



**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla  
Facultad de Ciencias Biológicas**

**Maestría en Ciencias Biológicas**

**“Efectos de metformina sobre la respuesta  
ovulatoria y la morfología ovárica de la rata Zucker  
obesa como modelo del Síndrome de Ovario  
Poliquístico asociado a Resistencia a la Insulina”**

**Tesis para obtener el grado de:  
Maestro en Ciencias Biológicas**

**PRESENTA:**

**Biol. Eliseo Flores Sánchez**

**DIRECTOR:**

**Dra. Angélica Trujillo Hernández**

**CODIRECTOR:**

**Dra. Julieta Azucena Espinoza Moreno**



**Mayo 2024**

*«Decía a menudo que sólo había un camino y que era como un río caudaloso; nacía en el umbral de todas las puertas, y todos los senderos eran ríos tributarios. "Es muy peligroso, Frodo, cruzar la puerta", solía decirme. "Vas hacia el Camino, y si no cuidas tus pasos no sabes hacia donde te arrastrarán"»*

***El Señor de los Anillos: La Comunidad del Anillo***

***J.R.R. Tolkien***

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD Y DE NO PLAGIO

Yo, **Eliseo Flores Sánchez**; alumno del posgrado de la **Maestría en Ciencias Biológicas** de la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla** con matrícula **221470304**, y autor de la tesis titulada: **“Efectos de metformina sobre la respuesta ovulatoria y la morfología ovárica de la rata Zucker obesa como modelo del Síndrome de Ovario Poliquístico asociado a Resistencia a la Insulina”**

DECLARO QUE:

El presente trabajo de investigación y tema de tesis para la obtención de grado de **Maestro en Ciencias Biológicas** es original; siendo resultado de mi trabajo personal, mismo que no se ha copiado, ni se han utilizado ideas, formulaciones, citas completas *“stricto sensu”* e ilustraciones diversas sacadas de cualquier tesis, obra, artículo, memoria, etc., (en versión digital o impresa), sin mencionar de forma clara y exacta su origen o autor; tanto en el cuerpo del texto, figuras, cuadros, tablas u otros que tengan derechos de autor.

Declaro que el trabajo de investigación que pongo en consideración para la evaluación no ha sido presentado anteriormente para obtener algún grado académico o título, ni ha sido publicado en algún sitio. En este sentido, soy consciente de que el hecho de no respetar los derechos de autor y hacer plagio son objeto de sanciones universitarias y/o legales, por lo que asumo cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de las irregularidades en la tesis, así como de los derechos sobre la obra presentada. Asimismo, me hago responsable ante la Universidad o terceros de cualquier irregularidad o daño que pudiera ocasionar por el incumplimiento de lo declarado.

H. Puebla de Zaragoza, a 14 de marzo de 2024



---

Eliseo Flores Sánchez



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

H. Puebla de Z. a 8 de mayo de 2024

Asunto: Voto Aprobatorio

Comité Académico del Posgrado  
PRESENTE

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

**"Efectos de metformina sobre la respuesta ovulatoria y la morfología ovárica de la rata Zucker obesa como modelo del Síndrome de Ovario Poliquístico asociado a Resistencia a la Insulina"**

Que presenta el (la) estudiante **Eliseo Flores Sánchez** con número de matrícula **221470304**, aspirante al grado de **Maestro (a) 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: D. en C. Berenice Venegas Meneses

Tutor Externo:

**Dr. Jose R. Egibarr**

Revisor: **Dr. Juan Manuel Bravo Benítez**

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



## **Agradecimientos Institucionales**

Agradezco al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología** por el apoyo con la beca No. 798694 para la realización de mis estudios de maestría.

Agradezco a la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado** de la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla** por el financiamiento para la realización de este trabajo vía el proyecto grupal 100274222-VIEP2021-2023 a favor del cuerpo académico BUAP-CA-288–Neuroendocrinología, y cuya responsable fue la Dra. Angélica Trujillo Hernández.

Al **Programa de Maestría en Ciencias Biológicas** de la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla** por permitirme la realización de mis estudios de maestría.

Al **Laboratorio de Aplicaciones Biotecnológicas del Instituto de Ciencias** de la **BUAP** por el apoyo brindado en la realización del trabajo de investigación.

## **Agradecimientos Personales**

Agradezco a mi asesora de tesis **Dra. Angélica Trujillo Hernández** por su dirección y tutoría durante todo el transcurso de la maestría; así como en la realización del escrito de tesis. Gracias por su amabilidad, su paciencia y su experiencia, que me han motivado a creer en el camino que quiero seguir.

A mi codirectora, **Dra. Julieta Azucena Espinoza Moreno** por su apoyo en la estructuración del escrito de tesis y sus acertados comentarios para mejorarla.

A mi comité tutorial, **Dra. Berenice Venegas** y **Dr. José Ramón Eguibar** por su acompañamiento durante toda la realización del proyecto de investigación, y por sus observaciones y puntos de vista que aportaron riqueza al trabajo final.

A mi padre, **Henoc Flores Segura** por ser un ejemplo de esfuerzo y dedicación, por su disciplina y consejería; y por ser un pilar importante en la construcción de la persona que soy hoy.

A mi madre, **Gemina Sánchez García** por su ejemplo, amor, cariño y disciplina, y que me motivó a siempre ser mejor cada día; siendo otro pilar importante en la persona que soy.

A mi hermano, **Henoc Flores Sánchez** por ser mi compañero de aventuras y uno de mis mejores amigos, siendo con su ejemplo parte fundamental de mi día a día, y mi cuñada, **Berenice Santamaría** por ser mi amiga y por compartir en familia momentos inolvidables.

A mis buenos amigos y personas muy especiales para mí **Itzel** e **Ismael**, por compartir momentos de alegría; así como su apoyo en todo aspecto cuando más lo necesito y recordarme siempre a cómo ser la persona que debo ser.

A mis amigas **Ani, Yara, Clau, Ely y Lay**, por ser apoyo durante toda mí formación profesional, aún más allá de la licenciatura. No hubiese sido lo mismo sin ustedes.

A mis buenos **compañeros y amigos del laboratorio**, gracias por sus enseñanzas y consejos, y por los momentos alegres con ustedes. ¡Arriba las Chicas Superpoderosas!

¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!



## **Contenido**

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Hipotálamo</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Hipófisis</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Eje Hipotálamo – Hipófisis - Gónadas</b>	<b>4</b>
<b>1.4. Ovarios</b>	<b>7</b>
<b>1.4.1. Foliculogénesis</b>	<b>7</b>
<b>1.4.2. Ciclo Ovárico</b>	<b>8</b>
<b>1.4.3. Ciclo Estral</b>	<b>9</b>
<b>1.4.4. Esteroideogénesis</b>	<b>11</b>
<b>1.5. Obesidad</b>	<b>12</b>
<b>1.6. Glucosa</b>	<b>12</b>
<b>1.7. Insulina</b>	<b>13</b>
<b>1.8. Resistencia a la insulina</b>	<b>15</b>
<b>1.9. Metformina</b>	<b>16</b>
<b>1.10. Síndrome de Ovario Poliquístico</b>	<b>16</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>18</b>
<b>2.1. Relación glucosa - ovario</b>	<b>18</b>
<b>2.2. Relación insulina – ovario</b>	<b>18</b>
<b>2.3. Síndrome de Ovario Poliquístico y Resistencia a Insulina</b>	<b>19</b>
<b>2.4. Uso de metformina en SOP</b>	<b>20</b>
<b>2.5. La Rata Zucker hembra como modelo de estudio</b>	<b>21</b>

<b>3.</b>	<b>Justificación</b>	<b>22</b>
<b>4.</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>23</b>
<b>5.</b>	<b>Objetivos</b>	<b>23</b>
<b>5.1.</b>	<b>Objetivo General</b>	<b>23</b>
<b>5.2.</b>	<b>Objetivos Particulares</b>	<b>23</b>
<b>6.</b>	<b>Material y métodos</b>	<b>24</b>
<b>6.1.</b>	<b>Animales</b>	<b>24</b>
<b>6.2.</b>	<b>Diseño Experimental</b>	<b>24</b>
<b>6.3.</b>	<b>Tratamiento con metformina</b>	<b>27</b>
<b>6.4.</b>	<b>Registro de Ciclicidad</b>	<b>27</b>
<b>6.5.</b>	<b>Toma de peso y parámetros zoométricos</b>	<b>27</b>
<b>6.6.</b>	<b>Prueba de tolerancia a la glucosa</b>	<b>27</b>
<b>6.7.</b>	<b>Prueba de tolerancia a la insulina</b>	<b>28</b>
<b>6.8.</b>	<b>Sacrificio y obtención de tejidos</b>	<b>28</b>
<b>6.9.</b>	<b>Obtención de muestras sanguíneas para medición de glucosa, colesterol, triglicéridos y testosterona</b>	<b>29</b>
<b>6.10.</b>	<b>Obtención del índice Triglicéridos - Glucosa como indicativo de Resistencia a la Insulina</b>	<b>29</b>
<b>6.11.</b>	<b>Evaluación de morfología ovárica</b>	<b>29</b>
<b>6.12.</b>	<b>Evaluación de la población folicular</b>	<b>30</b>
<b>6.13.</b>	<b>Análisis de ovulación</b>	<b>32</b>
<b>6.14.</b>	<b>Análisis estadísticos</b>	<b>32</b>
<b>7.</b>	<b>Resultados</b>	<b>33</b>
<b>7.1.</b>	<b>Peso corporal</b>	<b>33</b>

