durante la adolescencia, los resultados del presente trabajo confirman que las hembras tienden a mantener un porcentaje de grasa corporal estable entre grupos experimentales aun ante el consumo de dietas hipercalóricas. En ambos casos, no se observaron aumentos significativos en el peso corporal ni en la masa grasa, lo que sugiere la existencia de mecanismos compensatorios hormonales o metabólicos en las hembras que modulan la acumulación de tejido adiposo (Myles et al., 2023).

A diferencia de lo observado en machos Wistar por Treviño y colaboradores en 2015 (Treviño et al., 2015) quienes reportaron incrementos significativos en peso corporal, índice de masa corporal y porcentaje de grasa al inducir el SM con una dieta hiperglúcida similar, en el presente estudio las ratas hembra *Long Evans* no mostraron dichos cambios. Esta discrepancia puede explicarse por las diferencias fisiológicas entre sexos, particularmente por la acción de las hormonas esteroideas. En los machos, la testosterona favorece el desarrollo de masa magra y el crecimiento somático (Bhasin et al., 2003; Quirós Cognuck et al., 2020) mientras que en las hembras se ha descrito una mayor tendencia a la acumulación de grasa hepática y al desarrollo de perfiles inflamatorios específicos caracterizados por niveles elevados de IL-1 β y TNF- α (Miras et al., 2014). Estos resultados respaldan la hipótesis de que las hembras pueden ser más susceptibles a la inflamación sistémica y hepática sin necesariamente mostrar cambios morfométricos evidentes en los primeros meses de exposición dietaria.

El índice de adiposidad disfuncional (DAI por sus siglas en inglés) obtenido en las ratas DHG (>1.065) refuerza la presencia de daño morfofuncional temprano del tejido adiposo, lo que concuerda con los hallazgos de Reyes-Barrera y colaboradores en 2021, quienes asocian valores elevados de DAI con alteraciones cardio metabólicas y pérdida de funcionalidad del tejido adiposo (Reyes-Barrera et al., 2021). Este indicador, junto con el perfil bioquímico observado (dislipidemia, hiperglicemia y resistencia a la insulina) confirma la inducción efectiva del SM en el modelo experimental, coincidiendo con lo descrito previamente por Treviño y colaboradores en 2015 (Treviño et al., 2015).

A nivel reproductivo, no se observaron diferencias en la aparición de la pubertad entre grupos, lo cual coincide con estudios como el de Hohos y colaboradores, que demuestran que la administración de dietas hipercalóricas a partir del destete no altera significativamente el inicio del desarrollo sexual (Hohos et al., 2018; Klump et al., 2021). No obstante, el grupo DHG presentó una alta prevalencia de aciclicidad y una mayor frecuencia de fases de diestro, en comparación con el grupo control. Estos resultados son consistentes con los reportes de Hohos y colaboradores en 2018 y Morsi y colaboradores en 2024, quienes observaron aciclicidad en más del 50% de las hembras expuestas a dietas hipercalóricas, acompañadas de irregularidad en el ciclo estral y reducción en la ovulación (Hohos et al., 2018; MORSI et al., 2024).

Aunque el grupo DHG presentó concentraciones elevadas de testosterona, este incremento se observó tanto en hembras ovulatorias como acíclicas, lo que sugiere que el hiperandrogenismo por sí solo no es suficiente para explicar la irregularidad del ciclo estral. En ese sentido, es probable que la aciclicidad observada esté relacionada con una alteración en la sensibilidad ovárica a las gonadotropinas, particularmente a FSH, que podría ser explicado a través de la diferencia en expresión de receptores a FSH visto en las hembras DHG no ovulantes, mostrando una falta de comunicación entre hormona (FSH) y su receptor, así como con cambios en el microambiente folicular asociados a inflamación y estrés oxidativo, que se han demostrado estar presente en modelos de SM y de SOPQ donde se han documentado niveles elevados de ROS, junto con un aumento de marcadores de peroxidación lipídica como el malondialdehído (MDA), tanto en suero como en líquido folicular, causando que se interrumpan las acciones de la FSH y la LH, incluso induciendo apoptosis en las células de la granulosa, impidiendo así la maduración folicular adecuada (Liu et al., 2025; Treviño et al., 2015). Estas alteraciones podrían impedir una adecuada inducción de

la aromatasa y la producción de estrógenos necesarios para el feedback positivo y la ovulación, prolongando la fase de diestro en un grupo de hembras, aunque estas muestren un perfil androgénico similar (Hohos et al., 2018; Rocks & Kundakovic, 2023).

Si bien no se observaron diferencias significativas del E_2 y la p450aromatasa entre los grupos DHG O y DHG N O, se observa una tendencia que podría indicarnos que el problema a nivel gonadotrópico tarda en verse reflejado a nivel hormonal dentro del ovario, pero la maduración folicular si se ve afectada de inmediato.

En el modelo del presente trabajo no se evidenció un incremento correlacionado en la expresión del LHR y la hormona LH en el ovario ni en la actividad esteroidogénica local. Esto sugiere que el hiperandrogenismo observado no se originó directamente a partir de la vía clásica ovárica dependiente de LH, sino que pudo provenir de una fuente extrínseca: la corteza adrenal, regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA).

En condiciones fisiológicas, la hormona luteinizante (LH) desempeña un papel esencial en la esteroidogénesis ovárica a través de su unión al receptor de LH (LHR) localizado en las células de la teca interna (De los Reyes et al., 2017). La activación de su receptor LHR, estimula la adenilatociclasa y la producción de AMPc, lo que activa la proteína quinasa A (PKA) (Kishi et al., 2018). Esta cascada induce la expresión de la proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR por sus siglas en inglés), que es responsable del transporte de colesterol desde la membrana externa hacia la interna de la mitocondria, un paso limitante en la síntesis de esteroides (Bremer & Miller, 2014). De esta manera, la LH regula indirectamente la producción de estradiol al generar los andrógenos precursores que la aromatasa (CYP19A1) transforma en estrógenos dentro de las células de la granulosa (Bremer & Miller, 2014).

En el presente trabajo, el consumo crónico de una dieta hiperglucídica indujo alteraciones metabólicas incluyendo hiperglucemia persistente, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina y disfunción del tejido adiposo. Estas condiciones se ha observado que activan de manera sostenida el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) a través de diferentes vías (Ahmad et al., 2019; Buhl et al., 2007).

