



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

LÍNEA DE GENERACIÓN Y APLICACIÓN DEL CONOCIMIENTO

ESTRUCTURA Y FUNCIONAMIENTO DE LOS SERES VIVOS

**Estudio de la rata hembra Zucker delgada y obesa: arborización dendrítica de
neuronas hipotalámicas y del tracto solitario**

TESIS

para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Biológicas

PRESENTA

Biól. Alicia Reyes Nava

DIRECTORA: Dra. Adriana Berenice Silva Gómez

CODIRECTORA: Dra. Angélica Trujillo Hernández

Otoño 2025



“El único modo de lograr lo imposible, es
convenciéndose de que sí es posible”

Lewis Carroll

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD Y NO PLAGIO

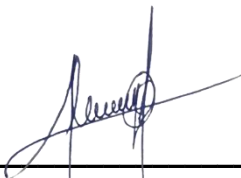
Yo, **Alicia Reyes Nava**, con número de **matrícula 223470521**, alumna de posgrado de la **Maestría en Ciencias Biológicas** de la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**, autora de la tesis titulada **“Estudio de la rata hembra Zucker delgada y obesa: arborización dendrítica de neuronas hipotalámicas y del tracto solitario”**

Declaro que el presente trabajo de investigación, tema de tesis presentada para obtener el grado de Maestra en Ciencias Biológicas es original, ha sido elaborado por mí, y no existe plagio y/o copia de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación (tesis, congreso, texto, o similar) que haya sido presentado por cualquier persona ante cualquier institución académica, de investigación, o profesional.

Además, hago constar que las citas de otros documentos han sido debidamente identificadas en el trabajo de investigación; por lo que, no he asumido como mías las opiniones vertidas por terceros ni las citas completas, ni las ilustraciones o texto extraídos de documentos escritos o en su versión digital. Así mismo, ratifico que soy plenamente consciente de todo el contenido de la tesis y asumo la responsabilidad de cualquier error u omisión en el documento, y soy consciente de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de incumplimiento de esta declaración, me hago responsable ante la universidad y terceros de lo dispuesto en los reglamentos de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y los lineamientos legales vigentes o de cualquier daño e irregularidad que pudiera ocasionar.

H. Puebla de Zaragoza a 10 de octubre de 2025



Biól. Alicia Reyes Nava



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

H. Puebla de Z. a 27 de octubre de 2025

Asunto: Voto Aprobatorio

**Comité Académico del Posgrado
PRESENTE**

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

Estudio de la rata hembra Zucker delgada y obesa: arborización dendrítica de neuronas hipotalámicas y del tracto solitario

Que presenta la estudiante **Alicia Reyes Nava** con número de matrícula **223470521**, aspirante al grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**, de la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: "(LGYAC)", 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. Dalia Molina Romero

Tutor Externo: Dra. Carolina Morán Raya

Revisor: Dr. Ángel Ismael Melo Salazar

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



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la **Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación** por la beca número **1280510** otorgada para realizar mis estudios de maestría.

Agradezco a la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla** por el apoyo otorgado para el desarrollo de mi proyecto de tesis mediante el **Of.VIEP/DGI/2855/2023**.

Agradezco a la **Maestría en Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla** por haberme permitido formar parte de la **generación 2023-2025** en beneficio de mi formación académica y profesional.

Índice

Índice de abreviaturas	9
Resumen.....	11
Introducción	12
Control neuroendocrino de la reproducción.....	13
Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario (HHO).....	13
Esteroidogénesis ovárica.....	16
Núcleo arcuato	17
Núcleo periventricular anteroventral.....	19
Área preóptica	20
Núcleo del tracto solitario	22
Relación de la Homeostasis energética y la reproducción	25
Sistema neuroendocrino del apetito, de la ingesta y de la saciedad.....	26
<i>Regulación integral entre la homeostasis energética y la reproducción</i>	27
Leptina y su relación con la Obesidad	29
Modelos animales de obesidad	31
Rata Zucker	32
Modelo OZDF.....	33
Modelo LZDF	34
Ciclo estral	35
Antecedentes	36
Justificación.....	37
Pregunta de investigación	37
Hipótesis	38
Objetivos	38

General.....	38
Particulares.....	38
Material y Métodos.....	39
Diseño experimental.....	39
Grupos experimentales	39
Diagrama de trabajo.....	40
Materiales y soluciones	41
Preparación de laminillas para cortes histológicos del cerebro	41
Solución de Golgi- Cox.....	41
Seguimiento del ciclo estral.....	41
Frotis vaginal.....	41
Caracterización del fenotipo obeso	43
Obtención de tejidos.....	43
Determinación de la concentración estradiol (E2)	43
Cuantificación de las concentraciones de los metabolitos	44
Concentración de Glucosa.....	45
Concentración de Triglicéridos.....	45
Concentración de Colesterol.....	46
Método de Golgi-Cox	46
Revelado de la tinción de Golgi-Cox.....	46
Identificación de los núcleos ARC, AVPV, POA y NTS: coordenadas estereológicas....	47
Análisis de Sholl.....	49
Análisis estadístico.....	50
Resultados	51
Ciclo estral.....	51
Concentración de estradiol.....	54
Caracterización del fenotipo obeso	54
Peso corporal	55
Índice de Lee.....	56

Grasa abdominal y circunferencia abdominal.....	57
Concentración de metabolitos: glucosa, triglicéridos y colesterol	58
Arborización dendrítica del Núcleo del Tracto solitario	59
Arborización dendrítica del Núcleo del Periventricular Anteroventral	61
Arborización dendrítica del Área Preóptica	63
Arborización dendrítica de Núcleo Arcuato	65
Discusión.....	68
Conclusión	74
Limitaciones y perspectivas	75
Literatura citada	76
Anexo I Ciclo estral.....	95
Anexo II Etapas del ciclo estral	98
Anexo III Método Golgi Cox	99

Índice de abreviaturas

AChE	Ag-enzima: acetilcolinesterasa antígeno-enzima
AgRP	Péptido relacionado con agouti
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
ANP	Péptido natriurético atrial
AP	Área postrema
AR	Receptores adrenérgicos
ARC	Núcleo arcuato
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Trifosfato de adenosina
AVPV	Núcleo periventricular anteroventral
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CART	Transcriptasa relacionada con la cocaína- anfetamina
CCK	Colecistoquinina
CG	Células de la granulosa
CICUAL	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
CYP17a1	Enzima 17 α -hidroxilasa-17, 20-desmolasa
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHM	Núcleo dorsomedial
DVC	Complejo vagal dorsal
ELISA	Ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzimas
EM	Eminencia media
ER α	Receptores de estrógenos α
E2	17 β -estradiol
FSH	Hormona folículo estimulante
GH	Hormona del crecimiento
GI	Sistema gastrointestinal
GLP-1	Péptido similar al glucagón-1
GLUT-2	Transportador de glucosa tipo 2
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
GPR54	Receptores para kisspeptina
HD	Hemisferio derecho
HHO	Eje hipotálamo hipófisis ovario
HHG	Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal
HI	Hemisferio izquierdo
HSD3B	Enzima 3 β - hidroxiesteroide deshidrogenasa
HSL	Lipasa sensible a hormonas
<i>Kiss1</i>	Gen que codifica para kisspeptina
KNDy	Coexpresión de kisspeptina, dinorfina y neuroquinina B
LepR	Receptor de leptina
LE	Long Evans
LH	Hormona luteinizante
LHA	Longitud hocico-ano
LHA	Área hipotalámica lateral
LM	Neurona grande multipolar
LPL	Lipoproteína lipasa
LPOA	Área preóptica lateral
LZDF	Lean Zucker Diabetic Fatty
MCH	Hormona concentradora de melanina
mPOA	Área preótica medial
mTOR	Diana mamífera de la rampamicina
NA	Noradrenalina
NMDA	N- metil-D-aspartato

NOM	Norma Oficial Mexicana
NPY	Neuropéptido Y
nRB	Neurona bipolar no ramificada
nRU	Neurona unipolar no ramificada
NTS	Núcleo del tracto solitario
OMS	Organización Mundial de la Salud
OVLT	Órgano vascular de la lámina terminal
OZDF	Obese Zucker Diabetic Fatty
PCOS	Ovario Poliquístico
POA	Área preóptica
POMC	Péptidos derivados de la proopiomelanocortina
PP	Polipéptido pancreático
PPY	Polipéptido pancreático Y
PVN	Núcleo paraventricular
RB	Neurona bipolar ramificada
RFRP	Péptido relacionado con arginina y fenilalanina-amida
RP3V	Área periventricular rostral del tercer ventrículo
RU	Neurona unipolar ramificada
SM	Neurona pequeña multipolar
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nerviosos central
SNS	Sistema nervioso simpático
SNP	Sistema nervioso parasimpático
StAR	Reguladora aguda esteroideogénica
VLPOA	Área preóptica ventrolateral
VMN	Núcleo ventromedial

Resumen

La obesidad en mamíferos se caracteriza por un incremento anormal de tejido adiposo, que puede generar cambios metabólicos y modificaciones de diferentes estructuras neuroendocrinas. Estudios previos han reportado una prevalencia de cambios morfofisiológicos en estructuras reproductivas que provocan una disminución en la tasa de fertilidad, tanto en mujeres obesas como en ratas hembra obesas, lo que sugiere posibles alteraciones del eje hipotálamo-hipofisario-ovario (HHO). La rata hembra Zucker obesa (*fa/fa*) expresa una mutación del gen que codifica para el receptor de leptina; es un modelo de obesidad genética y de resistencia a la insulina que presenta alteraciones en la morfología ovárica e baja fertilidad. Este trabajo de investigación tuvo como objetivo identificar posibles cambios en la arborización dendrítica de neuronas hipotalámicas y del núcleo del tracto solitario relacionadas con procesos de reproducción mediante la tinción de Golgi-Cox y el análisis de Sholl. Se usaron ratas hembra en estro de 120 días de edad Long Evans (LE) como grupo control y ratas hembra Zucker delgadas y obesas como grupos de estudio (n=12 por grupo). Además, se caracterizó el fenotipo de obesidad. Nuestros resultados reafirman que el modelo Zucker obeso presenta un incremento en la concentración de glucosa, de triglicéridos y de colesterol, así como del peso corporal, del índice de Lee y de la grasa abdominal; mientras que, el modelo Zucker delgado presentó una disminución significativa en el peso corporal. Los resultados de la arborización dendrítica muestran una retracción en la longitud dendrítica de las neuronas del núcleo del tracto solitario, sitios clave de retroalimentación para estrógenos que se activan por vías anorexigénicas, en comparación con el grupo control y las ratas LZDF. Además, se observó una disminución en el número de intersecciones dendríticas cerca del soma, tanto en neuronas del AVPV y ARC, de la rata hembra Zucker obesa respecto de las ratas LE y LZDF. Estos resultados sugieren que los cambios pueden relacionarse con alteraciones en la señalización de leptina y con una hiposensibilidad a estrógenos, hormonas que participan en la remodelación dendrítica y en la secreción de gonadotropinas durante el estro. Se destaca la relevancia de estos hallazgos en la comprensión de los mecanismos neuroendocrinos que vinculan la obesidad y la función reproductiva.

Introducción

En mamíferos, las funciones reproductivas y el equilibrio energético tienen una relación estrecha y sólida por lo que, si se presentan cambios en la ingesta de alimentos pueden provocarse problemas de fertilidad. En las mujeres, la función reproductiva se encuentra regulada por estructuras y sistemas neuroendocrinos como el eje Hipotálamo-Hipofisiario-Ovario (HHO) mientras que, la conducta de ingesta de alimentos es regulada por el núcleo del tracto solitario (NTS), entre otras áreas neurales. Para ambos fenómenos biológicos, se ha demostrado que existe una relación entre el hipotálamo y el NTS (Zhang *et al.*, 2020) a partir de la cual, se modula la actividad de diferentes núcleos hipotalámicos como el núcleo arcuato (ARC) y el área preóptica (POA).

La obesidad, es una condición que se presenta por un desequilibrio entre la ingesta de calorías y el gasto energético que los organismos tienen (Fernandez *et al.*, 2011). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), desde 1975, la prevalencia de obesidad se ha triplicado (OMS, 2021), y para el año 2022 casi 900 millones de personas adultas eran obesas, mientras que, 160 millones de jóvenes entre 5 y 19 años presentaban este problema de salud (Okunogbe *et al.*, 2022). De los anteriores datos se conoce que los hombres mayores a 18 años representan un 16% de la población con dicho trastorno mientras que, las mujeres adultas un 18%. Al respecto, México ocupa los primeros lugares de los países con altas tasas de obesidad, siendo prevalente en el 46% de mujeres con edad de 30 a 59 años (INEGI, 2020).

Se ha relacionado a la obesidad temprana con alteraciones en la señalización de la leptina, hormona clave en la regulación de la ingesta y de la saciedad. Además de su función metabólica, la leptina desempeña un papel fundamental en la regulación del eje reproductivo, por lo que, tanto su sobreexpresión como la pérdida de sensibilidad a esta hormona puede generar disfunciones reproductivas (Yazdi *et al.*, 2015; Obradovic *et al.*, 2021).

En comparación con los hombres, las mujeres presentan una mayor tendencia al sobrepeso y a la obesidad, condiciones que se relacionan con disfunciones en las estructuras reproductivas, una menor secreción de gonadotropinas y alteraciones en la morfología ovárica, sobrepeso u obesidad, lo cual ha sido relacionado con cambios en el funcionamiento de las estructuras reproductivas, con la liberación atenuada de gonadotropinas y con la alteración morfológica de los ovarios (Rachoń & Teede, 2010; Eng *et al.*, 2024), lo que en conjunto favorece el decremento en la fertilidad.

Control neuroendocrino de la reproducción

Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario (HHO)

El eje HHO regula las funciones morfofisiológicas de la reproducción a partir de las neuronas en el hipotálamo que producen la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). En ratas, estas neuronas se localizan principalmente en el área preóptica (POA) del hipotálamo, en el núcleo arcuato (ARC) y en el hipotálamo medio basal, formando una red de conexiones para la secreción de la GnRH. Las neuronas GnRHérgicas no son necesariamente receptivas a la mayoría de las señales requeridas para la síntesis y para la liberación de GnRH durante las diferentes fases del ciclo estral. Sin embargo, las neuronas de kisspeptina transmiten estas señales necesarias para la síntesis y para la secreción sincronizada de GnRH (Plain *et al.*, 2022). La liberación de GnRH es bimodal, por un lado, las neuronas GnRHérgicas expresan pulsos sincronizados de liberación de GnRH (proporción 1:1 pulso/h) (Herbison, 2018), este proceso es mediado por las neuronas KNDy (síntesis de kisspeptina, dinorfina y neuroquinina B) que liberan kisspeptina la cual se une a los receptores GPR54 en las terminales de las neuronas GnRH, que posteriormente es liberada a través del sistema portal a la adenohipófisis (exclusivamente en los gonadotropos) para provocar la estimulación de la síntesis y de la liberación pulsátil de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona folículo estimulante (FSH) (Plant, 2015). A través del torrente sanguíneo, estas hormonas llegan al ovario hasta alcanzar a las células de la granulosa (CG) y de la teca, y estimular con ello el desarrollo folicular y la síntesis de esteroides sexuales y hormonas proteínicas (Paccola *et al.*, 2013; Plant, 2015; Puga y Colmenares *et al.*, 2021). Mientras que, las neuronas Kiss 1 del núcleo periventricular anteroventral (AVPV) del hipotálamo modulan la liberación de oleada de GnRH hacia la eminencia media (EM), generando una posterior oleada de liberación de LH y de FSH por la adenohipófisis, hasta alcanzar en la tarde del proestro un pico de liberación de LH que más tarde promoverá la ovulación (Figura 1). La coordinación de las anteriores actividades permite mantener un buen funcionamiento de la función reproductiva.

La actividad bimodal de liberación de GnRH se encuentra bajo control de hormonas esteroideas gonadales mediante mecanismos de retroalimentación positiva y negativa. Los esteroides gonadales sintetizados a partir del colesterol cumplen funciones vitales a nivel local, periférico y central, en el control neuroendocrino de la reproducción (Limonta *et al.*, 2018):

- I. Estradiol: Se secreta en las CG del folículo ovárico donde participa en su crecimiento, en la modulación de la secreción de FSH en la hipófisis y regula la estimulación o la inhibición de la secreción de GnRH y LH. Además, participan en el crecimiento y en la maduración de los órganos sexuales femeninos, incluyendo los ovarios y el útero.
- II. Progesterona: Se secreta principalmente en el cuerpo lúteo y tiene un papel importante en la maduración del ovocito y en la ruptura folicular. Así mismo, participa en la preparación y en el mantenimiento del endometrio durante el proceso de embarazo.
- III. Testosterona: Es un andrógeno sintetizado por las células de la teca y transformado a estradiol en las CG, participa en el mantenimiento del funcionamiento del ovario, media la síntesis de la FSH en la hipófisis y participa en el crecimiento folicular.

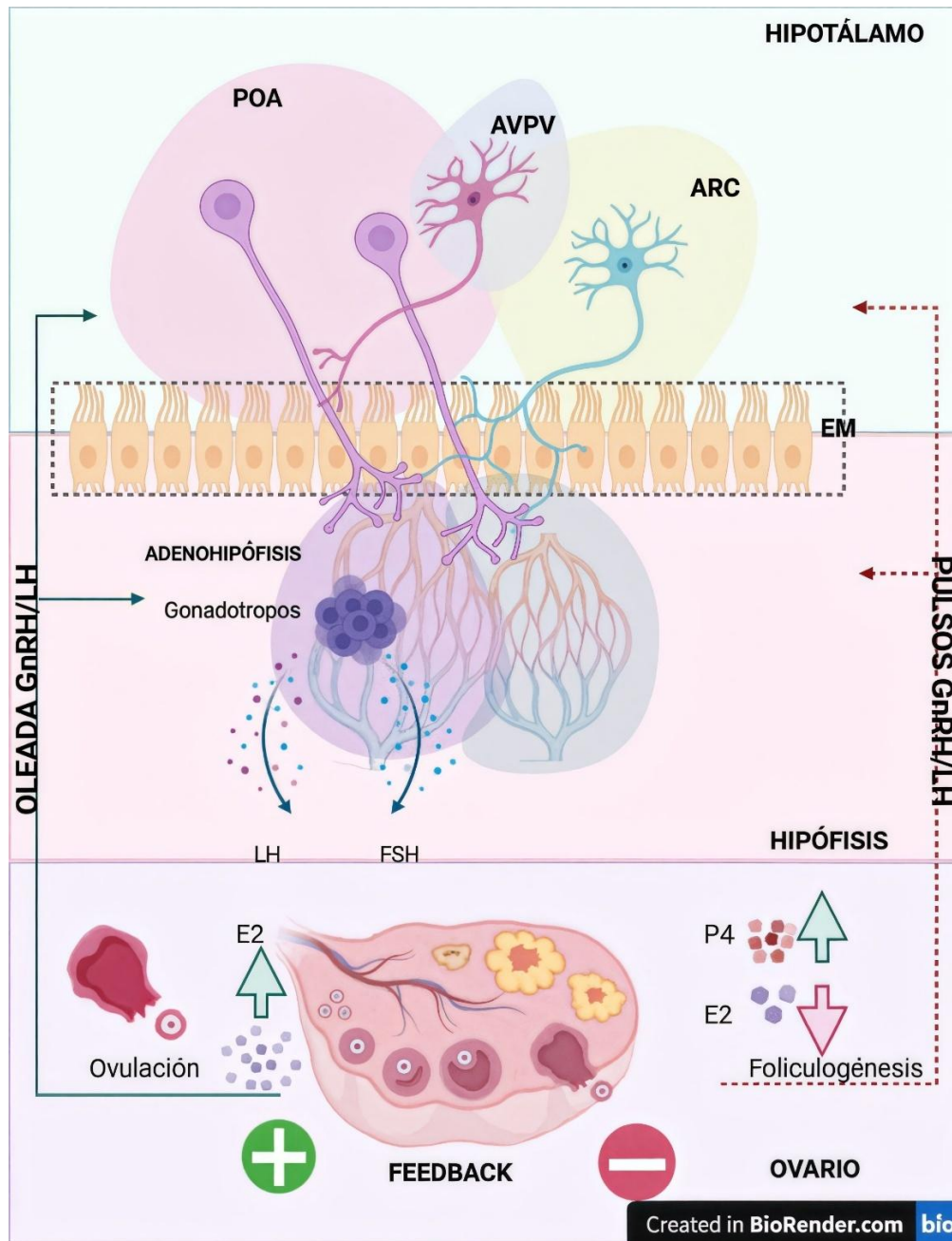


Figura 1. Regulación del Eje HHO de rata. El eje HHO se encuentra regulado por múltiples señales endocrinas, ambientales y nerviosas. Las neuronas GnRHérgicas, localizadas en POA, reciben señales de las neuronas Kiss pertenecientes a los núcleos AVPV y ARC del hipotálamo y que modulan la síntesis y la liberación pulsátil y sincronizada de GnRH. La GnRH liberada, se une a su receptor en los gonadotropos de la hipófisis, permitiendo la liberación pulsátil y sincronizada de LH, así como de FSH. Las gonadotropinas liberadas se unen a su receptor en el ovario, modulando la foliculogénesis, la esteroidogénesis y la ovulación. Dentro del ovario, ocurre un proceso de esteroidogénesis tras unirse la LH y la FSH a su receptor en las células de la teca y de las CG, respectivamente. La liberación de estradiol al torrente sanguíneo induce mecanismos de retroalimentación para regular la función reproductiva. Creado en BioRender.com

Esteroidogénesis ovárica

La síntesis de las hormonas esteroideas gonadales ocurre mediante la coordinación de dos tipos de células presentes en el ovario: las células de la teca y las CG, las cuales responden a la señalización de las gonadotropinas LH y FSH. El colesterol es el precursor de las hormonas esteroideas, y es reclutado en las células de la teca por receptores a lipoproteínas o bien es sintetizado *de novo* (Gioacchini *et al.*, 2019). Este proceso se lleva a cabo en el interior de la membrana interna de las mitocondrias, donde la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR) permite la transferencia del colesterol dentro de la mitocondria. Cuando la LH se une a su receptor, se activa la aromatasa P450_{scc} dando como resultado la conversión de colesterol a pregnenolona (Miller, 1988; Nisa *et al.*, 2024). Posterior a esta conversión, la actividad de la enzima 17 α -hidroxilasa-17, 20-desmolasa (CYP17a1) convierte la pregnenolona en dehidroepiandrosterona (DHEA), luego la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD3B) la transforma en progesterona. Tanto la DHEA como la progesterona se transforman en androstenediona por la actividad de las enzimas HSD3B y CYP17a1 (Figura 2).

La androstenediona, es el precursor de la testosterona por la actividad de CYP17a1 en las células de la teca, o bien se traslada a las células de la granulosa. En las CG, la unión de la FSH con su receptor activa una cascada de señalización que induce la expresión de enzimas esteroidogénicas clave, permitiendo la síntesis de estrógenos. Por ello, la androstenediona puede convertirse en estrona mediante la acción de la aromatasa P450, o en testosterona a través de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD17B). Posteriormente, tanto la estrona como la testosterona son convertidas en 17 β -estradiol por la acción de la aromatasa P450_{scc} (Hanukoglu, 1992; Franks & Hardy, 2018). Finalmente, los estrógenos son liberados al torrente sanguíneo y también están disponibles localmente para ejercer sus efectos sobre el desarrollo folicular, maduración del ovocito y la regulación de la secreción de gonadotropinas.

El proceso de esteroidogénesis está íntimamente relacionado con el balance energético, ya que la síntesis de las hormonas esteroideas requiere de colesterol y cofactores metabólicos que dependen de la disponibilidad energética (Sun *et al.*, 2021). Se ha demostrado que alteraciones en este proceso produce la alteración morfofuncional del ovario.

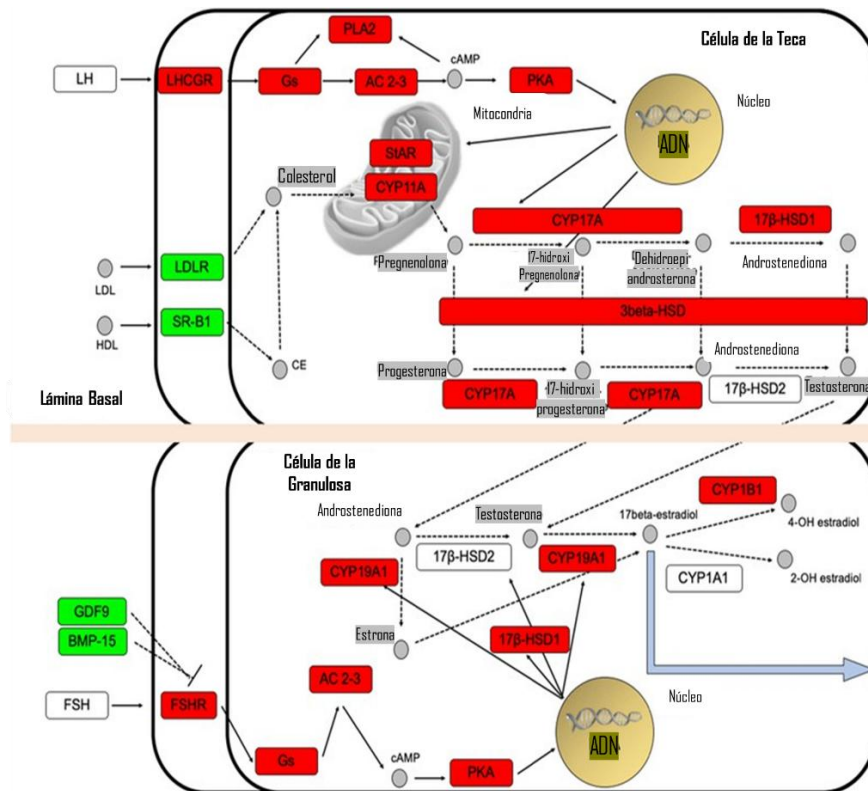


Figura 2. Vía de señalización de la síntesis de los esteroides gonadales: Teoría de dos células y dos gonadotropinas. En el ovario, la célula de la teca recibe la señal de hormona luteinizante (LH) para inducir la síntesis de andrógenos: androstenediona y testosterona. Estas hormonas serán convertidas a estrógenos por acción de la hormona folículo estimulante (FHS) en la CG; todo este proceso se modula por la acción enzimática propia de cada célula, posteriormente las hormonas esteroideas son liberadas al torrente sanguíneo para cumplir sus diversas funciones (Tomado y modificado de Gioacchini *et al.*, 2019).

Como se mencionó anteriormente, en mamíferos, una zona integradora sensorial crucial para el control endocrino, autonómico y somático de la homeostasis, es el hipotálamo, que se conforma de núcleos que expresan un compendio de comunicación reguladora (Plant, 2015), entre ellos, el núcleo arcuato, el núcleo periventricular anteroventral y el área preóptica. A continuación, se describirán los aspectos de interés para el presente estudio de cada uno de estos núcleos.

Núcleo arcuato

El núcleo arcuato (ARC) se distingue por su morfología y por su funcionalidad en conjunto con la EM como una entidad de regulación, debido a que la EM le confiere entradas periféricas para su nutrición y para su activación. Se localiza a nivel del hipotálamo medio basal (Swaab, *et al.*, 2021) y contiene una amplia variedad de tipos celulares que controlan la homeostasis relacionada con la

ingesta de alimentos, con el metabolismo, con la reproducción y con la maduración sexual, mediante la liberación de diferentes proteínas moduladoras, como neuropéptidos y hormonas (Kamitakahara *et al.*, 2018). Este núcleo incluye neuronas medianas con prolongaciones comunicantes a otros núcleos hipotalámicos y de acuerdo con la caracterización morfométrica de las neuronas se han considerado seis diferentes tipos neuronales, que se pueden observar en la figura 3. A partir del uso del método rápido de Golgi (modificado), se describieron neuronas bipolares sin ramificación, bipolares con ramificación, unipolares sin ramificación y con ramificación, así como neuronas multipolares pequeñas y grandes (Figura 3). El 15% de estas poblaciones presentan espinas dendríticas, principalmente las neuronas tipo bipolar ramificada y las neuronas multipolares (González-Burgos *et al.*, 1993).

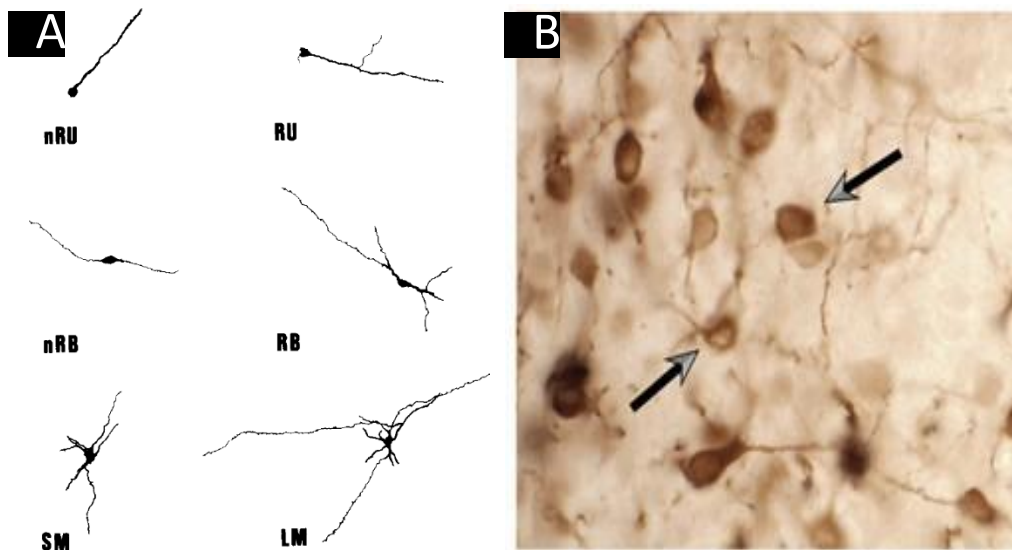


Figura 3. Tipos neuronales identificados en el núcleo ARC del hipotálamo de rata. A. Dibujos elaborados con ayuda de una cámara lúcida de los seis tipos neuronales. nRU: neurona unipolar no ramificada; RU: neurona unipolar ramificada; nRB: neurona bipolar no ramificada; RB: neurona bipolar ramificada; SM: neurona pequeña multipolar; LM: neurona grande multipolar. Tomado de González-Burgos *et al.* (1993). B. Neuronas medianas bipolares dopaminérgicas del núcleo ARC (Tomada y modificada de Brown *et al.*, 2016).

El núcleo ARC, presenta un dimorfismo sexual en la conectividad sináptica dependiente de hormonas esteroideas. En ratas hembra, las células muestran una remodelación sináptica fásica basal que se relaciona con las variaciones en la concentración de estradiol que ocurren durante el ciclo estral (Fernandez-Galaz *et al.*, 1999; Csakvari *et al.*, 2008). De acuerdo con esto, Olmos *et al.*, (1989) mostraron que, ratas hembra adultas exhiben una remodelación sináptica en el núcleo arcuato, a partir de una disminución en el número de sinapsis, entre el proestro y el estro. Mientras que los números de sinapsis aumentan durante el metaestro y el diestro (Csakvari *et al.*, 2008).

Otra subpoblación del núcleo ARC, que cumple con funciones reproductivas y metabólicas, son las neuronas kisspeptidérgicas, población neuronal que también se distribuye en el núcleo periventricular del hipotálamo (Herbison, 2008; Moenter *et al.*, 2020). Estas neuronas, liberan kisseptina a las células GnRHérgicas, y presentan receptores a diferentes señales periféricas, como receptores a leptina, a insulina, a estrógenos, a catecolaminas y a glucosa, entre otros. Se caracterizan por ser células medianas y ovaladas con prolongaciones largas (Oakley *et al.*, 2009).