<b>7.2.</b>	<b>Parámetros zoométricos</b>	<b>36</b>
<b>7.3.</b>	<b>Peso de órganos</b>	<b>38</b>
<b>7.4.</b>	<b>Concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol sérico.</b>	<b>40</b>
<b>7.5.</b>	<b>Prueba de Tolerancia a la Glucosa</b>	<b>41</b>
<b>7.6.</b>	<b>Prueba de Tolerancia a la Insulina</b>	<b>42</b>
<b>7.7.</b>	<b>Índice de Triglicéridos y Glucosa</b>	<b>43</b>
<b>7.8.</b>	<b>Morfología ovárica.</b>	<b>43</b>
<b>7.9.</b>	<b>Respuesta ovulatoria</b>	<b>45</b>
<b>7.10.</b>	<b>Población folicular</b>	<b>46</b>
<b>7.11.</b>	<b>Ciclo Estral</b>	<b>47</b>
<b>7.12.</b>	<b>Concentración sérica de Testosterona</b>	<b>49</b>
<b>8.</b>	<b>Discusión</b>	<b>50</b>
<b>9.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>58</b>
<b>10.</b>	<b>Perspectivas</b>	<b>58</b>
	<b>Bibliografía</b>	<b>59</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Esquema del eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal.	6
<b>Figura 2:</b> Desarrollo folicular, desde el folículo primordial a la formación del cuerpo lúteo. Modificada de (Hannon & Flaws, 2015)	8
<b>Figura 3:</b> Grafica que muestra las concentraciones de Estradiol, progesterona y hormona luteinizante durante cada etapa del ciclo estral. Modificada de (Goldman, Murr, & Cooper, 2007)	10
<b>Figura 4:</b> Esquema de la ruta de síntesis de hormonas esteroideas a nivel folicular, junto con las enzimas involucradas. Modificado de (Bloom, Mok-Lin, & Fujimoto, 2016)	11
<b>Figura 5:</b> Las dos principales vías de la señalización de la Insulina. Modificada de (Gutiérrez-Rodelo, Roura-Guiberna, & Olivares-Reyes, 2017)	14
<b>Figura 6:</b> A: Esquema del diseño experimental. B: Fotografía de un organismo obeso en condiciones de bioterio.	26
<b>Figura 7:</b> Ejemplificación de las mediciones de los folículos, de la longitud y del grosor de la capa de la granulosa para su clasificación. Fotografía tomada por Eliseo Flores Sánchez.	31
<b>Figura 8:</b> Cortes ováricos de cada uno de los grupos experimentales, donde puede observarse la morfología típica encontrada. Abreviaturas: CL: Cuerpo lúteo; F: Folículo; PQ: Prequiste.	44

## Índice de Gráficas

<b>Gráfica 1:</b> Peso Corporal de los organismos al inicio del tratamiento, con 45 días de edad. Presentados como medias $\pm$ E. E. M.	33
<b>Gráfica 2:</b> Peso corporal de los animales durante el transcurso del tratamiento. Presentados como medias $\pm$ E. E. M.	34
<b>Gráfica 3:</b> Peso corporal de los animales en el día del sacrificio. Presentados como medias $\pm$ E. E. M.	35
<b>Gráfica 4:</b> Longitud naso-anal de los animales experimentales. Presentados como medias $\pm$ E. E. M.	36
<b>Gráfica 5:</b> Longitud de la circunferencia abdominal de cada grupo experimental. Presentados como medias E. E. M.	37
<b>Gráfica 6:</b> Peso relativo de los ovarios izquierdos (A) y derechos (B) de cada uno de los grupos experimentales. Medias $\pm$ E. E. M.	38
<b>Gráfica 7:</b> Peso relativo de las glándulas adrenales izquierdas (A) y derechas (B) de cada uno de los grupos experimentales. Medias $\pm$ E. E. M.	38
<b>Gráfica 8:</b> Peso relativo de los úteros de cada uno de los grupos experimentales. Medias $\pm$ E. E. M.	39
<b>Gráfica 9:</b> Concentraciones de triglicéridos (superior izquierda), glucosa (superior derecha), y colesterol (inferior) de suero de cada uno de los grupos experimentales. n=4 Medias $\pm$ E. E. M.	40
<b>Gráfica 10:</b> Prueba de Tolerancia a la Glucosa. Presentada como Medias $\pm$ E. E. M.	41
<b>Gráfica 11:</b> Prueba de Tolerancia a la Insulina. Presentada como. Medias $\pm$ E. E. M.	42
<b>Gráfica 12:</b> Tasa de animales ovulantes (TAO)(A) y número de cuerpos lúteos (B). Presentados como medias $\pm$ E. E. M.	45
<b>Gráfica 13:</b> Gráficas de la permanencia en cada una de las etapas del ciclo estral de grupos de ratas obesas y delgadas, con tratamiento con MET y control. Se presentan los registros de los 45 días de edad a los 60, y de los 68 a los 80 días de edad.	47
<b>Gráfica 15:</b> Gráficas del Ciclo estral de los grupos con tratamiento comparándose con el control. Cada serie de puntos representa el ciclo de un organismo diferente. Se presentan	

3 animales delgados control diferentes y 3 animales con MET diferentes. De igual forma, se presentan 3 animales obesos con MET y 3 animales obesos control. 48

**Gráfica 16:** Concentración de testosterona libre en suero de cada uno de los grupos experimentales. Medias  $\pm$  E. E. M. 49

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1:</b> Índice de Triglicéridos y Glucosa como indicativo de Resistencia a la Insulina. Datos presentados como medias E. E. M.	43
<b>Tabla 2:</b> Número de prequistes en el grupo de animales obesos, tanto el grupo del tratamiento y su respectivo control. Datos presentados como medias $\pm$ E. E. M.	43
<b>Tabla 3:</b> Número de folículos en cada uno de los estadios reportados (Primario, Secundarios, Preantrales y Antrales) de animales delgados y obesos, tanto experimentales como control. Datos presentados como media $\pm$ E. E. M.	46
<b>Tabla 4:</b> Diámetros promedio de los folículos en cada uno de los estadios de desarrollo de animales delgados y obesos, tanto grupos experimentales como grupos control. Datos presentados como medias $\pm$ E. E. M.	46

## Resumen

El eje reproductivo hipotálamo-hipófisis-gónadas es el principal regulador de las funciones reproductivas en mamíferos. Cuando su señalización se ve mermada, pueden presentarse afectaciones, como el Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP). El SOP es un trastorno endocrino y metabólico bastante común en mujeres de edad reproductiva y es la causa principal de infertilidad anovulatoria. Entre sus características comunes se encuentran la oligo-anovulación, el hiperandrogenismo y la presencia de quistes ováricos, y puede ser diagnosticado cuando se presenten al menos dos de los mismos. La obesidad y la resistencia a la insulina también parecen ser importantes en la etiología de SOP. La metformina es el fármaco más utilizado en el tratamiento de la resistencia a la insulina y ha demostrado ser un medicamento eficaz para aminorar los síntomas de SOP. Un modelo animal que permite estudiar tanto afecciones reproductivas como metabólicas es la rata hembra Zucker, la cual tiene disrupción en la señalización de leptina; lo que le provoca hiperfagia y obesidad. También tiene cambios en el perfil lipídico, y desarrolla hiperglucemia y resistencia a la insulina. En este modelo se han reportado alteraciones reproductivas, como ciclos estrales irregulares, oligoovulación, así como formación de prequistes y quistes ováricos. En este trabajo se propuso el uso de la rata hembra Zucker obesa como un modelo de SOP con resistencia a la insulina para poder evaluar el papel del tratamiento con metformina sobre el peso corporal, los parámetros zoométricos, y las concentraciones séricas de glucosa, triglicéridos y colesterol. Además, se analizó su efecto sobre la resistencia a la insulina mediante el índice de triglicéridos glucosa (ITG), la morfología ovárica con el análisis de la población folicular y la presencia de prequistes y quistes ováricos. Se utilizaron un total de 48 animales; de los cuales 24 eran obesos y 24 delgados. Tanto animales delgados como obesos fueron repartidos en 3 grupos: un grupo control, uno con administración de vehículo (PBS) y otro con tratamiento de metformina. A los grupos del tratamiento se les administró metformina (150mg/kg de peso corporal) diariamente durante 15 días. Al final de la administración, los animales obesos presentaron mayor peso corporal, mayor circunferencia abdominal, aumento en las concentraciones de glucosa, triglicéridos y colesterol