Una de estas vías es la metabólica en presencia de hiperinsulinemia al incrementar la secreción de CRH, que estimula la liberación de ACTH en la hipófisis anterior, y la ACTH, a su vez, actúa sobre la corteza adrenal, particularmente la zona reticularis, incrementando la expresión de la enzima del citocromo p450 17a1 (CYP17A1) y 3 β hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), enzimas responsables de la síntesis de andrógenos adrenales, principalmente DHEA y androstenediona (Bhasin et al., 2003; Unluhizarci et al., 2021). Diversos trabajos (Ahmad et al., 2019; Bhasin et al., 2003; Buhl et al., 2007; Unluhizarci et al., 2021) han demostrado este mecanismo a nivel adrenal como el de Buhl y colaboradores en 2007 en donde trabajaron con ratas SD hiperinsulinémicas desde los 14 días de edad y encontraron que, ante el estrés metabólico temprano, se genera hiperactividad crónica del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, lo que resulta en un aumento de las concentraciones plasmáticas de corticosterona y con ello sustrato disponible para la síntesis androgénica (Buhl et al., 2007)

Otra vía es a través de la potenciación de la vía PI3K/AKT, ya que la insulina promueve el acoplamiento del receptor a Melanocortina 2 (MCR2), el cual actúa como principal receptor de ACTH (Stener-Victorin et al., 2005; H. Zhang et al., 2016).

Estos andrógenos adrenales circulantes pueden convertirse periféricamente en testosterona mediante la acción de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β HSD) en hígado, tejido adiposo o incluso en el propio ovario. Así, el exceso de testosterona presente en el modelo no refleja una sobreproducción intrínseca ovárica, sino una sobreproducción adrenal secundaria al estrés metabólico crónico (H. Zhang et al., 2016). En conjunto, estos mecanismos contribuyen a un estado de hiperandrogenismo de origen adrenal, independiente de la estimulación ovárica mediada por LH, lo que explica el por qué no existen cambios significativos en la expresión del LHR ovárico observada en este modelo, así como el por qué no se observó una sobreexpresión de enzimas ováricas esteroideogénicas, a pesar del hiperandrogenismo evidente en suero.

En este trabajo, además, no se encontraron diferencias significativas entre grupos DNG y DHG en cuanto a la concentración de estradiol y la expresión enzimática de la p450 aromatasa. Si bien se esperaba observar una alteración que podría explicar la anovulación, no se descarta que pueda haber una falta de estímulo o comunicación entre las hormonas esteroideas y las gonadotrópicas.

En condiciones normales, el aumento transitorio de estradiol durante el proestro ejerce un efecto de retroalimentación positiva sobre el eje HHG. Este efecto está mediado principalmente por los receptores estrogénicos α (ER α) y β (ER β) localizados en neuronas del hipotálamo y células gonadotropas de la hipófisis. El estradiol estimula la liberación de kisspeptina en el núcleo preóptico y el área anteroventral periventricular (AVPV), lo que incrementa la actividad de las neuronas productoras de GnRH y desencadena el pico preovulatorio de LH (Totta et al., 2014; Herbison, 2018)

En el contexto del síndrome metabólico, este mecanismo se ve comprometido. La inflamación hipotalámica inducida por IL-6 y TNF- α (Leon et al., 2021), junto con la resistencia a la insulina, reduce la expresión de ER α en las neuronas *Kiss1*, atenuando la sensibilidad al estradiol, tal como explica León y colaboradores en 2021, que trabajaron con ratones knock-out condicional *Kiss1-Nhlh2* y observaron que la inflamación hipotalámica inducida por el daño en el gen *Nhlh2* encargado de la regulación de funciones corporales como el metabolismo, la actividad física, la obesidad y la fertilidad, generó citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α , característica del síndrome metabólico y que junto con la resistencia central a la insulina, alteró la señalización intracelular y la regulación transcripcional en neuronas *Kiss1* del núcleo AVPV (Leon et al., 2021). Estos procesos reducen la expresión y funcionalidad del receptor de estrógenos α (ER α), atenuando la capacidad de dichas neuronas para detectar el incremento fisiológico de estradiol necesario para la retroalimentación positiva. En consecuencia, la liberación de kisspeptina resulta insuficiente para inducir el pico preovulatorio de LH, perpetuando la anovulación y la aciclicidad observadas en el presente modelo experimental. (Leon et al., 2021). Con ello, no se genera el estímulo suficiente para la liberación del pico de LH, lo que perpetúa la anovulación y la aciclicidad observadas en el presente modelo.

De esta manera, el modelo de ratas hembra *Long Evans* sometidas a dieta hiperglúcida podría estar reflejando una disfunción dual: una disminución de la capacidad ovárica para responder a LH mediante la vía del colesterol y la esteroidogénesis, y una fuente extrínseca de andrógenos adrenales exacerbada por la activación del eje HHA. Esta combinación genera un estado de hiperandrogenismo sistémico, pérdida de la retroalimentación positiva del estrógeno y, por ende, una alteración profunda del ciclo estral y de la función reproductiva.

Finalmente, la disminución en la expresión del receptor FSHR observada en el grupo DHG, a pesar del aumento sérico de FSH, sugiere un mecanismo de desensibilización por sobreestimulación hormonal. Totta y colaboradores en 2014, y Clark y colaboradores en 2022 describen que la exposición crónica a niveles elevados de FSH puede inducir la internalización y degradación de su receptor, reduciendo la sensibilidad de las células de la granulosa (Totta et al., 2014; Clark et al., 2022). Este fenómeno se ve exacerbado por el ambiente inflamatorio e insulino-resistente del ovario, lo que limita la inducción de aromatasa (p450aro) y, en consecuencia, la producción de estrógenos (Lebbe & Woodruff, 2013).

12. Conclusión

Los resultados del presente estudio demuestran que el síndrome metabólico (SM) se manifiesta en el modelo experimental mediante hiperglucemia, hiperinsulinemia en ayuno, resistencia a la insulina y dislipidemia, aun en ausencia de obesidad. Asimismo, en ratas hembra adultas de la cepa Long-Evans, el SM se asocia con un incremento del índice de adiposidad disfuncional, lo que confirma que las alteraciones metabólicas pueden desarrollarse independientemente del aumento de peso corporal total.

De manera relevante, el SM impacta negativamente la función reproductiva, evidenciado por alteraciones en el ciclo estral, caracterizadas por aciclicidad y anovulación, así como por cambios en las concentraciones de gonadotropinas (FSH y LH) y en la expresión del receptor de FSH en el ovario. Adicionalmente, se observó un estado de hiperandrogenismo asociado a una desregulación en la síntesis de testosterona, pero no relacionado a la esteroidogénesis ovárica, lo que sugiere una alteración profunda a nivel del eje H-H-A y los mecanismos de regulación endocrina que la controlan.

En conjunto, estos hallazgos confirman que el SM va más allá de una vía metabólica y ejerce un efecto directo sobre la fisiología reproductiva femenina. La alteración del ciclo estral y de la función gonadotrópica pone de manifiesto la estrecha dinámica entre el metabolismo energético y la regulación endocrina del ovario. Asimismo, la presencia de hiperandrogenismo y de disfunción esteroidogénica proporciona un marco experimental que permite explicar fenómenos clínicos observados en mujeres con SM, tales como la irregularidad menstrual, la anovulación y la predisposición al desarrollo del SOPQ.