Núcleo periventricular anteroventral

El núcleo periventricular anteroventral (AVPV) del hipotálamo rostral es un pequeño cúmulo de neuronas localizadas a lo largo del tercer ventrículo que se extiende caudal al órgano vascular de la lámina terminal (OVLT) (Saper & Stornetta, 2015). Morfológicamente, las neuronas del AVPV se caracterizan por ser células pequeñas o medianas, con un soma fusiforme o multipolar, organizadas de manera densa y alargada a lo largo del eje periventricular (Ducret *et al.*, 2010). Este núcleo tiene proyecciones directas a diferentes áreas del SNC como los núcleos hipotalámicos paraventricular, arcuato, dorsomedial, así como el área preóptica (Gu & Simerly, 1997). Participa en la regulación del sistema cardiovascular, debido a que muchas de sus neuronas son inmunorreactivas al péptido natriurético atrial (ANP), por lo que, el AVPV puede modular los ajustes cardiovasculares que acompañan los ciclos de reproducción a partir de terminales nerviosas que alcanzan diferentes áreas del SN autónomo como el núcleo parabraquial y el NTS (Gu & Simerly, 1997). Además, estudios recientes en roedores han mostrado, que este núcleo recibe una inervación dopaminérgica sexualmente dimórfica entradas dopaminérgicas (Simerly *et al.*, 1985), con mayor número de neuronas dopaminérgicas en hembras que en machos. También muestran una alta expresión de neuronas kisspeptidérgicas, dopaminérgicas, GABAérgicas y glutamatérgicas (Semaan & Kauffman, 2010) que participan en regular la liberación de la oleada preovulatoria de GnRH y la reproducción sexual (Watson *et al.*, 1995; Semaan & Kauffman, 2010).

Para que los mamíferos lleven a cabo una reproducción exitosa se requieren interacciones altamente sofisticadas y sincronizadas de diversas células y señales hormonales centrales, entre ellas, la interacción de neuronas GnRH y neuronas kisspeptidérgicas.

Neuronas Kiss 1

Las neuronas kisspeptidérgicas integran las señales neuroendocrinas y ambientales y las

transmiten hacia la adenohipófisis a través de la secreción de kisspeptina. Codificada por el gen *KISS1*, esta proteína de 54 aminoácidos se une a su receptor GPR54 o KISS1R localizado en las neuronas GnRHérgicas del área preóptica, donde estimula la liberación de GnRH durante el ciclo estral de las hembras (Vas *et al.*, 2024). En roedores, la población neuronal de kiss 1 se localiza en el hipotálamo, específicamente en el núcleo ARC (neuronas KNDy que actúan como generador pulsátil de GnRH) y en el núcleo AVPV (Kiss 1, que actúan como generador de oleadas de GnRH) (Prashar *et al.*, 2023).

Las neuronas kisspeptidérgicas se caracterizan por exhibir una morfología dendrítica variada con orientación paralela al tercer ventrículo; el 53% de las neuronas Kiss 1 presentan un árbol dendrítico multipolar, el 43% son neuronas bipolares y el 4% son neuronas unipolares de la región AVPV (Figura 4; Ducret *et al.*, 2010).

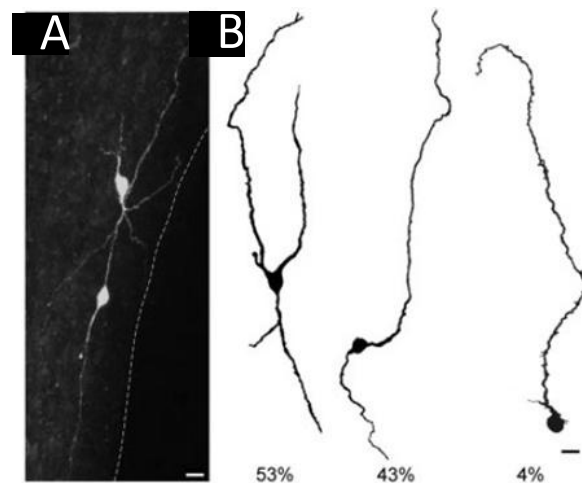


Figura 4. Caracterización morfológica de las neuronas Kiss 1 del área periventricular rostral del tercer ventrículo (RP3V). A. Neuronas de núcleo AVPV con dendritas superpuestas (arriba multipolar, abajo bipolar). B. Dibujos con ayuda de una cámara lúcida de neuronas Kiss 1 típicas multipolares, bipolares, unipolares (de izquierda a derecha en la imagen) con el porcentaje de prevalencia indicado. Escala de 10 μ m (Tomado de Ducret *et al.*, 2010).

Área preóptica

El área preóptica (POA) se constituye de tres regiones hipotalámicas: POA medial (mPOA), POA lateral (LPOA) y el POA ventrolateral (VLPOA) (Mohns *et al.*, 2006). El área del mPOA contiene neuronas grandes con forma de huso, neuronas medianas bipolares y neuronas pequeñas redondeadas (Koutcherov *et al.*, 2007) que expresan receptores a distintos neuromoduladores (Figura 5).

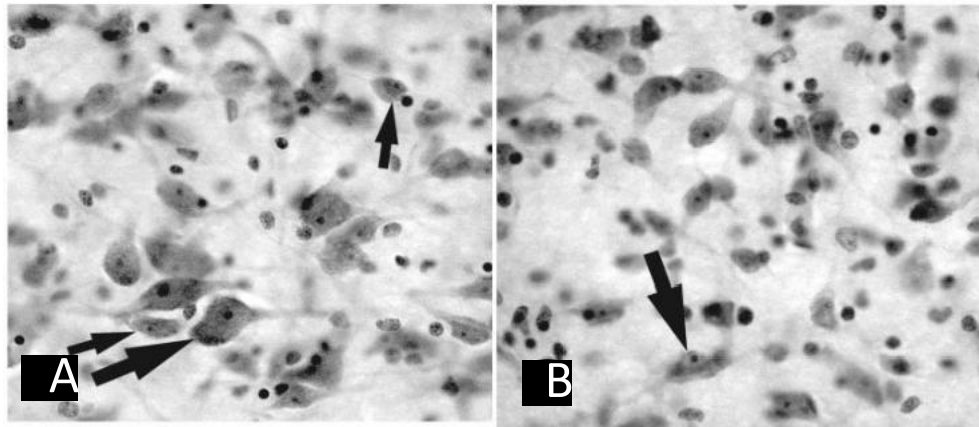


Figura 5. Microfotografías de los tipos celulares presentes en el mPOA, tinción violeta de cresilo. A. Neuronas células grandes en forma de huso (flecha grande) y neuronas pequeñas redondas (flecha pequeña). B. Neuronas medianas bipolares dispersas (flecha) (Tomado de Koutcherov *et al.*, 2007).

Una de las poblaciones neuronales presentes en POA medial que regulan las funciones reproductivas, son las neuronas GnRHérgicas. Durante el proceso de embriogénesis temprana, tienen su origen en la placoda olfatoria y posteriormente migran al cerebro (Martinez-Corral & Prevot, 2021). Estas células son pequeñas y ovaladas, bipolares o unipolares que forman una red que conecta con la EM y presentan receptores para kisseptina (GPR54) en sus terminales nerviosas (Hanchate *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2018).

Este núcleo hipotalámico tiene un papel importante en la regulación de distintas funciones fisiológicas, por ejemplo: adaptación a cambios de temperatura, papel modulador del gasto energético y de la ingesta de alimentos (Yu *et al.*, 2018), en la regulación del sueño y de procesos reproductivos. En relación con la respuesta de la homeostasis energética, se ha descrito que presenta muchas neuronas que expresan receptores a leptina (Bellefontaine *et al.*, 2014), lo que apoya la información de su participación en la modulación de dichos procesos. También tiene contacto con otras estructuras hipotalámicas que sugieren una amplia red de comunicación para la regulación homeostática del organismo, como el área hipotalámica lateral (LHA), que se encarga del inicio y del mantenimiento del sueño (Suntsova *et al.*, 2007).

Dado que el POA, principalmente el área preóptica medial (mPOA) expresa muchos receptores a leptina, se sugiere que su participación es crucial (Bellefontaine *et al.*, 2014) como una señal excitatoria proveniente de las reservas energéticas que se requieren para la etapa de reproducción. Además de los procesos endócrinos en los que participa el hipotálamo en roedores y en humanos, la actividad reproductiva se encuentra modulada por la inervación del sistema nervioso autónomo

(Gerendai *et al.*, 2005) ya que tanto el sistema nervioso simpático (SNS) como el sistema nervioso parasimpático (SNP) median la respuesta excitatoria e inhibitoria del eje HHG (Delsouc *et al.*, 2016). De acuerdo con los trabajos realizados por Gerendai *et al.*, (1998), se mostró la primera evidencia neuromorfológica de la existencia de una vía multisensorial entre el ovario y el SNC, mediante la conexión de aferencias colinérgicas y noradrenérgicas.

Núcleo del tracto solitario

Una de las estructuras del SNP que recibe información de la respuesta vagal-ovárica es el núcleo del tracto solitario (NTS). Este núcleo, se localiza en la médula dorsomedial y se considera una primera estación de relevo de las señales periféricas de la vía parasimpática (Cutsforth-Gregory & Benarroch, 2017) que regula varias funciones autónomas, como la respiración, la regulación del ritmo cardíaco, la digestión y el apetito (Gasparini *et al.*, 2020). Este núcleo recibe información directa del nervio vago con inervación de una gran variedad de estructuras viscerales, por ello sus funciones autónomas. Además, es considerado como un núcleo regulador energético, que detecta metabolitos y hormonas liberadas por los órganos periféricos (Wachsmuth *et al.*, 2022; Fry *et al.*, 2007), estas señales se transmiten hacia el hipotálamo mediante proyecciones descendentes y ascendentes para alcanzar la homeostasis energética (Zhang *et al.*, 2020).

En humanos y en modelos animales se ha descrito que el NTS se subdivide en la región rostral, intermedia (o medial) y caudal. Cada una de éstas, está formada por diferentes subnúcleos que contienen células de diferente tamaño. Este núcleo constituye un haz de fibras mielinizadas compuesto de fibras de los nervios craneales V (trigémino), VII (facial), IX (glossofaríngeo), X (vago) (Cutsforth-Gregory & Benarroch, 2017).

El NTS es una estructura que recibe abundantes entradas de botones presinápticos glutamatérgicos y GABAérgicos (Gasparini *et al.*, 2020). Asimismo, su regulación y proyección se debe a la presencia de diversos receptores en sus células, como son receptores a leptina, receptores a estrógenos, receptores a insulina, receptores colinérgicos y receptores GPR54, entre otros (Zhang *et al.*, 2020; Fry *et al.*, 2007; Karges *et al.*, 2003). Además, los subnúcleos mediales expresan receptores de dopamina (D2 y D4) (Cutsforth-Gregory & Benarroch, 2017).

Este núcleo expresa abundancia de neuronas con múltiples ramas dendríticas secundarias y con finas dendritas terciarias con pequeñas espinas dendríticas (Figura 6). Las prolongaciones axonales que presentan son largas dependiendo de las células dianas de proyección (Gasparini *et al.*, 2020). Su morfología celular difiere dependiendo de la localización y proyección, lo que confiere

su funcionalidad. Se han observado neuronas ovaladas o bipolares en sentido de proyección rostro-caudal hacia el núcleo motor dorsal del vago, sin embargo, en sentido medial y rostral con proyección hacia el IV ventrículo y al núcleo motor dorsal del vago, se observan neuronas multipolares (Barnes *et al.*, 1994).

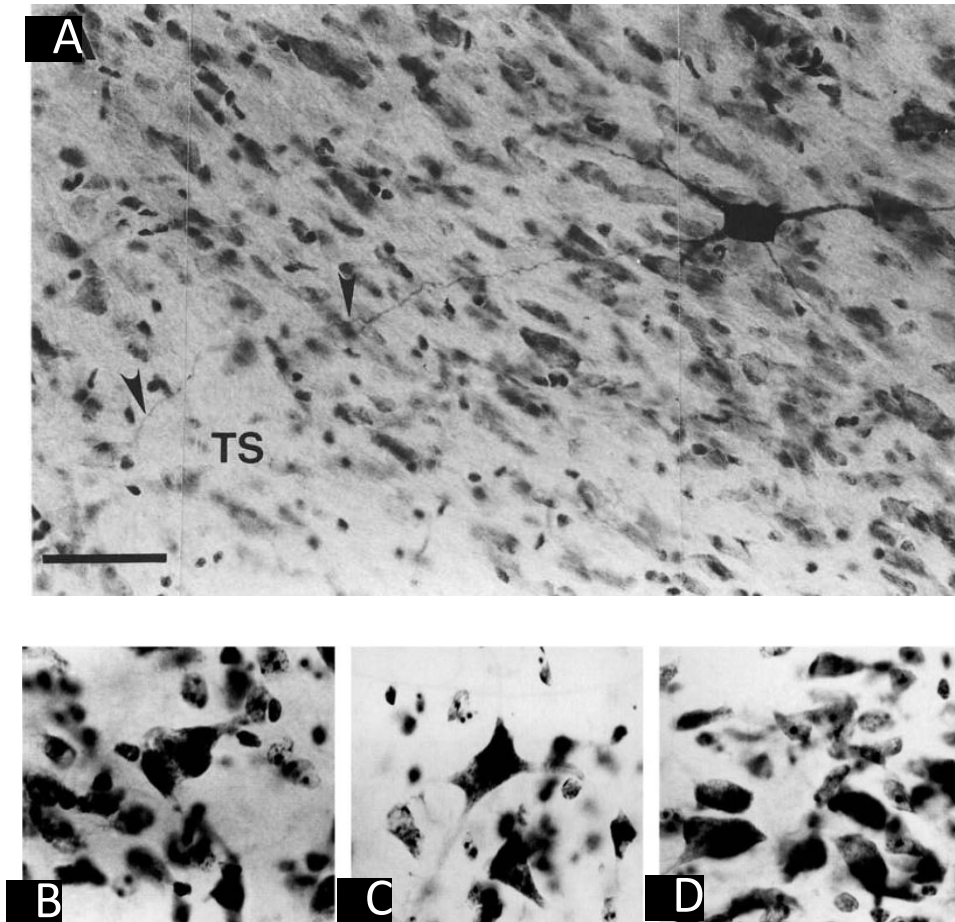


Figura 6. Microfotografías de los tipos celulares presentes en el NTS. A. NTS medial: célula multipolar con dendrita primaria proyectada al núcleo motor vagal (flecha negra; escala 50 µm). B. Subdivisión ventral: se observan células de mayor tamaño, y pequeñas neuronas ovaladas (escala 20 µm). C. Ventrolateral: se observan células multipolares gigantes en el centro, células ovaladas y poligonales pequeñas (escala 20 µm). D. Rostral núcleo motor vagal: neuronas motoras grandes, con células ovaladas pequeñas (escala 20 µm) (Tomadas y modificadas de Barnes *et al.*, 1994 y Whitehead, 1988).

Una población neuronal del NTS que se encuentra relacionada con la homeostasis y la reproducción son las neuronas A2, estas se encuentran en la porción rostro-caudal del núcleo del tracto solitario, pero sus somas se concentran en la porción media (Rinaman, 2011). Son células estrelladas-ovoides de tamaño mediano, multipolares con prolongaciones dendríticas largas (Edwards *et al.*, 2021) (Figura 7). Conectan con el nervio vago y con la porción del área postrema (AP), lo que le permite una conexión con órganos periféricos y con vasos sanguíneos. Presentan receptores a leptina, a estrógenos, a glutamato, a GABA, a glucocorticoides, a neuropéptido Y

(NPY), a CRH y receptores adrenérgicos (Rinaman, 2011).

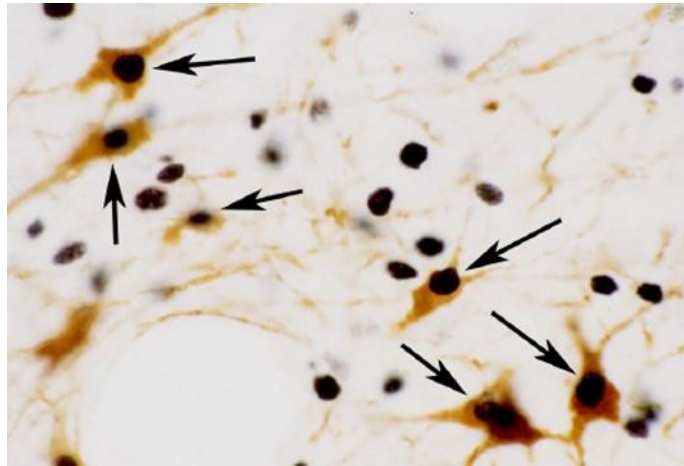


Figura 7. Microfotografía de neuronas A2 del NTS con estimulación vagal (flechas negras) (Tomada de Rinaman, 2011).

Estas neuronas son estimuladas por vías anorexigénicas (leptina), relacionadas con la saciedad, y por cambios en la concentración plasmática de estradiol (Estacio *et al.*, 1996). Sus proyecciones llegan al núcleo paraventricular (neuronas CRH) y al núcleo arcuato (neuronas Kiss), a partir de lo cual se libera noradrenalina (NA) y con ello se transmite la información del estado energético, para controlar los cambios en la secreción pulsátil de GnRH y la modulación de la respuesta en la ingesta de alimentos (Deura *et al.*, 2019). En relación con esto, se demostró que el ayuno de 48 horas conduce a un aumento de receptores a estrógenos en el NTS y en el núcleo paraventricular en las ratas hembra, sugiriendo que estos núcleos son sitios para la retroalimentación del estrógeno (Estacio *et al.*, 1996).

Por otro lado, las neuronas A2 noradrenérgicas también se encuentra regulando a las neuronas GnRH del área preóptica de la rata. Wright & Jenness (1993), mediante técnicas de rastreo retrógrado reportaron que las neuronas noradrenérgicas que provienen del tronco encefálico, tanto de la médula ventrolateral (neuronas A1) como del núcleo del tracto solitario (A2), conectan sus terminales axónicas en el soma de las células GnRH dentro del área preóptica rostral, respondiendo ante el aumento de las concentraciones de estradiol administrada en ratas hembra ovariectomizadas (Figura 8).

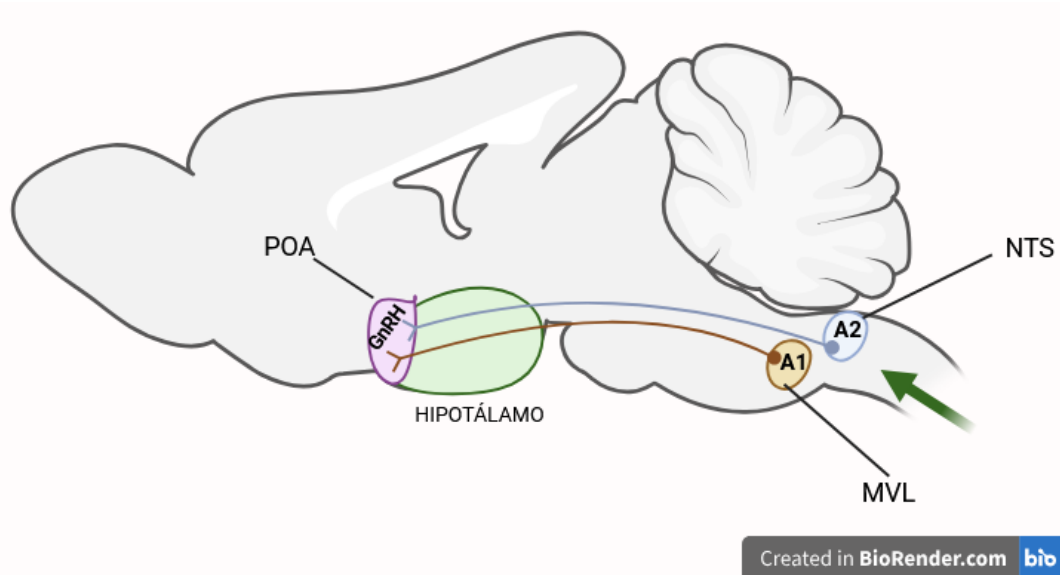


Figura 8. Representación de la conexión de las neuronas noradrenérgicas del troco encefálico y el área preóptica en rata. POA: área preóptica; NTS: núcleo del tracto solitario; MVL: médula ventrolateral; A2: subpoblación de neuronas A2; A1: subpoblación de neuronas A1; GnRH: hormona liberadora de gonadotropina. Creado en BioRender.com

Relación de la Homeostasis energética y la reproducción

El equilibrio entre la energía suministrada y la energía disipada se mantiene a través de los mecanismos homeostáticos de un complejo sistema de comunicación entre el tejido adiposo, el sistema gastrointestinal, los cuerpos celulares del SNC (hipotálamo y estructuras límbicas) y del sistema nervioso autónomo (nervio vago y NTS, principalmente). A partir de una variedad de neurotransmisores, de neuropéptidos y de hormonas, así como de sus receptores específicos, se permite regular la ingesta de alimentos, la saciedad y por tanto el peso corporal, lo que se conoce como homeostasis energética, un estado energético constante (Vergara, 2019). La homeostasis energética indica que la cantidad de energía almacenada es igual a la diferencia entre la ingesta y el gasto energético (Chaptini & Peikin, 2008). Un ligero desequilibrio en la señalización de los mecanismos homeostáticos entre la ingesta y el gasto energético pueden conducir a un aumento de peso corporal, que a largo plazo induce patologías como la obesidad. Por el contrario, una ingesta insuficiente de alimentos o estados de desnutrición también altera el balance energético, retrasando la pubertad, disminuyendo la función reproductiva y comprometiendo en general la homeostasis del organismo (Dupont, *et al.*, 2014; Chan *et al.*, 2015).

Sistema neuroendocrino del apetito, de la ingesta y de la saciedad

Se conoce que el hambre, la saciedad y la homeostasis energética están altamente regulados por información neuroendocrina proveniente del hipotálamo (Hernández *et al.*, 2018). El hipotálamo presenta regiones con funciones específicas y estrechamente conectadas (Figura 9); dentro de los núcleos importantes en la regulación de la homeostasis energética y de la conducta alimentaria se encuentran el núcleo ventromedial (VMN), el núcleo arcuato (ARC), el núcleo paraventricular (PVN) y el núcleo dorsomedial (DMN) (Perry & Wang, 2012; Hernández *et al.*, 2018; Bravo Durán *et al.*, 2021; Wachsmuth *et al.*, 2022). Estas estructuras se modulan mediante diversas señales anorexigénicas que median la saciedad y por señales orexigénicas que promueven la ingesta de alimentos.

Así mismo, existen señales sistémicas (desde la periferia) que aumentan la ingesta y disminuyen el gasto energético; todas estas se coordinan y se integran para modular la actividad del hipotálamo, a corto plazo, la colecistoquinina (CCK) proveniente de sistema gastrointestinal y a largo plazo, la leptina, proveniente del tejido adiposo. La interpretación de estas señales incide en la sensación de hambre o de saciedad, aumentando o disminuyendo el metabolismo basal y la eficacia termogénica del tejido adiposo pardo, en respuesta a las condiciones del balance energético de cada organismo (Calzada *et al.*, 2008).

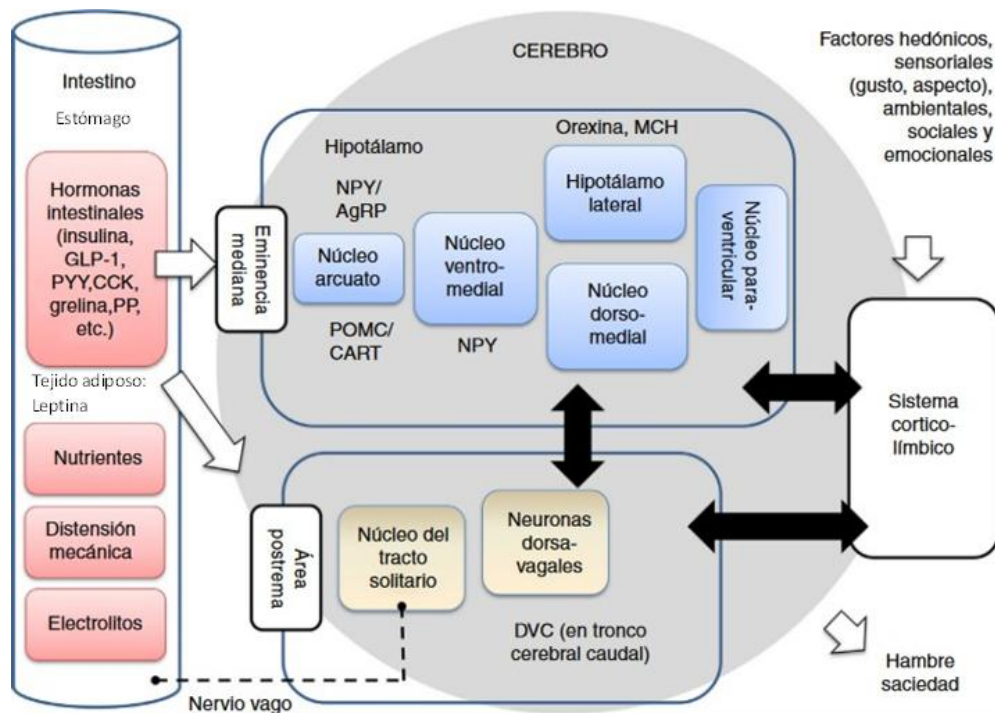


Figura 9. Representación de la vía de señalización implicada en la regulación de la ingesta, homeostasis energética y conducta alimentaria. El centro regulador principal es el hipotálamo, posteriormente el complejo vagal dorsal (DVC) y finalmente el sistema corticolímbico. Las señales provenientes de la periferia (órganos periféricos: estómago, intestino, tejido adiposo) viajan a través del nervio vago y realizan el primer relevo al núcleo del tracto solitario (NTS), y posteriormente, las proyecciones celulares llegan al hipotálamo. La regulación gustativa se procesa en el sistema corticolímbico, quien a su vez modula los núcleos hipotalámicos. GLP-1: péptido similar al glucagón-1; PYY: polipéptido pancreático Y; CCK: colecistoquinina; PP: polipéptido pancreático; NPY: neuropéptido Y; AgRP: péptido relacionado con agouti; POMC: péptidos derivados de la proopiomelanocortina; CART: transcriptasa relacionada con la cocaína- anfetamina; MCH: hormona concentradora de melanina (Tomada y modificada de Hernández *et al.*, 2018).

Regulación integral entre la homeostasis energética y la reproducción

Se ha descrito que la reproducción es un proceso vital para la supervivencia de las especies y conlleva un alto gasto energético. Por lo que, se asume que exista una íntima relación entre el estado nutricional y la capacidad de reproducción, respecto de las señales hormonales y las provenientes de los nutrientes. De tal forma que un desequilibrio en el balance energético generado tanto por obesidad como por desnutrición conducen a un decremento en la fertilidad (McIlwraith & Belsham, 2020; Silvestris *et al.*, 2018). Esta relación neuroendócrina se expresa, principalmente, por la organización y por la comunicación que presenta el hipotálamo, ya que contiene diversas neuronas (Figura 10) implicadas en la regulación de ambas funciones: la reproducción y la homeostasis energética.

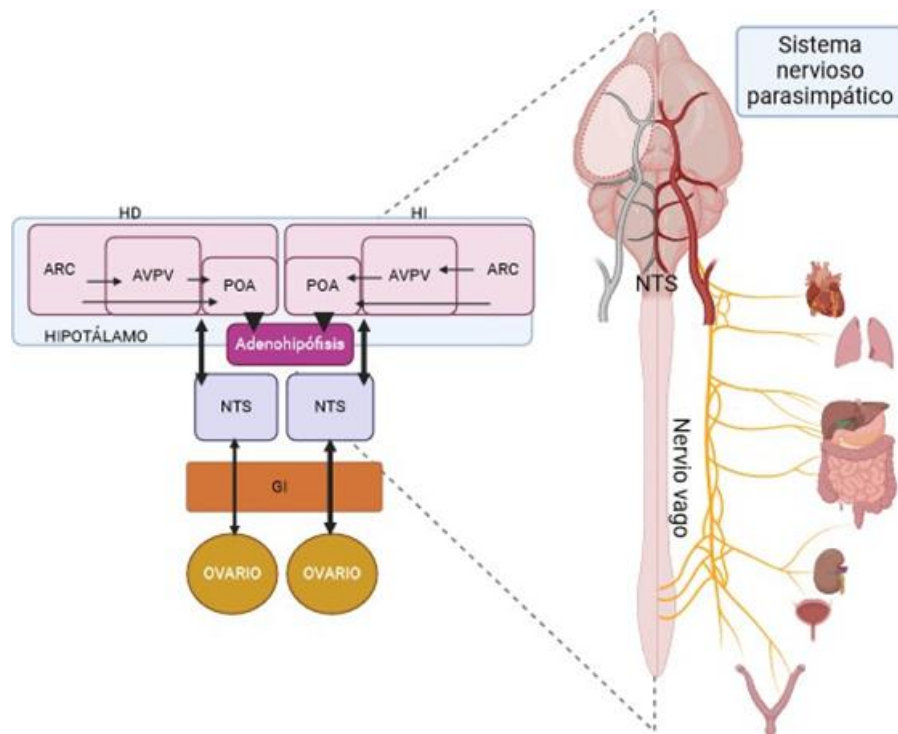


Figura 10. Esquema de la vía de señalización de la regulación energética en la modulación de los parámetros reproductivos. La señal GnRHérgica liberada por los núcleos hipotalámicos, induce la síntesis de gonadotropinas en la hipófisis, estas señales se liberan al torrente sanguíneo llegando al ovario, a su vez el ovario induce la síntesis y la liberación de hormonas esteroideas y péptidos que autorregulan su funcionamiento y el del propio eje para mediar la reproducción. Este eje recibe información sobre el estado energético y la disponibilidad de los nutrientes para la reproducción mediante el sistema parasimpático, de señales periféricas que viajan de manera ascendente desde el nervio vago al NTS, quien proyecta conexiones hacia el hipotálamo para regular su función. NTS: núcleo del tracto solitario; POA: área preóptica; ARC: núcleo arcuato; AVPV: núcleo periventricular anteroventral; HI: hemisferio izquierdo; HD: hemisferio derecho; GI: sistema gastrointestinal. Creado en BioRender.com

Para que se lleve a cabo el proceso reproductivo, diferentes estudios realizados a finales del siglo XX, propusieron la presencia de un rango de peso corporal crítico para la activación de la pubertad y para el mantenimiento de las funciones reproductivas en la etapa adulta (Frisch & McArthur, 1974). Kennedy & Mitra (1963) observaron que la maduración sexual ocurre cuando alcanzan aproximadamente entre el 45% y el 50% de su peso corporal adulto. Sin embargo, también se sabe de situaciones en las que el organismo presenta suficientes depósitos energéticos, pero no puede utilizarlos adecuadamente, tal es el caso de las patologías metabólicas como la obesidad y la diabetes (Boden & Shulman, 2002), lo que puede interferir con la función reproductiva normal.

De acuerdo con esto, el balance entre las funciones reproductivas y las reservas energéticas dependen de una amplia red neuroendocrina que comunica el estado nutricional y energético desde la periferia a la región central y que regula la función reproductiva. En este sentido, se asumiría que

las señales anorexigénicas promoverían la función reproductiva, mientras que un decremento energético activaría las señales orexigénicas e inhibiría la función del eje HHG.

Leptina y su relación con la Obesidad

La leptina es una hormona anorexigénica responsable del control de la ingesta de alimentos y la homeostasis energética (Gao *et al.*, 2007; Spicer & Francisco, 1997). Esta hormona se encuentra constituida por 167 aminoácidos con un peso molecular de 16 kDa, codificada por el gen *LEP*, es sintetizada por el tejido adiposo blanco principalmente (Garavito *et al.*, 2020), pero se conoce su expresión en otros órganos, como los ovarios, la placenta, la médula ósea y el tejido linfático (Garfield *et al.*, 2012).