séricos; así como un ITG mayor al compararse con los animales delgados. También mostraron ciclos estrales irregulares, menor desarrollo folicular y presencia de prequistes ováricos. El tratamiento con metformina disminuyó el peso corporal, la circunferencia abdominal, las concentraciones de glucosa y triglicéridos, el ITG; y ayudó con la regularización del ciclo estral. Se observó una tendencia a la disminución de prequistes ováricos acompañado del aumento en el desarrollo folicular. Estos resultados nos permiten postular a la rata hembra Zucker obesa como un modelo de SOP con resistencia a la insulina, y que el tratamiento con metformina mejora o atenúa las alteraciones del síndrome.

## 1. Introducción

La reproducción es un proceso fundamental en todos los seres vivos, pues es el mecanismo mediante el cual los organismos son capaces de perpetuar su especie y continuar preservando la vida. Existen funciones específicas tanto en machos como en hembras, que tienen como consecuencia la formación de gametos sexuales, los cuales son espermatozoides y ovocitos. Dichos gametos se conjugan en el proceso de fertilización y así dan lugar a un nuevo individuo. Los animales cuyas hembras ovulan sin necesidad de un estímulo externo se conocen como ovuladores espontáneos. Los mecanismos que median las funciones que involucran los procesos de ovulación y de síntesis de hormonas esteroideas son demasiado complejos. El principal regulador de las funciones reproductivas en los mamíferos es el eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal, que involucra al hipotálamo y a la hipófisis a nivel cerebral, y a las gónadas a nivel periférico.

### 1.1. *Hipotálamo*

El hipotálamo es una estructura cerebral ubicada por encima de la parte anterior de la hipófisis, y actúa como un regulador homeostático maestro que media en diferentes funciones indispensables para la supervivencia; incluyendo el control energético, la termorregulación, los estados de sueño/vigilia, las respuestas al estrés, y los procesos y comportamientos reproductivos; controlando la señalización hormonal que dirigen el desarrollo sexual, la cópula, la preñez, el nacimiento y el amamantamiento (Burbridge y cols., 2016; Saper & Lowell, 2014). Las miles de neuronas y circuitos que conforman al hipotálamo han sido conservados a través de la evolución durante millones de años debido a su importancia en las funciones básicas de la vida (Saper & Lowell, 2014). El hipotálamo recibe información y señales aferentes desde diferentes tejidos, incluyendo otras áreas cerebrales que lo circundan, por lo que actúa como un nodo integrador (Burbridge y cols., 2016). Anatómicamente el hipotálamo está formado por un conjunto de núcleos y territorios distribuidos a manera de mosaico a través de toda su superficie, pero que trabajan en conjunto para regular el metabolismo y el comportamiento (Burbridge y cols., 2016). El hipotálamo tiene tres conjuntos de neuronas que controlan la respuesta

endócrina: el sistema magnocelular, cuyas principales neurohormonas son la oxitocina y la vasopresina; el parvocelular, que comprende un pequeño conjunto de neuronas en la parte medial del núcleo paraventricular y en el núcleo arcuato que incluye señalizaciones de hormonas liberadoras o inhibitorias de la liberación, como la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH); y las inervaciones provenientes directamente de las glándulas periféricas, como las gónadas, a modo de regulación retroalimentada. La principal acción hormonal del hipotálamo se da a través de la glándula hipofisiaria. Las neuronas de GnRH típicamente tienen dos proyecciones dendríticas, y su principal objetivo es el plexo primario del sistema porta-hipotálamo-hipofisiario ubicado en la eminencia media (Plant, 2015).

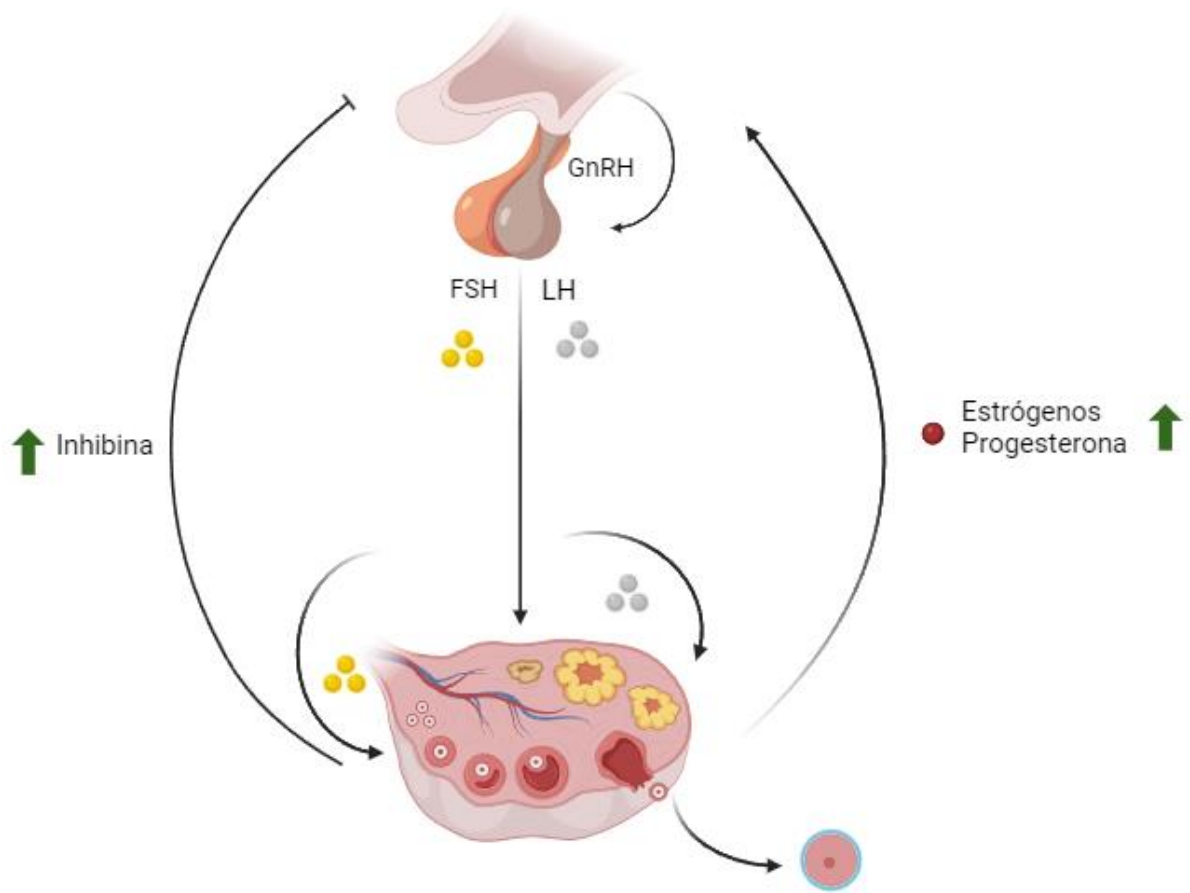
### *1.2. Hipófisis*

La hipófisis o pituitaria es una glándula ubicada en la parte inferior del hipotálamo, y ambas estructuras se conectan a través del sistema porta-hipotálamo-hipofisiario. La hipófisis es el principal objetivo de las neuronas parvicelulares, las cuales controlan gran variedad de procesos fisiológicos. Se divide en una región anterior, llamada adenohipófisis; una posterior, conocida como neurohipófisis; y un lóbulo intermedio (Musumeci y cols., 2015). La hipófisis regula las funciones de las glándulas adrenales, las gónadas y la glándula tiroidea mediante la secreción de hormonas reguladoras específicas vertidas hacia la circulación sistémica. Las funciones hipofisiarias pueden verse afectadas principalmente por padecimientos derivados de la presencia de tumores pituitarios benignos, llamados adenomas. Estos pueden ocasionar hipersecreción hormonal, disrupción de las funciones normales de la hipófisis; o afectaciones en estructuras cercanas (Hong y cols., 2016).