El presente estudio amplía la comprensión de los mecanismos que vinculan las alteraciones metabólicas con la disfunción reproductiva, al aportar evidencia experimental de que el SM ejerce un efecto modulador indirecto sobre la expresión de receptores gonadotrópicos y la regulación de la síntesis hormonal ovárica. Asimismo, establece un modelo animal robusto para el análisis de la interacción entre el metabolismo energético y la endocrinología reproductiva, lo que permite futuras investigaciones orientadas al diseño de terapias integrales que consideren en conjunto las alteraciones metabólicas y reproductivas. Estos hallazgos refuerzan la perspectiva de que la funcionalidad reproductiva femenina depende estrechamente del estado metabólico sistémico.

13. Referencias

- Adeniyi, M. (2019). Estrous Cycle Ratio as a Reproductive Index in the Rats. *American Journal of Biomedical Science & Research*, 4(2), 100–103. <https://doi.org/10.34297/AJBSR.2019.04.000772>
- Ahima, R. S., & Flier, J. S. (2000). Leptin. *Annual Review of Physiology*, 62(1), 413–437. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.62.1.413>
- Ahmad, M. H., Fatima, M., & Mondal, A. C. (2019). Role of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis, Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis and Insulin Signaling in the Pathophysiology of Alzheimer's Disease. *Neuropsychobiology*, 77(4), 197–205. <https://doi.org/10.1159/000495521>
- Ajayi, A. F., & Akhigbe, R. E. (2020). Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertility Research and Practice*, 6(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40738-020-00074-3>
- Al-Shahat, A., Hulail, M. A. E., Soliman, N. M. M., Khamis, T., Fericean, L. M., Arisha, A. H., & Moawad, R. S. (2022). Melatonin Mitigates Cisplatin-Induced Ovarian Dysfunction via Altering Steroidogenesis, Inflammation, Apoptosis, Oxidative Stress, and PTEN/PI3K/Akt/mTOR/AMPK Signaling Pathway in Female Rats. *Pharmaceutics*, 14(12), 2769. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122769>
- Azarbad, L., & Gonder-Frederick, L. (2010). Obesity in Women. *Psychiatric Clinics of North America*, 33(2), 423–440. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2010.01.003>
- Bakhtyukov, A. A., Derkach, K. V., Fokina, E. A., Lebedev, I. A., Sorokoumov, V. N., Bayunova, L. V., & Shpakov, A. O. (2023). Effect of Different Luteinizing Hormone Receptor Agonists on Ovarian Steroidogenesis in Mature Female Rats. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 59(1), 57–68. <https://doi.org/10.1134/S0022093023010052>
- Barquera S, Hernández-Barrera L, Trejo-Valdivia B, Shamah T, Campos-Nonato I, & Rivera-Dommarco J. (2020). Obesity in Mexico, prevalence and trends in adults. *Salud Publica Mex* , 62(6), 682–692.
- Becú-Villalobos, D., & Libertun, C. (1995). Development of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron regulation in the female rat. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 15(1), 165–176. <https://doi.org/10.1007/BF02069564>
- Bhasin, S., Taylor, W. E., Singh, R., Artaza, J., Sinha-Hikim, I., Jasuja, R., Choi, H., & Gonzalez-Cadavid, N. F. (2003). The Mechanisms of Androgen Effects on Body Composition: Mesenchymal Pluripotent Cell as the Target of Androgen Action. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 58(12), M1103–M1110. <https://doi.org/10.1093/gerona/58.12.M1103>

- Blair, R. S., Acca, G. M., Tsao, B., Stevens, N., Maren, S., & Nagaya, N. (2022). Estrous cycle contributes to state-dependent contextual fear in female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 141, 105776. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2022.105776>
- Boesch, M., Lindhorst, A., Feio-Azevedo, R., Brescia, P., Silvestri, A., Lannoo, M., Deleus, E., Jaekers, J., Topal, H., Topal, B., Ostyn, T., Wallays, M., Smets, L., Van Melkebeke, L., Härtlova, A., Roskams, T., Bedossa, P., Verbeek, J., Govaere, O., ... van der Merwe, S. (2023). Adipose tissue macrophage dysfunction is associated with a breach of vascular integrity in NASH. *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.10.039>
- Boucher, J., Kleinridders, A., & Kahn, C. R. (2014). Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(1), a009191–a009191. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191>
- Bourque, M., Dluzen, D. E., & Di Paolo, T. (2012). Signaling pathways mediating the neuroprotective effects of sex steroids and SERMs in Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 33(2), 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2012.02.003>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bremer, A. A., & Miller, W. L. (2014). Regulation of Steroidogenesis. In *Cellular Endocrinology in Health and Disease* (pp. 207–227). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408134-5.00013-5>
- Buhl, E. S., Neschen, S., Yonemitsu, S., Rossbacher, J., Zhang, D., Morino, K., Flyvbjerg, A., Perret, P., Samuel, V., Kim, J., Cline, G. W., & Petersen, K. F. (2007). Increased hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and hepatic insulin resistance in low-birth-weight rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 293(5), E1451–E1458. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00356.2007>
- Busebee, B., Ghusn, W., Cifuentes, L., & Acosta, A. (2023a). Obesity: A Review of Pathophysiology and Classification. *Mayo Clinic Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2023.05.026>
- Busebee, B., Ghusn, W., Cifuentes, L., & Acosta, A. (2023b). Obesity: A Review of Pathophysiology and Classification. *Mayo Clinic Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2023.05.026>
- Cato, A. C. B., Nestl, A., & Mink, S. (2002). Rapid Actions of Steroid Receptors in Cellular Signaling Pathways. *Science's STKE*, 2002(138). <https://doi.org/10.1126/stke.2002.138.re9>
- Cheng, H. S., Ton, S. H., Phang, S. C. W., Tan, J. B. L., & Abdul Kadir, K. (2017). Increased susceptibility of post-weaning rats on high-fat diet to metabolic syndrome. *Journal of Advanced Research*, 8(6), 743–752. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.002>