La producción de niveles basales de leptina es proporcional al tamaño de las células adipocitarias, es decir, al estado de reserva energético del organismo (Lee & Fried, 2009). Estos niveles basales se encuentran regulados por alteraciones en el ARNm de la leptina que están determinados por diferentes señales hormonales, como los glucocorticoides y las catecolaminas (Rentsch & Chiesi, 1996), pero también en respuesta a insulina y precursores energéticos (Moreno-Aliaga *et al.*, 2001). Después de que ocurre la ingesta de alimentos, tanto la insulina como la glucosa y los aminoácidos, inducen la traducción del ARNm de leptina, mediante la vía mTOR (mammalian Target of Rapamycin) en las células adipocitarias (Figura 11; Chakrabarti *et al.*, 2008).

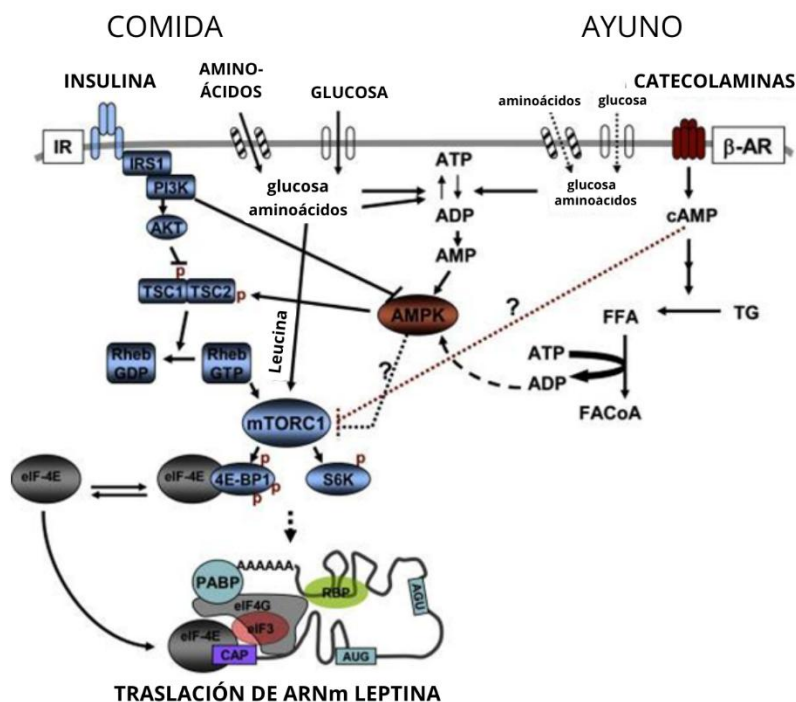


Figura 11. Vía de señalización dependiente de insulina para la síntesis y traslación de ARNm de leptina en el adipocito. Durante la comida se activa la señalización mediada por insulina en el adipocito por la vía PI3 - mTOR. La rapamicina sensible a mTORC1 regula la síntesis de proteínas mediante la fosforilación de la proteína de unión tipo 1-4E (4E-BP1) y S6 k. La glucosa y los aminoácidos como la leucina permiten la energía disponible (ATP) para la traducción del ARNm. Mientras que, durante el ayuno, disminuyen los niveles de insulina, de glucosa y de aminoácidos, activando al sistema simpático por medio de los receptores adrenérgicos (AR) e inhibiendo la vía de señalización mTORC1 mediante la vía del AMPc (Adenosin monofosfato cíclico) (Tomado y modificado de Lee & Fried, 2009).

Su liberación al torrente sanguíneo propicia una amplia gama de señalización a sus células blanco, gracias a la expresión de su receptor en múltiples tejidos. El receptor de leptina (LepR) que es similar al receptor de citoquinas y que codifica para 6 isoformas distintas, inicialmente se ubicó en el núcleo arcuato (Gao *et al.*, 2007), sin embargo, se ha localizado en otras estructuras también, como el núcleo ventromedial, el núcleo dorsomedial, el núcleo paraventricular y lateral del hipotálamo, en núcleos talámicos, en núcleos cerebelosos, en núcleos provenientes del tallo cerebral, como el NTS, así como en estructuras periféricas, como el nervio vago y los ovarios (Garavito *et al.*, 2020; Garafield *et al.*, 2012; Aleixandre & Miguel 2008).

A nivel neuronal, la leptina ejerce diferentes funciones durante el neurodesarrollo, principalmente se ha reconocido su participación en el establecimiento de circuitos hipotalámicos hasta la plasticidad en vías corticales mediante neurogénesis y sinaptogénesis (Pinto *et al.*, 2004; Garfield *et al.*, 2012; Bravo-Durán *et al.*, 2021). Estos cambios se derivan de su participación en la reorganización de los componentes estructurales de la célula, como los filamentos de actina, en la

activación de receptores como los NMDA y en la promoción de la expresión de factores como el BDNF (Valerio *et al.*, 2006). Mientras que, a nivel fisiológico modula el apetito, participa en la homeostasis energética, en el sueño-vigilia, en la osteogénesis, en el sistema inmunitario, en la actividad locomotora, así como en la reproducción y en el establecimiento de la pubertad en respuesta a funciones adaptativas y metabólicas. Esta última función se ejerce mediante la modulación de la actividad del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal (HHG) y de la señalización proveniente de la periferia, regulando la actividad de las neuronas hipotalámicas reproductivas (Brzechffa *et al.*, 1996; Mantzoros, 1999).

Se ha demostrado que la leptina es un factor permisivo para el inicio de la pubertad y la fase reproductiva, ya que su deficiencia establece un retraso en la pubertad, en la maduración del eje HHG y ocasiona hipogonadismo hipogonadotrópico (Pitteloud *et al.*, 2007). La mutación del receptor a leptina provee una alteración morfofuncional en todas las vías de señalización involucradas, su inactivación se asocia con el desarrollo de un fenotipo obeso y con la infertilidad, afectando el ciclo reproductivo y la conducta sexual (Keen-Rhinehart *et al.*, 2004). Además, se reporta que existen asociaciones positivas entre las concentraciones plasmáticas de la leptina (31.3 ± 24.1 ng/ml en pacientes con obesidad; 7.5 ± 9.3 ng/ml en pacientes con normopeso) y el porcentaje de masa corporal en individuos con obesidad (Considine *et al.*, 1996).

Modelos animales de obesidad

En las últimas décadas, numerosas investigaciones han recurrido a modelos animales con predisposición al desarrollo de obesidad para caracterizar las alteraciones morfofisiológicas que favorecen el desarrollo de esta condición, empleando principalmente roedores, como ratas y ratones.

De acuerdo con esto, estos animales han sido usados con éxito durante décadas en la investigación biomédica, distinguiendo principalmente dos tipos de modelos animales obesos: los monogénicos (mutación ligada a un gen) y los poligénicos (obesidad inducida por dieta) (Doulberis *et al.*, 2020). En el caso de los modelos monogénicos, se ha estudiado principalmente una mutación en la vía de la leptina, que modifica los procesos metabólicos, endócrinos y autónomos en los animales. Estos modelos representan una ventaja clara en la selección del estudio, al determinar un fenotipo específico de estudio (Speakman *et al.*, 2008; Speakman *et al.*, 2007). Así mismo, estos animales

genéticamente modificados, presentan obesidad desde etapas tempranas de la vida, lo que permite abordar el fenómeno de obesidad en individuos de corta edad. Por otro lado, los modelos inducidos por dieta derivan de la ingesta de alimentos hipercalóricos y puede desarrollarse por diversos factores en los que participan más de un gen. Estas dietas pueden ser principalmente de dos tipos: 1) dieta rica en grasas y 2) dieta de cafetería que induce hiperfagia (Doulberis *et al.*, 2020).

Rata Zucker

La rata Zucker es un modelo animal ampliamente utilizado en estudios relacionados con obesidad y con el síndrome metabólico; fue descrita por Louis Zucker y Theodore F. Zucker en 1961 y surge a partir de la cruce de ratas de la cepa M y de la cepa Sherman. Dicha rata expresa una mutación en el gen *fa* que codifica para los receptores de leptina (LepR) y por tanto se denominó “fatty” (obesa). Los autores, describieron un animal con aumento de peso notable en comparación con el animal normal, con alto porcentaje de grasa, de baja movilidad locomotora e infertilidad. La mutación *fa* se considera como una mutación sin sentido que afecta todas las isoformas del receptor a leptina, se caracteriza por ser una mutación puntual, lo que ocasiona que la proteína resultante no sea funcional, y por tanto se inhibe la dimerización del receptor o bien disminuye su expresión en la membrana celular (Yamashita *et al.*, 1997).

Esta mutación se hereda como un carácter autosómico recesivo, que provoca que los animales homocigotos para el alelo *fa* (*fa/fa*) presenten obesidad (Obese Zucker Diabetic Fatty: OZDF), mientras que los animales heterocigotos (*Fa/+*) son delgados (Lean Zucker Diabetic Fatty: LZDF) (Aleixandre & Miguel, 2008, Tomassoni *et al.*, 2020) (Figura 12). Las ratas Zucker obesas *fa/fa* expresan obesidad espontánea desde la tercera a la quinta semana de vida respecto de las ratas *Fa/+*, y durante la etapa adulta las ratas *fa/fa* superan un 60% el peso de las ratas LZDF y de las ratas “wild type” (Hausman *et al.*, 2003; Bravo-Durán *et al.*, 2021).

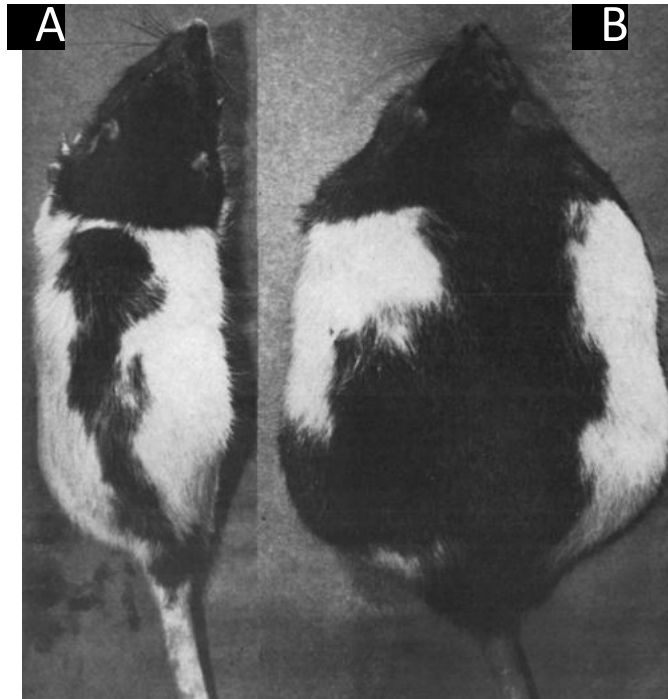


Figura 12. Fotografías de ratas Zucker. (A) delgada ($Fa/+$) de 447 gr de peso y (B) obesa (fa/fa) de 1035 gr de peso, a los 10 meses de edad (Tomado de Zucker & Zucker, 1961).

Modelo OZDF

Las ratas obesas mantienen una alta concentración de leptina circulante, debido a la resistencia de leptina por los receptores que no son funcionales por la mutación (Oanna *et al.*, 2005). Además, expresan alteraciones en las áreas del cerebro involucradas en los mecanismos que regulan el consumo de alimento y por tanto el peso corporal, así como cambios metabólicos y endócrinos (Aleixandre & Miguel, 2008).

Estas ratas exhiben hiperfagia a partir de los 17 días postnatales, obteniendo a las 14 semanas de edad un constituyente del 40% de peso lipídico, por lo que presentan hiperlipidemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina antes de que presenten diabetes; hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hipertensión e hipertrofia de adipocitos (con un aumento de tamaño celular principalmente en el tejido graso subcutáneo) a temprana edad (Tommasoni *et al.*, 2020; Jonhson *et al.*, 1971; Aleixandre & Miguel, 2008; Melnyk & Hakkak, 2022). Estas características fisiológicas desarrolladas por la mutación son semejantes a las condiciones fisiológicas del humano obeso, lo que ha permitido que este modelo sea utilizado para estudiar obesidad genética, diabetes mellitus no dependiente de insulina, procesos neurodegenerativos, enfermedad renal, infertilidad y otras

condiciones patológicas (Melnik & Hakkak, 2022; Zucker & Zucker, 1963; Tomassoni *et al.*, 2020).

El modelo obeso OZDF, expresa un plasma de apariencia lechoso debido a la alta cantidad de triglicéridos y de ácidos grasos (10% mayor), con diferencias entre hembras y machos, siendo mayor en hembras (Lin, 1985), lo cual es diferente a los modelos animales que presentan obesidad cuando se lesiona la región hipotalámica lateral (Johnson *et al.*, 1971).

Modelo LZDF

Las ratas Zucker delgadas *Fa/+*, presentan un aumento de peso corporal más lento y progresivo en la etapa adulta en comparación con las ratas obesas. Esto se debe en parte, a que su tejido adiposo muestra mayores concentraciones de la lipasa sensible a hormonas (HSL), implicada en el metabolismo de las grasas (Pagano *et al.*, 2004) respecto de las ratas obesas. A nivel fisiológico, su metabolismo es acelerado, lo que genera un mayor gasto energético y conduce a cambios en su comportamiento alimenticio, incluyendo una reducción en su consumo de calorías (Sullivan *et al.*, 1978).

Por su parte, en los últimos años este modelo ha tomado relevancia para el estudio de la carcinogénesis mamaria inducida por 7,12-dimetilbenz(a) antraceno, debido a su alta susceptibilidad al desarrollo de la proliferación celular asociada a la hiperleptinemia, especialmente cuando se expone a una dieta alta en grasas (Imai *et al.*, 2013). Además, autores como Johnson *et al.* (1997), mostraron que las ratas hembra Zucker delgadas exhiben una mayor longevidad de aproximadamente 30% en comparación con ratas obesas, lo que sugiere la existencia de diferencias fisiológicas entre estos dos animales.

De acuerdo con Melnik & Hakkak (2022), se identificaron diferencias del 62% en el perfil metabólico sérico entre las ratas hembra Zucker delgadas y las Zucker obesas, lo que sugiere que la obesidad promueve dichos cambios a nivel metabólico. Por otro lado, Berra-Romani *et al.* (2019), mostraron que existen diferencias a nivel de la fisiología cardiovascular, ya que los factores relacionados con Ca^{++} se encuentran alterados en el endotelio de la aorta de las ratas macho OZDF en comparación con sus controles LZDF. Así mismo, se sabe que las poblaciones de microbiota intestinal difieren entre las ratas Zucker macho delgadas y las obesas. Esta diferencia es relevante, debido a se asocia estrechamente con el peso corporal, ya que un microbiota equilibrado favorece la emisión de señales de saciedad, además de modular el metabolismo energético y los procesos inflamatorios (Hakkak *et al.*, 2017). Otros autores reportan que en la etapa temprana del desarrollo (antes de las 6 semanas de edad) la concentración de hormona del crecimiento (GH) no difiere entre

la rata hembra delgada y la rata obesa, pero que las diferencias observadas en la secreción de GH, se establece entre las semanas 6-7, con una disminución entre las ratas obesas (Leidy *et al.*, 1993) lo que conduce a cambios en el desarrollo.

Tanto la rata LZDF como la OZDF, expresan alteraciones estructurales y funcionales en las áreas del cerebro involucradas en los mecanismos para regular el consumo de alimento, así como cambios metabólicos y endócrinos (Aleixandre & Miguel, 2008). Estas señales se relacionan con efectos en la regulación hipotalámica, que afectan la actividad de circuitos neuronales específicos y la liberación de péptidos orexigénicos y anorexigénicos – como la colecistoquinina y el neuropéptido Y -, así como de neurotransmisores clave en el control del apetito, como la dopamina (Martin *et al.*, 1986; Oanna *et al.*, 2005).

Ciclo estral

El ciclo reproductivo de las hembras de roedor, denominado como ciclo estral, comparte semejanzas generales con el ciclo menstrual en mujeres, aunque difiere en su duración y en la ausencia de la menstruación (Cruz *et al.*, 2016). Este proceso reproductivo está determinado por variaciones en la secreción de las diferentes hormonas gonadotrópicas y esteroideas que participan en eventos sincronizados y cíclicos, estos eventos modifican la conducta sexual de las hembras (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1988; Ajayi & Akhigbe, 2020). Además, el seguimiento del ciclo estral se caracteriza por la expresión diferenciada de células epiteliales que se observan mediante una citología vaginal (Figura 13, revisar Anexo II):

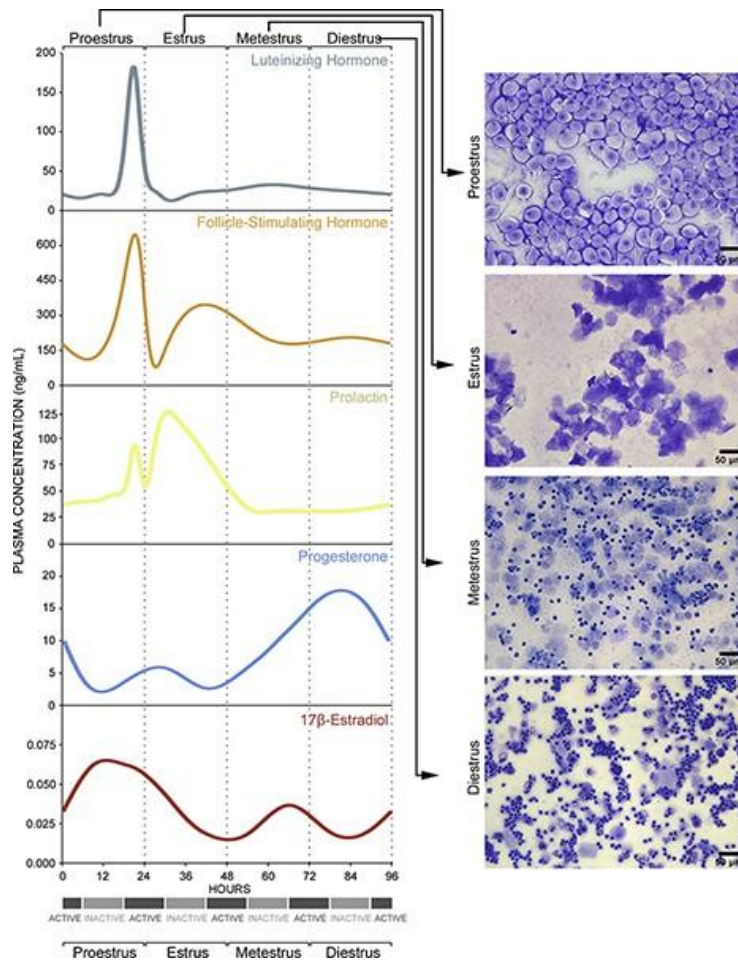


Figura 13. Etapas del ciclo estral de ratas: concentración hormonal y visualización de las células presentes mediante citología vaginal durante el ciclo estral, tinción cristal violeta (Tomado de McLean *et al.*, 2012).

Antecedentes

Tanto la obesidad como el sobrepeso son trastornos asociados a diversos factores de riesgo como las enfermedades cardiovasculares, la hipertensión, los desórdenes metabólicos, así como las alteraciones reproductivas (Fernandez *et al.*, 2011). En las mujeres, se ha demostrado que existe una relación entre el aumento del tejido adiposo y la producción de andrógenos y estrógenos, que desencadenan una serie de señales alteradas que afectan la función ovárica y la fertilidad. Este aumento en el perfil hormonal desencadena una serie de cambios en la maduración del ovocito, en su implantación y en la calidad del producto (Barrios-De-Tomasi *et al.*, 2013).

En relación con la capacidad reproductiva se han descrito alteraciones endócrinas y metabólicas en la rata Zucker obesa (*fa/fa*). En estas hembras se producen cambios relacionados con el ciclo

estral, un deficiente desarrollo folicular, presencia de quistes, la expresión de un útero anormal, así como un comportamiento sexual atenuado en comparación con ratas Long Evans (Honma et al., 2010; Puga y Colmenares *et al.*, 2021). Sin embargo, Chelich & Edmons (1981), reportaron que la principal diferencia entre la rata hembra LZDF (*Fa/+*) y la rata OZDF, es la duración de ciclo reproductivo, donde la rata obesa tiene una mayor duración del ciclo estral por un diestro prolongado, y por tanto el comportamiento copulatorio se ve alterado. En sus observaciones, todas las hembras delgadas participaron en cada sesión del comportamiento copulatorio, mientras que las hembras obesas no completaron todas las sesiones.

Por otro lado, un estudio realizado por Bravo-Durán *et al.*, (2021), demostró que las ratas OZDF presentan retracción dendrítica de neuronas del núcleo hipotalámico ventromedial en comparación con las ratas delgadas LZDF y con las ratas Long Evans, lo que sugiere modificaciones de la regulación de la ingesta de alimentos.

Justificación

En la actualidad, la obesidad ha alcanzado magnitudes pandémicas, se estima que 200 millones de hombres y 300 millones de mujeres padecen obesidad (van Dammen et al., 2018), siendo México uno de los países con alta prevalencia. Dado que esta condición afecta en gran medida a mujeres, diversas investigaciones se han enfocado en dilucidar el impacto negativo que tiene la obesidad con alteraciones neuronales y reproductivas. Los modelos animales permiten el estudio de las condiciones fisiológicas de esta patología, ya que se presentan de manera semejante a la fisiología humana. Específicamente, el modelo de la rata hembra Zucker obesa (OZDF) expresa una variedad de problemas reproductivos que sugieren una alteración en las estructuras neuroendocrinas y, por tanto, es de interés reconocer si existen diferencias morfológicas de las neuronas de los núcleos hipotalámicos ARC, AVPV, POA, así como el NTS de ratas hembra Zucker delgadas y obesas.

Pregunta de investigación

¿Existen diferencias en la arborización dendrítica de las neuronas de los núcleos arcuato, periventricular anteroventral y área preóptica del hipotálamo, y del núcleo del tracto solitario en las ratas hembra Zucker delgadas (LZDF) y las ratas Zucker obesas (OZDF) de 120 días de edad?

Hipótesis

Las ratas hembra Zucker obesas (OZDF) expresan una reducción en la arborización dendrítica de neuronas de los núcleos hipotalámicos arcuato, periventricular anteroventral y área preóptica, así como del núcleo del tracto solitario en comparación con las ratas hembra Zucker delgadas (LZDF) de 120 días de edad.

Objetivos

General

Identificar el efecto de la obesidad genética en la arborización dendrítica de neuronas de los núcleos hipotalámicos arcuato, periventricular, anteroventral y del área preóptica, así como del núcleo del tracto solitario, de ratas hembra Zucker que presenten parámetros zoométricos y en sangre, relacionados con el fenotipo delgado y obeso.

Particulares

1. Determinar la ciclicidad estral de ratas LZDF y OZDF mediante frotis vaginal.
2. Cuantificar la concentración sérica de la hormona esteroidea estradiol de ratas hembra LZDF y OZDF en la etapa de estro.
3. Caracterizar el fenotipo delgado y obeso de las ratas hembra LZDF y OZDF mediante el registro del peso, de la circunferencia abdominal, de la grasa abdominal y del índice de Lee.
4. Determinar los niveles de glucosa, de triglicéridos y de colesterol en plasma de ratas LZDF y OZDF.
5. Examinar la arborización dendrítica de las neuronas de los núcleos hipotalámicos arcuato, periventricular anteroventral y área preóptica del hipotálamo, así como del núcleo del tracto solitario de ratas LZDF y OZDF.

Material y Métodos

Diseño experimental

Grupos experimentales

Para llevar a cabo este proyecto, se utilizaron 36 ratas hembra de 120 días de edad (Figura 14), de las cepas Long Evans (LE, n=12) como grupo control y las cepas Lean Zucker Diabetic Fatty (LZDF-delgada, n=12) y Obese Zucker Diabetic Fatty (OZDF-obesa, n=12) como grupos experimentales. Las ratas fueron obtenidas del Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y mantenidas en esas instalaciones, bajo el cuidado y la supervisión del MVZ. Francisco Ramos Collazo con número de cédula profesional 651957. Los animales estuvieron bajo condiciones de temperatura ambiente de 21-22°C, humedad relativa del 55% y de agua y alimento (LE y LZDF: Labdiet 5001; OZDF: Labdiet 5008) ad libitum.

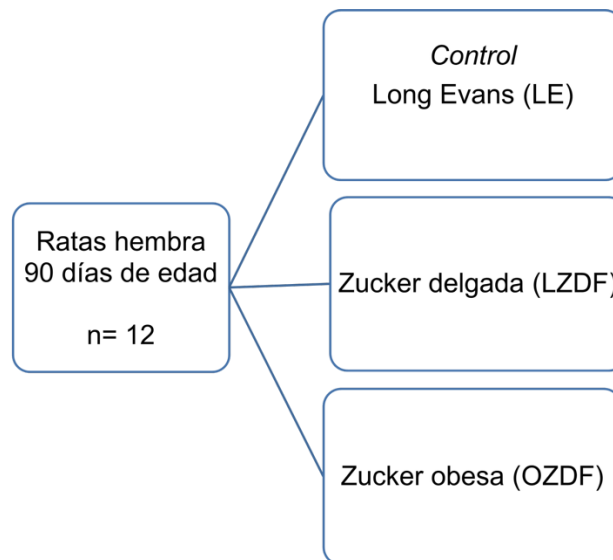


Figura 14. Grupos experimentales. Grupo control – ratas LE, Grupo experimental 1 – ratas LZDF y Grupo experimental 2 – ratas OZDF.

El presente estudio se reporta de acuerdo con las directrices de ARRIVE 2.0 (Kilkenny *et al.*, 2010). Así mismo, el protocolo para la realización del presente estudio fue autorizado por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado, y el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la BUAP, con clave 100274211-UALVIEP- 23/1. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en los animales de acuerdo con los lineamientos establecidos

en la Guía para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio y las Especificaciones establecidas por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y la Ley Mexicana de Protección Animal para el uso de animales de experimentación (de Aluja, 2002). Además, se tomó el “Curso de manejo y vías de administración en la rata de laboratorio” para aplicar los criterios de manejo, anestesia y eutanasia aprobados por el CICUAL de la BUAP. Por tanto, se aplicaron todos los esfuerzos encaminados a minimizar el sufrimiento y la cantidad de animales a utilizar en el proyecto.

Diagrama de trabajo

Las actividades realizadas en el presente estudio se dividieron en siete etapas que incluyen la obtención de los animales, el seguimiento del ciclo estral, la caracterización del fenotipo, el procedimiento de eutanasia, así como, el ensayo morfométrico (etapa 3-5), la determinación de la concentración de metabolitos y estradiol, la obtención de información respecto de la arborización dendrítica de los núcleos ARC, POA, AVPV y NTS, el análisis estadístico de los datos, la elaboración de las gráficas correspondientes, y finalmente la redacción del escrito (Figura 15).

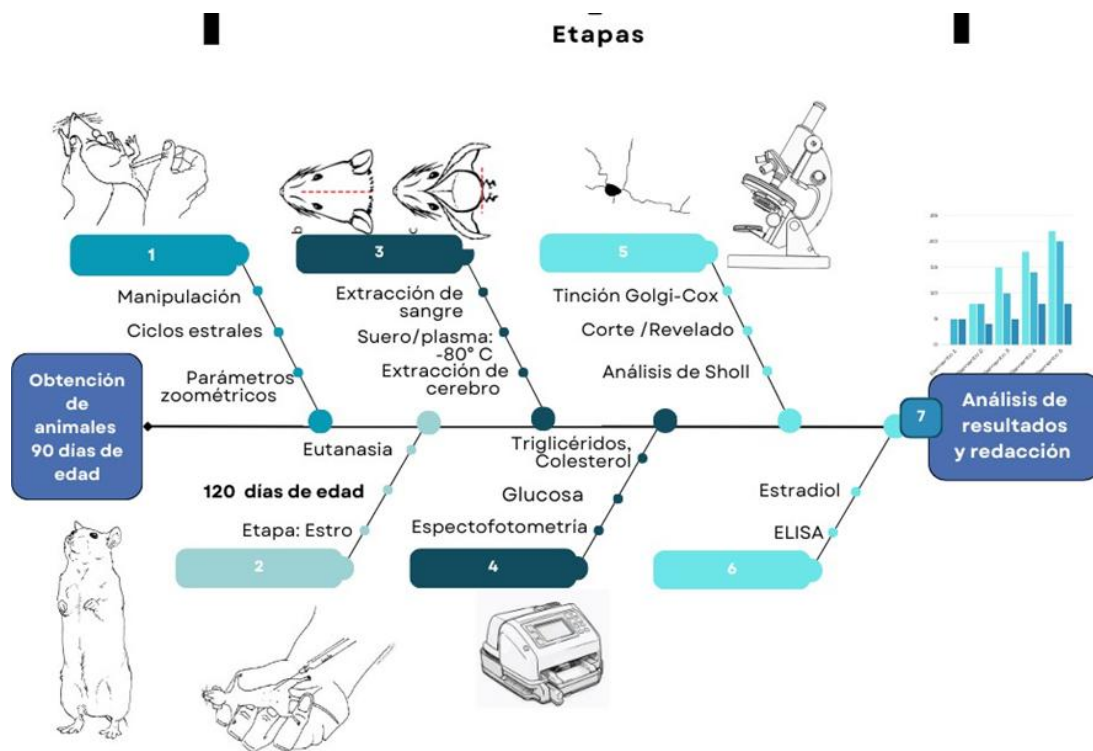


Figura 15. Diagrama de trabajo. Etapas del proyecto de investigación.

Materiales y soluciones

Preparación de laminillas para cortes histológicos del cerebro

Se llevó a cabo el lavado de los portaobjetos, utilizando un baño de agua jabonosa, un enjuague abundante con agua corriente y un segundo enjuague con agua destilada. Una vez que los portaobjetos estaban secos, se sumergieron en una solución de gelatina al 2% por 2 minutos y se dejaron secar por 24 horas.

Solución de Golgi- Cox

Se prepararon soluciones al 5% de dicromato de potasio, de cloruro de mercurio y de cromato de potasio por separado e inmediatamente después, todas las soluciones fueron mezcladas (Das et al., 2013). La solución resultante fue filtrada para ser almacenada en un frasco ámbar en completa oscuridad por 5 días. Inmediatamente, se filtró nuevamente y se almacenó para su uso.

Seguimiento del ciclo estral

Se implementó la manipulación a todos los animales por parte del experimentador para favorecer la interacción y la reducción de factores de estrés. Con ello, se monitoreo la expresión de 3 ciclos estrales mediante frotis vaginal.

Frotis vaginal

Se determinó la etapa del ciclo estral de cada rata mediante citología vaginal obtenida por frotis (Figura 16). Para la toma de muestra, se expuso la región ventral y se introdujo un asa bacteriológica estéril en la zona superficial de la vagina, realizando un movimiento circular para colectar la muestra. Una vez obtenida la muestra se colocó en un portaobjetos haciendo movimientos circulares; se dejó secar la muestra exponiéndola al ambiente. El asa se esterilizó en cada toma realizada para evitar contaminación entre muestras. Posteriormente se aplicó la tinción directa con Hematoxilina-Eosina a partir del siguiente procedimiento:

1. Se agregó una gota de hematoxilina de manera directa a la muestra y se incubó por 5 minutos.
2. Se enjuagó con agua corriente de manera indirecta hasta eliminar el exceso del colorante y se dejó secar.
3. Inmediatamente después, se agregó una gota de eosina de manera directa a la muestra, se dejó incubar por 5 minutos más. Posteriormente, se enjuagó

con agua corriente de forma indirecta hasta eliminar el colorante y se dejó secar.

Las laminillas se observaron en un microscopio óptico (LEICA DM 1000 LED) a una amplificación de 100x, para observar la cantidad y el tipo de células que nos permitiera determinar en qué etapa del ciclo estral se encontraba cada animal (Tabla 1).