### *1.3. Eje Hipotálamo – Hipófisis - Gónadas*

La señalización comienza en el hipotálamo, el cual libera a la GnRH hacia la hipófisis a través del sistema porta-hipotálamo-hipofisario. En la hipófisis, la GnRH estimula la liberación de las gonadotropinas; es decir, de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH). Estas dos hormonas viajan por el

torrente sanguíneo hacia sus tejidos diana, principalmente las gónadas, en donde regularán procesos como el inicio de la pubertad, la síntesis y liberación de hormonas esteroides, la espermatogénesis en machos y la ovulación en las hembras. Parte de las hormonas esteroides gonadales son liberadas a la circulación sistémica, y en el hipotálamo o la hipófisis regulan el eje reproductivo de manera estimulante o inhibitoria (Plant, 2015) [Figura 1]. Existen condiciones patológicas que pueden modificar las funciones del eje reproductivo, como las alteraciones metabólicas que derivan en el sobrepeso y la obesidad (Tsatsanis y cols., 2015).



**Figura 1:** Esquema del eje hipotálamo – hipófisis - gónada. La señal de GnRH comienza en el hipotálamo, y pasa a través del sistema porta -hipotálamo-hipofisiario hacia la adenohipófisis. Ahí estimula la liberación de las gonadotropinas LH y FSH, las cuales a través del torrente sanguíneo llegan hasta sus tejidos diana en el ovario. En el ovario, las gonadotropinas participan estimulando el desarrollo folicular, la ovulación y la síntesis de hormonas esteroides. Después de la ovulación, las gonadotropinas estimulan la formación del cuerpo lúteo. Las hormonas esteroides y proteicas (inhibina y activina) producidas en el ovario regulan el eje a nivel hipotalámico. Hecho en BioRender por Eliseo Flores Sánchez

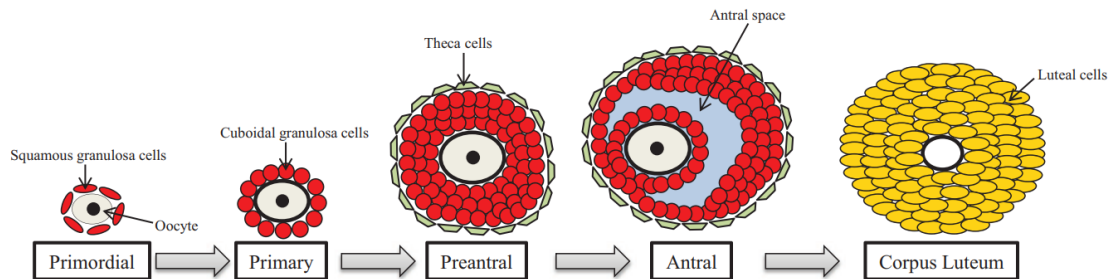
#### 1.4. Ovarios

El ovario es un órgano bilateral que se encuentra en la región abdominal en las hembras de los mamíferos, y ha sido de los más estudiados a la fecha. Los ovarios llevan a cabo tres funciones principales: producción de gametos femeninos, los ovocitos; la secreción de hormonas sexuales femeninas, principalmente estradiol y progesterona; y la secreción de inhibina y activina, las cuales están involucradas en la retroalimentación de liberación de FSH a nivel hipofisiario, disminuyendo su expresión (Robertson y cols., 2004). Para su estudio, el ovario se puede dividir en diferentes regiones. La parte más externa está formada por una capa densa de tejido conectivo llamada túnica albugínea. La parte interior, o estroma, se divide en la médula y en el córtex; es en este sitio en donde se encuentran los folículos (Martini y cols., 2012). Los folículos están formados por un ovocito, células de la granulosa, células de la teca, células del tejido intersticial, y es en estas estructuras en donde se lleva a cabo el proceso de esteroideogénesis ovárica. Los folículos pasan por diferentes etapas de crecimiento hasta llegar al folículo maduro.

##### 1.4.1. Foliculogénesis

En los humanos, la foliculogénesis comienza desde la etapa fetal, aproximadamente a los 4 meses de gestación (Baker, 1963; Baerwald y cols., 2012). Una vez que las células germinales primordiales dieron lugar a la formación de gónadas femeninas, éstas comienzan un proceso de proliferación, formando sincitios. Estos cúmulos entran en meiosis, pero son detenidos en el primer ciclo meiótico, para dar paso a los ovocitos. Luego, comienza la organización de las estructuras que van a formar los folículos primordiales. Los folículos primordiales consisten en un ovocito rodeado por células aplanadas epiteliales, llamadas células de la pre-granulosa. Muchos de los folículos primordiales no llegan a madurar, dejando sólo unos pocos para el crecimiento a folículos primarios (Pepling & Spradling, 2001). El cambio de folículos primordiales a folículos primarios está caracterizado por el cambio de células de forma aplanada a forma cuboidal, dando paso a las células de la granulosa (Gershon & Dekel, 2020).

Posteriormente, los folículos primarios pasan a ser folículos preantrales, los cuales ya están rodeados por varias capas de células de la granulosa. Este tipo de folículo presenta una nueva capa de células externa, que se denomina células de la teca. Es importante mencionar que esta primera etapa de folículos primordiales, pasando a folículos primarios es independiente de gonadotropinas (Gershon & Dekel, 2020). Una vez el antro aparece, los folículos pasan a denominarse folículos antrales, los cuales tienen una división de dos grupos de células de la granulosa: una rodeando directamente al ovocito; conocido como células del cúmulo, y otra en la periferia, en línea con la pared folicular. El estímulo de FSH provoca la proliferación de las células de la granulosa y el aumento considerable de receptores a LH. Finalmente, gracias al estímulo de las gonadotropinas; principalmente LH, el folículo pasa a ser un folículo preovulatorio o folículo de Graaf en mujeres, listo para la liberación del ovocito (Gershon & Dekel, 2020; Richards & Pangas, 2010) [Figura 2].



**Figura 2:** Desarrollo folicular, desde el folículo primordial a la formación del cuerpo lúteo. Modificada de (Hannon & Flaws, 2015)

#### 1.4.2. Ciclo Ovárico

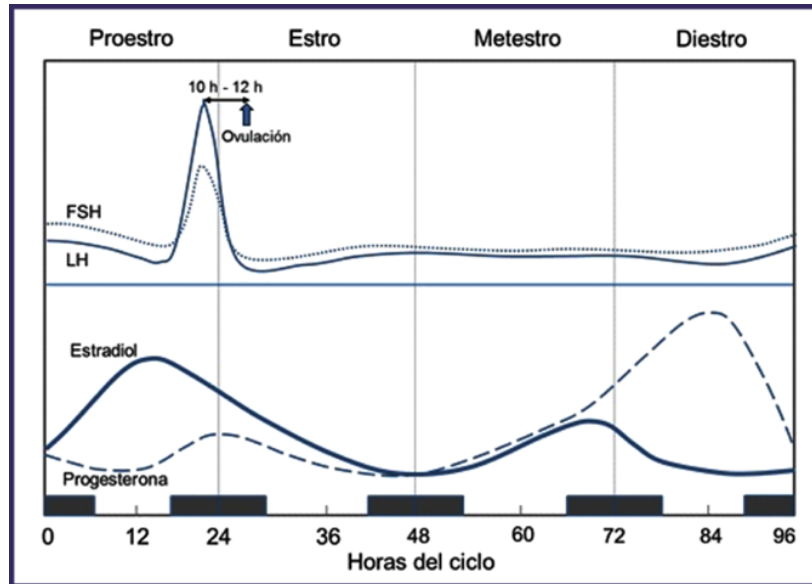
El ciclo ovárico está dividido principalmente en tres etapas: la etapa folicular, ovulación, y la etapa lútea (Zeleznik & Plant, 2015). En humanos, la fase folicular comienza desde el sangrado menstrual del ciclo anterior hasta la mitad de la duración del ciclo; y esta fase está caracterizada por la presencia de una alta concentración de FSH y una baja de LH, así como también de estradiol y progesterona. Alrededor de siete a diez días antes de la mitad del ciclo, la concentración de estradiol y de inhibina A comienzan a elevarse, mientras que la de FSH empieza a disminuir, preparando al folículo que va a ovular, cuya maduración tiene una duración cercana a dos semanas. Además, es en esta fase cuando, a

nivel uterino, el endometrio es estimulado para aumentar su proliferación celular gracias a la acción del estradiol producido por el folículo que está en desarrollo (Baird & Fraser, 1975; Zeleznik & Plant, 2015). Posteriormente, la fase folicular termina con un pico de liberación de LH y FSH; al mismo tiempo que se disminuye la producción de estradiol y de inhibina B a nivel del folículo. Todo esto provoca el rompimiento del folículo maduro y la inminente liberación del ovocito, dando lugar a la fase de ovulación; momento en el que es liberado un ovocito detenido en la metafase de la segunda división meiótica, el cual es liberado hacia el oviducto (Baker, 1963). Finalmente, la producción de progesterona se incrementa, lo que estimula que el folículo recién ovulado se convierta en un cuerpo lúteo, pasando así a la fase lútea. El aumento de progesterona producida por el cuerpo lúteo también prepara al endometrio para una posible implantación. En caso de no haber concepción, después de 14 a 16 días, el recubrimiento del endometrio se desprende y es desechado, provocando el sangrado menstrual, e iniciando el ciclo nuevamente (Zeleznik & Plant, 2015).