- Clark, Z. L., Ruebel, M. L., Schall, P. Z., Karl, K. R., Ireland, J. J., & Latham, K. E. (2022). Follicular Hyperstimulation Dysgenesis: New Explanation for Adverse Effects of Excessive FSH in Ovarian Stimulation. *Endocrinology*, 163(9). <https://doi.org/10.1210/endocr/bqac100>
- Consenso multidisciplinar sobre dislipidemia aterogénica. (2013). *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis*, 25(2), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2013.03.001>
- Cornier, M.-A., Dabelea, D., Hernandez, T. L., Lindstrom, R. C., Steig, A. J., Stob, N. R., Van Pelt, R. E., Wang, H., & Eckel, R. H. (2008). The Metabolic Syndrome. *Endocrine Reviews*, 29(7), 777–822. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0024>
- Cossio-Bolaños, M. A., Gómez, R., Rojas, J., & Flores, H. (2010). Proposed equations for predicting body composition of male wistar rats. : : *Anales de La Facultad de Medicina*, 71(2), 97–102.
- De los Reyes, M., Palomino, J., Parraguez, V. H., & Ramirez, F. (2017). Analysis of LH receptor in canine ovarian follicles throughout the estrous cycle. *Theriogenology*, 93, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.029>
- Drummond, A. E. (2006). The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4(1), 16. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-16>
- Estienne, A., Bongrani, A., Reverchon, M., Ramé, C., Ducluzeau, P.-H., Froment, P., & Dupont, J. (2019). Involvement of Novel Adipokines, Chemerin, Visfatin, Resistin and Apelin in Reproductive Functions in Normal and Pathological Conditions in Humans and Animal Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4431. <https://doi.org/10.3390/ijms20184431>
- Fauser, B. C. J. M., Tarlatzis, B. C., Rebar, R. W., Legro, R. S., Balen, A. H., Lobo, R., Carmina, E., Chang, J., Yildiz, B. O., Laven, J. S. E., Boivin, J., Petraglia, F., Wijeyeratne, C. N., Norman, R. J., Dunaif, A., Franks, S., Wild, R. A., Dumesic, D., & Barnhart, K. (2012). Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertility and Sterility*, 97(1), 28-38.e25. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.09.024>
- Fernando Carrasco, N., José Eduardo Galgani, F., & Marcela Reyes, J. (2013). Síndrome de resistencia a la insulina. estudio y manejo. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(5), 827–837. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(13\)70230-X](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(13)70230-X)
- Flier, J. S., Cook, K. S., Usher, P., & Spiegelman, B. M. (1987). Severely Impaired Adipsin Expression in Genetic and Acquired Obesity. *Science*, 237(4813), 405–408. <https://doi.org/10.1126/science.3299706>
- Fu, Z., R. Gilbert, E., & Liu, D. (2013). Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Current Diabetes Reviews*, 9(1), 25–53. <https://doi.org/10.2174/157339913804143225>

- Fuller, P. J. (1991). The steroid receptor superfamily: mechanisms of diversity. *The FASEB Journal*, 5(15), 3092–3099. <https://doi.org/10.1096/fasebj.5.15.1743440>
- Galgani, J. E., & Ravussin, E. (2012). Postprandial whole-body glycolysis is similar in insulin-resistant and insulin-sensitive non-diabetic humans. *Diabetologia*, 55(3), 737–742. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2413-0>
- Gassmann, M., Grenacher, B., Rohde, B., & Vogel, J. (2009). Quantifying Western blots: Pitfalls of densitometry. *ELECTROPHORESIS*, 30(11), 1845–1855. <https://doi.org/10.1002/elps.200800720>
- Gunawan, S., Aulia, A., & Soetikno, V. (2021). Development of rat metabolic syndrome models: A review. *Veterinary World*, 1774–1783. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1774-1783>
- Herbison, A. E. (2018). The Gonadotropin-Releasing Hormone Pulse Generator. *Endocrinology*, 159(11), 3723–3736. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00653>
- Hernández López, L. E., Mondragón Ceballos, R., Estrada Camarena, E. M., Mondragón Ceballos, R., & Barrios De Tomasi, J. (2023). Evaluación de las fases del ciclo estral de la rata mediante frotis vaginales y mediciones hormonales. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7(2), 7482–7505. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i2.5877
- Hevener, A. L., Clegg, D. J., & Mauvais-Jarvis, F. (2015). Impaired estrogen receptor action in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 418, 306–321. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.020>
- Hohos, N. M., Cho, K. J., Swindle, D. C., & Skaznik-Wikiel, M. E. (2018). High-fat diet exposure, regardless of induction of obesity, is associated with altered expression of genes critical to normal ovulatory function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 470, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.10.016>
- Hossain, Md. A., Al Ashik, S. A., Mahin, M. R., Al Amin, Md., Rahman, M. H., Khan, Md. A., & Emran, A. Al. (2022). Systems biology and in silico-based analysis of PCOS revealed the risk of metabolic disorders. *Heliyon*, 8(12), e12480. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12480>
- Hsieh, C.-C., Liao, C.-C., Liao, Y.-C., Hwang, L. S., Wu, L.-Y., & Hsieh, S.-C. (2016). Proteomic changes associated with metabolic syndrome in a fructose-fed rat model. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(4), 754–761. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.03.005>
- Hsueh, A. J. W., McGee, E. A., Hayashi, M., & Hsu, S. Y. (2000). Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 163(1–2), 95–100. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00245-2](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00245-2)
- Jiang, X., Dias, J. A., & He, X. (2014). Structural biology of glycoprotein hormones and their receptors: Insights to signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 424–451. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.08.021>

- Johnson, V. R., Anekwe, C. V., Washington, T. B., Chhabria, S., Tu, L., & Stanford, F. C. (2023). A Women's health perspective on managing obesity. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 78, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2023.04.007>
- Kershaw, E. E., & Flier, J. S. (2004). Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6), 2548–2556. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0395>
- Kishi, H., Kitahara, Y., Imai, F., Nakao, K., & Suwa, H. (2018). Expression of the gonadotropin receptors during follicular development. *Reproductive Medicine and Biology*, 17(1), 11–19. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12075>
- Klump, K. L., Kashy, D. A., Culbert, K. M., Sinclair, E. B., Hildebrandt, B. A., Van Huysee, J. L., O'Connor, S. M., Fowler, N., Johnson, A., & Sisk, C. L. (2021). The effects of puberty and ovarian hormone removal on developmental trajectories of palatable food and chow intake in female rats. *Physiology & Behavior*, 235, 113394. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113394>
- Krentzel, A. A., Proaño, S. B., Dorris, D. M., Setzer, B., & Meitzen, J. (2022). The estrous cycle and 17 β -estradiol modulate the electrophysiological properties of rat nucleus accumbens core medium spiny neurons. *Journal of Neuroendocrinology*, 34(6). <https://doi.org/10.1111/jne.13122>
- Kwok, T. C., Ojha, S., & Symonds, M. E. (2020). Obesity/Perinatal Origins of Obesity. In *Maternal-Fetal and Neonatal Endocrinology* (pp. 891–911). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814823-5.00051-9>
- Laclaustra Gimeno, M., Bergua Martínez, C., Pascual Calleja, I., & Casasnovas Lenguas, J. A. (2005). Síndrome metabólico. Concepto y fisiopatología. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 5(4), 3D-10D. [https://doi.org/10.1016/S1131-3587\(05\)74114-5](https://doi.org/10.1016/S1131-3587(05)74114-5)
- Lakka, H.-M., & Bouchard, C. (2007). Etiology of Obesity. In *Surgical Management of Obesity* (pp. 18–28). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-0089-1.50008-X>
- Lebbe, M., & Woodruff, T. K. (2013). Involvement of androgens in ovarian health and disease. *Molecular Human Reproduction*, 19(12), 828–837. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat065>
- Lee, S.-H., Park, S.-Y., & Choi, C. S. (2022). Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. *Diabetes & Metabolism Journal*, 46(1), 15–37. <https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0280>
- Leon, S., Talbi, R., McCarthy, E. A., Ferrari, K., Fergani, C., Naule, L., Choi, J. H., Carroll, R. S., Kaiser, U. B., Aylwin, C. F., Lomniczi, A., & Navarro, V. M. (2021). Sex-specific pubertal and metabolic regulation of Kiss1 neurons via Nhlh2. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.69765>
- Li, M., Chi, X., Wang, Y., Setrerrahmane, S., Xie, W., & Xu, H. (2022). Trends in insulin resistance: insights into mechanisms and therapeutic strategy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 216. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01073-0>