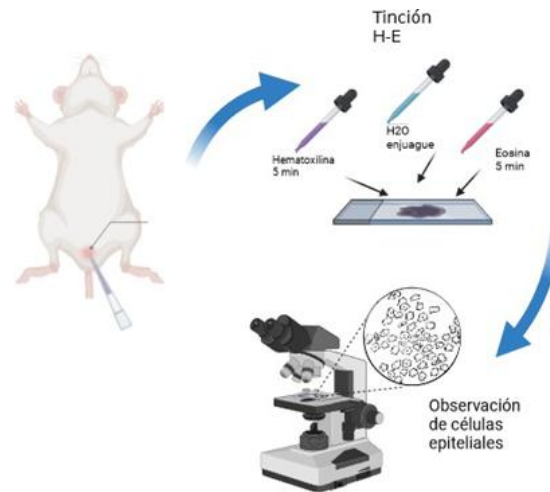


Figura 16. Citología vaginal directa. Procedimiento para la obtención de la muestra, su tinción y su observación en el microscopio. Creado en BioRender.com.

Tabla 1. Criterios para la identificación de la etapa del ciclo estral en la rata de laboratorio.

<i>Proestro</i>	<p>> % células epiteliales cornificadas</p> <p>< % leucocitos</p>
<i>Estro</i>	<p>> % de células cornificadas en forma de hojuela</p>
<i>Metaestro</i>	<p>< % células epiteliales cornificadas</p> <p>> % de leucocitos</p>
<i>Diestro</i>	<p>> % de leucocitos</p>

Caracterización del fenotipo obeso

Los datos del peso (g) y la longitud hocico-ano (H-A, cm) se utilizaron para calcular el índice de Lee. Se consideró como obesidad cuando el índice fue mayor a 0.310, de acuerdo con lo descrito por Lee (1929) y con la siguiente fórmula (Arika *et al.*, 2019):

$$\text{Índice de Lee} = \frac{\sqrt[3]{\text{Peso corporal (g)}}}{\text{LHA (cm)}}$$

El peso fue registrado con una balanza digital, mientras que la circunferencia abdominal y la longitud H-A fueron medidas con una cinta métrica colocando al animal en posición decúbito supino para exponer la región ventral.

Obtención de tejidos

Cuando los animales alcanzaron los 120 ± 4 días de edad y se encontraban en la etapa de estro, se les administró vía intraperitoneal una sobredosis de ketamina (75 mg/kg ip.) y de xilacina (10 mg/kg ip.) para alcanzar anestesia profunda (Connell *et al.*, 2022), este procedimiento fue aprobado y supervisado por el bioterio de la Institución. El fármaco, se mantuvo bajo la supervisión, el resguardo y la custodia de la Dra. Adriana Berenice Silva Gómez, responsable del proyecto.

Colecta de sangre

Bajo anestesia profunda, se obtuvieron de 2-3 ml de sangre a través de una punción cardiaca. Se depositó al menos 1 ml de sangre en un tubo con EDTA para medir posteriormente concentraciones en suero de glucosa, de triglicéridos y de colesterol y, al menos 1 ml de sangre en tubos sin EDTA para cuantificar la concentración de estradiol. La sangre fue centrifugada (Centrifuga Marca Eppendorf) a 3000 rpm por 15 minutos para obtener el suero o el plasma, los cuales se mantuvieron a -80°C para su adecuada preservación hasta el momento en el que se utilizaron para medir la concentración de los metabolitos y de estradiol.

Determinación de la concentración estradiol (E2)

Para determinar la concentración de estradiol en cada grupo experimental, se utilizó un kit de ELISA (Cayman Chemical) y se siguieron las instrucciones del proveedor. Este ensayo consiste en una competencia que se observa entre el estradiol muestra (que está presente en el suero de cada muestra) con un conjugado de estradiol referencia (Ag-enzima: acetilcolinesterasa (AChE)+

trazador (AChE Tracer)) por el sitio de unión (antisuero de estradiol-anticuerpo de captura) (Figura 17). La reacción enzimática que se presenta tiene una coloración amarillenta que absorbe a 414 nm. La intensidad de color que se obtiene es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno, como se presenta en la siguiente fórmula:

$$\text{Absorbancia} \propto [\text{Unión Trazador AChE y estradiol}] \propto \frac{1}{[\text{Estradiol}]}$$

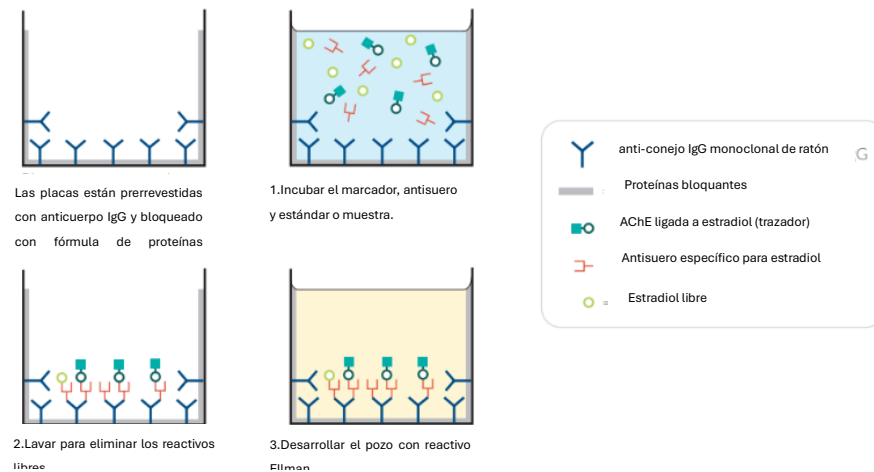


Figura 17. Principio del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Obtenido y modificado de la ficha técnica del kit de ELISA estradiol Cayman Chemical.

Brevemente, previo al ensayo, la muestra fue descongelada de manera gradual para ser utilizada a temperatura ambiente (22-25°C) al igual que los reactivos y la solución estándar. Para la lectura se utilizó un lector de Microelisas (*Eppendorf*) con filtro de 450nm (rango $\geq 0-2$ D.O).

Cuantificación de las concentraciones de los metabolitos

Las concentraciones plasmáticas de glucosa, de triglicéridos y de colesterol se cuantificaron mediante kits de la marca *Valtek* para determinaciones por espectrofotometría; se utilizó un espectrofotómetro (Marca *Velab*).

Concentración de Glucosa

La determinación de la concentración de glucosa se realizó por triplicado para cada muestra a temperatura ambiente. Se utilizó el kit Bio-Glucosa y la lectura de la absorbancia se realizó a 505 nm. Los datos obtenidos permitieron calcular la concentración de glucosa en suero a partir del cálculo del siguiente factor y de la siguiente fórmula:

$$\text{Factor} = \frac{\text{Concentración del calibrador}}{\text{Absorbancia promedio del calibrador}}$$

$$\text{Glucosa} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \text{Factor} \times \text{Absorbancia promedio de la muestra}$$

Concentración de Triglicéridos

Para determinar la concentración de triglicéridos la prueba se realizó por triplicado para cada muestra. Se utilizó el kit para la determinación fotométrica de triglicéridos en plasma, el cual fue conservado a 2-8°C sin exposición a la luz antes de ser utilizados. La reacción se realizó a temperatura ambiente para la lectura de la absorbancia a 510 nm.

Para obtener la concentración de triglicéridos, se calculó el factor y luego la concentración mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Factor} = \frac{\text{Concentración del calibrador}}{\text{Absorbancia promedio de calibrador}}$$

$$\text{Triglicéridos} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \text{Factor} \times \text{Absorbancia promedio de la muestra}$$

Concentración de Colesterol

Para calcular la concentración de colesterol también se realizó el ensayo por triplicado para cada muestra. Se utilizó el kit Colesterol Total que fue conservado a 2-8°C sin exposición a la luz antes de ser utilizado. La lectura de la absorbancia de la reacción se realizó a 505 nm. Para obtener la concentración de colesterol total, se calculó el factor:

$$Factor = \frac{Concentración\ del\ calibrador}{Absorbancia\ promedio\ del\ calibrador}$$

Con ello, se calculó la concentración de Colesterol Total:

$$Colesterol\ Total\ \left(\frac{mg}{dL}\right) = Factor \times Absorbancia\ promedio\ de\ la\ muestra$$

Método de Golgi-Cox

Disección de cerebro y toma de tejido adiposo abdominal

Cuando los animales se encontraban bajo anestesia profunda y después de colectar la sangre, inmediatamente se llevó a cabo una perfusión intracardiaca con solución salina al 0.9% para eliminar el excedente de sangre de los órganos. Se procedió a extraer toda la grasa de la cavidad abdominal, se mantuvo en frío para mantener su integridad e inmediatamente se pesó en una balanza analítica (VELAB VE-300). Acto seguido se realizó una craneotomía y se extrajo de la cavidad craneal el cerebro, el cual fue almacenado en solución de Golgi-Cox por 14 días en completa obscuridad. Una vez cumplido el tiempo de 14 días en completa obscuridad, la solución fue reemplazada por sacarosa al 30% por 3 días.

Revelado de la tinción de Golgi-Cox

Posteriormente, se obtuvieron cortes histológicos coronales al nivel de los núcleos hipotalámicos ARC, AVPV y POA, y cortes histológicos al nivel del NTS de 200 µm con la ayuda de un vibratomo semiautomático (Leica VT 1000S). Los cortes fueron montados en laminillas gelatinizadas e incubados en una cámara húmeda por toda una noche para después llevar a cabo el revelado de la tinción con hidróxido de amonio y fijador rápido de Kodak, finalmente los cortes se deshidrataron con soluciones de concentraciones ascendentes de alcohol (50, 75, 90 y 100%) y finalmente el

aclaramiento con xilol, como se describe en la Figura 18. Se realizó el montaje con resina sintética Entellan, para su posterior observación a través de microscopía de campo claro.

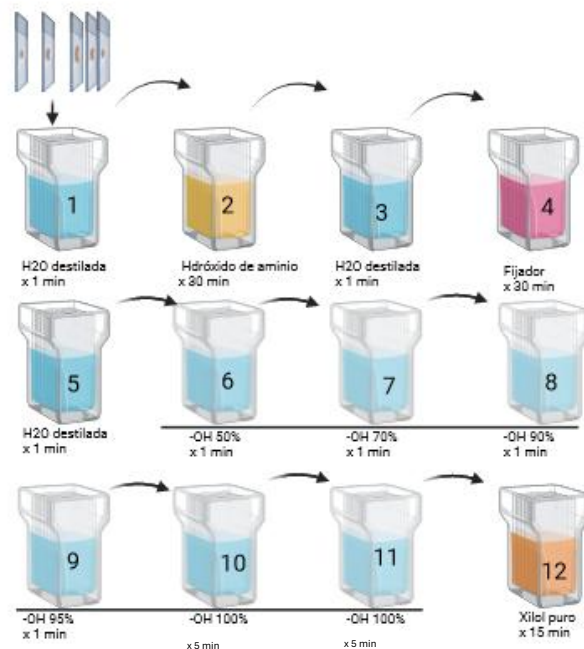


Figura 18. Proceso de revelado de la tinción de Golgi-Cox. El rack con las laminillas se sumerge en cada solución de acuerdo con el tiempo establecido. *Todo el proceso se llevó a cabo en un cuarto oscuro iluminado con luz roja.* Creado en BioRender.com

Identificación de los núcleos ARC, AVPV, POA y NTS: coordenadas estereológicas

Se analizó la morfología neuronal de los núcleos ARC en cortes histológicos respecto de Bregma de -2.12 a -4.16 mm (Figura 19), del periventricular anteroventral (AVPV) y del área preóptica (POA) en cortes respecto de Bregma -0.26 a -0.80 mm (Figura 20), así como del núcleo del tracto solitario (NTS), en cortes respecto de Bregma -13.68 a -14.60 mm (Figura 21).

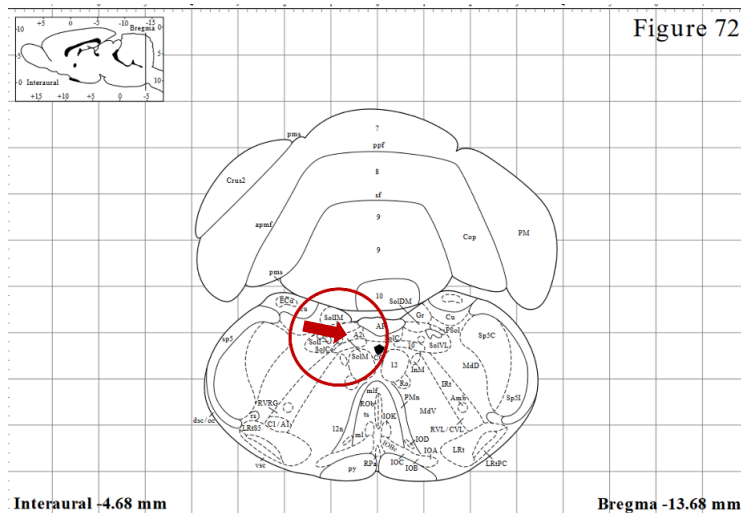


Figura 21. Dibujo del corte coronal de la localización del núcleo del tracto solitario, círculo rojo (región sol-A2, flecha roja) respecto a Bregma -13.68 (Tomada y modificada de Paxinos & Watson 1998).

Análisis de Sholl

De acuerdo con las coordenadas mencionadas para cada núcleo se observaron a las neuronas con una amplificación de 400x (con el método descrito anteriormente) y mediante el uso de una cámara lúcida (cámara de dibujo) acoplada a un microscopio (LEICA DM 1000 LED) se hicieron reconstrucciones bidimensionales de ellas en papel.

Cada neurona fue seleccionada si cumplió con los siguientes criterios: 1) neurona aislada y definida; 2) sin dendritas rotas; 3) tinción consistente y oscura. Se dibujaron 20 neuronas de cada núcleo por cerebro (diez neuronas del hemisferio izquierdo y diez del hemisferio derecho para analizar lateralización a nivel del SNC). Sobre cada dibujo, se calculó el número de intersecciones dendríticas de acuerdo con el análisis de Sholl (Figura 22); este análisis consiste en colocar una lámina de círculos concéntricos equidistantes que representan la medida de 10 μm para cuantificar el número de intersecciones dendríticas por círculo concéntrico, y con ello determinar la arborización y la longitud dendrítica total (Kolb *et al.*, 1998).

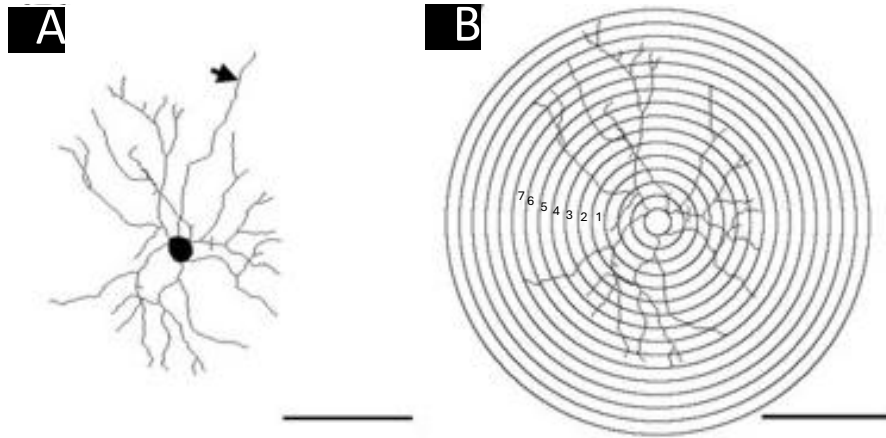


Figura 22. Representación esquemática del análisis de Sholl. A. Dibujo de la neurona seleccionada, con ayuda de la cámara lúcida. B. Lámina de círculos concéntricos equidistantes sobre el dibujo de la neurona, cada círculo representa 10 μm para cuantificar el número de intersecciones dendríticas. Escala de barra: 100 μm . Obtenido y modificado de Binley *et al.*, 2014.

Análisis estadístico

Para este trabajo, se consideró como variable independiente la cepa de las ratas y el fenotipo delgado y obeso. Las variables dependientes que se sometieron a un análisis estadístico fueron el peso corporal, la talla, el índice de Lee, la circunferencia abdominal, el porcentaje de grasa abdominal, la concentración de colesterol, de triglicéridos y de glucosa (ng/ml), número de intersecciones dendríticas y longitud dendrítica total. Todos los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis exploratorio (datos descriptivos: promedio, mediana, desviación estándar, error estándar, mínimo y máximo) seguido de una prueba de normalidad para determinar el tipo de análisis estadístico que se realizaría. De acuerdo con estos resultados, para los parámetros zoométricos, el perfil metabólico y la concentración plasmática de la hormona E2 se utilizó una prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey, mientras que para los datos de arborización y longitud dendrítica total se utilizó ANOVA de dos vías. En todos los casos se consideró como diferencias estadísticamente significativas cuando la P fue < 0.05 . El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Graph Pad Prism versión 8.

Resultados

Ciclo estral

En cuanto a la identificación de la morfología epitelial vaginal de las ratas LE se observa de manera clara, la presencia de células nucleadas durante la etapa del proestro (Figura 23A), una abundante cantidad de células cornificadas durante la etapa de estro (Figura 23B), presencia de leucocitos y células anucleadas en el metaestro (Figura 23C) y leucocitos principalmente durante la etapa de diestro (Figura 23D).

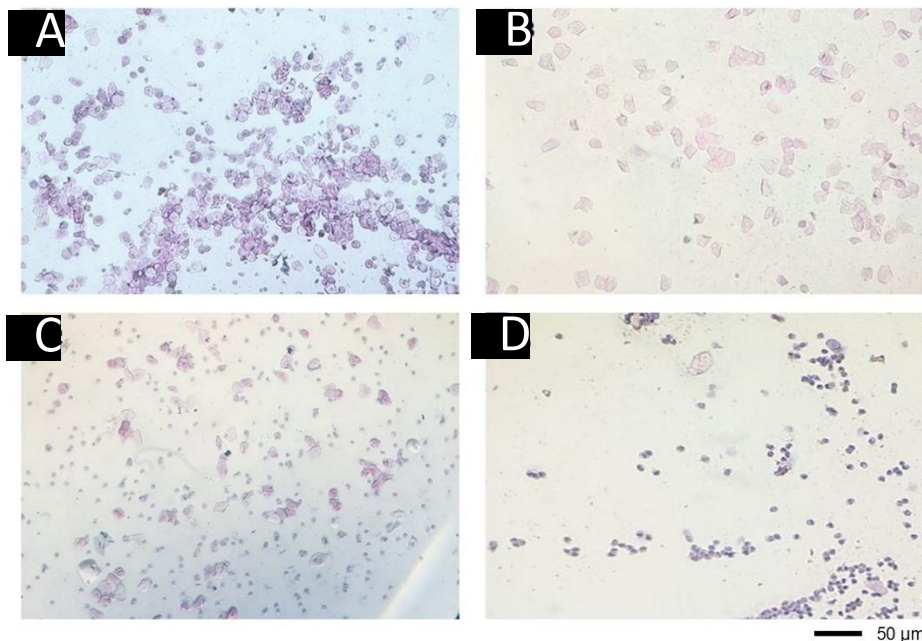


Figura 23. Etapas del ciclo estral por frotis vaginal en ratas LE. A: Proestro. B: Estro. C: Metaestro. D: Diestro.

En relación con las ratas LZDF, la morfología de las células epiteliales del frotis vaginal mostró evidencia de células nucleadas en la etapa de proestro (Figura 24A), y una clara presencia de células cornificadas en la etapa de estro (Figura 24B). En la etapa de metaestro se observó la presencia de leucocitos (Figura 24C) y una gran cantidad de leucocitos durante la etapa de diestro (Figura 24D). Mientras que, en las ratas OZDF, se observaron células nucleadas uniformes en la etapa de proestro (Figura 25A), la presencia de células cornificadas característica de la etapa de estro (Figura 25B), pocos leucocitos en la etapa de metaestro (Figura 25C), y una cantidad abundante de leucocitos que es característica de la etapa de diestro (Figura 25D).

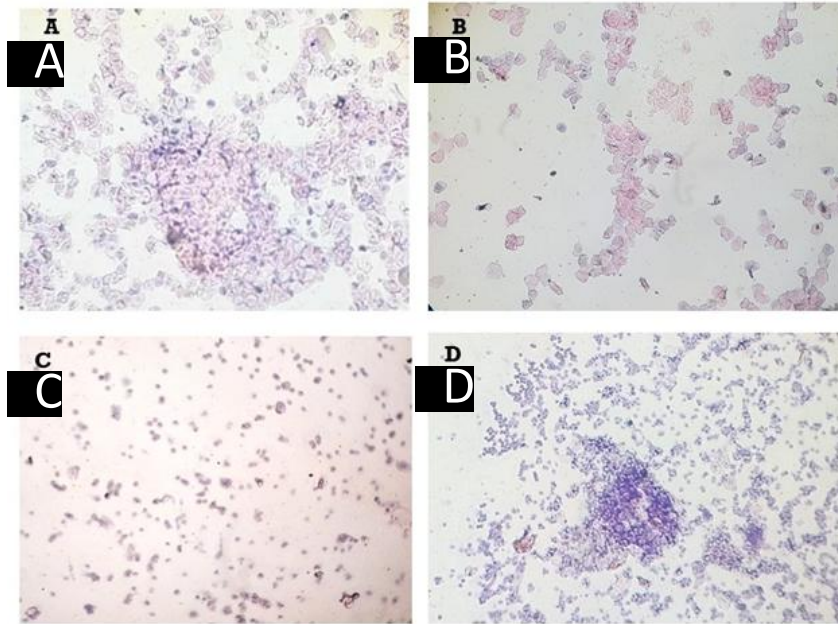


Figura 24. Etapas del ciclo estral por frotis vaginal en ratas LZDF. A: Proestro. B: Estro. C: Metaestro. D: Diestro. Amplificación 100x.

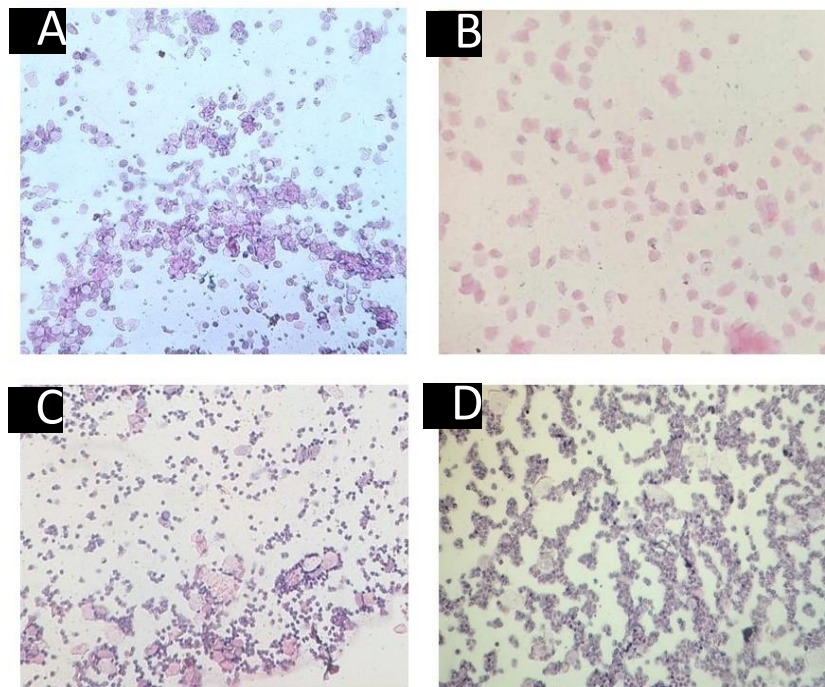


Figura 25. Etapas del ciclo estral por frotis vaginal en ratas OZDF. A: Proestro. B: Estro. C: Metaestro. D: Diestro. Amplificación 100x.

Por otro lado, al evaluar el ciclo estral de las hembras se observó que, tanto las ratas control, como las ratas LZDF y las ratas OZDF presentaron la etapa de estro con una duración de 24 horas

aproximadamente (Tabla 2) y que las ratas LE, quiénes presentaron un patrón regular del ciclo estral, mostraron una duración de 55 horas aproximadamente de la etapa de diestro (Figura 26). Mientras que, las ratas LZDF mostraron periodos no cíclicos (irregulares); en el 50% de las hembras la duración de la etapa de diestro (en algunos individuos alcanzó 3 días consecutivos) se prolongó sin evidencia clara de la etapa de metaestro (Anexo I). Por otro lado, el 60% de los animales del grupo OZDF presentó todas las etapas del ciclo estral (Tabla 2), sin embargo, la etapa de diestro tuvo mayor prevalencia en este grupo. Cabe mencionar que, en ocasiones no se registró la expresión de la etapa de proestro en todos los animales del estudio (Figura 27). Para el registro de permanencia en cada una de las etapas del ciclo estral, los datos respecto de las etapas de metaestro y de diestro se conjuntó y se tomó como diestro.

Tabla 2. Registro del ciclo estral (%) de ratas LE, LZDF y OZDF

CICLO ESTRAL	LE	LZDF	OZDF
% CÍCLICO (4-5 DÍAS)	100%	50%	60%
% NO CÍCLICO	0	50%	40%

No cíclico: ciclo con duración de más de 8 días, con etapas prolongadas de diestro y estro, como estro permanente y efecto de pseudogestación.

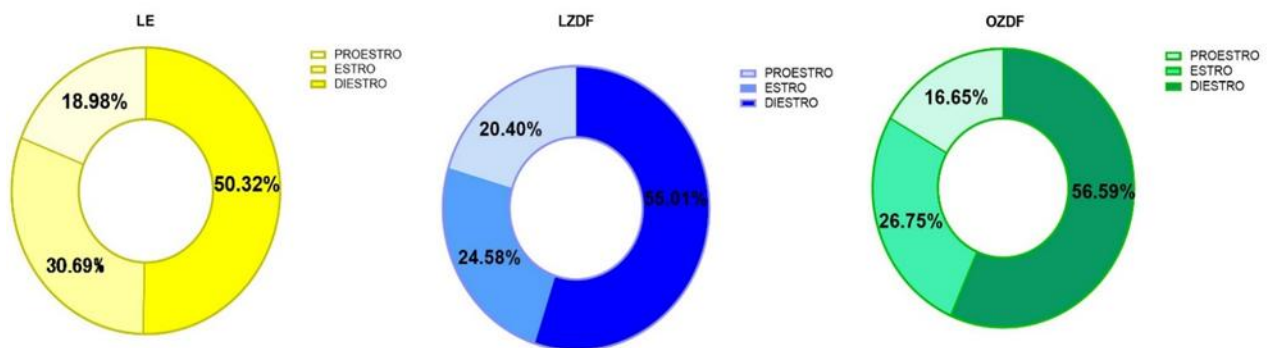


Figura 26. Permanencia de cada una de las etapas del ciclo estral para cada uno de los grupos experimentales a lo largo de tres ciclos consecutivos, equivalente a 12-15 días de observación.

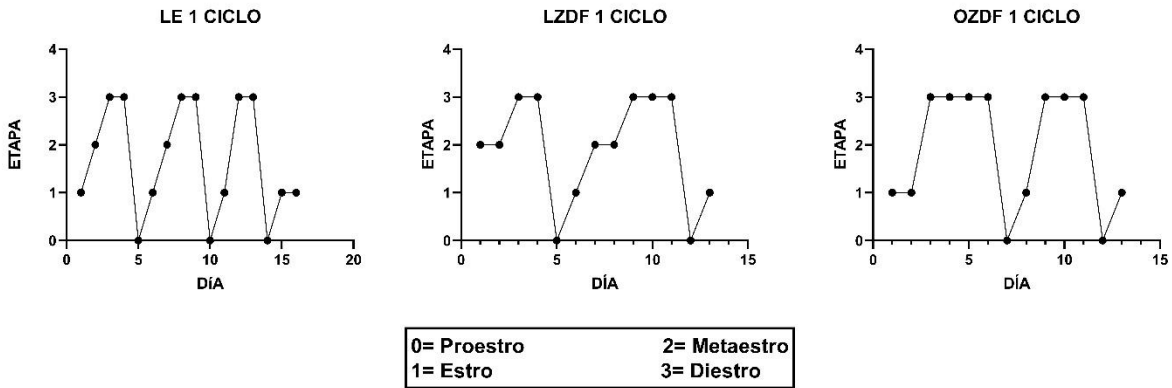


Figura 27. Seguimiento del ciclo estral en ratas LE, LZDF y OZDF. Gráficas representativas para cada grupo experimental.

Concentración de estradiol

La concentración sérica de estradiol del grupo control, del grupo LZDF y de las ratas OZDF fue similar, no se presentaron diferencias significativas entre los grupos (Figura 28; $F_{(2, 21)} = 2.814$, $P = 0.0826$).

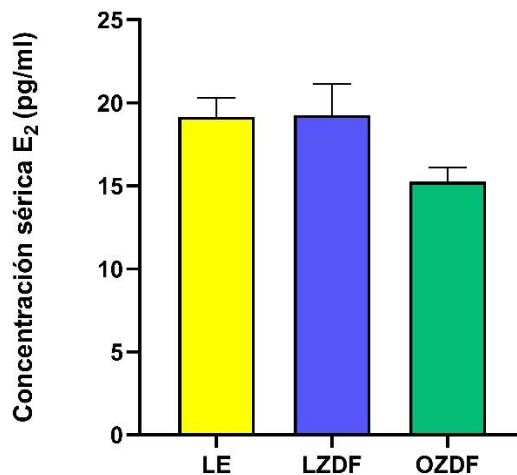


Figura 28. Concentración sérica de la hormona estradiol en ratas LE, LZDF y OZDF de 120 días de edad. Se presentan la media \pm SEM (n=8 por grupo experimental). Sin diferencias significativas entre los grupos. ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey.

Caracterización del fenotipo obeso

Se mostró que existe una visible diferencia morfológica entre cada uno de los grupos

experimentales (Figura 29), ya que las ratas LZDF son más delgadas y pequeñas y las ratas OZDF expresan una apariencia más robusta respecto del grupo control.