#### *1.4.3. Ciclo Estral*

Por otro lado, en el caso de los roedores, el ciclo estral se divide en cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y diestro. Por funciones prácticas y de acuerdo con el objetivo de la investigación, puede dividirse y clasificarse en tres etapas: proestro, estro y diestro. Por lo regular, las ratas comienzan a presentar ciclos una vez muestran apertura vaginal, lo cual ocurre dentro de los días 32 a 36 después del nacimiento (Goldman y cols., 2007). El ciclo estral en roedores puede medirse por medio de la citología vaginal obtenida mediante frotis. La apariencia de las células contenidas dentro de los frotis está relacionada con el estado de la mucosa vaginal, el útero y los ovarios, así como en las alteraciones de las concentraciones de hormonas a nivel sistémico (Goldman y cols., 2007). La fase del proestro puede compararse con la fase folicular en los humanos, pues se relaciona con un aumento en la concentración de estradiol; provocado por el aumento en la expresión de LH y FSH. Por su parte, el pico de liberación de FSH se relaciona con la ovulación, y una rápida disminución de estradiol se correlaciona con la fase del estro. Finalmente,

las fases de metaestro y de diestro se relaciona con la fase lútea en humanos, caracterizada por altas concentraciones de progesterona (Ajayi & Akhigbe, 2020) [Figura 3].

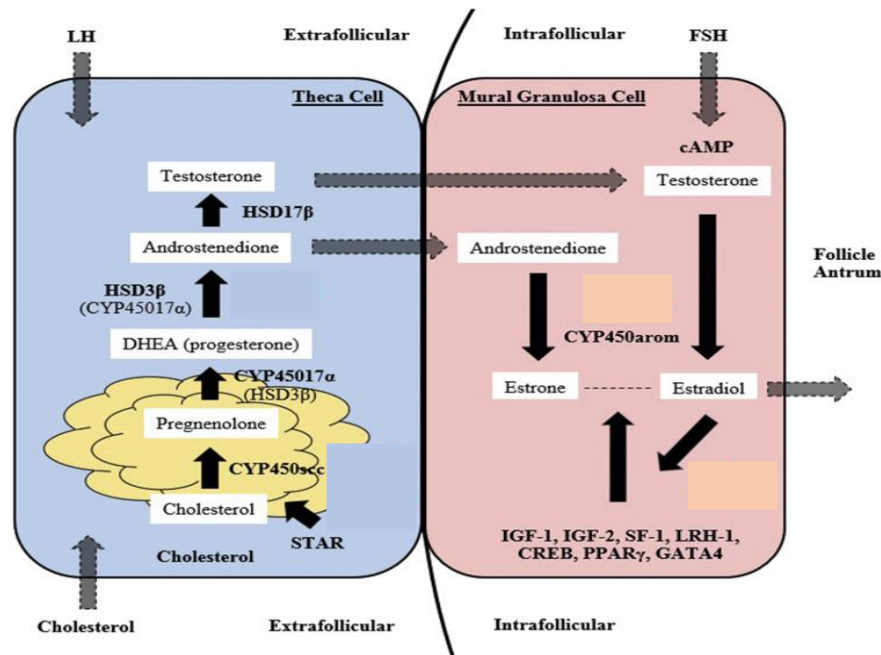


**Figura 3:** Gráfica que muestra las concentraciones de estradiol, progesterona, hormona luteinizante y hormona foliculoestimulante durante cada etapa del ciclo estral. (Modificada de Romero y cols., 2021)

#### 1.4.4. Esteroideogénesis

Otra de las funciones principales del ovario es la producción de hormonas esteroideas. El colesterol es el precursor, el cual ingresa al folículo; específicamente a las células de la teca, en donde gracias a la acción del complejo enzimático de escisión de la cadena lateral del colesterol, pasa a convertirse a pregnenolona. Este producto es transformado a progesterona por la enzima 17 $\alpha$ -hidroxilasa-17,20-desmolasa. Luego, se cataliza su conversión a androstenediona por la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Finalmente, androstenediona es convertida a testosterona por la acción catalizadora de la enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Todo el proceso dentro de las células de la teca es mediado por la acción de la LH (Bloom y cols., 2016).

La hormona FSH provoca que en las células de la granulosa aumente la expresión de la enzima citocromo P450 aromatasa, o aromatasa. La testosterona se trasporta desde las células de la teca a las de la granulosa, en donde por la acción catalizadora provocada por la aromatasa pasa a ser sintetizada en estradiol (Bloom y cols., 2016) [Figura 4].



**Figura 4:** Esquema de la ruta de síntesis de hormonas esteroideas a nivel folicular, junto con las enzimas involucradas. (Modificado de Bloom y cols., 2016)

### 1.5. *Obesidad*

La obesidad es una enfermedad que se define como la acumulación anormal o excesiva de grasa con potencial perjudicial para la salud. Por lo regular, la obesidad se desarrolla cuando la cantidad de energía obtenida de los alimentos es mayor al consumo energético del cuerpo (Caballero, 2019), sumado a los estilos de vida poco saludables (Felsó y cols., 2017; Friedenreich y cols., 2021). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, el índice de masa corporal (IMC) es un indicador que permite identificar el sobrepeso y la obesidad en adultos. Cuando el valor del IMC se encuentra en el intervalo de 25 a 29.9 el individuo se clasifica con sobrepeso, mientras que si el valor es igual o superior a 30 se clasifica con obesidad. La prevalencia de ambas condiciones se ha triplicado desde 1975 a nivel mundial, y las estimaciones indican que en 2016 cerca del 39% de la población adulta mundial tenía sobrepeso, y alrededor del 13% eran obesos (OMS, 2021). En el caso de las mujeres, la prevalencia de la obesidad ha aumentado del 6% al 15% en los últimos 40 años (Jaacks y cols., 2019). En México, la prevalencia del sobrepeso en la población adulta alcanza el 38.8%, mientras que la de la obesidad un 32.4%. En mujeres mexicanas adultas, la prevalencia del sobrepeso ronda el 35.5%, y de la obesidad un 37.5% (Barquera y cols., 2013).

La obesidad también está estrechamente relacionada con patologías que reducen considerablemente la calidad de vida de los pacientes, tales como enfermedades cardíacas y con alteraciones como intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina (RI), las cuales en muchos casos incrementan el riesgo a desarrollar diabetes tipo 2 (La Sala & Pontiroli, 2020).

### 1.6. *Glucosa*

La glucosa es una de las fuentes principales de energía para el organismo. Es una hexosa y una aldosa que se obtiene principalmente de los alimentos, aunque también es posible obtenerla mediante el proceso de gluconeogénesis en los momentos de inanición (Melkonian y cols., 2024). Es transportada por el torrente sanguíneo hacia el hígado, en donde, por acción del transportador GLUT 2, ingresa a los hepatocitos. En estas células es fosforilada por la glucocinasa para generar