- Liu, H., Jin, L., Wang, X., Shi, J., He, Y., Sun, N., & Yang, F. (2025). Reactive oxygen species in polycystic ovary syndrome: Mechanistic insights into pathogenesis and therapeutic opportunities. *Redox Biology*, 85, 103776. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2025.103776>
- Luengo Fernández, E., Ordóñez Rubio, B., Bergua Martínez, C., & Laclaustra Gimeno, M. (2005). Obesidad, dislipemia y síndrome metabólico. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 5(4), 21D-29D. [https://doi.org/10.1016/S1131-3587\(05\)74117-0](https://doi.org/10.1016/S1131-3587(05)74117-0)
- Lutsey, P. L., Steffen, L. M., & Stevens, J. (2008). Dietary Intake and the Development of the Metabolic Syndrome. *Circulation*, 117(6), 754–761. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.716159>
- Madonna, R., & De Caterina, R. (2012). Aterogénesis y diabetes: resistencia a la insulina e hiperinsulinemia. *Revista Española de Cardiología*, 65(4), 309–313. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2011.11.010>
- MARCONDES, F. K., BIANCHI, F. J., & TANNO, A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, 62(4a), 609–614. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000400008>
- Marques, C., Meireles, M., Norberto, S., Leite, J., Freitas, J., Pestana, D., Faria, A., & Calhau, C. (2016). High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte*, 5(1), 11–21. <https://doi.org/10.1080/21623945.2015.1061723>
- Miras, A. D., Seyfried, F., Phinikaridou, A., Andia, M. E., Christakis, I., Spector, A. C., Botnar, R. M., & le Roux, C. W. (2014). Rats Fed Diets with Different Energy Contribution from Fat Do Not Differ in Adiposity. *Obesity Facts*, 7(5), 302–310. <https://doi.org/10.1159/000368622>
- MORSI, Y., EZZAT, G., ALI, M., EL-BAZ, M., & HUSSEIN, H. (2024). EFFECT OF HIGH FAT DIET ON ESTROUS CYCLE REGULARITY AND BODYWEIGHT IN FEMALE RATS. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 70(181), 57–68. <https://doi.org/10.21608/avmj.2024.255211.1210>
- Mosztbacher, D., Hanák, L., Farkas, N., Szentesi, A., Mikó, A., Bajor, J., Sarlós, P., Czimmer, J., Vincze, Á., Hegyi, P. J., Erőss, B., Takács, T., Czakó, L., Németh, B. C., Izbéki, F., Halász, A., Gajdán, L., Hamvas, J., Papp, M., ... Hegyi, P. (2020). Hypertriglyceridemia-induced acute pancreatitis: A prospective, multicenter, international cohort analysis of 716 acute pancreatitis cases. *Pancreatology*, 20(4), 608–616. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2020.03.018>
- Myles, E. M., Hamm, S. I., Allden, S. N., Romkey, I. D., O’Leary, M. E., & Perrot, T. S. (2023). A comparative study of Western, high-carbohydrate, and standard lab diet consumption throughout adolescence on metabolic and anxiety-related outcomes in young adult male and female Long-Evans rats. *Behavioural Brain Research*, 438, 114184. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2022.114184>
- Niewiadomska, J., Gajek-Marecka, A., Gajek, J., & Noszczyk-Nowak, A. (2022). Biological Potential of Polyphenols in the Context of Metabolic Syndrome: An Analysis of Studies on Animal Models. *Biology*, 11(4), 559. <https://doi.org/10.3390/biology11040559>

- Noubiap, J. J., Nansseu, J. R., Lontchi-Yimagou, E., Nkeck, J. R., Nyaga, U. F., Ngouo, A. T., Tounouga, D. N., Tianyi, F.-L., Foka, A. J., Ndoadoumgue, A. L., & Bigna, J. J. (2022). Geographic distribution of metabolic syndrome and its components in the general adult population: A meta-analysis of global data from 28 million individuals. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 188, 109924. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2022.109924>
- Nubiola, A., Ferrer, M., & Remolins, I. (2015). La asociación de hiperinsulinemia con riesgo cardiovascular y cáncer plantea nuevos retos en el abordaje del paciente con diabetes tipo 2, insulinoresistente. *Hipertensión y Riesgo Vascular*, 32(1), 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.hipert.2014.06.001>
- Nwankwo, M., Okamkpa, C. J., & Danborn, B. (2022). Comparison of diagnostic criteria and prevalence of metabolic syndrome using WHO, NCEP-ATP III, IDF and harmonized criteria: A case study from urban southeast Nigeria. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 16(12), 102665. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2022.102665>
- OMS. (2023). *Obesidad y sobrepeso*. Organización Mundial de La Salud .
- Otaghi, M., Azami, M., Khorshidi, A., Borji, M., & Tardeh, Z. (2019). The association between metabolic syndrome and polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 13(2), 1481–1489. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.01.002>
- Ottolenghi, C., Uda, M., Hamatani, T., Crisponi, L., Garcia, J., Ko, M., Pilia, G., Sforza, C., Schlessinger, D., & Schlessinger, D. (2004). Aging of Oocyte, Ovary, and Human Reproduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1034(1), 117–131. <https://doi.org/10.1196/annals.1335.015>
- Packard, C. J., Boren, J., & Taskinen, M.-R. (2020). Causes and Consequences of Hypertriglyceridemia. *Frontiers in Endocrinology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00252>
- Parhofer, K. G., & Laufs, U. (2019). The Diagnosis and Treatment of Hypertriglyceridemia. *Deutsches Ärzteblatt International*. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2019.0825>
- Plant, T. M., & Zeleznik, A. J. (2015). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2011-1-07288-0>
- Preguiça, I., Alves, A., Nunes, S., Fernandes, R., Gomes, P., Viana, S. D., & Reis, F. (2020). Diet-induced rodent models of obesity-related metabolic disorders—A guide to a translational perspective. *Obesity Reviews*, 21(12). <https://doi.org/10.1111/obr.13081>
- Qi, S., Yu, H., Hu, W., Xia, D., Shi, Q., & Wang, K. (2025). Evaluation of representativeness and sustainability of PCOS rat models induced by letrozole with or without high-fat diet. *Scientific Reports*, 15(1), 30754. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-15026-4>
- Quirós Cognuck, S., Reis, W. L., Silva, M., Debarba, L. K., Mecawi, A. S., de Paula, F. J. A., Rodrigues Franci, C., Elias, L. L. K., & Antunes-Rodrigues, J. (2020). Sex differences in body composition,

metabolism-related hormones, and energy homeostasis during aging in Wistar rats.