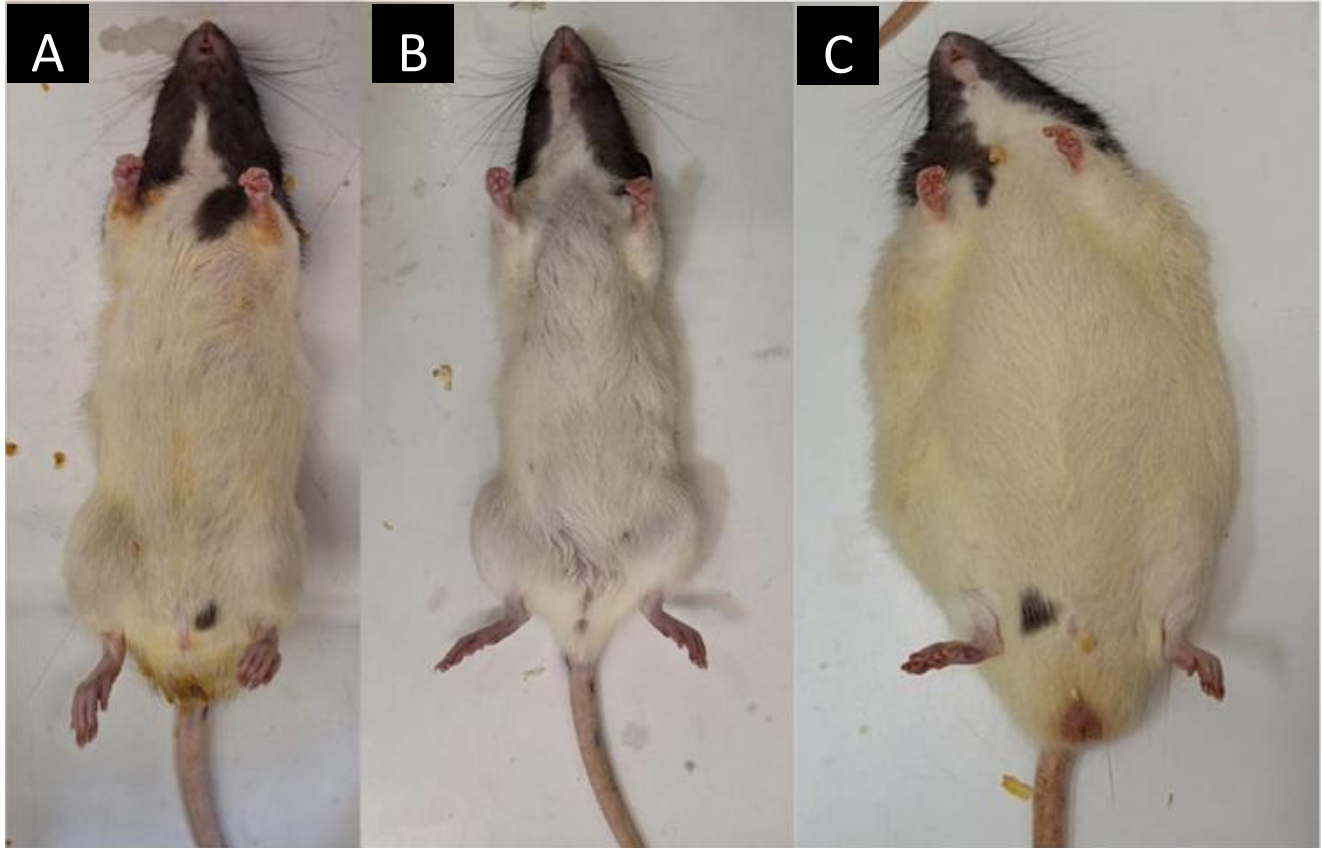


Figura 29. Rata A: Long Evans (LE), B: Lean Zucker diabetic fatty (LZDF), C: Obese diabetic fatty (OZDF).

Peso corporal

Existe una diferencia significativa entre los grupos en cuanto al peso corporal (Figura 30). Las ratas OZDF presentan un mayor peso corporal, alcanzando un peso promedio de 385 ± 7.8 g, respecto al grupo control (278 ± 3.1 g) y el grupo LZDF (219 ± 4.3) ($F_{(2, 33)} = 23$, $P < 0.0001$). El menor peso corporal de las ratas LZDF es significativamente diferente del grupo control y del grupo OZDF ($F_{(2, 33)} = 23$, $P < 0.0001$).

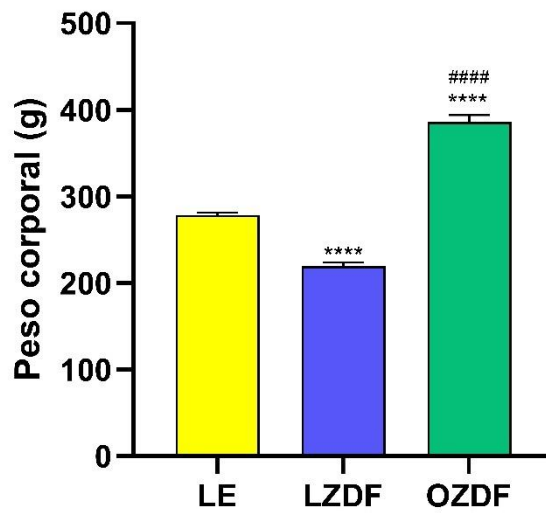


Figura 30. Peso corporal de ratas LE, LZDF y OZDF a los 120 días de edad. Se muestra la media \pm SEM con una $n=12$, **** $P < 0.0001$ LE vs LZDF, LE vs OZDF; ##### $P < 0.0001$ LZDF vs OZDF. ANOVA de una vía con prueba post hoc de *Tukey*.

Índice de Lee

De acuerdo con el índice de Lee, el análisis estadístico mostró que las ratas OZDF presentaron un índice superior a 0.310 que determina un fenotipo obeso en comparación con la rata delgada LZDF y las ratas del grupo control LE ($F_{(2, 33)} = 72.0$, $P < 0.0001$, $n=12$). No se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo LZDF (Figura 31).

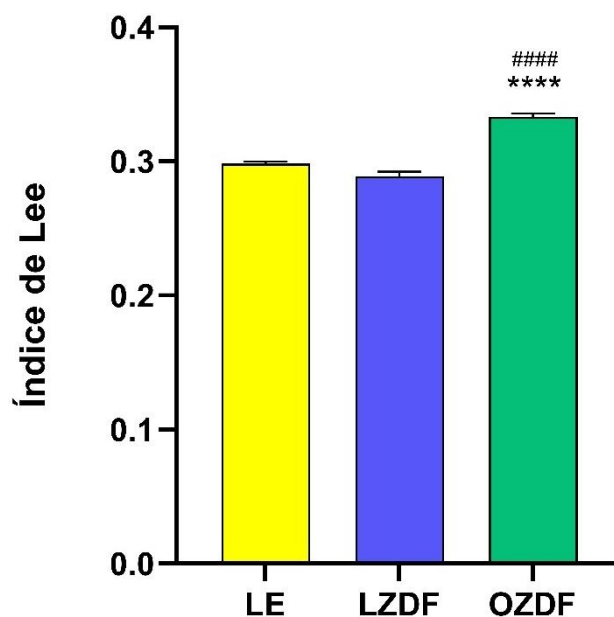


Figura 31. Índice de Lee. Se observa que las ratas OZDF muestran un índice significativamente mayor respecto de las ratas LE y las ratas LZDF. Se muestra la media \pm SEM con una $n=12$, **** $P < 0.0001$ para OZDF vs LE y #### $P < 0.0001$ OZDF vs LZDF. ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey.

Grasa abdominal y circunferencia abdominal

Los resultados de la medición de circunferencia abdominal (cm) mostraron un aumento significativo en el grupo OZDF (Figura 32A; $F_{(2, 33)} = 121.5$, $P < 0.0001$) en comparación con la cepa delgada LZDF y el grupo control LE. Mientras que el análisis estadístico para el peso de la grasa abdominal (g), la rata OZDF presentó un incremento superior respecto del grupo LZDF y del grupo control (Figura 32B; $F_{(2, 9)} = 389.2$, $P < 0.0001$).

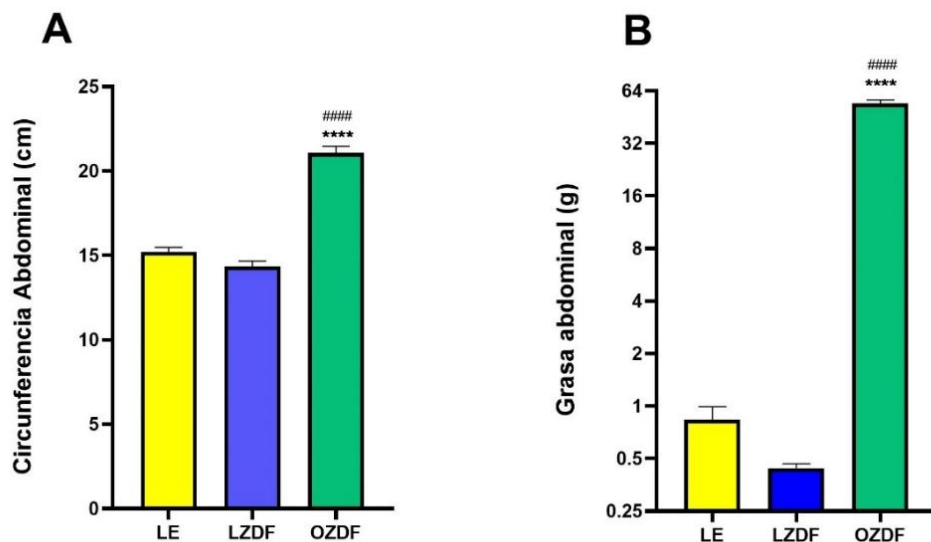


Figura 32. Circunferencia y grasa abdominal de ratas LE, LZDF y OZDF. Se muestra la media \pm SEM con una $n=12$ para circunferencia abdominal (A) y una $n=4$ para grasa abdominal (B), **** $P < 0.0001$ para OZDF vs LE y #### $P < 0.0001$ OZDF vs LZDF. ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey.

Concentración de metabolitos: glucosa, triglicéridos y colesterol

Las concentraciones de glucosa fueron significativamente mayores en el grupo OZDF en comparación con el grupo LE ($F_{(2,33)} = 4.93$, $P = 0.0101$); cuando se compara a las ratas LZDF y OZDF, no se observaron diferencias, tampoco las ratas LZDF difieren en las concentraciones plasmáticas de glucosa respecto de las ratas LE (Figura 33A). Por otro lado, los resultados respecto de las concentraciones plasmáticas de triglicéridos (Figura 33B; $F_{(2,33)} = 39.56$, $P < 0.0001$) y de colesterol (Figura 33C; $F_{(2,33)} = 19.36$, $P < 0.0001$) muestran que el grupo obeso presenta una mayor concentración de dichas moléculas, en comparación con el grupo control y con el grupo LZDF. Mientras que, en el grupo LZDF los niveles plasmáticos de triglicéridos y de colesterol no difieren del grupo control, pero si se observa una diferencia significativa respecto del grupo OZDF (Figura 33C; $F_{(2,33)} = 19.36$, $P < 0.0001$).

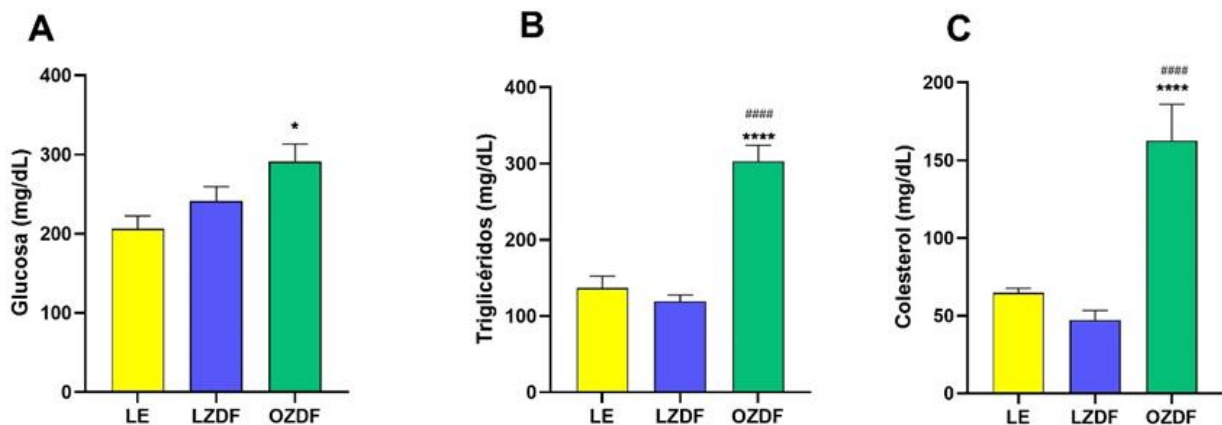


Figura 33. Concentración plasmática de (A) glucosa, de (B) triglicéridos y de (C) colesterol en ratas hembra LE, LZDF y OZDF de 120 días de edad. Se presenta la media \pm SEM con una $n=12$ por grupo experimental. Para la concentración de glucosa se muestra una diferencia estadísticamente significativa, * $P = 0.0101$ para OZDF vs LE. En el caso de la concentración de triglicéridos y de colesterol, **** $P < 0.0001$ para OZDF vs LE y #### $P < 0.0001$ OZDF vs LZDF, sin diferencias entre el grupo control y el grupo LZDF; ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey.

Arborización dendrítica del Núcleo del Tracto solitario

En la figura 34 se muestran microfotografías de neuronas representativas del NTS que fueron analizadas en cuanto a su arborización dendrítica. Se pueden observar neuronas bipolares ovaladas y en forma de huso con prolongaciones largas y sencillas. De acuerdo con el análisis estadístico, las ratas obesas presentaron una retracción dendrítica en comparación con el grupo control y el grupo de ratas con fenotipo delgado. Sin embargo, no se observaron diferencias en dicha variable entre las neuronas del hemisferio derecho y del hemisferio izquierdo (Figura 35; Cepa: $F_{(2, 42)} = 5.464$, $P=0.0083$; Hemisferio: $F_{(1, 42)} = 0.03050$, $P=0.0078$; Interacción: $F_{(2, 42)} = 0.01294$, $P=0.9871$). Las comparaciones post hoc (Tukey) indicaron que las ratas con fenotipo obeso (OZDF) presentaron una menor longitud dendrítica total en comparación con el grupo control ($P=0.0083$) y el grupo LZDF ($P=0.0483$).

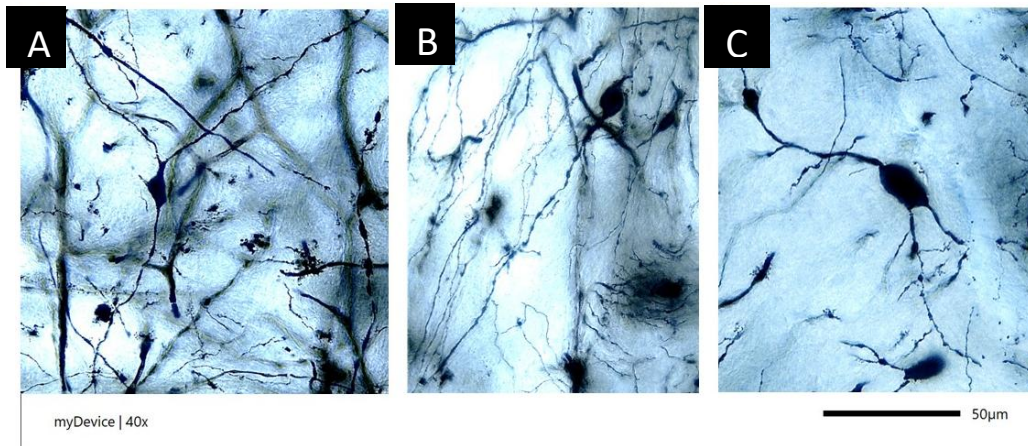


Figura 34. Neuronas del núcleo del tracto solitario. Microfotografías representativas de neuronas del núcleo del tracto solitario de ratas (A) LE, (B) LZDF y (C) OZDF, tratadas con la tinción de Golgi-Cox. Barra de escala 50 μm .

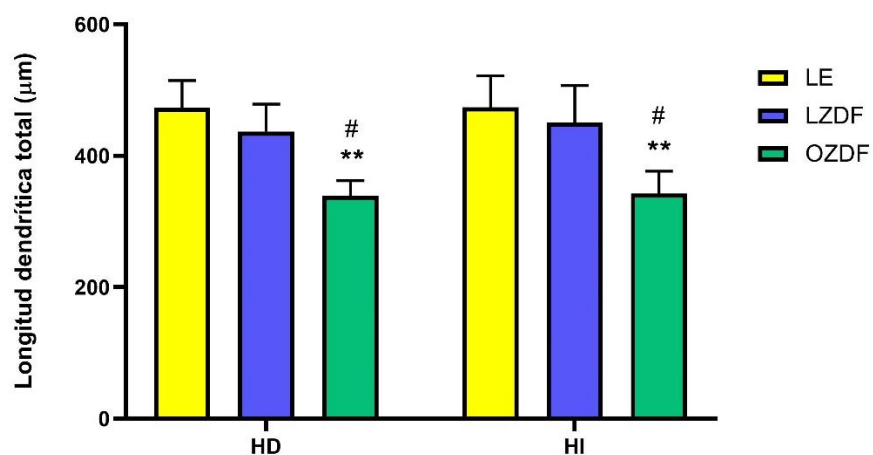


Figura 35. Longitud dendrítica total de las neuronas del núcleo del tracto solitario de ratas LE, LZDF y OZDF de 120 días de edad. Se presentan la media \pm SEM con una $n=12$ por grupo experimental. ** $P = 0.007$ vs LE y # $P = 0.04$ vs LZDF. ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey. D: NTS derecho; I: NTS izquierdo.

Existen diferencias estadísticamente significativas en el número de intersecciones dendríticas por círculo concéntrico, en donde el fenotipo obeso presenta una disminución en dicha variable en las neuronas del hemisferio derecho (Figura 36A; Cepa: $F_{(2, 714)} = 50.92$, $P < 0.0001$; Círculo concéntrico: $F_{(33, 714)} = 160.9$, $P < 0.0001$; Interacción: $F_{(66, 714)} = 1.626$, $P = 0.0018$). De acuerdo con la prueba post hoc (Tukey), la diferencia significativa fue específicamente al nivel del círculo concéntrico 5 al 12, respecto del grupo control ($P \leq 0.01$); así como, al nivel del círculo concéntrico 7 en comparación con el grupo LZDF ($P < 0.01$). Así mismo, el grupo LZDF presenta una disminución en el número de intersecciones dendríticas al nivel de los círculos concéntricos 8, 9 y

10 en comparación con el grupo control ($P < 0.01$), sin diferencias con el grupo OZDF.

Las neuronas del hemisferio izquierdo muestran un patrón similar de diferencias significativas (Figura 36B; Ceba: $F_{(2, 714)} = 38.58$, $P < 0.0001$; Círculo concéntrico: $F_{(33, 714)} = 138.4$, $P < 0.0001$; Interacción: $F_{(66, 714)} = 1.663$, $P = 0.0012$), para el grupo OZDF, específicamente a partir del círculo concéntrico 4 al 12 al comparar los datos con las ratas del grupo control ($P < 0.001$) y del grupo LZDF ($P < 0.05$).

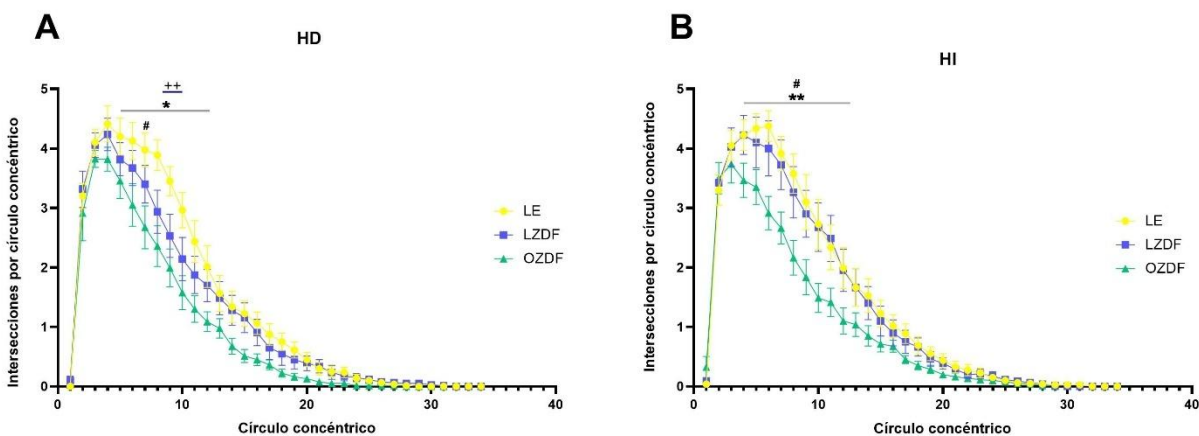


Figura 36. Número de intersecciones dendríticas por círculo concéntrico de las neuronas del núcleo del tracto solitario de ratas LE, LZDF y OZDF de 120 días de edad. Se presenta la media \pm SEM con una $n=12$ por grupo experimental. (A) hemisferio derecho con diferencia significativa del círculo concéntrico 5 al 12, * $P = 0.01$ para OZDF vs LE y para el círculo número 8, # $P = 0.0236$ OZDF vs LZDF; con diferencias en los círculos 8 al 10 ** $P < 0.01$ para LZDF vs LE. (B) hemisferio izquierdo con diferencia significativa del círculo concéntrico 4 al 12, ** $P < 0.001$ para OZDF vs LE y # $P < 0.05$ OZDF vs LZDF, sin diferencias entre el grupo control y el grupo LZDF. ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey. HD: NTS derecho; HI: NTS izquierdo.

Arborización dendrítica del Núcleo del Periventricular Anteroventral

De acuerdo con los datos obtenidos, no se observaron diferencias en la arborización dendrítica de las neuronas del núcleo periventricular anteroventral (AVPV) del hipotálamo entre los grupos. En la figura 37 se muestran fotografías representativas de las neuronas del núcleo AVPV que fueron analizadas para calcular la arborización dendrítica, se observan neuronas ovaladas pequeñas con ramificaciones sencillas. El análisis estadístico no mostró una diferencia significativa en la longitud dendrítica total de las neuronas del núcleo AVPV tanto del hemisferio izquierdo como del hemisferio

derecho entre los grupos experimentales (Figura 38; Ceba: $F_{(2, 66)} = 2158$, $P = 0.8064$; Círculo concéntrico: $F_{(1, 66)} = 0.0972$, $P = 0.7561$; Interacción: $F_{(2, 66)} = 0.7627$, $P = 0.4705$).

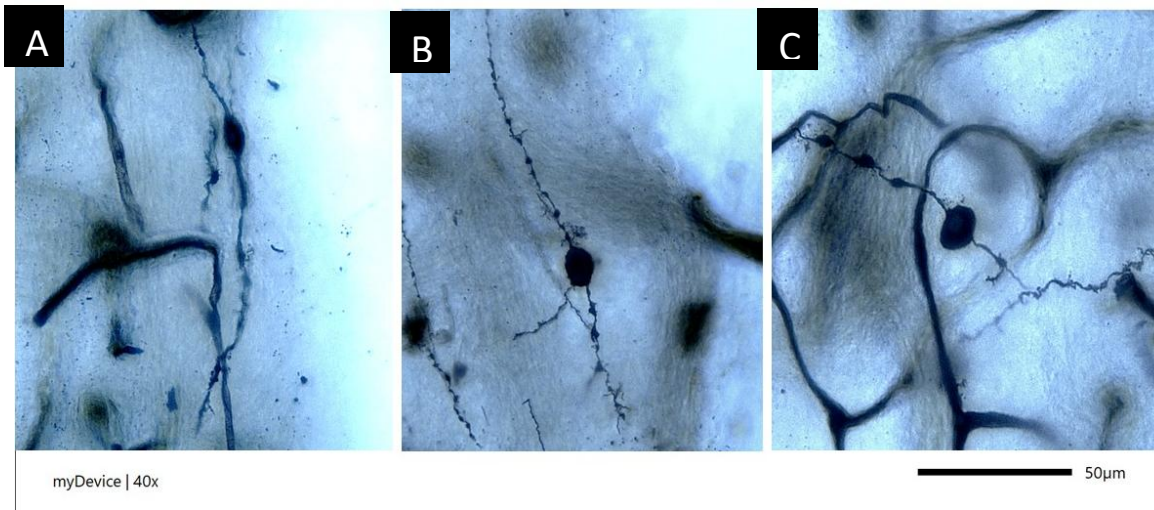


Figura 37. Neuronas del núcleo periventricular anteroventral. Microfotografías representativas de neuronas del núcleo del AVPV de ratas (A) LE, (B) LZDF y (C) OZDF teñidas con la tinción Golgi-Cox. Barra de escala 50 μm .

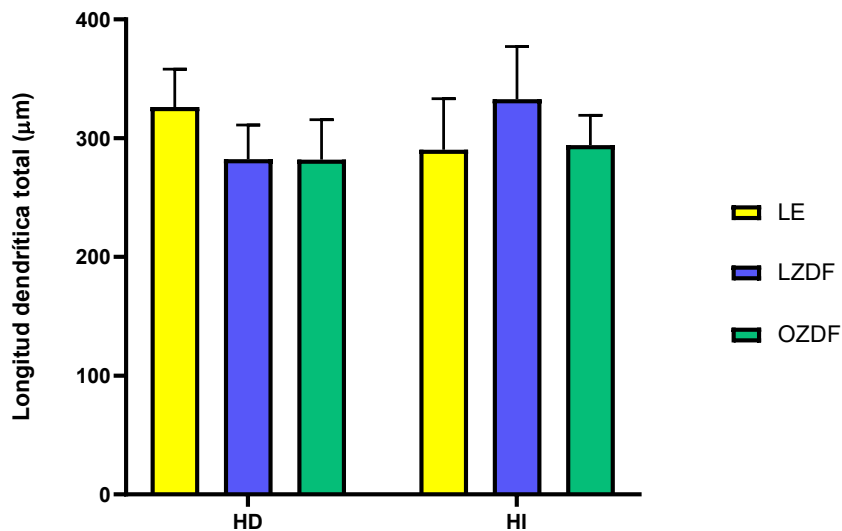


Figura 38. Longitud dendrítica total de las neuronas del Núcleo Periventricular Anteroventral en ratas LE, LZDF y OZDF de 120 días de edad. Se presentan la media \pm SEM con una $n=12$ por grupo experimental. Para la longitud dendrítica total no se muestra una diferencia estadísticamente significativa entre la interacción de las variables para ninguno de los grupos, $P = 0.47$. Para el caso de laterización, sin diferencia significativa entre las variables. ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey. HD: AVPV derecho; HI: AVPV izquierdo.

El análisis de Sholl mostró una diferencia significativa en el número de intersecciones por círculo concéntrico en el hemisferio derecho entre los grupos experimentales (Figura 39A; Cepa: $F_{(2, 1088)} = 10.54, P < 0.0001$; Círculo concéntrico: $F_{(33, 1088)} = 145.8, P < 0.0001$; Interacción: $F_{(66, 1088)} = 0.7627, P > 0.9999$). La prueba post hoc (Tukey) indicó que solo existe una disminución del número intersecciones dendríticas en las neuronas de las ratas del fenotipo obeso (OZDF) al nivel del círculo concéntrico 7 y 8 respecto del grupo control ($P < 0.04$).

Por otro lado, en el hemisferio izquierdo se observó una diferencia significativa entre el factor cepa y el círculo concéntrico (Figura 39B; Cepa: $F_{(2, 1088)} = 8.139, P = 0.0003$; Círculo concéntrico: $F_{(33, 1088)} = 158.0, P < 0.0001$; Interacción: $F_{(66, 1088)} = 0.4784, P = 0.9999$), con una disminución en el número de intersecciones dendríticas en el círculo concéntrico 6 del fenotipo obeso respecto al fenotipo delgado ($F_{(2, 1088)} = 8.139, P = 0.0003$), sin diferencia significativa con el grupo control, respecto a la prueba post hoc (Tuckey).

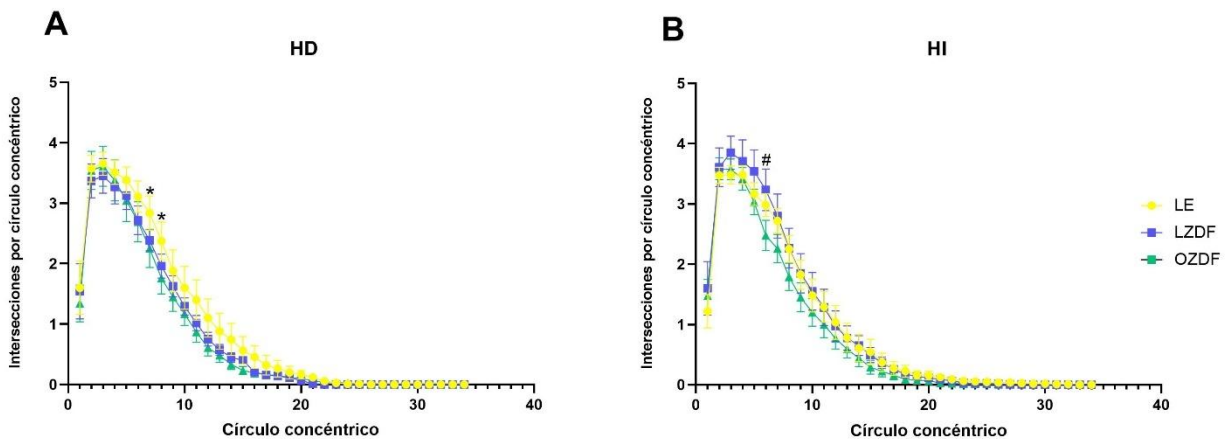


Figura 39. Número de intersecciones dendríticas por círculo concéntrico de las neuronas del núcleo periventricular anteroventral de ratas LE, LZDF y OZDF de 120 días de edad. Se presenta la media \pm SEM con una $n=12$ por grupo experimental. (A) hemisferio derecho con diferencia significativa al nivel del círculo concéntrico 7 y 8, $*P < 0.05$ entre ratas OZDF y LE. (B) hemisferio izquierdo con diferencia significativa al nivel del círculo concéntrico 6, $\# P < 0.05$ entre ratas OZDF y LZDF, sin diferencias entre el grupo control y el grupo LZDF. ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey. HD: AVPV derecho; HI: AVPV izquierdo.

Arborización dendrítica del Área Preóptica

No existe una diferencia significativa en la arborización dendrítica del área preóptica hipotalámica entre los grupos. En la figura 40 se muestran fotografías representativas de las neuronas del POA

de cada grupo experimental, se observan neuronas ovaladas medianas, bipolares y con ramificaciones largas. Respecto a la longitud dendrítica total, el análisis estadístico no mostró una diferencia significativa entre los grupos experimentales, ni entre los hemisferios derecho e izquierdo (Figura 41; Ceba: $F_{(2, 66)} = 0.4146$, $P = 0.6623$; Círculo concéntrico: $F_{(1, 66)} = 2817$, $P = 0.5953$; Interacción: $F_{(2, 66)} = 1.089$, $P = 0.3426$). Por otro lado, el análisis estadístico del número de intersecciones dendríticas por círculo concéntrico tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales en el hemisferio derecho (Figura 42A; Ceba: $F_{(2, 1122)} = 1.793$, $P = 0.1570$; Círculo concéntrico: $F_{(33, 1122)} = 217.9$, $P < 0.0001$; Interacción: $F_{(6, 1122)} = 0.8694$, $P = 0.7617$), ni en el hemisferio izquierdo (Figura 42B; Ceba: $F_{(2, 1122)} = 0.5754$, $P = 0.5626$; Círculo concéntrico: $F_{(33, 1122)} = 195.5$, $P < 0.0001$; Interacción: $F_{(6, 1122)} = 0.6885$, $P = 0.9725$).

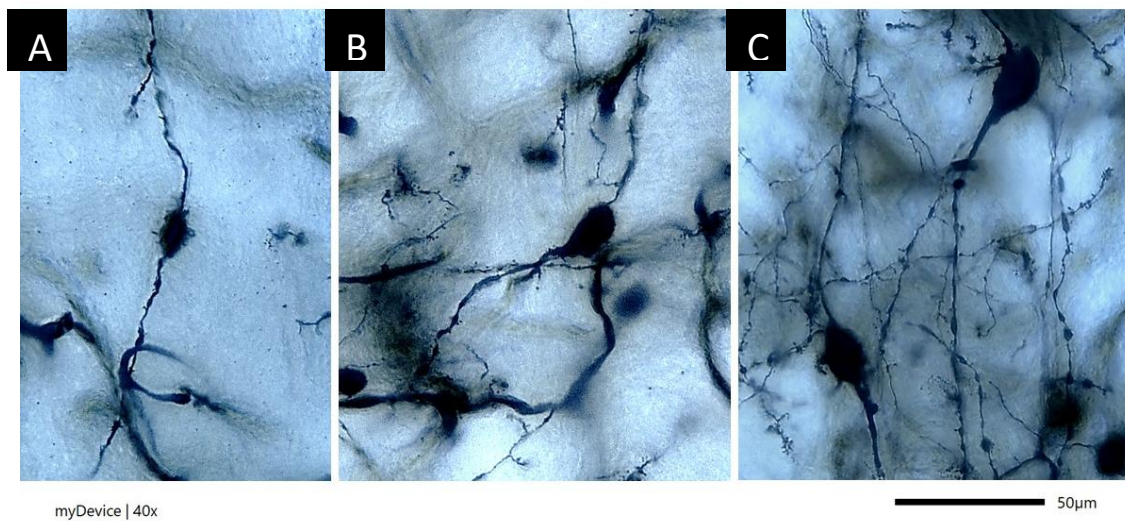


Figura 40. Neuronas del área preóptica medial. Microfotografías representativas de neuronas del núcleo del POA de ratas (A) LE, (B) LZDF y (C) OZDF teñidas con la tinción de Golgi-Cox. Barra de escala 50 μm .