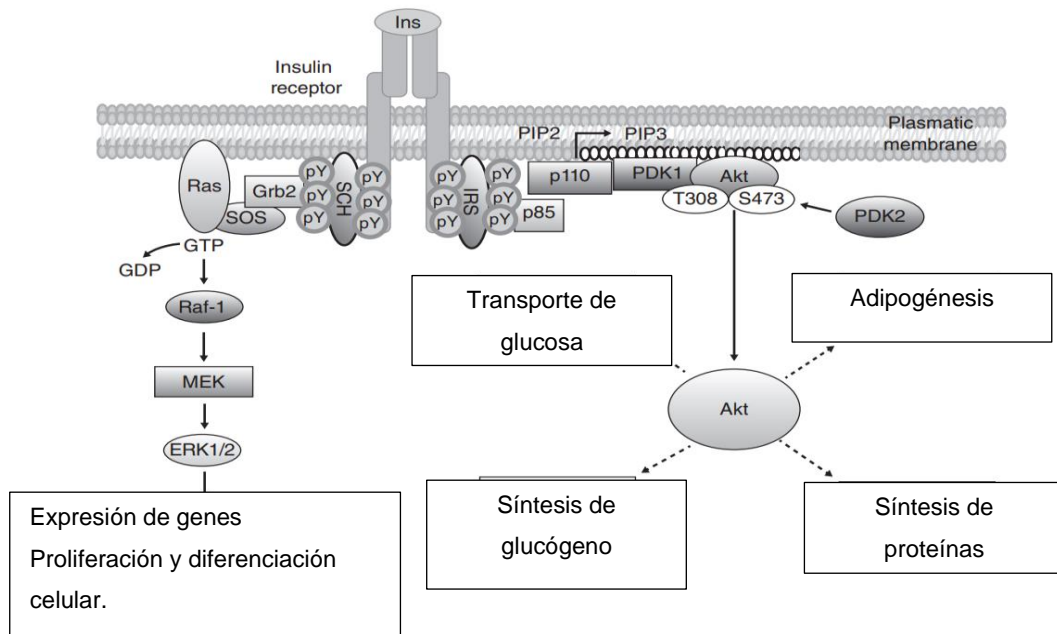
glucosa-6-fosfato (G6P). La G6P puede ser metabolizada mediante el proceso de glucólisis en piruvato, el cual entra posteriormente en el ciclo del ácido tricarboxílico para ser oxidado completamente a ATP. Si el organismo se encuentra en un estado de alimentación óptimo, la G6P se utiliza para la síntesis de glucógeno mediante la acción del glucógeno-sintasa en un proceso llamado glucogenogénesis, lo cual funciona como un reservorio energético. Por el contrario, si el organismo se encuentra en un estado de ayuno, las reservas de glucógeno son utilizados para la síntesis de glucosa gracias a la acción de la glucógeno-fosforilasa en un proceso llamado glucogenólisis. Ambas enzimas (glucógeno-sintasa y glucógeno-fosforilasa) pueden ser desfosforiladas por la proteína fosfatasa 1 (Rui, 2014). El G6P funciona como inhibidor alostérico de la glucógeno-fosforilasa y un activador alostérico de la glucógeno-sintasa, incrementado así la concentración de glucógeno en el hígado (Agius, 2008).

Otra molécula que participa en la regulación es la glucógeno-sintasa-cinasa-3 (GSK-3), la cual fosforila a glucógeno-sintasa inhibiendo su actividad; y fosforila al glucógeno-fosforilasa, incrementando la glucogenólisis (Rui, 2014). La insulina participa en la regulación de estas dos actividades, pues su acción a través de la vía de PI3K/Akt inhibe a GSK-3, incrementando la síntesis de glucógeno. También promueve la desfosforilación e inhibición del glucógeno-fosforilasa mediada por la proteína fosfatasa 1, suprimiendo así la glucogenólisis (T. Zhang y cols., 2012). El suministro energético es de suma importancia para que los tejidos del cuerpo puedan llevar a cabo sus funciones de manera correcta, incluyendo órganos tan energéticamente dinámicos como los ovarios.

### 1.7. *Insulina*

La insulina es una hormona peptídica anabólica clave en muchas funciones. Es sintetizada en las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans en el páncreas. Tiene un efecto contrario a la del glucagón, pues es la responsable de promover el almacenamiento de reservorios energéticos y permite el aprovechamiento de la glucosa sanguínea por parte de las células. Está encargada de controlar el metabolismo de carbohidratos, proteínas y grasas por medio de sus acciones. Las

células  $\beta$  de los islotes pancreáticos producen insulina en respuesta a un aumento en la concentración de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos en la sangre (Campbell & Newgard, 2021). Se trata de un dipéptido codificado por el gen *INS* (*ins1* y *ins2* en roedores) ubicado en el cromosoma 11 tanto de humanos como roedores.; y su expresión está regulada por las concentraciones de glucosa y señales autocrinas de insulina (Tokarz y cols., 2018). La insulina lleva a cabo sus funciones por la unión al receptor de insulina (IR), el cual está ubicado en la membrana celular. El IR pertenece a la familia de los receptores de tirosina-cinasa (RTK), con una estructura homotetramérica, pues está compuesto por dos subunidades  $\alpha$  extracelulares y dos  $\beta$  intracelulares (Hubbard, 2013). Cuando la insulina se une a su receptor, este es inducido a un cambio conformacional, permitiendo la autofosforilación de residuos de tirosina en las subunidades  $\beta$ , sirviendo como sitios de unión al sustrato de receptor de insulina (IRS). Después, puede ejercer su acción a través de dos vías principales de señalización: la vía del fosfoinositol-3-cinasa (PI3K/Akt) y la vía de cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Taniguchi y cols., 2006) [Figura 5].



**Figura 5:** Las dos principales vías de la señalización de la Insulina. Modificada de (Gutiérrez-Rodelo, Roura-Guiberna, & Olivares-Reyes, 2017)

En la vía de las MAPK, una vez que la insulina se une a su receptor, se da una asociación de la proteína Shc, la cual une al complejo Grb2/SOS. Este complejo

activa GTP-Ras, el cual se une a su vez a Raf – 1, cuya fosforilación recluta a MEK, ERK1 y ERK2. Para la vía PI3K, la cual es la principal mediante la cual la insulina brinda la mayoría de sus funciones, la unión entre IRS – 1 y el PI3K y su activación consecuente favorece la conversión del sustrato fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). La PIP3 impulsa la activación de la proteína cinasa B (PKB/Akt), la cual favorece y activa diversas acciones dependiendo de los mecanismos activados en consecuencia, incluyendo el ingreso y transporte de la glucosa en la célula, pues favorece la translocación de los transportadores de glucosa (GLUTs; siendo GLUT-4 el principal dependiente de insulina) (Yaribeygi y cols., 2019).

### *1.8. Resistencia a la insulina*

Cuando esta vía celular se ve alterada, principalmente a nivel del IRS, se puede presentar Resistencia a la Insulina (RI) (Samuel & Shulman, 2016), la cual puede definirse como un estado metabólico en la que las células no pueden aprovechar las funciones proporcionadas por la hormona. Esta condición trae consigo una hiperinsulinemia compensatoria, en dónde los islotes de Langerhans producen una mayor cantidad de insulina. El método más utilizado para el establecimiento de la RI es el clamp euglucémico-hiperinsulinémico, el cual es una medición de la toma de glucosa periférica en condiciones de hiperinsulinemia (DeFronzo y cols., 1979), pero debido a los costos elevados y a su complejidad existen otros métodos más accesibles, como el índice del modelo homeostático para la evaluación de la resistencia a la insulina (HOMA-IR). El HOMA-IR considera la relación existente entre las concentraciones de glucosa e insulina sanguíneas (Matthews y cols., 1985). Sin embargo, un método que ha tenido especial atención debido a que no es necesario conocer la concentración de insulina para calcularlo es el índice de triglicéridos y glucosa (ITG), ya que la resistencia a la insulina también tiene afectaciones en la oxidación de los ácidos grasos (Kelley, 2002). Se ha demostrado que la especificidad de dicho índice puede llegar a ser bastante cercana a la del clamp euglucémico-hiperinsulinémico (Guerrero-Romero y cols., 2010), lo que contribuye a considerarlo como una herramienta competente para la detección de

RI. Dentro de los tratamientos para contrarrestar la RI se encuentra el uso de los sensibilizadores a la insulina, como la metformina (Kirpichnikov y cols., 2002).

### 1.9. *Metformina*

Dimetilbigunida, o metformina (MET) es una biguanida oral que tiene origen en la lila francesa, o *Galega officinalis* y forma parte del grupo de los sensibilizadores a la insulina. Es utilizada para el tratamiento de RI e hiperglucemia en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 desde 1957 (Bailey, 2017; Rojas & Gomes, 2013) y fue catalogada en 2011 como un medicamento esencial por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2023). Se sabe que mejora la utilización de insulina en los tejidos periféricos, y no causa ni hiperinsulinemia ni hipoglucemia, pues su principal método de acción es la interrupción de la síntesis de glucosa en el hígado (gluconeogénesis) (American Diabetes Association, 2019). También se ha reportado que MET podría tener relación con cambios en el microbiota intestinal y en la absorción de glucosa a nivel de este órgano (McCreight y cols., 2016).