Physiological Reports, 8(20). <https://doi.org/10.14814/phy2.14597>

Rakic, D., Joksimovic Jovic, J., Jakovljevic, V., Zivkovic, V., Nikolic, M., Sretenovic, J., Nikolic, M., Jovic, N., Bicanin Ilic, M., Arsenijevic, P., Dimitrijevic, A., Vulovic, T., Ristic, N., Bulatovic, K., Bolevich, S., Stijak, L., & Pantovic, S. (2023). High Fat Diet Exaggerate Metabolic and Reproductive PCOS Features by Promoting Oxidative Stress: An Improved EV Model in Rats. *Medicina*, 59(6), 1104. <https://doi.org/10.3390/medicina59061104>

Ranasinha, S., Joham, A. E., Norman, R. J., Shaw, J. E., Zoungas, S., Boyle, J., Moran, L., & Teede, H. J. (2015). The association between Polycystic Ovary Syndrome (<scp>PCOS</scp>) and metabolic syndrome: a statistical modelling approach. *Clinical Endocrinology*, 83(6), 879–887. <https://doi.org/10.1111/cen.12830>

Reaven, G. M. (1988). Role of Insulin Resistance in Human Disease. *Diabetes*, 37(12), 1595–1607. <https://doi.org/10.2337/diab.37.12.1595>

Ressler, I. B., Grayson, B. E., & Seeley, R. J. (2014). Metabolic, Behavioral, and Reproductive Effects of Vertical Sleeve Gastrectomy in an Obese Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome. *Obesity Surgery*, 24(6), 866–876. <https://doi.org/10.1007/s11695-013-1153-2>

Ressler, I. B., Grayson, B. E., Ulrich-Lai, Y. M., & Seeley, R. J. (2015). Diet-induced obesity exacerbates metabolic and behavioral effects of polycystic ovary syndrome in a rodent model. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 308(12), E1076–E1084. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00182.2014>

Reyes-Barrera, J., Sainz-Escárrega, V. H., Medina-Urritia, A. X., Jorge-Galarza, E., Osorio-Alonso, H., Torres-Tamayo, M., Leal-Escobar, G., Posadas-Romero, C., Torre-Villalvazo, I., & Juárez-Rojas, J. G. (2021). Dysfunctional adiposity index as a marker of adipose tissue morpho-functional abnormalities and metabolic disorders in apparently healthy subjects. *Adipocyte*, 10(1), 142–152. <https://doi.org/10.1080/21623945.2021.1893452>

Richards, J. S., & Pangas, S. A. (2010). The ovary: basic biology and clinical implications. *Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 963–972. <https://doi.org/10.1172/JCI41350>

Rocks, D., & Kundakovic, M. (2023). Hippocampus-based behavioral, structural, and molecular dynamics across the estrous cycle. *Journal of Neuroendocrinology*, 35(2). <https://doi.org/10.1111/jne.13216>

Rogers, P., & Webb, G. P. (1980). Estimation of body fat in normal and obese mice. *British Journal of Nutrition*, 43(1), 83–86. <https://doi.org/10.1079/BJN19800066>

Rosini, T. C., Ramos da Silva, A. S., & de Moraes, C. (2012). Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. *Revista Da Associação Médica Brasileira (English Edition)*, 58(3), 383–387. [https://doi.org/10.1016/S2255-4823\(12\)70211-4](https://doi.org/10.1016/S2255-4823(12)70211-4)

- Saltiel, A. R. (2021). Insulin signaling in health and disease. *Journal of Clinical Investigation*, 131(1). <https://doi.org/10.1172/JCI142241>
- Santos-Baez, L. S., & Ginsberg, H. N. (2020). Hypertriglyceridemia—Causes, Significance, and Approaches to Therapy. *Frontiers in Endocrinology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00616>
- Schmitz, O., Rungby, J., Edge, L., & Juhl, C. B. (2008). On high-frequency insulin oscillations. *Ageing Research Reviews*, 7(4), 301–305. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2008.04.002>
- Shin, J., Lee, J., Lim, S., Ha, H., Kwon, H., Park, Y., Lee, W., Kang, M., Yim, H., Yoon, K., & Son, H. (2013). Metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes, and its clinical interpretations and usefulness. *Journal of Diabetes Investigation*, 4(4), 334–343. <https://doi.org/10.1111/jdi.12075>
- Siiteri, P. K. (1987). Adipose tissue as a source of hormones. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 45(1), 277–282. <https://doi.org/10.1093/ajcn/45.1.277>
- Silva-Ochoa, A. D., Velasteguí, E., Falconí, I. B., García-Solorzano, V. I., Rendón-Riofrio, A., Sanguña-Soliz, G. A., Vanden Berghe, W., & Orellana-Manzano, A. (2023). Metabolic syndrome: Nutri-epigenetic cause or consequence? *Heliyon*, 9(11), e21106. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21106>
- Silveira Rossi, J. L., Barbalho, S. M., Reverete de Araujo, R., Bechara, M. D., Sloan, K. P., & Sloan, L. A. (2022). Metabolic syndrome and cardiovascular diseases: Going beyond traditional risk factors. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 38(3). <https://doi.org/10.1002/dmrr.3502>
- Stener-Victorin, E., Ploj, K., Larsson, B.-M., & Holmäng, A. (2005). Rats with steroid-induced polycystic ovaries develop hypertension and increased sympathetic nervous system activity. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3(1), 44. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-44>
- Stocks, T., Bjørge, T., Ulmer, H., Manjer, J., Häggström, C., Nagel, G., Engeland, A., Johansen, D., Hallmans, G., Selmer, R., Concin, H., Tretli, S., Jonsson, H., & Stattin, P. (2015). Metabolic risk score and cancer risk: pooled analysis of seven cohorts. *International Journal of Epidemiology*, 44(4), 1353–1363. <https://doi.org/10.1093/ije/dyv001>
- Suckale, J. (2008). Pancreas islets in metabolic signaling - focus on the beta-cell. *Frontiers in Bioscience, Volume*(13), 7156. <https://doi.org/10.2741/3218>
- Tang, N., Ma, J., Tao, R., Chen, Z., Yang, Y., He, Q., Lv, Y., Lan, Z., & Zhou, J. (2022). The effects of the interaction between BMI and dyslipidemia on hypertension in adults. *Scientific Reports*, 12(1), 927. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-04968-8>
- Tetsuka, M., Milne, M., & Hillier, S. G. (1998). Expression of oestrogen receptor isoforms in relation to enzymes of oestrogen synthesis in rat ovary¹This work was supported by the UK Medical