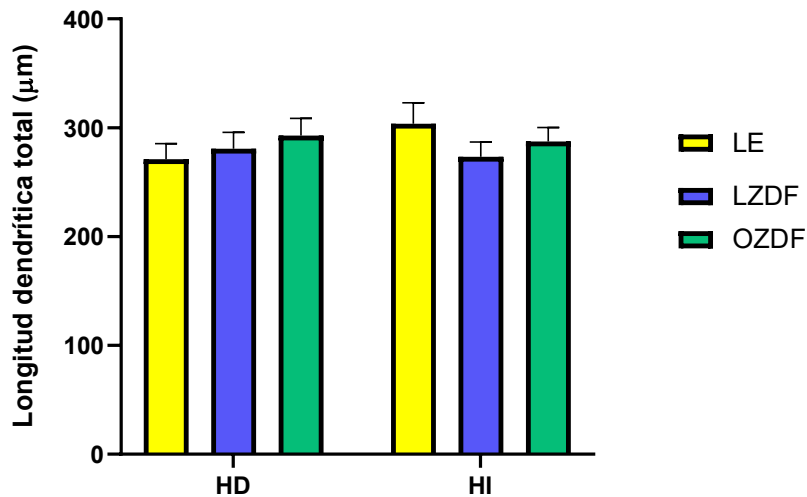


Figura 41. Longitud dendrítica total de las neuronas del área preóptica en ratas LE, LZDF y OZDF de 120 días de edad. Se presenta la media \pm SEM con una $n=12$ por grupo experimental. No se muestra una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey. HD: POA derecho; HI: POA izquierdo.

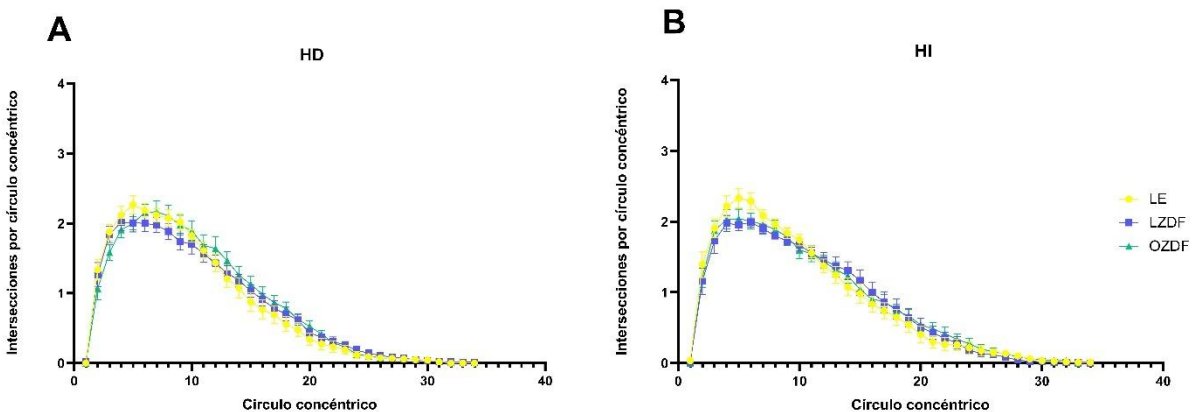


Figura 42. Número de intersecciones dendríticas por círculo concéntrico de las neuronas del área preóptica de ratas LE, LZDF y OZDF de 120 días de edad. Se presenta la media \pm SEM con una $n=12$ por grupo experimental. (A) hemisferio derecho. (B) hemisferio izquierdo. No se observan diferencias significativas entre los grupos. ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey. HD: POA derecho; HI: POA izquierdo.

Arborización dendrítica de Núcleo Arcuato

En la figura 43 se muestran fotografías representativas del núcleo ARC de todos los grupos experimentales; se observan neuronas con soma pequeño y redondo, multipolares con ramificaciones sencillas. Respecto de la longitud dendrítica total, el análisis estadístico no arrojó

una diferencia significativa en el hemisferio derecho ni en el hemisferio izquierdo para ninguno de los grupos experimentales (Figura 44; Cepa: $F_{(2, 66)} = 3.181$, $P = 0.480$; Círculo concéntrico: $F_{(1, 66)} = 0.2479$, $P = 0.6202$; Interacción: $F_{(2, 66)} = 0.9075$, $P = 0.9134$).

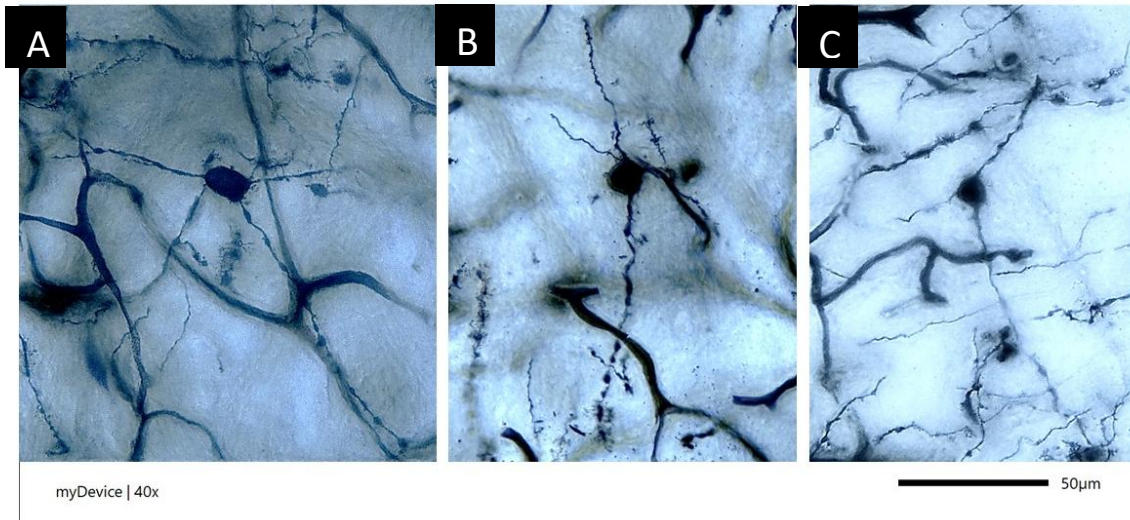


Figura 43. Neuronas del núcleo arcuato. Microfotografías representativas de neuronas del núcleo del ARC de ratas (A) LE, (B) LZDF y (C) OZDF teñidas con la tinción Golgi-Cox. Barra de escala 50 μm .

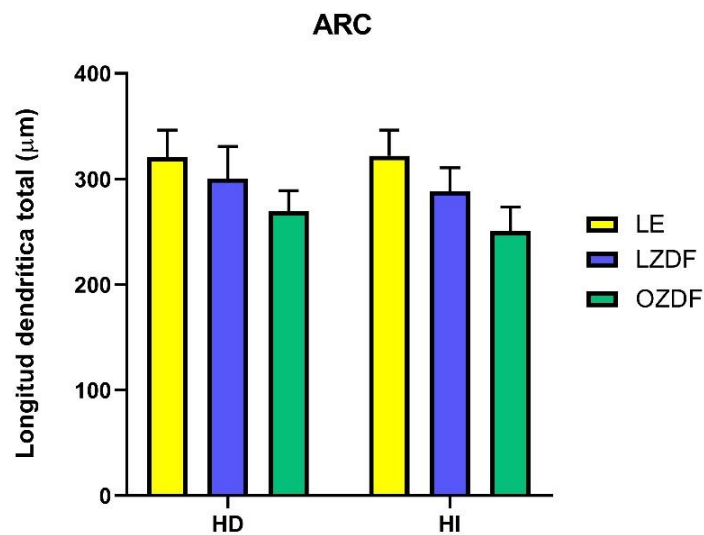


Figura 44. Longitud dendrítica total de las neuronas del núcleo arcuato en ratas LE, LZDF y OZDF de 120 días de edad. Se presenta la media \pm SEM con una $n=12$ por grupo experimental. Para la longitud dendrítica total no se muestra una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Para el caso de laterización, no hay diferencia significativa entre las variables. ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey. HD: ARC N derecho; HI: ARCA izquierdo.

Por otra parte, se observó una diferencia significativa en el número de intersecciones dendríticas por orden de ramificación en el hemisferio derecho (Figura 45A; Cepa: $F_{(2, 1122)} = 14.58, P < 0.0001$; Círculo concéntrico: $F_{(33, 1122)} = 172.3, P < 0.0001$; Interacción: $F_{(66, 1122)} = 1.044, P = 0.3835$), donde el análisis post hoc (Tukey), muestra que el fenotipo obeso presentó una disminución en el número de intersecciones del círculo concéntrico 3, 5 y 6, respecto del grupo control ($P < 0.05$); y que el fenotipo delgado tiene una disminución a nivel del círculo concéntrico 2-6 en comparación con el grupo control ($P < 0.01$).

Así mismo, en el hemisferio izquierdo, el ANOVA de dos vías mostró que existe diferencia significativa en el factor cepa y en el círculo concéntrico (Figura 45B; Cepa: $F_{(2, 1122)} = 26.79, P < 0.0001$; Círculo concéntrico: $F_{(33, 1122)} = 170.3, P < 0.0001$; Interacción: $F_{(66, 1122)} = 0.9982, P = 0.4828$), y de acuerdo con el análisis post hoc (Tukey), el fenotipo obeso presentó una menor número de intersecciones dendríticas en el círculo concéntrico 3-13 respecto al grupo control ($P < 0.04$), mientras que, el fenotipo delgado mostró una disminución en el número de intersecciones dendríticas del círculo concéntrico 3 y 7 en comparación con el grupo control ($P < 0.01$).

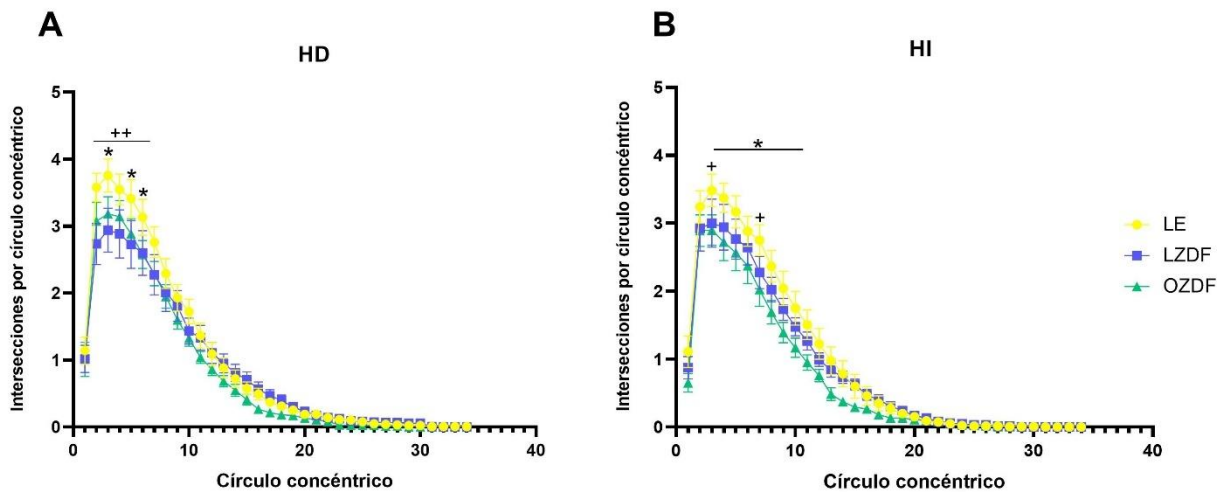


Figura 45. Número de intersecciones dendríticas por círculo concéntrico de las neuronas del núcleo arcuato de ratas LE, LZDF y OZDF de 120 días de edad. Se presenta la media \pm SEM con una $n=12$ por grupo experimental. (A) hemisferio derecho con diferencia significativa del círculo concéntrico 3,5 y 6, * $P < 0.05$ para OZDF vs LE y en el círculo concéntrico 2-6, ** $P < 0.01$ para LZDF vs LE. (B) hemisferio izquierdo con diferencia significativa del círculo concéntrico 3-11, * $P < 0.05$ para OZDF vs LE y del círculo concéntrico 3 y 7 + $P < 0.05$ para LZDF vs LE. ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey. HD: ARC derecho; ARC izquierdo.

Discusión

Los resultados del presente trabajo confirman nuestra hipótesis de que las ratas obesas muestran una menor arborización dendrítica de neuronas del NTS y del ARC, pero no en las áreas AVPV y POA. Además, el ciclo estral es irregular en las ratas obesas en comparación con los otros grupos. Igualmente, los datos del fenotipo OZDF están acorde al modelo animal, mostraron un mayor peso corporal y de circunferencia abdominal, y los parámetros metabólicos como glucosa, triglicéridos e índice Lee fueron más altos que los demás grupos. Sin embargo, también se mostró que las ratas LZDF presentaron irregularidades en su ciclo estral, así como una disminución en su peso corporal.

El ciclo estral promedio en la rata tiene una duración de 4-5 días, lo cual fue observado en las ratas control LE, estos datos concuerdan con lo previamente reportado por otros autores (Long & Evans, 1992; Matochik *et al.*, 1992; Pentkowski *et al.*, 2018). Contrario a esto, las ratas Zucker, tanto LZDF como OZDF, mostraron alteraciones en la duración de las diferentes fases del ciclo estral. Sin embargo, estos resultados difieren de lo reportado por Whitaker & Robinson (1989) y Honnma *et al.*, (2010), quienes observaron ciclos estrales regulares en ratas Zucker delgadas de 4-6 meses de edad. Al respecto, es probable que, la disminución en la grasa corporal de las ratas LZDF registrado en el presente estudio, influya en los cambios en la regularidad del ciclo estral, ya que, en humanos se ha demostrado que las mujeres que presentan poca grasa corporal tienen anomalías al nivel del ciclo menstrual (Mumford *et al.*, 2016; Mazza *et al.*, 2024). En el caso de las ratas OZDF, la ciclicidad irregular se presenta en más del 50% de los organismos evaluados y es semejante a lo reportado por Marín-Bivens & Olster (1997), Keen-Rhinehart *et al.*, (2004) y Kajihara *et al.*, (2009), quienes observaron ciclos estrales de 7-8 días en más del 75% de los individuos estudiados a partir de las 9 semanas de edad y persistencia de la etapa de diestro. Al respecto, la edad es un factor determinante en cuánto a la regularidad del ciclo estral, ya que la irregularidad del ciclo aumenta de un 28% a un 71% entre las 12 y las 16 semanas de vida en las ratas Zucker obesas (Honnma *et al.*, 2010).

El diestro prolongado puede deberse a posibles cambios en la esteroidogénesis ovárica (Marín-Bivens & Olster, 1997; Honnma *et al.*, 2010) debido a un estado de pseudogestación, anomalías morfológicas de los ovarios o problemas en las glándulas adrenales (Khan *et al.*, 2023). En relación con esto, Whitaker & Robinson (1989) mostraron que las ratas Zucker obesas de 6 meses de edad expresan altas concentraciones de progesterona durante el ciclo estral, lo cual puede relacionarse con quistes lúteos persistentes (Taketa 2022; Khan *et al.*, 2023), desequilibrios

de factores autocrinos y/o paracrinos en el ovario (Rearte *et al.*, 2003), y/o en la retroalimentación negativa del eje HHP, y finalmente, una posible alteración de la secreción pulsátil de gonadotropinas. Conductualmente, la prolongación de la etapa de diestro puede representar una condición de pseudogestación y por tanto infertilidad debido a una sinergia de la acción de prolactina y de progesterona para suprimir el comportamiento reproductivo (van der Schoot & de Greef, 1976; Sosa *et al.*, 2004).

De manera semejante a lo observado previamente, la rata Zucker obesa, expresa procesos metabólicos alterados como la dislipidemia (Chelich & Edmons, 1981; Barrios-De-Tomasi *et al.*, 2013), lo que modifica la disponibilidad de diferentes macromoléculas como la glucosa y los ácidos grasos, útiles para la esteroidogénesis (Gioacchini *et al.*, 2019). Además, se relaciona con altos niveles de adiponectina sérica y resistencia a la insulina que, de manera indirecta, se vincula con la disminución en la síntesis de androstenediona inducida por insulina (Lagaly *et al.*, 2008), la hormona esteroidea intermediaria en la producción de andrógenos y estrógenos, sintetizada en las células de la teca del ovario. Esta síntesis también es un proceso que puede ser dependiente de la edad, debido a una predisposición a la disminución de hormonas esteroideas ováricas en ratas maduras (Michalakis & Segars, 2010; Honnma *et al.*, 2010).

De acuerdo con Whitaker *et al.* (1983) el modelo hembra Zucker (obesa y delgada) de 8 a 16 semanas de edad, presenta concentraciones plasmáticas normales de estradiol durante la etapa de proestro y estro, lo que se asemeja con los resultados obtenidos en este trabajo. Mientras que, durante la etapa de diestro, Honnma *et al.* (2010) reportaron variaciones en la concentración de estradiol en ratas Zucker delgadas y obesas.

Por otro lado, nuestros resultados muestran que la rata Zucker delgada presentan una complejión significativamente menor y un peso corporal reducido respecto del grupo OZDF y del grupo control. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Cleary & Phillips (1999) quienes señalaron que tanto el periodo de lactancia como la alimentación posterior al destete, influyen de manera determinante en el desarrollo corporal y en la acumulación de grasa en este modelo experimental. En relación con el peso corporal de las ratas Zucker obesas, nuestros resultados son semejantes a lo descrito previamente (Zucker & Zucker 1963; Bravo-Durán *et al.*, 2021) que relaciona las anomalías del tejido adiposo, tales como hipertrofia e hiperplasia adipocitaria (Johnson *et al.*, 1971), que se relacionan con un incremento superior al 20% del peso corporal en la obesidad (Arika *et al.*, 2019; Adamowski *et al.*, 2024).

Estudios previos señalan que parámetros antropométricos como la circunferencia abdominal, la

relación cintura-cadera y la relación cintura-altura son estimaciones confiables del contenido de grasa corporal y predicen el riesgo de enfermedades metabólicas en humanos (Novelli *et al.*, 2007). De manera similar, Gerbaix *et al.* (2010) demostraron que el índice de masa corporal y la circunferencia abdominal son marcadores eficaces para estimar el grosor de la grasa abdominal y un estado de obesidad, lo que respalda la validez de nuestros hallazgos.

En el presente estudio, observamos que la circunferencia abdominal y el peso de la grasa abdominal del modelo OZDF, son superiores en comparación con los grupos delgados, resultados que concuerda con lo reportado anteriormente en rata macho (Zucker & Zucker, 1963; Johnson *et al.*, 1971). Se sugiere que este aumento en dichos parámetros se debe a un incremento en el número de células adiposas dependiente de la edad (Hirsch & Han, 1969; Johnson *et al.*, 1971) no obstante, en el caso de la rata hembra Zucker, no se han realizado estudios al respecto.

Por un lado, las ratas LE exhibieron parámetros normoglucémicos, resultados que se encuentran relacionados con lo estandarizado por el Laboratorio Charles River (2012) en ratas hembra LE de 10 semanas de edad (rango de concentración que oscila de 173 – 322 mg/dl). Además, las ratas Zucker LZDF también presentaron normoglucemia, mientras que para la rata Zucker obesa, Oanna *et al.*, en 2005, reportaron diferencias fisiológicas en los niveles plasmáticos de adiponectina, de ácidos grasos libres (FFA), de triglicéridos y de insulina en la rata macho Zucker, lo que se relaciona con nuestros resultados. Las altas concentraciones de glucosa sin ayuno (Yokoi *et al.*, 2013; Chaudhary & Schreihofner (2018), sugiere cambios en la homeostasis de la glucosa en respuesta al alimento en el modelo de la rata Zucker obesa. En estas ratas, Guzzardi *et al.* (2022) observaron que durante el ayuno se presenta una disrupción de la homeostasis de la glucosa y una falta de acción hipoglucemiante de la leptina que se puede relacionar con una alteración en el proceso de contraregulación de glucosa en ayunas y resistencia a la insulina periférica (Bergsten, 2000; D'souza *et al.*, 2017; Guzzardi *et al.*, 2022).

Por otra parte, Kaplan *et al.*, (1980) y otros autores (Oanna *et al.*, 2005; Guzzardi *et al.*, 2022) mostraron un incremento en las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y de colesterol que oscila entre el 10 y el 60% en ratas macho Zucker obesas respecto de las ratas Zucker delgadas, lo cual es semejante a los resultados presentados en este estudio. Al respecto, McNamara (1985) describió que en la rata Zucker, el incremento de triglicéridos y de colesterol en plasma se relaciona con una sobreproducción de lipoproteínas de muy baja densidad por parte del hígado (Triscari *et al.*, 1982; Chabowski *et al.*, 2013; Bruinstroop *et al.*, 2015). Esto también se ha relacionado con lo reportado para organismos obesos por lesión hipotalámica (Goldman *et al.*, 1981).

Un dato interesante de resaltar es que, el modelo Zucker delgado presenta concentraciones plasmáticas de triglicéridos y colesterol bajas, lo que estudios previos han asociado con un incremento en la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) o de la lipasa sensible a hormonas (HSL), que favorece la hidrólisis de triglicéridos (Pagano *et al.*, 2014), así como con una baja concentración de insulina, lo que sugiere una disminución de la lipólisis y de ácidos grasos libres (Cleary & Phillips, 1999; Chung *et al.*, 1998).

De acuerdo con nuestros resultados, las ratas obesas expresan una retracción dendrítica que provoca una disminución de la longitud dendrítica total de las neuronas NTS A2, tanto en el hemisferio derecho como en el hemisferio izquierdo. Dicha retracción puede estar relacionada con la disminución de la expresión del ARNm del transportador de glucosa tipo 2 (GLUT-2) observada en estos animales (Bogacka *et al.*, 2004) y por tanto, con cambios en la actividad excitatoria e inhibitoria que produce la glucosa en estas neuronas (Mizuno y Comura, 1984; Alshamrani *et al.*, 2020). De esta forma, aumentaría o disminuiría la señal de noradrenalina (NA) en las proyecciones dirigidas al hipotálamo. Mizuno & Comura (1984) en un estudio electrofisiológico *in vitro*, describieron que el 28 % de las neuronas del NTS de rata, son sensibles a glucosa y el 11 % presentan glucorreceptores. Por lo que se sugiere que, una alteración en la captura y en la señal de la glucosa, lo que caracteriza a nuestro modelo de estudio, puede influir en las características morfofisiológicas de las neuronas NTS A2.

Así mismo, el acortamiento de las dendritas puede deberse a cambios en la actividad electrofisiológica de las neuronas NTS A2, modulada por concentraciones circulantes de estradiol durante el ciclo estral (Spary *et al.*, 2010). No obstante, se desconoce la densidad de receptores a dicha hormona en el NTS en la rata Zucker obesa a pesar de que, en comparación con la rata Zucker delgada muestran una baja expresión de E_{α} uterinos, niveles de expresión similares en el hipotálamo de dicho receptor y diferencias en la expresión de ellos en la corteza cerebral de organismos de 6 meses de edad (Saiduddin & Zassenhaus, 1979). En conjunto, la retracción dendrítica observada en el presente estudio apoya la sugerencia de que la rata OZDF expresa una baja sensibilidad a estrógenos dependiente de los receptores, como ocurre en los modelos de obesidad inducidos por dieta (Giles, *et al.*, 2010).

Otra posible causa de la retracción dendrítica de las neuronas del NTS, está en relación con la baja o la ausencia en la señalización de leptina y el efecto modulador de estrógenos, ya que ambas hormonas, ejercen una función de regulación sináptica, a través de la modulación de la expresión de receptores como los N- metil-D-aspartato (NMDA; Aicher *et al.*, 1999). De acuerdo con Bouret (2010), el NTS en el ratón adulto, expresa neuronas selectivas a leptina, molécula que evoca un

incremento en la potenciación a largo plazo (LTP) tanto en el nervio vago como en el NTS (Neyens *et al.*, 2020). Además, la leptina regula canales iónicos mediante la activación de la vía PI3K, que modulan la entrada de Ca^{2+} remodelando el citoesqueleto de actina (Gavello *et al.*, 2016). Autores como Raffaelli *et al.* (2004), observaron que, en el hipocampo, la leptina es un freno para la acumulación excesiva de calcio intracelular mediante la activación de los canales de potasio BK. Por lo que, se sugiere que la baja señalización de Lep-LepR induce citotoxicidad por acción de Ca^{2+} , la consecuente activación de ROS, el reclutamiento de citocinas y finalmente la poda de dendritas inactivas o débiles (Popoli *et al.*, 2011; Faust *et al.*, 2021).

Por otra parte, la disminución en el número de intersecciones dendríticas de las neuronas de los núcleos ARC y AVPV sugieren un efecto indirecto de la señalización de leptina debido a que la población celular de Kiss1 en el AVPV no es inmunoreactiva para LepRb y a que existe una población limitada del 0-6% de neuronas Kiss1 que son inmunoreactivas a LepRb en el núcleo ARC (Louis *et al.*, 2011). Además, el núcleo ARC de las hembras Zucker obesas muestra una disminución en la expresión del ARNm de *Kiss1*, *Tac3* y *Pdyn* (Genes que codifican para kisspeptina, neuroquinina B y prodinorfina respectivamente) y en el número de neuronas que expresan dichos péptidos (Nakao *et al.* 2018) los cuales participan en el mantenimiento de la complejidad dendrítica.

Además, este cambio en la arborización dendrítica de las neuronas del núcleo ARC puede estar repercutiendo en la expresión de los árboles dendríticos de las neuronas AVPV que expresaron un bajo número de intersecciones dendríticas al nivel de los círculos concéntricos 6, 7 y 8, debido a que se proyecta información moduladora entre ambos núcleos que a su vez se regula por las concentraciones de estradiol (Prashar *et al.*, 2023).

De manera general, durante el ciclo estral de la rata, los cambios hormonales principalmente de estradiol, ejercen remodelaciones sinápticas en el hipotálamo. Durante el “feedback” positivo, los Era incrementan su actividad (Adachi *et al.*, 2007) en respuesta a dicha hormona. Kurunczi *et al.* (2009) mostraron que el tratamiento con estradiol en ratas hembra Sprague-Dawley adultas OVX, aumentan las sinapsis axosomáticas GABAérgicas (inhibitorias) de manera selectiva para las neuronas que expresan el $Er\beta$ en el núcleo AVPV, permitiendo así la oleada de GnRH normal. Estos resultados podrían sugerir que la región AVPV exhibe una funcionalidad normal de los Era en nuestro modelo de estudio, como lo menciona Saiduddin & Zassenhaus (1979). Mientras que, en el núcleo ARC las hembras presentan una mayor remodelación a los cambios fásicos que se vinculan con las variaciones de las concentraciones de las hormonas gonadales (Olmos *et al.*, 1989). Con relación a esto, Parducz *et al.* (2003) observaron que después del pico de estradiol,

durante la mañana del estro, el número de sinapsis axosomáticas disminuye, pero únicamente en la subpoblación que proyecta a la eminencia media. Además, se ha observado que en la etapa de estro, momento en el cual las concentraciones de estradiol disminuyen de manera importante, hay retracción dendrítica y de espinas dendríticas en regiones como el hipocampo (Woolley *et al.*, 1990), por tanto, la remodelación sináptica observada en nuestro estudio puede estar determinada también, por la baja presencia de estrógenos característica de la etapa de estro.

Algunos autores, como Todd *et al.* (2003), describieron que en la rata hembra Zucker obesa, no se ve afectada por la oleada de LH (feedback positivo), permitiendo la generación de un pico preovulatorio. Sin embargo, las secreciones pulsátiles de LH (feedback negativo) se presentan de manera anormal, afectando así la etapa folicular del ciclo estral de la rata (Honnma *et al.*, 2010; Puga y Colmenares *et al.*, 2021). Por tanto, se requiere de una óptima señalización de leptina para la generación de estos pulsos; en conjunto con los datos presentados en este estudio se sugiere que las afectaciones reproductivas de la rata OZDF no son de origen hipotalámico.

Conclusión

Los resultados del presente estudio evidencian que las ratas hembra del grupo OZDF presentan alteraciones reproductivas y metabólicas significativas, incluyendo una mayor prevalencia de la fase de diestro, irregularidades en el ciclo estral, hiperglicemia, dislipidemias y obesidad. A nivel neuroanatómico, se observaron modificaciones morfológicas en las neuronas A2 del núcleo del tracto solitario (NTS), caracterizadas por una arborización reducida y dendritas más cortas. Además, se identificó una disminución en la complejidad dendrítica en neuronas del núcleo ARC. En contraste, las neuronas de los núcleos AVPV, ARC y POA no mostraron alteraciones en la longitud dendrítica total. Estos hallazgos sugieren una posible asociación entre la obesidad y la disfunción reproductiva, mediada por cambios no estructurales en núcleos hipotalámicos y estructurales del tallo cerebral involucrados en la regulación neuroendocrina de la reproducción. En conjunto, estos resultados aportan información para comprender los mecanismos neuroendocrinos mediante los cuales la obesidad afecta la función reproductiva femenina, y abren la posibilidad de futuras investigaciones orientadas al desarrollo de estrategias terapéuticas o preventivas que reduzcan dichos efectos.

Limitaciones y perspectivas

Entre las principales limitaciones del estudio se encuentra la ausencia de la determinación del genotipo del modelo experimental por parte del laboratorio, aspecto que, según reportes resulta relevante para la extrapolación de los resultados relacionados con la alteración de la vía de señalización de la leptina. Además, el análisis solo se centró exclusivamente en la etapa de estro, por lo que, para establecer una asociación integral entre obesidad y disfunción reproductiva sería necesario incluir las demás fases del ciclo estral. Adicionalmente, el estudio morfológico se restringió al análisis de la arborización dendrítica mediante la tinción de Golgi-Cox, sin incorporar aproximaciones funcionales que permitieran establecer una relación directa entre las alteraciones estructurales y la actividad neuronal.

En este contexto, futuras investigaciones deberían considerar el empleo de técnicas complementarias, como inmunohistoquímica, mapeo retrógrado o registros electrofisiológicos, que permitan correlacionar las modificaciones morfológicas con la función neuronal. Asimismo, la exploración de la interacción leptina-estrógenos a nivel hipotalámico y del tronco encefálico en el modelo de la rata Zucker podría aportar información clave sobre los mecanismos neuroendocrinos que vinculan la obesidad con la disminución de la fertilidad. En conjunto, estos planteamientos abren nuevas perspectivas para comprender con mayor precisión la relación entre la disrupción de la homeostasis metabólica y los procesos reproductivos, y contribuyen a delinear futuras estrategias experimentales orientadas a atenuar los efectos neuroendocrinos de la obesidad.