La dosis de MET prescrita para pacientes diabéticos es de 1 a 2 gramos al día, o un aproximado de 20mg/kg por día, lo que significa una concentración de MET de entre 10 $\mu$ M a 40 $\mu$ M en plasma (Kajbaf y cols., 2016; Lamoia & Shulman, 2021). La MET utiliza transportadores especializados para atravesar la membrana plasmática de las células en los tejidos diana. Se ha reportado que MET utiliza al transportador de cationes orgánico 1 y 3 (OCT1, OCT3), y del transportador de multifármacos y extrusión de toxinas 1 (MATE1); los cuales están mayormente expresados en el hígado, los riñones y en el intestino delgado (Graham y cols., 2011; Jakobsen y cols., 2016).

### 1.10. *Síndrome de Ovario Poliquístico*

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es uno de los desórdenes endócrinos y metabólicos más comunes en mujeres en edad reproductiva (Rosenfield, 2020). Algunos autores han sugerido que el síndrome se desarrolla en mujeres que tienen predisposición genética a desarrollarlo (Vink y cols., 2006). Se han identificado que, en algunas mujeres, las características del síndrome empiezan a desarrollarse

desde la adolescencia (Barber & Franks, 2021). Se estima que su prevalencia a nivel mundial es de casi el 10% (Lizneva y cols., 2016). Por su parte, la prevalencia de SOP entre mujeres mexicanas alcanza el 6% (Moran y cols., 2010). Se considera que el SOP podría ser la principal causa de la infertilidad anovulatoria en mujeres (Gluszak y cols., 2012). Las pacientes con SOP desarrollan características y alteraciones heterogéneas que incluyen hiperandrogenismo, asociado con hirsutismo o acné; irregularidad menstrual y formación de quistes ováricos (Azziz, 2018).

Existen tres criterios para diagnosticar SOP: los criterios del National Institutes of Health (NIH) de 1990, los criterios de Rotterdam del 2003 y los del Androgen Excess & PCOS Society del 2006, los cuales en conjunto han aportado diferentes fenotipos de SOP (Lizneva y cols., 2016). De acuerdo con un consenso del NIH en el 2012, se recomendó la utilización de los criterios de Rotterdam 2003 tomando en cuenta a los 4 fenotipos descritos (Johnson y cols., 2012). Dichos fenotipos se clasifican de acuerdo con las características que los conforman en: el fenotipo A; referido como fenotipo “completo” (incluye hiperandrogenismo, oligo-anovulación y quistes ováricos), el fenotipo B (agrupa hiperandrogenismo y oligo-anovulación, dejando fuera a los quistes ováricos), el fenotipo C (con hiperandrogenismo y quistes ováricos, excluyendo la oligo-anovulación), y el fenotipo D (que considera oligo-anovulación y quistes ováricos, pero sin hiperandrogenismo) (Azziz, 2018). Una alteración metabólica, que se suele presentar y que no forman parte de los criterios de diagnóstico, es la RI, pues cerca del 75% de las pacientes con SOP la presentan (Tosi y cols., 2017).

No se sabe demasiado acerca de la asociación que existe entre la obesidad, el SOP, las alteraciones metabólicas y la disfunción ovárica, por lo que el presente proyecto tiene como finalidad analizar dicha asociación, utilizando a la rata hembra Zucker *fa/fa*; la cual desarrolla alteraciones relacionadas con el SOP, como obesidad, oligo – anovulación, y RI. Así mismo se buscó analizar si en este modelo, el uso de un sensibilizador a la insulina, como la metformina, es eficaz para aminorar dichas alteraciones.

## **2. Antecedentes**

### *2.1. Relación glucosa - ovario*

La relación entre las funciones mediadas por el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal y el estado de las reservas energéticas en el cuerpo se ha estudiado de manera habitual. Una relación en la que se ha prestado bastante atención es con la glucosa. Al ser hidrofílica, la glucosa no puede traspasar la membrana plasmática, por lo que se apoya de transportadores GLUT (Wood & Trayhurn, 2003). Kodaman y Behrman observaron que en el ovario de rata se expresaba los ARNm de los transportadores GLUT 1, 3 y 4 (Kodaman & Behrman, 1999). También se ha visto que células de la granulosa de pacientes con SOP expresan GLUT 1, 3, 5, 8 y 13 de manera constitutiva, y curiosamente GLUT 6 se expresa mayormente en las células de la granulosa de pacientes con un índice de RI mayor (Kim y cols., 2014). Otros estudios han demostrado la presencia de glucosa en el líquido folicular de varias especies, siendo una fuente de energía importante para el desarrollo y crecimiento de los folículos. La glucosa es un sustrato importante para la generación de ATP, y en el ovario favorece el desarrollo de los folículos y su maduración, la ovulación y la posterior formación y mantenimiento del cuerpo lúteo (Dupont & Scaramuzzi, 2016). También la glucosa es importante para el mantenimiento y la calidad de los ovocitos (Sutton-McDowall y cols., 2010). Además de ser una fuente de energía, hay estudios que indican que la glucosa también podría funcionar como una molécula de señalización. Por ejemplo, en algunas especies, la falta de glucosa disminuye la expresión de LH a nivel hipofisario (Wade & Schneider, 1996). Existen dos vías de señalización que podrían estar participando como mecanismos de señalización para la glucosa en las células foliculares: AMPK y la vía de la hexosamina (Dupont y cols., 2014).

### *2.2. Relación insulina – ovario*

Las vías de señalización por medio de las cuales la insulina lleva a cabo sus funciones se han estudiado mayormente en tejidos del músculo, el hígado y tejido adiposo, y se postula que la mayoría de estos mecanismos también participan en el

ovario (Dupont & Scaramuzzi, 2016). Aunque en un principio se sugirió que la insulina tendría funciones similares a las de las gonadotropinas en el ovario (Poretsky & Kalin, 1987), se piensa ahora que dichas funciones son el resultado de interacciones en segundos mensajeros específicos dentro de sus mismas vías de señalización, como Akt o MAPK (Taniguchi y cols., 2006). También, se ha encontrado la expresión del receptor de insulina en células de la granulosa y de la teca (el-Roeiy y cols., 1994; Samoto y cols., 1993), aunque su presencia no parece ser necesaria para el crecimiento, diferenciación y maduración de los ovocitos (Pitetti y cols., 2009). Hay una discrepancia entre los resultados de experimentos *in vivo* e *in vitro* del papel de la insulina en el ovario con respecto a la esterodogénesis, pues mientras que en los estudios *in vivo* parece ser que la insulina inhibe la secreción ovárica de estradiol (E2) (Maruthini y cols., 2014); en trabajos *in vitro* estimula dicha secreción (Scaramuzzi y cols., 2015). Dentro de las vías de señalización de la insulina que participan en la regulación de la foliculogénesis, la vía del PI3K/Akt parece ser la principal reguladora independiente de gonadotropinas de la diferenciación, crecimiento y supervivencia de los folículos (Canipari y cols., 2012).

### 2.3. *Síndrome de Ovario Poliquístico y Resistencia a Insulina*

La RI está presente en la mayoría de los casos de pacientes con SOP. Se trata de una característica que no está incluida en los criterios de diagnóstico, pero cerca del 75% de las mujeres con SOP la presentan (Tosi y cols., 2017). Aun cuando la fisiopatología del SOP todavía no está bien establecida, hay evidencia de que la RI, junto con el hiperandrogenismo, tiene un papel importante en su etiología (Teede y cols., 2010). Por ejemplo, existen estudios que muestran que la insulina podría actuar de manera sinérgica con la hormona luteinizante, estimulando la producción de andrógenos en las células de la teca y agravando aún más el hiperandrogenismo (Azziz, 2018). En un metaanálisis realizado por Cassar y cols., se expuso que las mujeres con SOP presentaban una reducción de casi el 27% en la sensibilidad a la insulina, como medida para representar a la RI, independientemente del índice de masa corporal, la edad o los criterios de diagnóstico (Cassar y cols., 2016). Los

mecanismos moleculares involucrados en la RI y su asociación con el SOP no son del todo claros. Dunaif y cols; quienes trabajaron con cultivos celulares de fibroblastos y de células del musculo esquelético de pacientes con SOP, mostraron evidencia de un incremento anormal de la fosforilación de serina, además de una reducción en la fosforilación de tirosina en los receptores de insulina, así como en su sustrato IRS-1. Sin embargo, dado que solamente la mitad de las muestras presentaron dichas alteraciones, se sugirió una heterogeneidad en los mecanismos moleculares que pueden estar involucrados en esta asociación (Dunaif y cols., 1995).