- Research Council (Program Grant 8929853).1. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 141(1–2), 29–35. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(98\)00101-4](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00101-4)
- Totta, P., Pesiri, V., Marino, M., & Acconcia, F. (2014). Lysosomal Function Is Involved in 17 β -Estradiol-Induced Estrogen Receptor α Degradation and Cell Proliferation. *PLoS ONE*, 9(4), e94880. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094880>
- Treviño, S., Aguilar-Alonso, P., Flores Hernandez, J. A., Brambila, E., Guevara, J., Flores, G., Lopez-Lopez, G., Muñoz-Arenas, G., Morales-Medina, J. C., Toxqui, V., Venegas, B., & Diaz, A. (2015). A high calorie diet causes memory loss, metabolic syndrome and oxidative stress into hippocampus and temporal cortex of rats. *Synapse*, 69(9), 421–433. <https://doi.org/10.1002/syn.21832>
- Unluhizarci, K., Karaca, Z., & Kelestimur, F. (2021). Role of insulin and insulin resistance in androgen excess disorders. *World Journal of Diabetes*, 12(5), 616–629. <https://doi.org/10.4239/wjd.v12.i5.616>
- Valenzuela, P. L., Carrera-Bastos, P., Castillo-García, A., Lieberman, D. E., Santos-Lozano, A., & Lucia, A. (2023). Obesity and the risk of cardiometabolic diseases. *Nature Reviews Cardiology*, 20(7), 475–494. <https://doi.org/10.1038/s41569-023-00847-5>
- Villalobos, J. Á. C. (2016). Obesity: the real pandemic of the 21st century. *Cirugía y Cirujanos (English Edition)*, 84(5), 351–355. <https://doi.org/10.1016/j.circen.2016.08.013>
- Vintimilla, R., Seyedahmadi, A., Hall, J., Johnson, L., & O'Bryant, S. (2023). Association of Area Deprivation Index and hypertension, diabetes, dyslipidemia, and Obesity: A Cross-Sectional Study of the HABS-HD Cohort. *Gerontology and Geriatric Medicine*, 9. <https://doi.org/10.1177/23337214231182240>
- Violin, A., Enard, E., Blin, J., Paillusson, D., Collin, A., Guénet, D., Raverot, V., Bach-Ngohou, K., & Masson, D. (2023). Insulin: Know what your immunoassay detects. Evaluation of two new immunoassays. *Clinica Chimica Acta*, 548, 117516. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117516>
- von Frankenberg, A. D., do Nascimento, F. V., Gatelli, L. E., Nedel, B. L., Garcia, S. P., de Oliveira, C. S., Saddi-Rosa, P., Reis, A. F., Canani, L. H., & Gerchman, F. (2014). Major components of metabolic syndrome and adiponectin levels: a cross-sectional study. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 6(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-6-26>
- Vryonidou, A., Paschou, S. A., Muscogiuri, G., Orio, F., & Goulis, D. G. (2015). MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Metabolic syndrome through the female life cycle. *European Journal of Endocrinology*, 173(5), R153–R163. <https://doi.org/10.1530/EJE-15-0275>
- Wang, H., Wang, X., Zhou, D., Zheng, L., Zhang, J., Huo, Y., & Tian, H. (2013). Effects of low-dose, long-term formaldehyde exposure on the structure and functions of the ovary in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 29(7), 609–615. <https://doi.org/10.1177/0748233711430983>

- Wierman, M. E. (2007). Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action. *Advances in Physiology Education*, 31(1), 26–33. <https://doi.org/10.1152/advan.00086.2006>
- Williams, C. J., & Erickson, G. F. (2000). *Morphology and Physiology of the Ovary*.
- Yao, L., Wei, J., Shi, S., Guo, K., Wang, X., Wang, Q., Chen, D., & Li, W. (2017). Modified lingguizhugan decoction incorporated with dietary restriction and exercise ameliorates hyperglycemia, hyperlipidemia and hypertension in a rat model of the metabolic syndrome. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 132. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1557-y>
- Yudkin, J. S., Juhan-Vague, I., Hawe, E., Humphries, S. E., di Minno, G., Margaglione, M., Tremoli, E., Kooistra, T., Morange, P. E., Lundman, P., Mohamed-Ali, V., & Hamsten, A. (2004). Low-grade inflammation may play a role in the etiology of the metabolic syndrome in patients with coronary heart disease: the HIFMECH study. *Metabolism*, 53(7), 852–857. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2004.02.004>
- Zhang, H., Yi, M., Zhang, Y., Jin, H., Zhang, W., Yang, J., Yan, L., Li, R., Zhao, Y., & Qiao, J. (2016). High-fat diets exaggerate endocrine and metabolic phenotypes in a rat model of DHEA-induced PCOS. *REPRODUCTION*, 151(4), 431–441. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0542>
- Zhang, T., Chen, J., Tang, X., Luo, Q., Xu, D., & Yu, B. (2019). Interaction between adipocytes and high-density lipoprotein: new insights into the mechanism of obesity-induced dyslipidemia and atherosclerosis. *Lipids in Health and Disease*, 18(1), 223. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-1170-9>
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425–432. <https://doi.org/10.1038/372425a0>

ANEXO A

Protocolo para la prueba de tolerancia oral a la glucosa PTOG y prueba de tolerancia oral a la insulina PTOI y protocolo para la cuantificación de parámetros bioquímicos en sangre. (Treviño et al., 2015)

Después de 90 días de administración de la dieta, se retiró la comida a las ratas de ambos grupos para asegurar un ayuno de 5 horas, y se tomaron muestras de sangre para análisis posteriores.

La sangre se obtuvo de la aorta abdominal de ratas anestesiadas (usando pentobarbital sódico, 50 mg/kg de peso corporal, vía intraperitoneal).

La sangre recolectada se procesó mediante un método de microcentrifuga, y los sueros se almacenaron en un congelador a -70°C .

Se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa en animales despiertos a las 9:00 a.m. La carga de glucosa (75 g en 100 mL/70 kg) se administró por vía oral, y los niveles de glucosa en sangre se determinaron en muestras de sangre caudal tomadas a los 0, 30, 60 y 90 minutos después de la carga de glucosa.

Las determinaciones basales de glucosa, la prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT), los lípidos totales, triglicéridos, ácidos grasos libres, lipoproteína de alta densidad (HDL), lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y finalmente lipoproteína de baja densidad (LDL) se determinaron mediante técnicas colorimétricas (espectrofotómetro BT-330, Biosystems).

Las concentraciones séricas de insulina (0, 30, 60 y 90 minutos post carga de glucosa) se determinaron mediante un inmunoensayo ELISA, y el complejo antígeno-anticuerpo se midió a 415 nm en un lector de placas Stat Fax 2600 (WinerLab Group, EE. UU.).

La concentración de insulina se obtuvo a partir de una curva estándar con un rango de 0 a 20 $\mu\text{U/mL}$.

Todas las mediciones se realizaron después de los 90 días. Posteriormente, los datos de glucosa e insulina se recopilaron a partir del área total bajo la curva (AUC), y las concentraciones se calcularon utilizando el método trapezoidal (Potteiger et al., 2002; Purves, 1992).