Literatura citada

- Adachi, S., Yamada, S., Takatsu, Y., Matsui, H., Kinoshita, M., Takase, K., Sugiura, H., Ohtaki, T., Matsumoto, H., Uenoyama, Y., Tsukamura, H., Inoue, K., Maeda, K. (2007). Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *The Journal of reproduction and development*, 53(2), 367–378. <https://doi.org/10.1262/jrd.18146>
- Adamowski, M., Sharma, Y., Molcan, T., Wołodko, K., Kelsey, G., Galvão, A. M. (2024). Leptin signalling regulates transcriptional differences in granulosa cells from genetically obese mice but not the activation of NLRP3 inflammasome. *Scientific reports*, 14(1), 8070. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58181-w>
- Aicher, S. A., Sharma, S., Pickel, V. M. (1999). N-methyl-D-aspartate receptors are present in vagal afferents and their dendritic targets in the nucleus tractus solitarius. *Neuroscience*, 91(1), 119–132. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(98\)00530-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(98)00530-2)
- 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, 5. <https://doi.org/10.1186/s40738-020-00074-3>
- Aleixandre, A., & Miguel, M. (2008). Ratas Zucker como modelo experimental para el estudio de diferentes enfermedades. *Endocrinología y Nutrición*, 55(5), 217–222.
- Alshamrani, A. A., Bheemanapally, K., Ibrahim, M. M. H., Briski, K. P. (2020). Impact of caudal hindbrain glycogen metabolism on A2 noradrenergic neuron AMPK activation and ventromedial hypothalamic nucleus norepinephrine activity and glucoregulatory neurotransmitter marker protein expression. *Neuropeptides*, 82, 102055. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2020.102055>
- Alshamrani, A. A., Ibrahim, M. M. H., Briski, K. P. (2022). Effects of short-term food deprivation on catecholamine and metabolic-sensory biomarker gene expression in hindbrain A2 noradrenergic neurons projecting to the forebrain rostral preoptic area: Impact of negative versus positive estradiol feedback. *IBRO neuroscience reports*, 13, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2022.06.001>
- Appleyard, S. M., Marks, D., Kobayashi, K., Okano, H., Low, M., Andresen, M. (2007). Visceral afferents directly activate catecholamine neurons in the solitary tract nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(48), 13292–13302. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3502-07.2007>
- Arika, W. M., Kibiti, C. M., Njagi, J. M., Ngugi, M. P. (2019). Anti-obesity effects of dichloromethane

- leaf extract of *Gnidia glauca* in high fat diet-induced obese rats. *Heliyon*, 5(11), e02800. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02800>
- Barnes, K. L., McQueeney, A. J., Barrett, W. R., & Knowles, W. D. (1994). Morphology and projections of neurobiotin-labeled nucleus tractus solitarius neurons recorded in vitro. *Brain Research Bulletin*, 34(4), 339–348.
- Barrios-De-Tomasi, J., Barrios-De-Tomasi, E., Vergara-Galicia, J. (2013). Efecto de la obesidad en la reproducción femenina. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 44(3),8-18.
- Bellefontaine, N., Chachlaki, K., Parkash, J., Vanacker, C., Colledge, W., d'Anglemont de Tassigny, X., Garthwaite, J., Bouret, S. G., Prevot, V. (2014). Leptin-dependent neuronal NO signaling in the preoptic hypothalamus facilitates reproduction. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(6), 2550–2559. <https://doi.org/10.1172/JCI65928>
- Bentivoglio, M., Cotrufo, T., Ferrari, S., Tesoriero, C., Mariotto, S., Bertini, G., Berzero, A., Mazzarello, P. (2019). The Original Histological Slides of Camillo Golgi and His Discoveries on Neuronal Structure. *Frontiers in neuroanatomy*, 13, 3. <https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00003>
- Bergsten, P. (2000). Pathophysiology of impaired pulsatile insulin release. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 16(3), 179–191. [https://doi.org/10.1002/1520-7560\(200005/06\)16:3<179::aid-dmrr115>3.0.co;2-c](https://doi.org/10.1002/1520-7560(200005/06)16:3<179::aid-dmrr115>3.0.co;2-c)
- Berra-Romani, R., Guzmán-Silva, A., Vargaz-Guadarrama, A., Flores-Alonso, J., Alonso-Romero, J., Treviño, S., Sánchez-Gómez, J., Coyotl-Santiago, N., García-Carrasco, M., Moccia, F. (2019). Type 2 Diabetes Alters Intracellular Ca²⁺ Handling in Native Endothelium of Excised Rat Aorta. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 250.
- Binley, K. E., Ng, W. S., Tribble, J. R., Song, B., Morgan, J. E. (2014). Sholl analysis: a quantitative comparison of semi-automated methods. *Journal of Neuroscience Methods*, 225, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.01.017>
- Bogacka, I., Roane, D. S., Xi, X., Zhou, J., Li, B., Ryan, D. H., & Martin, R. J. (2004). Expression levels of genes likely involved in glucose-sensing in the obese Zucker rat brain. *Nutritional neuroscience*, 7(2), 67–74. <https://doi.org/10.1080/10284150410001710401>
- Boden, G., & Shulman, G. I. (2002). Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *European journal of clinical investigation*, 32 Suppl 3, 14–23. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.32.s3.3.x>
- Bouret S. G. (2010). Neurodevelopmental actions of leptin. *Brain research*, 1350, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.04.011>
- Bravo-Durán, D. A., Barreda Guzmán, S. J., Trujillo Hernández, A., Silva Gómez, A. B. (2021).

- Obese female Zucker rats (fa/fa) exhibit dendritic retraction in neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 113, 101919. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2021.101919>
- Brown, R. S., Kokay, I. C., Phillipps, H. R., Yip, S. H., Gustafson, P., Wyatt, A., Larsen, C. M., Knowles, P., Ladyman, S. R., LeTissier, P., & Grattan, D. R. (2016). Conditional Deletion of the Prolactin Receptor Reveals Functional Subpopulations of Dopamine Neurons in the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus. *The Journal of Neuroscience*, 36(35), 9173–9185. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1471-16.2016>
- Bruinstroop, E., Eliveld, J., Foppen, E., Busker, S., Ackermans, M. T., Fliers, E., Kalsbeek, A. (2015). Hepatic denervation and dyslipidemia in obese Zucker (fa/fa) rats. *International journal of obesity (2005)*, 39(11), 1655–1658. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.122>
- Brzechffa, P. R., Jakimiuk, A. J., Agarwal, S. K., Weitsman, S. R., Buyalos, R. P., Magoffin, D. A. (1996). Serum immunoreactive leptin concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(11), 4166–4169. <https://doi.org/10.1210/jcem.81.11.8923878>
- Calzada, L. R., Altamirano, B., N., Ruiz, R., M. (2008). Reguladores neuroendocrinos y gastrointestinales del apetito y la saciedad. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 65 (6), 468-487. Recuperado en 20 de mayo de 2024. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462008000600007&lng=es&tlng=es
- Chaptini, L., & Peikin, S. (2008). Neuroendocrine regulation of food intake. *Current opinion in gastroenterology*, 24(2), 223–229. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3282f3f4d8>
- Chakrabarti, P., Anno, T., Manning, B. D., Luo, Z., & Kandror, K. V. (2008). The mammalian target of rapamycin complex 1 regulates leptin biosynthesis in adipocytes at the level of translation: the role of the 5'-untranslated region in the expression of leptin messenger ribonucleic acid. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 22(10), 2260–2267. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0148>
- Chabowski, A., Żendzian-Piotrowska, M., Konstantynowicz, K., Pankiewicz, W., Mikłosz, A., Łukaszuk, B., Górski, J. (2013). Fatty acid transporters involved in the palmitate and oleate induced insulin resistance in primary rat hepatocytes. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 207(2), 346–357. <https://doi.org/10.1111/apha.12022>
- Chan, K., Tsoulis, M., Sloboda, D. (2015). Early-life nutritional effects on the female reproductive system. *The Journal of endocrinology*, 224(2), R45–R62. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0469>

- Charles River. (2012). Long-Evans rat. Recuperado el 14 de mayo de 2024, de <https://www.criver.com/products-services/find-model/long-evans-rat?region=3616>
- Chaudhary, P., & Schreihof, A. M. (2018). Improved glucose homeostasis in male obese Zucker rats coincides with enhanced baroreflexes and activation of the nucleus tractus solitarius. *American journal of physiology. Regulatory, integrative, and comparative physiology*, 315(6), R1195–R1209. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00195.2018>
- Chelich, A. M., & Edmonds, E. S. (1981). Copulatory behavior and reproductive capacity of the genetically obese female Zucker rat. *Physiology & Behavior*, 27(2), 331–335. doi:10.1016/0031-9384(81)90276-6
- Chung, W. K., Belfi, K., Chua, M., Wiley, J., Mackintosh, R., Nicolson, M., Boozer, C. N., Leibel, R. L. (1998). Heterozygosity for Lep(ob) or Lep(rdb) affects body composition and leptin homeostasis in adult mice. *The American journal of physiology*, 274(4), R985–R990. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.274.4.R985>
- Cleary, M. P., & Phillips, F. C. (1999). The presence of the "fa" gene in heterozygous (FA/fa) lean female rats, effects on body weight, body fat and serum leptin. *Obesity research*, 7(3), 293–298. <https://doi.org/10.1002/j.1550-8528.1999.tb00409.x>
- Connell, A. R., Hookham, M. B., Fu, D., Brazil, D. P., Lyons, T. J., Yu, J. Y. (2022). Comparisons of α 2-Adrenergic Agents, Medetomidine and Xylazine, with Pentobarbital for Anesthesia: Important Pitfalls in Diabetic and Nondiabetic Rats. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 38(2), 156–166. <https://doi.org/10.1089/jop.2021.0084>
- Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Marco, C. C., McKee, L. J., Bauer, T. L. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *The New England journal of medicine*, 334(5), 292–295. <https://doi.org/10.1056/NEJM199602013340503>
- Cruz, G., Fernandois, D., Paredes, A. H. (2016). Ovarian function and reproductive senescence in the rat: role of ovarian sympathetic innervation. *Reproduction*, 153(2), 59–R68. doi:10.1530/rep-16-0117
- Csakvari, E., Kurunczi, A., Hoyk, Z., Gyenes, A., Naftolin, F., Parducz, A. (2008). Estradiol-induced synaptic remodeling of tyrosine hydroxylase immunopositive neurons in the rat arcuate nucleus. *Endocrinology*, 149(8), 4137–4141. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1559>
- Cutsforth-Gregory, J. K., & Benarroch, E. E. (2017). Nucleus of the solitary tract, medullary reflexes, and clinical implications. *Neurology*, 88(12), 1187–1196. doi:10.1212/wnl.0000000000003751

- Das, G., Reuhl, K., Zhou, R. (2013). The Golgi–Cox Method. *Neural Development*, 313–321.
- de Aluja, A. (2002). Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-199). *Gaceta Médica Mexicana*, 138 (3).
- Delsouc, M. B., Morales, L. D., Vallcaneras, S. S., Bronzi, D., Anzulovich, A. C., Delgado, S. M., Casais, M. (2016). Participation of the extrinsic cholinergic innervation in the action of nitric oxide on the ovarian steroidogenesis in the first proestrous in rats. *General and comparative endocrinology*, 236, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.yggen.2016.07.003>
- Deura, C., Minabe, S., Ikegami, K., Inoue, N., Uenoyama, Y., Maeda, K. I., Tsukamura, H. (2019). Morphological analysis for neuronal pathway from the hindbrain ependymocytes to the hypothalamic kisspeptin neurons. *The Journal of Reproduction and Development*, 65(2), 129–137. <https://doi.org/10.1262/jrd.2018-122>
- Dinneen, S., Gerich, J., & Rizza, R. (1992). Carbohydrate metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England journal of medicine*, 327(10), 707–713. <https://doi.org/10.1056/NEJM199209033271007>
- Doulberis, M., Papaefthymiou, A., Polyzos, S. A., Katsinelos, P., Grigoriadis, N., Srivastava, D. S., Kountouras, J. (2020). Rodent models of obesity. *Minerva Endocrinologica*, 45(3), 243–263. <https://doi.org/10.23736/S0391-1977.19.03058-X>
- D'souza, A. M., Neumann, U. H., Glavas, M. M., Kieffer, T. J. (2017). The glucoregulatory actions of leptin. *Molecular metabolism*, 6(9), 1052–1065. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.04.011>
- Ducret, E., Gaidamaka, G., & Herbison, A. E. (2010). Electrical and morphological characteristics of anteroventral periventricular nucleus kisspeptin and other neurons in the female mouse. *Endocrinology*, 151(5), 2223–2232. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1480>
- Dupont, J., Reverchon, M., Bertoldo, M., Froment, P. (2014). Nutritional signals and reproduction. *Molecular and cellular endocrinology*, 382(1), 527–537. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.028>
- Edwards, C. M., Dolezel, T., Rinaman, L. (2021). Sex and metabolic state interact to influence expression of passive avoidance memory in rats: Potential contribution of A2 noradrenergic neurons. *Physiology & Behavior*, 239, 113511. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113511>
- Eng, P. C., Phylactou, M., Qayum, A., Woods, C., Lee, H., Aziz, S., Moore, B., Miras, A. D., Cominos, A. N., Tan, T., Franks, S., Dhillo, W. S., Abbara, A. (2024). Obesity-Related Hypogonadism in Women. *Endocrine reviews*, 45(2), 171–189. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnad027>

- Estacio, M. A., Tsukamura, H., Yamada, S., Tsukahara, S., Hirunagi, K., Maeda, K. (1996). Vagus nerve mediates the increase in estrogen receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus and nucleus of the solitary tract during fasting in ovariectomized rats. *Neuroscience Letters*, 208(1), 25–28. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12534-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12534-9)
- Farhadi, Z., Khaksari, M., Azizian, H., Mortazaeizadeh, A., Shabani, M., Shahrokhi, N. (2020). Beneficial effects of tamoxifen on leptin sensitivity in young mice fed a high fat diet: Role of estrogen receptor α and cytokines. *Life sciences*, 246, 117384. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117384>
- Faust, T., Gunner, G., & Schafer, D. (2021). Mechanisms governing activity-dependent synaptic pruning in the developing mammalian CNS. *Nature reviews. Neuroscience*, 22(11), 657–673. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00507-y>
- Fernandez, C., Bellentani, F., Fernandes, G., Perobelli, J., Favareto, A., Nascimento, A. Kempinas, W. (2011). Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9(1), 1-10.
- Fernandez-Galaz, M. C., Naftolin, F., Garcia-Segura, L. M. (1999). Phasic synaptic remodeling of the rat arcuate nucleus during the estrous cycle depends on insulin-like growth factor-I receptor activation. *Journal of neuroscience research*, 55(3), 286–292. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990201\)55:3<286::AID-JNR3>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990201)55:3<286::AID-JNR3>3.0.CO;2-4)
- Franks, S., & Hardy, K. (2018). Androgen Action in the Ovary. *Frontiers in endocrinology*, 9, 452. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00452>
- Frisch, R. E., & McArthur, J. W. (1974). Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance or onset. *Science*, 185(4155), 949–951. <https://doi.org/10.1126/science.185.4155.949>
- Fry, M., Hoyda, T., Ferguson, A. (2007). Making Sense of It: Roles of the Sensory Circumventricular Organs in Feeding and Regulation of Energy Homeostasis. *Experimental Biology and Medicine*, 232, 14-26. <https://doi.org/10.3181/00379727-207-2320014>
- Gao, S., Kinzig, K. P., Aja, S., Scott, K. A., Keung, W., Kelly, S., Strynadka, K., Chohnan, S., Smith, W. W., Tamashiro, K. L., Ladenheim, E. E., Ronnett, G. V., Tu, Y., Birnbaum, M. J., Lopaschuk, G. D., Moran, T. H. (2007). Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(44), 17358–17363. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708385104>
- Garfield, A. S., Patterson, C., Skora, S., Gribble, F. M., Reimann, F., Evans, M. L., Myers, M. G., Jr, Heisler, L. K. (2012). Neurochemical characterization of body weight-regulating leptin

- receptor neurons in the nucleus of the solitary tract. *Endocrinology*, 153(10), 4600–4607. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1282>
- Garavito, P., Mosquera-Heredia, M. I., Fang, L., Payares, F., Ruiz, M., Arias, I., Tuesca, R., Navarro, É., Silvera-Redondo, C. (2020). Polymorphisms of leptin-melanocortin system genes associated with obesity in an adult population from Barranquilla. Polimorfismos de los genes del sistema leptina-melanocortina asociados con la obesidad en la población adulta de Barranquilla. *Biomedica: Revista del Instituto Nacional de Salud*, 40(2), 257–269. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4827>
- Gasparini, S., Howland, J., Thatcher, A., Geerling, J. (2020). Central afferents to the nucleus of the solitary tract in rats and mice. *The Journal of Comparative Neurology*, 528(16), 2708–2728. <https://doi.org/10.1002/cne.24927>
- Gavello, D., Carbone, E., & Carabelli, V. (2016). Leptin-mediated ion channel regulation: PI3K pathways, physiological role, and therapeutic potential. *Channels (Austin, Tex.)*, 10(4), 282–296. <https://doi.org/10.1080/19336950.2016.1164373>
- Gerbaix, M., Metz, L., Ringot, E., Courteix, D. (2010). Visceral fat mass determination in rodent: validation of dual-energy X-ray absorptiometry and anthropometric techniques in fat and lean rats. *Lipids in health and disease*, 9, 140. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-9-140>
- Gerendai, I., Tóth, I. E., Boldogkoi, Z., Medveczky, I., Halász, B. (1998). Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique. *Neuroendocrinology*, 68(4), 244–256. <https://doi.org/10.1159/000054372>
- Gerendai, I., Banczerowski, P., Halász, B. (2005). Functional significance of the innervation of the gonads. *Endocrine*, 28(3), 309–318. <https://doi.org/10.1385/ENDO:28:3:309>
- Gioacchini, G., Marisaldi, L., Basili, D., Candelma, M., Pignalosa, P., Aiese Cigliano, R., Sanseverino, W., Hardiman, G., Carnevali, O. (2019). A de novo transcriptome assembly approach elucidates the dynamics of ovarian maturation in the swordfish (*Xiphias gladius*). *Scientific reports*, 9(1), 7375. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43872-6>
- Giles, E. D., Jackman, M. R., Johnson, G. C., Schedin, P. J., Houser, J. L., & MacLean, P. S. (2010). Effect of the estrous cycle and surgical ovariectomy on energy balance, fuel utilization, and physical activity in lean and obese female rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 299(6), R1634–R1642. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00219.2010>
- Goldman, J. K., Bernardis, L. L., MacKenzie, R. G., Kodis, M., Luboshitzky, R. (1981). Effects of ventromedial hypothalamic lesions on adipose tissue of weanling male rats. *Diabetologia*, 20(Suppl 1), 357–361. <https://doi.org/10.1007/BF00254503>

- González-Burgos, I., del Angel-Meza, A. R., Barajas-López, G. (1993). Morphometric characterization of the arcuate nucleus neurons of the rat. A Golgi study. *Neuroscience Letters*, 155(1), 99–101. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90682-b](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90682-b)
- Gu, G. B., & Simerly, R. B. (1997). Projections of the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus in the female rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 384(1), 142–164. doi:10.1002/(sici)1096-9861(19970721)384:1
- Guzzardi, M. A., Guiducci, L., Campani, D., La Rosa, F., Cacciato Insilla, A., Bartoli, A., Cabiati, M., De Sena, V., Del Ry, S., Burchielli, S., Bonino, F., Iozzo, P. (2022). Leptin resistance before and after obesity: evidence that tissue glucose uptake underlies adipocyte enlargement and liver steatosis/steatohepatitis in Zucker rats from early-life stages. *International journal of obesity*, 46(1), 50–58. <https://doi.org/10.1038/s41366-021-00941-z>
- Hakkak, R., Korourian, S., Foley, S. L., Erickson, B. D. (2017). *Assessment of gut microbiota populations in lean and obese Zucker rats. PLOS ONE*, 12(7), e0181451. Doi: 10.1371/journal.pone.0181451
- Hanchate, N. K., Parkash, J., Bellefontaine, N., Mazur, D., Colledge, W. H., d'Anglemont de Tassigny, X., Prevot, V. (2012). Kisspeptin-GPR54 signaling in mouse NO-synthesizing neurons participates in the hypothalamic control of ovulation. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(3), 932–945. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4765-11.2012>
- Hanukoglu I. (1992). Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 43(8), 779–804. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(92\)90307-5](https://doi.org/10.1016/0960-0760(92)90307-5)
- Hausman, D. B., Fine, J. B., Tagra, K., Fleming, S. S., Martin, R. J., Di Girolamo, M. (2003). Regional fat pad growth and cellularity in obese Zucker rats: modulation by caloric restriction. *Obesity Research*, 11, 674-82. <https://doi.org/10.1038/oby.2003.96>
- Herbison A. E. (2018). The Gonadotropin-Releasing Hormone Pulse Generator. *Endocrinology*, 159(11), 3723–3736. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00653>
- Herbison A. E. (2008). Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain research reviews*, 57(2), 277–287. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.05.006>
- Hernández, M., Martínez, B., Almiron-Roig, E., Pérez-Diez, S., San Cristóbal Blanco, R., Navas-Carretero, S., & Martínez, J. A. (2018). Influencia multisensorial sobre la conducta alimentaria: ingesta hedónica. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*, 65(2), 114–125.

doi:10.1016/j.endinu.2017.09.008

- Hirsch, J., & Han, P. W. (1969). Cellularity of rat adipose tissue: effects of growth, starvation, and obesity. *Journal of lipid research*, 10(1), 77–82.
- Honnma, H., Endo, T., Kiya, T., Shimizu, A., Nagasawa, K., Baba, T., Ishioka, S. (2010). Remarkable features of ovarian morphology and reproductive hormones in insulin-resistant Zucker fatty (fa/fa) rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1), 73. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-73>
- Imai, T., Cho, Y., Takahashi, M., Kitahashi, T., Takami, S., Nishikawa, A., Ogawa, K. (2013). High susceptibility of heterozygous (+/fa) lean Zucker rats to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis. *Oncology reports*, 29(5), 1914–1922. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2326>
- INEGI. (2020). La obesidad. Estadísticas a propósito del día mundial contra la obesidad. *COMUNICADO DE PRENSA NÚM. 528/20*. Org.mx. Recuperado el 14 de noviembre de 2023, de: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2020/EAP_Obesidad20
- Johnson, P., Zucker, L., Cruce, J., Hirsch, J. (1971). Cellularity of adipose depots in the genetically obese Zucker rat. *Journal of Lipid Research*, 12(6), 706–714. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)39459-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)39459-1).
- Johnson, P., Stern, J., Horwitz, B., Harris, R., Greene, S. (1997). Longevity in obese and lean male and female rats of the Zucker strain: prevention of hyperphagia. *The American journal of clinical nutrition*, 66(4), 890–903. <https://doi.org/10.1093/ajcn/66.4.890>
- Kajihara, T., Uchino, S., Suzuki, M., Itakura, A., Brosens, J. J., Ishihara, O. (2009). Increased ovarian follicle atresia in obese Zucker rats is associated with enhanced expression of the forkhead transcription factor FOXO1. *Medical molecular morphology*, 42(4), 216–221. <https://doi.org/10.1007/s00795-009-0466-7>
- Kamitakahara, A., Bouyer, K., Wang, C. H., Simerly, R. (2018). A critical period for the trophic actions of leptin on AgRP neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus. *The Journal of Comparative Neurology*, 526(1), 133–145. <https://doi.org/10.1002/cne.24327>
- Kaplan, M. L., Trout, J. R., Smith, P. (1980). Adipocyte size distribution in fa/fa rats during development. *Metabolism: clinical and experimental*, 29(4), 333–339. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(80\)90006-2](https://doi.org/10.1016/0026-0495(80)90006-2)
- Karges, B., Karges, W., de Roux, N. (2003). Clinical and molecular genetics of the human GnRH receptor. *Human Reproduction Update*, 9(6), 523–530. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmg040>
- Keen-Rhinehart, E., Kalra, S. P., Kalra, P. S. (2004). Leptin-receptor gene transfer into the arcuate

- nucleus of female Fatty Zucker rats using recombinant adeno-associated viral vectors stimulates the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Biology of Reproduction*, 71(1), 266–272. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.025858>
- Kennedy, G. C., & Mitra, J. (1963). Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. *The Journal of physiology*, 166(2), 408–418. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1963.sp007112>
- Khan, D., Sridhar, A., Flatt, P., Moffett, R. C. (2023). Disturbed ovarian morphology, oestrous cycling and fertility of high fat fed rats are linked to alterations of incretin receptor expression. *Reproductive biology*, 23(3), 100784. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2023.100784>
- Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2010). "Investigación animal: informes de experimentos in vivo: las directrices ARRIVE." *PLOS Biol*, 8(6), e1000412. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000412
- Kolb, B., Forgie, M., Gibb, R., Gorny, G., Rowntree, S. (1998). Age, experience and the changing brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22(2), 143–159. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(97\)00008-0](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(97)00008-0)
- Koutcherov, Y., Paxinos, G., Mai, J. K. (2007). Organization of the human medial preoptic nucleus. *The Journal of Comparative Neurology*, 503(3), 392–406. <https://doi.org/10.1002/cne.21355>
- Lagaly, D. V., Aad, P. Y., Grado-Ahuir, J. A., Hulsey, L. B., & Spicer, L. J. (2008). Role of adiponectin in regulating ovarian theca and granulosa cell function. *Molecular and cellular endocrinology*, 284(1-2), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.01.007>
- Lee, M. O. (1929). Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 89(1), 24–33. doi:10.1152/ajplegacy.1929.89.1.24
- Lee, M. & Fried, S. (2009). Integration of hormonal and nutrient signals that regulate leptin synthesis and secretion. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 296(6), 1230–1238. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90927.2008>
- Leidy, J. W., Jr, Romano, T. M., & Millard, W. J. (1993). Developmental and sex-related changes of the growth hormone axis in lean and obese Zucker rats. *Neuroendocrinology*, 57(2), 213–223. <https://doi.org/10.1159/000126362>
- Limonta, P., Marelli, M., Moretti, R., Marzagalli, M., Fontana, F., Maggi, R. (2018). GnRH in the Human Female Reproductive Axis. *Vitamins and hormones*, 107, 27–66. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.01.003>

- Lin R. C. (1985). Serum cholesterol, lecithin-cholesterol acyltransferase, and hepatic hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase activities of lean and obese Zucker rats. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 34(1), 19–24. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(85\)90054-x](https://doi.org/10.1016/0026-0495(85)90054-x)
- Long, J., A. & Evans, H., M. 1922. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Memoirs of the University of California*, 6:1-148.
- Louis, G. W., Greenwald-Yarnell, M., Phillips, R., Coolen, L. M., Lehman, M. N., Myers, M. G., Jr (2011). Molecular mapping of the neural pathways linking leptin to the neuroendocrine reproductive axis. *Endocrinology*, 152(6), 2302–2310. <https://doi.org/10.1210/en.2011-0096>
- Maeda, K., Nagatani, S., Estacio, M. A., & Tsukamura, H. (1996). Novel estrogen feedback sites associated with stress-induced suppression of luteinizing hormone secretion in female rats. *Cellular and molecular neurobiology*, 16(3), 311–324. <https://doi.org/10.1007/BF02088098>
- Mantzoros C. S. (1999). The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Annals of Internal Medicine*, 130(8), 671–680. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-130-8-199904200-00014>
- Marín-Bivens, C. L., & Olster, D. H. (1997). Abnormal estrous cyclicity and behavioral hyporesponsiveness to ovarian hormones in genetically obese Zucker female rats. *Endocrinology*, 138(1), 143–148. <https://doi.org/10.1210/endo.138.1.4849>
- Martin, R. J., Harris, R.B.S., Jones, D.D. (1986). Evidence for a Central Mechanism of Obesity in the Zucker Fatty Rat (fa/fa). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 183(1),1-10. doi:[10.3181/00379727-183-42380](https://doi.org/10.3181/00379727-183-42380)
- Martinez-Corral, I., & Prevot, V. (2021). GnRH Neurons: The Return of the Rat. *Endocrinology*, 162(1), bqaa207. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa207>
- Matochik, J. A., White, N. R., Barfield, R. J. (1992). Variations in scent marking and ultrasonic vocalizations by Long-Evans rats across the estrous cycle. *Physiology & behavior*, 51(4), 783–786. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90116-j](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90116-j)
- Mazza, E., Troiano, E., Ferro, Y., Lisso, F., Tosi, M., Turco, E., Pujia, R., Montalcini, T. (2024). Obesity, Dietary Patterns, and Hormonal Balance Modulation: Gender-Specific Impacts. *Nutrients*, 16(11), 1629. <https://doi.org/10.3390/nu16111629>
- McIlwraith, E. K., & Belsham, D. D. (2020). Hypothalamic reproductive neurons communicate through signal transduction to control reproduction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 518, 110971. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110971>

- McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S., Bennett, S. A. (2012). Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (67), e4389. <https://doi.org/10.3791/4389>
- McNamara D. J. (1985). Cholesterol homeostasis in lean and obese male Zucker rats. *Metabolism: clinical and experimental*, 34(2), 130–135. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(85\)90121-0](https://doi.org/10.1016/0026-0495(85)90121-0)
- Melnyk, S., & Hakkak, R. (2022). Metabolic Status of Lean and Obese Zucker Rats Based on Untargeted and Targeted Metabolomics Analysis of Serum. *Biomedicines*, 10(1), 153. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10010153>
- Miller W. L. (1988). Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrine reviews*, 9(3), 295-318. <https://doi.org/10.1210/edrv-9-3-295>
- Michalakis, K. G., & Segars, J. H. (2010). The role of adiponectin in reproduction: from polycystic ovary syndrome to assisted reproduction. *Fertility and sterility*, 94(6), 1949–1957. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.05.010>
- Mizuno, Y., & Oomura, Y. (1984). Glucose responding neurons in the nucleus tractus solitarius of the rat: in vitro study. *Brain research*, 307(1-2), 109–116. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90466-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90466-9)
- Moenter, S. M., Silveira, M. A., Wang, L., & Adams, C. (2020). Central aspects of systemic oestradiol negative- and positive-feedback on the reproductive neuroendocrine system. *Journal of neuroendocrinology*, 32(1), e12724. <https://doi.org/10.1111/jne.12724>
- Mohns, E. J., Karlsson, K. A., Blumberg, M. S. (2006). The preoptic hypothalamus and basal forebrain play opposing roles in the descending modulation of sleep and wakefulness in infant rats. *The European Journal of Neuroscience*, 23(5), 1301–1310. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04652.x>
- Moreno-Aliaga, M., Stanhope, K. Havel, P. (2001). Transcriptional regulation of the leptin promoter by insulin-stimulated glucose metabolism in 3t3-L1 adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 283(3), 544–548. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4822>
- Mota, M., Banini, B. A., Cazanave, S. C., Sanyal, A. J. (2016). Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism: clinical and experimental*, 65(8), 1049–1061. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.02.014>
- Mumford, S. L., Chavarro, J. E., Zhang, C., Perkins, N. J., Sjaarda, L. A., Pollack, A. Z., Schliep,