ANEXO B

Protocolo para la cuantificación proteica por el Método de Bradford. (Bradford, 1976)

2.1 Protocolo Estándar

1. El protocolo estándar puede realizarse en tres formatos diferentes: 5 ml, 1 ml (cubeta) y 250 μ l (microplaca). El rango lineal de estos ensayos para BSA (albúmina sérica bovina) es de 125–1,000 μ g/ml, mientras que para gammaglobulina es de 125–1,500 μ g/ml.
2. Saque el reactivo colorante 1x del almacenamiento a 4 °C y deje que alcance la temperatura ambiente. Invierta el frasco unas cuantas veces antes de usarlo.
3. Si se usa la solución estándar de BSA o de gammaglobulina a 2 mg/ml, consulte las tablas del apéndice como guía para diluir el estándar. Use como diluyente el mismo tampón que el de las muestras. Normalmente las soluciones se analizan por duplicado o triplicado. Las muestras en blanco (0 μ g/ml) deben prepararse con agua y reactivo colorante.
4. Pipetee cada estándar y muestra desconocida en tubos o pozos limpios. Agregue el reactivo colorante 1x y mezcle mediante vórtex o con un mezclador de microplacas.

Tipo de ensayo	Volumen de muestra o estándar	Volumen de reactivo colorante 1x
5 ml	100 μ l	5 ml
1 ml	20 μ l	1 ml
Microplaca	5 μ l	250 μ l

5. Incube a temperatura ambiente por al menos 5 minutos. No incubar más de 1 hora.
6. Ajuste el espectrofotómetro a 595 nm y calíbrelo con el blanco (no es necesario para lectores de microplacas). Mida la absorbancia de los estándares y muestras. Consulte la Sección 3 para el análisis de datos.

2.2 Protocolo de Micro ensayo

1. El protocolo de micro ensayo puede realizarse en cubeta (2 ml) o microplaca (300 μ l). El rango lineal

para BSA es 1.25–10 µg/ml y para gammaglobulina 1.25–20 µg/ml. 2. Saque el reactivo colorante 1x del almacenamiento a 4 °C y deje que alcance la temperatura ambiente.

3. Consulte las tablas del apéndice para las diluciones del estándar de proteína. Use el mismo tampón que en las muestras. Normalmente se analizan por duplicado o triplicado.

Tipo de ensayo	Volumen de muestra o estándar	Volumen de reactivo colorante 1x
2 ml	1 ml	1 ml
Microplaca	150 µl	150 µl

5. Incube a temperatura ambiente por al menos 5 minutos. No incubar más de 1 hora.

6. Ajuste el espectrofotómetro a 595 nm y calíbrelo con el blanco. Mida la absorbancia de los estándares, blancos y muestras desconocidas.

ANEXO C

Protocolo de Western Blot. (De los Reyes et al., 2017)

Para el análisis por Western Blot, los folículos preantrales y antrales, previamente agrupados según su tamaño folicular y estado reproductivo, se colocaron en 1 mL de tampón de homogeneización RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40) (Pierce®, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, EE. UU.), suplementado con un cóctel inhibidor de proteasas (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, EE. UU.).

Después de 5 minutos de incubación en hielo, las muestras se sonicaron durante 30 segundos con un pulso del 50% en un Branson 5450D Digital Sonifier® (Branson Ultrasonics, Danbury, CT, EE. UU.). Luego, las muestras se centrifugaron a 14,000 × g durante 15 minutos a temperatura ambiente utilizando una centrífuga Hettich Universal 320R (Lab Technology, Beverly, MA, EE. UU.). El sobrenadante fue recolectado y la concentración total de proteínas se estimó con un fluorómetro Qubit® (Invitrogen™, Eugene, OR, EE. UU.) empleando el kit de cuantificación Qubit® Protein Assay (Molecular Probes®, Invitrogen™, Eugene, OR, EE. UU.).

Las alícuotas se hirvieron durante 5 minutos y se separaron por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras, según el método de Laemmli (1970) [28]. Se aplicaron cantidades iguales (30 µg) de proteína por carril en un sistema Mini Protean Tetra (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.), y las proteínas se separaron a 100 V.

Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF Immobilon®-P (Merk Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) y se incubaron (1:100 de dilución) con el anticuerpo policlonal de cabra anti-LHR (SC-26341, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, EE. UU.). Después de los lavados, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario IgG de conejo anti-cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, EE. UU.) en una dilución 1:500.

Las bandas proteicas se visualizaron mediante el sustrato NBT/BCIP (*Nitro blue tetrazolium; Bromo-chloroindolyl phosphate-p-toluidine salt*) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, EE. UU.). Los pesos moleculares de las proteínas separadas se estimaron por comparación con las posiciones de un patrón de masa molecular corrido en paralelo.

Se realizó un control negativo incubando únicamente con el anticuerpo secundario. La densitometría de las intensidades de las bandas en los análisis de Western Blot se evaluó utilizando el Sistema de Documentación de Geles Biosens SC-645 (Biotop, Shanghai Bio-Tech Co., Shanghái, China), en el cual el valor de volumen expresa la intensidad de cada banda.

ANEXO D

Protocolo para la medición de las bandas proteicas obtenidas del Western Blot. (Gassmann et al., 2009)

Para el análisis de las imágenes de Western Blot se utilizaron tres programas diferentes: ImageJ 1.38 (versión para Windows del NIH Image, QuantityOne Basic 4.6.3 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.), y MCID Analysis 7.0.

Tanto ImageJ como MCID permiten la medición de perfiles de densidad, alturas de picos, así como la intensidad del pico (densidad óptica promedio de la banda, INT) o el volumen (densidad óptica promedio de la banda multiplicada por su área, $\text{INT} \cdot \text{mm}^2$) de la banda correspondiente al peso molecular esperado.

En contraste, con QuantityOne Basic solo pueden medirse INT y $\text{INT} \cdot \text{mm}^2$.

Además, la corrección del fondo en QuantityOne se basa en restar la densidad óptica promedio de un área definida por el usuario dentro de la imagen (tanto su tamaño como su posición) de la densidad óptica promedio del área definida alrededor de las bandas medidas. Dado que este es un método bastante arbitrario, no se aplicó para el análisis de la banda correspondiente al peso molecular esperado.

En ImageJ, la corrección de fondo se realizó con los ajustes predeterminados (radio de bola rodante = 50), excepto cuando se probaron los efectos de modificar los parámetros de corrección (ver más abajo).

En MCID, la corrección de fondo se lleva a cabo buscando los puntos de datos más bajos a lo largo del gráfico y estableciéndolos como punto base.

Luego, los valores de densidad por debajo de estos puntos se restan, ajustando el gráfico a cero. Los ajustes predeterminados utilizados fueron:

- Sustracción automática de línea base,
- Curva spline (ajuste de una función cúbica a los puntos de la línea base),

- Recorte en cero, y
- Extrapolación en el punto final.

Para definir los perfiles, se dibujó una caja rectangular de manera arbitraria (excepto cuando se probó el efecto del ancho de la herramienta de muestreo con una anchura menor que la banda más estrecha en la película y una longitud igual a la del carril completo.

Una vez definida, la misma caja se utilizó para medir todos los carriles en ambas imágenes. Aunque los carriles en el blot analizado eran bastante rectos, resultó útil que MCID permite rotar la caja de muestreo, una característica que no está disponible en ImageJ.

Para la medición de las bandas con el tamaño molecular esperado, se definieron cajas de muestra individuales en las cuales cada banda se ajustó lo más estrechamente posible.