- K. C., Michels, K. A., Zarek, S. M., Plowden, T. C., Radin, R. G., Messer, L. C., Frankel, R. A., Wactawski-Wende, J. (2016). Dietary fat intake and reproductive hormone concentrations and ovulation in regularly menstruating women. *The American journal of clinical nutrition*, 103(3), 868–877. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.119321>
- Nakao, K., Iwata, K., Takeshita, T., Ozawa, H. (2018). Expression of hypothalamic kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin A neurons attenuates in female Zucker fatty rats. *Neuroscience letters*, 665, 135–139. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.12.002>
- Neyens, D., Zhao, H., Huston, N. J., Wayman, G. A., Ritter, R. C., & Appleyard, S. M. (2020). Leptin Sensitizes NTS Neurons to Vagal Input by Increasing Postsynaptic NMDA Receptor Currents. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 40(37), 7054–7064. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1865-19.2020>
- Nisa, K. U., Tarfeen, N., Mir, S. A., Waza, A. A., Ahmad, M. B., Ganai, B. A. (2024). Molecular Mechanisms in the Etiology of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): A Multifaceted Hypothesis Towards the Disease with Potential Therapeutics. *Indian journal of clinical biochemistry*, 39(1), 18–36. <https://doi.org/10.1007/s12291-023-01130-7>
- Novelli, E. L., Diniz, Y. S., Galhardi, C. M., Ebaid, G. M., Rodrigues, H. G., Mani, F., Fernandes, A. A., Cicogna, A. C., Novelli Filho, J. L. (2007). Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory animals*, 41(1), 111–119. <https://doi.org/10.1258/00236770779399518>
- Oanna, F., Takeda, H., Hayakawa, K., Matsuzawa, A., Akahane, S., Isaji, M., Akahane, M. (2005). Physiological difference between obese (fa/fa) Zucker rats and lean Zucker rats concerning adiponectin. *Metabolism Clinical and Experimental*, 54, 995-1001.
- Oakley, A. E., Clifton, D. K., Steiner, R. A. (2009). Kisspeptin signaling in the brain. *Endocrine Reviews*, 30(6), 713–743. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0005>
- Obradovic, M., Sudar-Milovanovic, E., Soskic, S., Essack, M., Arya, S., Stewart, A. J., Gojobori, T., Isenovic, E. R. (2021). Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. *Frontiers in endocrinology*, 12, 585887. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.585887>
- Ohkura, S., Tanaka, T., Nagatani, S., Bucholtz, D. C., Tsukamura, H., Maeda, K., & Foster, D. L. (2000). Central, but not peripheral, glucose-sensing mechanisms mediate glucoprivic suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in the sheep. *Endocrinology*, 141(12), 4472–4480. <https://doi.org/10.1210/endo.141.12.7853>
- Okunogbe, A., Nugent, R., Spencer, G., Ralston, J., Wilding, J. (2022). Economic impacts of overweight and obesity: current and future estimates for eight countries. *BMJ global health*, 6(10), e006351. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2021-006351>

- Olmos, G., Naftolin, F., Perez, J., Tranque, P. A., Garcia-Segura, L. M. (1989). Synaptic remodeling in the rat arcuate nucleus during the estrous cycle. *Neuroscience*, 32(3), 663–667. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90288-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90288-1)
- OMS. (2021). Obesidad y sobrepeso. *Who.int*. Recuperado el 14 de noviembre de 2023, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Paccola, C. C., Resende, C., Stumpp, T., Miraglia, S. M., Cipriano, I. (2013). The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Animal reproduction*, 10, 677–683.
- Pagano, C., Calcagno, A., Giacomelli, L., Poletti, A., Macchi, V., Vettor, R., De Caro, R., Federspil, G. (2004). Molecular and morphometric description of adipose tissue during weight changes: a quantitative tool for assessment of tissue texture. *International Journal of Molecular Medicine*, 14 (5), 897-902.
- Parducz, A., Zsarnovszky, A., Naftolin, F., Horvath, T. L. (2003). Estradiol affects axo-somatic contacts of neuroendocrine cells in the arcuate nucleus of adult rats. *Neuroscience*, 117(4), 791–794. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00967-3](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00967-3)
- Paxinos, G., & Watson, C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. Elsevier.
- Perry, B., & Wang, Y. (2012). Appetite regulation and weight control: the role of gut hormones. *Nutrition & Diabetes*, 2, e26. <https://doi.org/10.1038/nutd.2011.21>
- Pentkowski, N. S., Litvin, Y., Blanchard, D. C., Blanchard, R. J. (2018). Effects of estrus cycle stage on defensive behavior in female Long-Evans hooded rats. *Physiology & behavior*, 194, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.04.028>
- Pinto, S., Roseberry, A. G., Liu, H., Diano, S., Shanabrough, M., Cai, X., Friedman, J. M., & Horvath, T. L. (2004). Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science*, 304(5667), 110–115. <https://doi.org/10.1126/science.1089459>
- Pitteloud, N., Quinton, R., Pearce, S., Raivio, T., Acierno, J., Dwyer, A., Plummer, L., Hughes, V., Seminara, S., Cheng, Y. Z., Li, W. P., Maccoll, G., Eliseenkova, A. V., Olsen, S. K., Ibrahimi, O. A., Hayes, F. J., Boepple, P., Hall, J. E., Bouloux, P., Mohammadi, M., ... Crowley, W. (2007). Digenic mutations account for variable phenotypes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *The Journal of clinical investigation*, 117(2), 457–463. <https://doi.org/10.1172/JCI29884>
- Plain, Z., Voliotis, M., McArdle, C., Tsaneva-Atanasova, K. (2022). Modelling KNDy neurons and gonadotropin-releasing hormone pulse generation. *Current opinion in endocrine and metabolic research*, 27, 100407. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2022.100407>

- Plant, T. M. (2015). The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *The journal of endocrinology*, 226(2).
- Prashar, V., Arora, T., Singh, R., Sharma, A., Parkash, J. (2023). Hypothalamic Kisspeptin Neurons: Integral Elements of the GnRH System. *Reproductive sciences* (Thousand Oaks, Calif.), 30(3), 802–822. <https://doi.org/10.1007/s43032-022-01027-5>
- Puga y Colmenares, M. C., Hernández, A. T., & Morales-Ledesma, L. (2021). Unilateral section of the superior ovarian nerve induces first ovulation in the Zucker fatty (fa/fa) rat. *General and Comparative Endocrinology*, 300, 113636.
- Rachoń, D., & Teede, H. (2010). Ovarian function and obesity--interrelationship, impact on women's reproductive lifespan and treatment options. *Molecular and cellular endocrinology*, 316(2), 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.09.026>
- Raffaelli, G., Saviane, C., Mohajerani, M. H., Pedarzani, P., Cherubini, E. (2004). BK potassium channels control transmitter release at CA3-CA3 synapses in the rat hippocampus. *The Journal of physiology*, 557(Pt 1), 147–157. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.062661>
- Rinaman L. (2010). Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. *Brain research*, 1350, 18–34. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.059>
- Rinaman, L. (2011). Hindbrain noradrenergic A2 neurons: diverse roles in autonomic, endocrine, cognitive, and behavioral functions. *American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 300(2), R222–R235. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00556.2010>
- Rearte, M. B., Luchetti, C. G., Sander, V., González, C., Di Girolamo, G., Motta, A. (2003). Efecto de la leptina en la producción de progesterona y estradiol por el ovario de rata [Effect of leptin in the production of progesterone and estradiol by ovarian rat tissue]. *Medicina*, 63(5), 410–412.
- Rentsch, J., & Chiesi, M. (1996). Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS letters*, 379(1), 55–59. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01485-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01485-3)
- Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y., Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & molecular medicine*, 48(3), e219. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.6>
- Saiduddin, S., & Zassenhaus, H. P. (1979). Interaction of estradiol with its receptor in the infertile Zucker fatty female rat. *Biology of reproduction*, 20(2), 253–260. <https://doi.org/10.1095/biolreprod20.2.253>
- Saper, C. B., & Stornetta, R. L. (2015). Central Autonomic System. *The Rat Nervous System*, 629–673. doi:10.1016/b978-0-12-374245-2.00023-1
- Semaan, S. J., & Kauffman, A. S. (2010). Sexual differentiation and development of forebrain

- reproductive circuits. *Current opinion in neurobiology*, 20(4), 424–431. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.04.004>
- Silvestris, E., de Pergola, G., Rosania, R., Loverro, G. (2018). Obesity as disruptor of the female fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0336-z>
- Simerly, R. B., Swanson, L. W., & Gorski, R. A. (1985). The distribution of monoaminergic cells and fibers in a periventricular preoptic nucleus involved in the control of gonadotropin release: Immunohistochemical evidence for a dopaminergic sexual dimorphism. *Brain Research*, 330(1), 55–64. [doi:10.1016/0006-8993\(85\)90007-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90007-1)
- Smith, M. S., Freeman, M. E., Neill, J. D. (1975). The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*, 96(1), 219–226. <https://doi.org/10.1210/endo-96-1-219>
- Sosa, Z., Delgado, M., Casais, M., Aguado, L., & Rastrilla, A. M. (2004). Release of ovarian progesterone during the rat oestrous cycle by ganglionic cholinergic influence: the role of norepinephrine. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 91(3), 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.03.119>
- Speakman, J., Hambly, C., Mitchell, S., Krol, E. (2007). Animal models of obesity. *Obesity Reviews*, 8, 55-61. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2007.00319.x>
- Speakman, J., Hambly, C., Mitchell, S., Król E. (2008). The contribution of animal models to the study of obesity. *Laboratory Animals*, 42(4),413–32. <https://doi.org/10.1258/la.2007.006067>
- Spicer, L. J., & Francisco, C. C. (1997). The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinology*, 138(8), 3374–3379. <https://doi.org/10.1210/endo.138.8.5311>
- Spary, E. J., Maqbool, A., Batten, T. F. (2010). Changes in oestrogen receptor alpha expression in the nucleus of the solitary tract of the rat over the oestrous cycle and following ovariectomy. *Journal of neuroendocrinology*, 22(6), 492–502. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.01977.x>
- Suntsova, N., Guzman-Marin, R., Kumar, S., Alam, M. N., Szymusiak, R., McGinty, D. (2007). The median preoptic nucleus reciprocally modulates activity of arousal-related and sleep-related neurons in the perifornical lateral hypothalamus. *The Journal of Neuroscience*, 27(7), 1616–1630. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3498-06.2007>
- Sullivan, A. C., Triscari, J., Comai, K. (1978). Caloric compensatory responses to diets containing

- either nonabsorbable carbohydrate or lipid by obese and lean Zucker rats. *The American journal of clinical nutrition*, 31(10 Suppl), S261–S266.
- Sun, J., Shen, X., Liu, H., Lu, S., Peng, J., Kuang, H. (2021). Caloric restriction in female reproduction: is it beneficial or detrimental?. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 19(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00681-1>
- Swaab, D. F., Kreier, F., Lucassen, J. P., Salehi, A., Buijs, R. M. (2021). Arcuate nucleus, median eminence, and hypophysial pars tuberalis. *Handbook of Clinical Neurology. Elsevier*, 180, 227-251.
- Taketa Y. (2022). Evaluación de toxicidad luteal en ratas. *Revista de patología toxicológica*, (351) 7-17. <https://doi.org/10.1293/tox.2021-0058>
- Todd, B. J., Ladyman, S. R., & Grattan, D. R. (2003). Suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion but not luteinizing hormone surge in leptin resistant obese Zucker rats. *Journal of neuroendocrinology*, 15(1), 61–68. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.00871.x>
- Tomassoni, D., Martinelli, I., Moruzzi, M., Micioni, M. V., Cifani, C., Amenta, F., Tayebati, S. K. (2020). Obesity and Age-Related Changes in the Brain of the Zucker Lepr^{fa/fa} Rats. *Nutrients*, 12, 1356. <https://doi.org/10.3390/nu12051356>
- Triscari, J., Greenwood, M. R., Sullivan, A. C. (1982). Oxidation and ketogenesis in hepatocytes of lean and obese Zucker rats. *Metabolism: clinical and experimental*, 31(3), 223–228. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(82\)90057-9](https://doi.org/10.1016/0026-0495(82)90057-9)
- Ulloa-Aguirre, A., Espinoza, R., Damian-Matsumura, P., Larrea, F., Flores, A., Morales, L., Dominguez, R. (1988). Studies on the microheterogeneity of anterior pituitary follicle-stimulating hormone in the female rat. Isoelectric focusing pattern throughout the estrous cycle. *Biology of reproduction*, 38(1), 70–78. <https://doi.org/10.1095/biolreprod38.1.70>
- Valerio, A., Ghisi, V., Dossena, M., Tonello, C., Giordano, A., Frontini, A., Ferrario, M., Pizzi, M., Spano, P., Carruba, M. O., Nisoli, E. (2006). Leptin increases axonal growth cone size in developing mouse cortical neurons by convergent signals inactivating glycogen synthase kinase-3beta. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(18), 12950–12958. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508691200>
- van Dammen, L., Wekker, V., de Rooij, S. R., Groen, H., Hoek, A., Roseboom, T. J. (2018). A systematic review and meta-analysis of lifestyle interventions in women of reproductive age with overweight or obesity: the effects on symptoms of depression and anxiety. *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 19(12), 1679–1687. <https://doi.org/10.1111/obr.12752>
- van der Schoot, P., & de Greef, W. J. (1976). Dioestrous progesterone and pro-oestrous

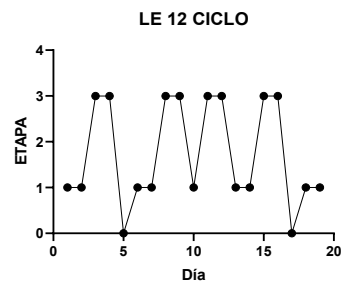
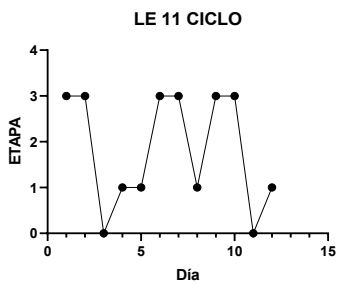
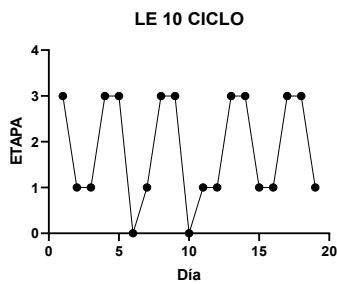
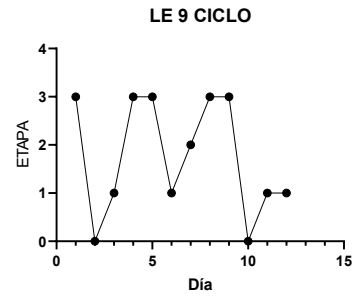
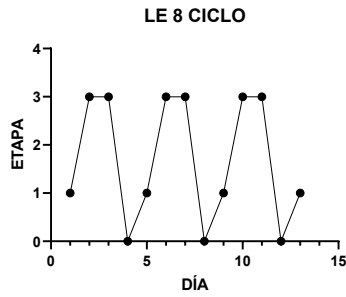
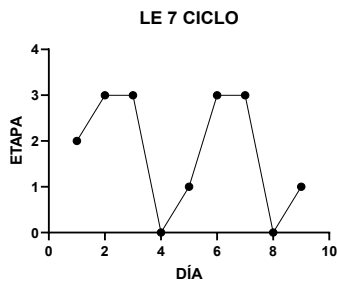
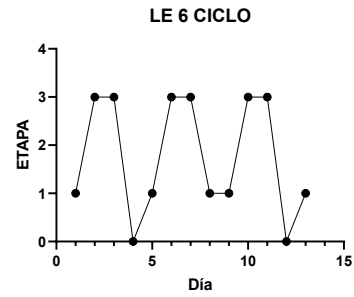
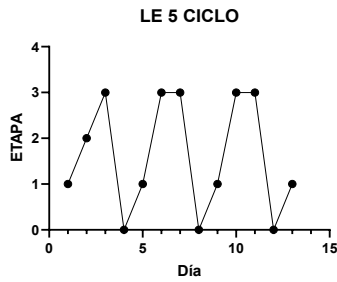
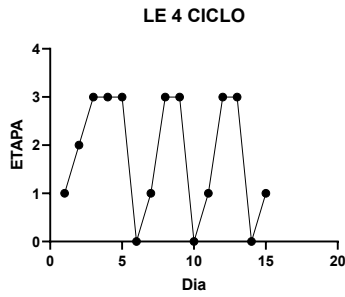
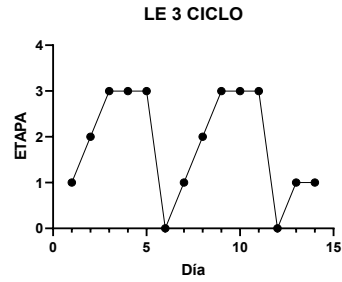
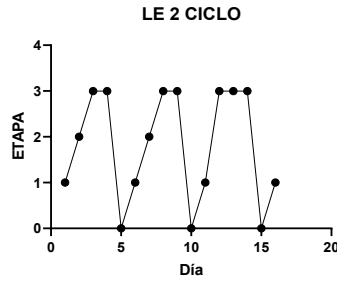
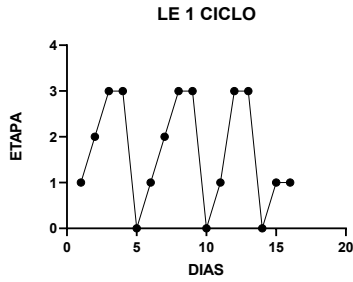
- lutinizing hormone in 4- and 5-day cycles of female rats. *The Journal of endocrinology*, 70(1), 61–68. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0700061>
- Vas, S., Wall, E., Zhou, Z., Kalmar, L., Han, S. Y., Herbison, A. E. (2024). Long-term Recordings of Arcuate Nucleus Kisspeptin Neurons Across the Mouse Estrous Cycle. *Endocrinology*, 165(3), bqae009. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqae009>
- Vergara, R. C., Jaramillo-Riveri, S., Luarte, A., Moëne-Loccoz, C., Fuentes, R., Couve, A., Maldonado, P. E. (2019). The Energy Homeostasis Principle: Neuronal Energy Regulation Drives Local Network Dynamics Generating Behavior. *Frontiers in computational neuroscience*, 13, 49. <https://doi.org/10.3389/fncom.2019.00049>
- Wachsmuth, H.R., Weninger, S.N., Duca, F.A. (2022). Role of the gut–brain axis in energy and glucose metabolism. *Experimental & Molecular Medicine*, 54, 377–392. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00677-w>
- Watson, R. E., Jr, Langub, M. C., Jr, Engle, M. G., Maley, B. E. (1995). Estrogen-receptive neurons in the anteroventral periventricular nucleus are synaptic targets of the suprachiasmatic nucleus and peri-suprachiasmatic region. *Brain research*, 689(2), 254–264. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00548-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00548-5)
- Wright, D. E., & Jennes, L. (1993). Origin of noradrenergic projections to GnRH perikarya-containing areas in the medial septum-diagonal band and preoptic area. *Brain Research*, 621(2), 272–278. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90116-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90116-5)
- Whitaker, E. M., & Robinson, A. C. (1989). Circulating reproductive hormones and hypothalamic oestradiol and progesterin receptors in infertile Zucker rats. *The Journal of endocrinology*, 120(2), 331–336. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1200331>
- Whitehead, M. C. (1988). Neuronal architecture of the nucleus of the solitary tract in the hamster. *The Journal of Comparative Neurology*, 276(4), 547–572. <https://doi.org/10.1002/cne.902760409>
- Woolley, C. S., Gould, E., Frankfurt, M., & McEwen, B. S. (1990). Naturally fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons occur. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 10(12), 4035–4039. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-12-04035.1990>
- Yamashita, T., Murakami, T., Iida, M., Kuwajima, M., Shima, K. (1997). Leptin Receptor of Zucker Fatty Rat Performs Reduced Signal Transduction. *Diabetes*, 46(6), 1077–1080. doi:10.2337/diab.46.6.1077
- Yazdi, F. T., Clee, S. M., Meyre, D. (2015). Obesity genetics in mouse and human: back and forth,

- and back again. *PeerJ*, 3, e856. <https://doi.org/10.7717/peerj.856>
- Yokoi, N., Hoshino, M., Hidaka, S., Yoshida, E., Beppu, M., Hoshikawa, R., Sudo, K., Kawada, A., Takagi, S., Seino, S. (2013). A Novel Rat Model of Type 2 Diabetes: The Zucker Fatty Diabetes Mellitus ZFDM Rat. *Journal of diabetes research*, 2013, 103731. <https://doi.org/10.1155/2013/103731>
- Yu, S., François, M., Huesing, C., Münzberg, H. (2018). The Hypothalamic Preoptic Area and Body Weight Control. *Neuroendocrinology*, 106(2), 187–194. <https://doi.org/10.1159/000479875>
- Zaqout, S., & Kaindl, A. M. (2016). Golgi-Cox Staining Step by Step. *Frontiers in neuroanatomy*, 10, 38. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00038>
- Zhang, C., Barkholt, P., Nielsen, J. C., Thorbek, D. D., Rigbolt, K., Vrang, N., Woldbye, D. P. D., Jelsing, J. (2020). The dorsomedial hypothalamus and nucleus of the solitary tract as key regulators in a rat model of chronic obesity. *Brain Research*, 1727, 14653 <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146538>
- Zucker, T. F., & Zucker, L. M. (1963). Fat accretion and growth in the rat. *The Journal of Nutrition*, 80, 6–19. <https://doi.org/10.1093/jn/80.1.6>

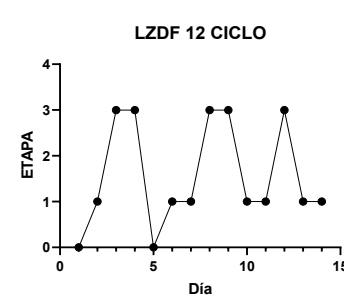
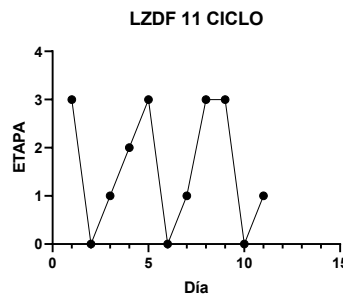
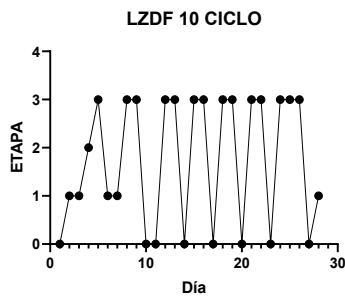
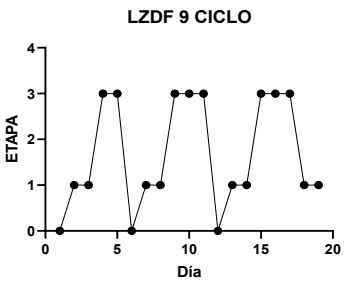
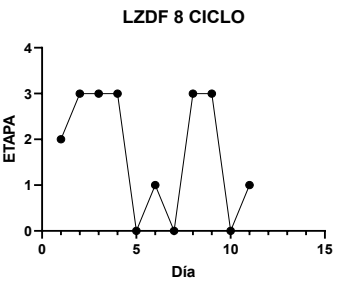
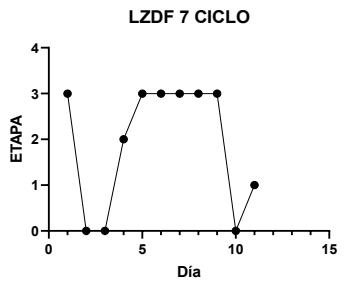
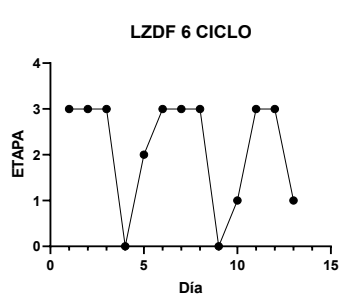
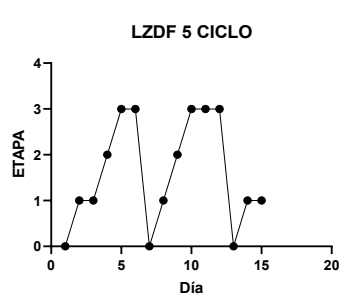
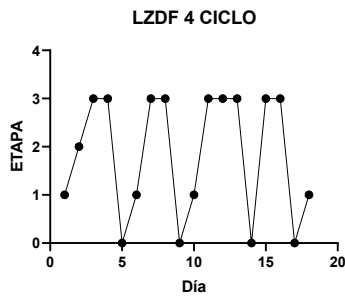
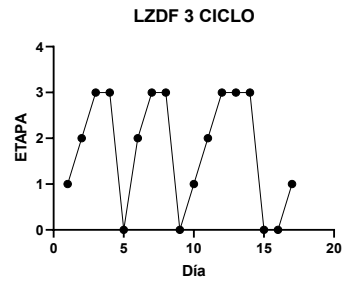
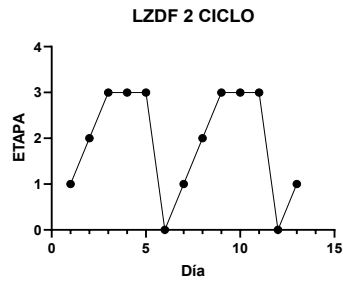
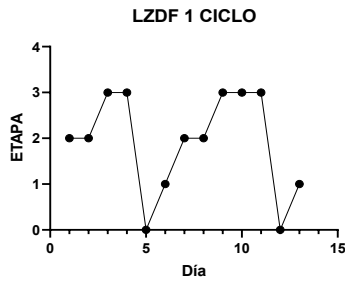
Anexo I Ciclo estral

Resultados del seguimiento por 10-15 días del ciclo estral de 12 ratas de la cepa Long Evans.

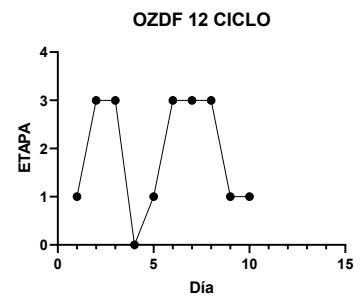
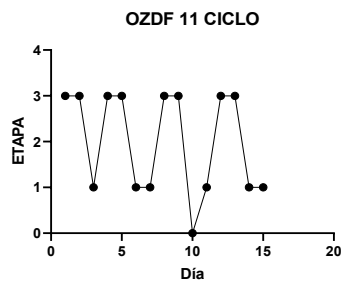
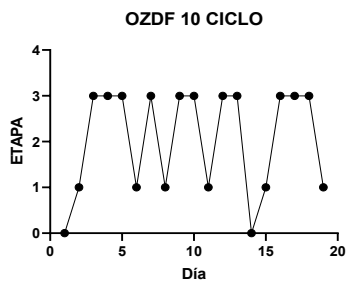
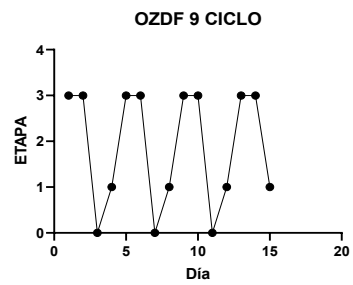
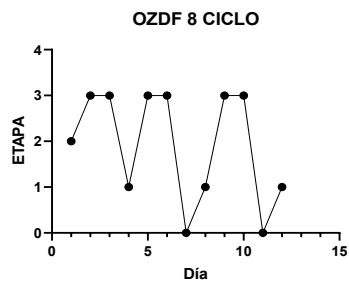
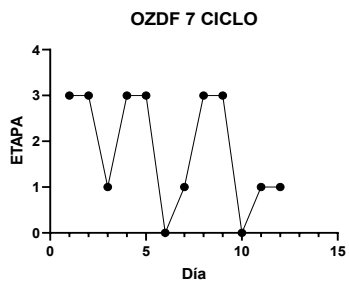
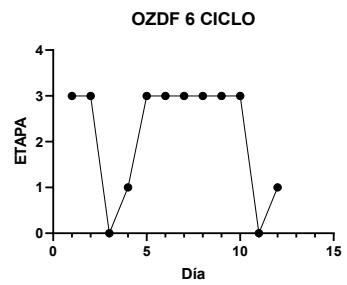
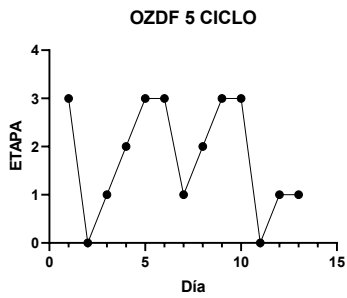
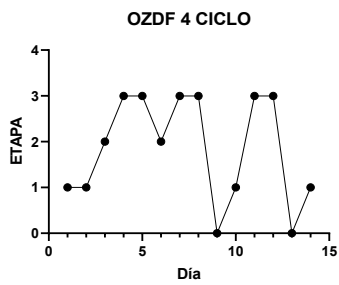
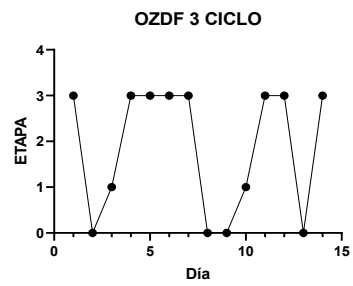
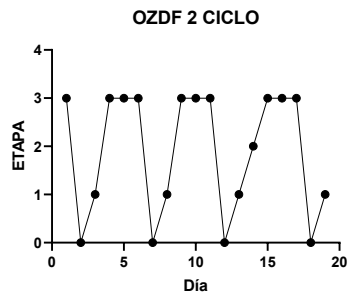
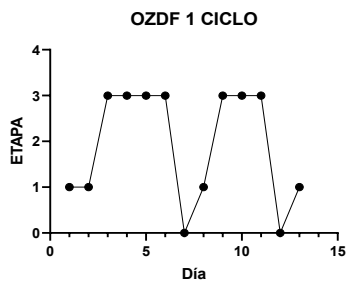
Donde 0= Proestro; 1= Estro; 2= Metaestro; 3= Diestro.



Resultados del seguimiento por 10-15 días del ciclo estral de 12 ratas de la cepa LZDF. Donde 0= Proestro; 1= Estro; 2= Metaestro; 3= Diestro.



Resultados del seguimiento por 10-15 días del ciclo estral de 12 ratas de la cepa OZDF. Donde 0= Proestro; 1= Estro; 2= Metaestro; 3= Diestro.



Anexo II Etapas del ciclo estral

En las ratas, se encuentra constituido por cuatro etapas con una duración total de 4-5 días dependiendo de las horas luz y consta de 4 etapas:

Proestro: Con una duración de 14 horas; se observa la predominancia de células nucleadas con una apariencia uniforme. Durante esta etapa se presenta un incremento en las concentraciones plasmáticas de estradiol de manera gradual hasta alcanzar 40-50 pg/ml (entre las 4-5 de la tarde), y un pico preovulatorio de LH de 35-40 ng/ml (Smith *et al.*, 1975; McLean *et al.*, 2012).

Estro: Dura de 24 a 27 horas; se observan células anucleadas queratinizadas y aisladas. En esta etapa se presentan niveles basales de estradiol de 7 pg/ml, de progesterona (P4) de 5-10 ng/ml y de la hormona luteinizante (LH) de 0.5 ng/ml. Sin embargo, la hormona folículo estimulante (FSH) alcanza un segundo pico, por lo que la ovulación se presenta 12 horas después del pico de LH en la tarde del proestro (1-8 am) en espera de la fertilización. Si ocurre, se incrementan los niveles de P4 a 25-30 ng/ml (Smith *et al.*, 1975; McLean *et al.*, 2012).

Metaestro: También llamado Diestro 1. Su duración es de 6 a 8 horas; se observan células anucleadas queratinizadas y también leucocitos. Esta fase es de transición entre el estro y diestro.

Diestro: También llamado Diestro 2. Con una duración de 55-72 horas; principalmente se observan leucocitos con células anucleadas queratinizadas aisladas, posteriormente se observan pocas células nucleadas y aisladas y escaso mucus. Durante esta etapa se presentan niveles basales de las concentraciones plasmáticas de estradiol (7 pg/ml), de LH (0.5 ng/ml), de FSH (50-100 ng/ml), y de P4 (5-10 ng/ml) (Smith *et al.*, 1975; McLean *et al.*, 2012).

Anexo III Método Golgi Cox

Para analizar la arborización dendrítica de las neuronas de los núcleos hipotalámicos (ARC, AVPV y POA) y el NTS, se utilizó el método de Golgi-Cox. Este método permite rastrear la trayectoria y conexiones neuronales, mediante una estrategia de “reacción negra” (denominada así por Golgi en 1873 (Bentivoglio *et al.*, 2019)); la cual está determinada por la formación de depósitos opacos intracelulares de cromato argéntico en el citoplasma celular (Zaqout & Kaindl, 2016), proporcionando una vista panorámica de los cuerpos celulares (neuronales) sobre un fondo amarillo/transparente.