#### *2.4. Uso de metformina en SOP*

Algunas evidencias clínicas han mostrado que mujeres con SOP tratadas con MET presentan una mejora en las características propias del síndrome (Nardo & Rai, 2001; Penzias y cols., 2017). En un estudio con ratas Sprague-Dawley inducidas a SOP con valerato de estradiol, la administración del tratamiento con metformina y pioglitazona disminuyó considerablemente la concentración de testosterona y folículos quísticos, además de la disminución de la concentración de insulina en la etapa de ayunas; posiblemente debido a la regulación de la vía de señalización AMPK/PI3K/JNK (Wu y cols., 2018). En otro experimento realizado por Zhang y cols. en el cual se utilizaron ratas Sprague-Dawley inducidas a SOP con letrozol, el tratamiento con metformina junto con Diane-35; el cual es un anticonceptivo utilizado en el tratamiento de SOP debido a que reduce la síntesis de andrógenos; también disminuye las características asociadas al síndrome, posiblemente por la regulación de la vía de la glucólisis (S. Zhang y cols., 2020). Tao y cols. usaron ratas Wistar con dehidroepiandrosterona como modelo de SOP, a las cuales les administraron metformina y exenatida para aminorar las características del síndrome. Sus resultados sugirieron que un posible mecanismo molecular mediante el cual la RI estaría participando en el SOP es por medio de la vía de AMPK-SIRT1 (Tao y cols., 2019).

## 2.5. *La Rata Zucker hembra como modelo de estudio*

La rata Zucker es un modelo animal muy utilizado para el estudio de la obesidad y la diabetes. Presenta un fenotipo delgado y uno obeso. Las ratas Zucker obesas tienen una mutación en el receptor de leptina (LEP-R), dada por una mutación homocigota en el alelo *fa/fa* lo que induce a hiperfagia, provocando obesidad desde las 4 semanas de vida (Zucker & Antoniades, 1972).

La leptina es una hormona peptídica liberada por los adipocitos del tejido graso blanco, y su concentración sistémica es dependiente de la cantidad de grasa acumulada en el organismo y del estado nutricional del mismo (Obradovic y cols., 2021), pues cuando un organismo se encuentra en ayuno o con restricción energética, la concentración de leptina se encuentra disminuida, pero la concentración aumenta cuando el organismo pasa a un estado de saciedad o de sobrealimentación (Boden y cols., 1996; Kolaczynski y cols., 1996; Obradovic y cols., 2021). La leptina actúa a nivel hipotalámico, a través de la unión con su receptor LEP-R mayormente expresado en el núcleo arcuato, dorsomedial, ventromedial y premamilar en el hipotálamo (Fruhwrth y cols., 2018; Saper & Lowell, 2014), y la acción de esta hormona se da principalmente a través de la interacción con el sistema de melanocortina; aunque también actúa sobre un segundo grupo neuronal en la parte medial del núcleo arcuato, inhibiendo la expresión de moléculas como la proteína relacionada con agutí (AgRP), GABA y neuropéptido Y (NPY).

Las neuronas del sistema de melanocortina liberan pro-opiomelanocortina (POMC), el cual es precursor de hormonas como la hormona estimulante de melanocitos  $\alpha$  ( $\alpha$ -MSH) o  $\beta$ -endorfina, y  $\alpha$ -MSH estimula al receptor de melanocortina 4 (MC4R). Las neuronas de AgRP y POMC proyectan hacia las mismas áreas, y su expresión tiene un efecto contrario en el organismo, pues AgRP es un agonista del receptor MC4R; por lo que actúan de manera coordinada de acuerdo con la cantidad de leptina disponible en el organismo. Cuando la concentración de leptina es baja, y/o el organismo se encuentra en un estado de ayuno, la expresión de AgRP está aumentada y la de POMC está disminuida, lo que estimula de manera dramática el hambre y disminuye el gasto energético. Por otro lado, cuando la concentración de

leptina es alta, y/o el organismo se encuentra en un estado de saciedad, se disminuye la expresión de AgRP, aumenta la de POMC, y se provoca una atenuación del hambre y un aumento en el gasto energético (Saper & Lowell, 2014). Las ratas hembra Zucker obesas presentan otras alteraciones metabólicas como hiperinsulinemia e hiperlipemia (Srinivasan & Ramarao, 2007), además de presentar hipertensión (Kurtz y cols., 1989). También, desarrollan RI e intolerancia a la glucosa entre las 3 y 8 semanas de vida. Las ratas hembra Zucker obesas presentan alteraciones reproductivas, como retraso en el inicio de la pubertad, un desarrollo folicular escaso, útero poco desarrollado, comportamiento sexual atenuado, ovulación irregular o interrumpida, e infertilidad (Honma y cols., 2010; Puga y Colmenares y cols., 2021). Estas ratas hembra Zucker presentan un aumento en la expresión de tirosina hidroxilasa a nivel ovárico (Puga y Colmenares y cols., 2021). Las señales del sistema nervioso simpático se han asociado con el estado nutricional y con la obesidad, y un incremento en la actividad simpática podría permitir el desarrollo de deficiencias metabólicas y energéticas, como la RI (Lambert y cols., 2019). Puga y Colmenares y col. reportaron que las ratas hembra Zucker obesas son propensas a desarrollar prequistes y quistes ováricos, además de no presentar ovulación en el primer estro vaginal; características que se vieron contrarrestadas por la sección unilateral del nervio ovárico superior, el cual es el que brinda señales simpáticas al ovario para regular sus funciones, reforzando la idea de que las señales simpáticas están participando en la regulación y la consecuente alteración que trae consigo la aparición de las características propias del SOP (Puga y Colmenares y cols., 2021).

### **3. Justificación**

El Síndrome de Ovario Poliquístico es el más común, complejo y heterogéneo desorden endocrino y metabólico en mujeres en edad reproductiva. La severidad de los síntomas varía dependiendo de cada paciente. Las mujeres con el síndrome presentan una amplia variedad de alteraciones que dificultan el tratamiento preciso de su condición. Un alto porcentaje de mujeres con SOP presenta alteraciones en el metabolismo de la insulina, de los lípidos y de la glucosa. Las alteraciones hormonales y metabólicas del SOP resultan en disminución de la capacidad

reproductiva, alteración de los ciclos menstruales, anovulación crónica e infertilidad, y la obesidad es un factor que puede empeorar esta condición, por lo que es importante diseñar modelos experimentales que permitan analizar su implicación en el síndrome. Evidencia clínica ha mostrado que la administración de MET en pacientes con SOP mejora algunas características del síndrome, por lo que en el presente estudio se analizaron los efectos del tratamiento con MET en el modelo de la rata Zucker obesa *fa/fa*; la cual presenta alteraciones tanto metabólicas como reproductivas similares a las del SOP. La administración del fármaco se realizó por vía intragástrica y de manera subaguda a partir de los 45 días de vida y se analizaron los efectos sobre la ovulación y la morfología ovárica a los 60 días de vida.

#### **4. Hipótesis**

Si en la rata hembra Zucker *fa/fa*, la anovulación y el desarrollo de características vinculadas al síndrome de ovario poliquístico son el resultado de un desbalance en la homeostasis de la señal de insulina, entonces el tratamiento subagudo con metformina resultará en una mejora en el metabolismo y en los parámetros reproductivos.

#### **5. Objetivos**

##### *5.1. Objetivo General*

Analizar los efectos del tratamiento subagudo con metformina (150 mg/kg de peso corporal) sobre el desarrollo de características vinculadas al SOP en la rata hembra Zucker *fa/fa*.

##### *5.2. Objetivos Particulares*

Analizar en el modelo de la rata obesa Zucker *fa/fa*, el efecto del tratamiento con metformina sobre:

- La ciclicidad estral.
- La concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol.
- El Índice Triglicéridos - Glucosa

- La morfología ovárica.
- La población folicular.

## 6. Material y métodos

### 6.1. *Animales*

Se utilizaron un total de 48 ratas hembra Zucker de 40 días de edad proporcionadas por el Bioterio Claude-Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla [Figura 6B]. Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de luz-oscuridad de 12 h y temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , con acceso a alimento y agua a libre demanda; además de manejadas con estricto apego a la Norma Oficial Mexicana sobre el cuidado y uso de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999 (Secretaría de Agricultura, 2001). Todos los experimentos fueron aprobados de acuerdo con las especificaciones del Comité de Uso de Animales de Laboratorio de la BUAP con número de aprobación VIEP/0909/2021. Los experimentos fueron realizados garantizando el uso mínimo de animales, así como la refinación de los tratamientos para disminuir lo máximo posible el sufrimiento de los organismos.

### 6.2. *Diseño Experimental*

Los animales fueron distribuidos en los siguientes grupos [Figura 6A]:

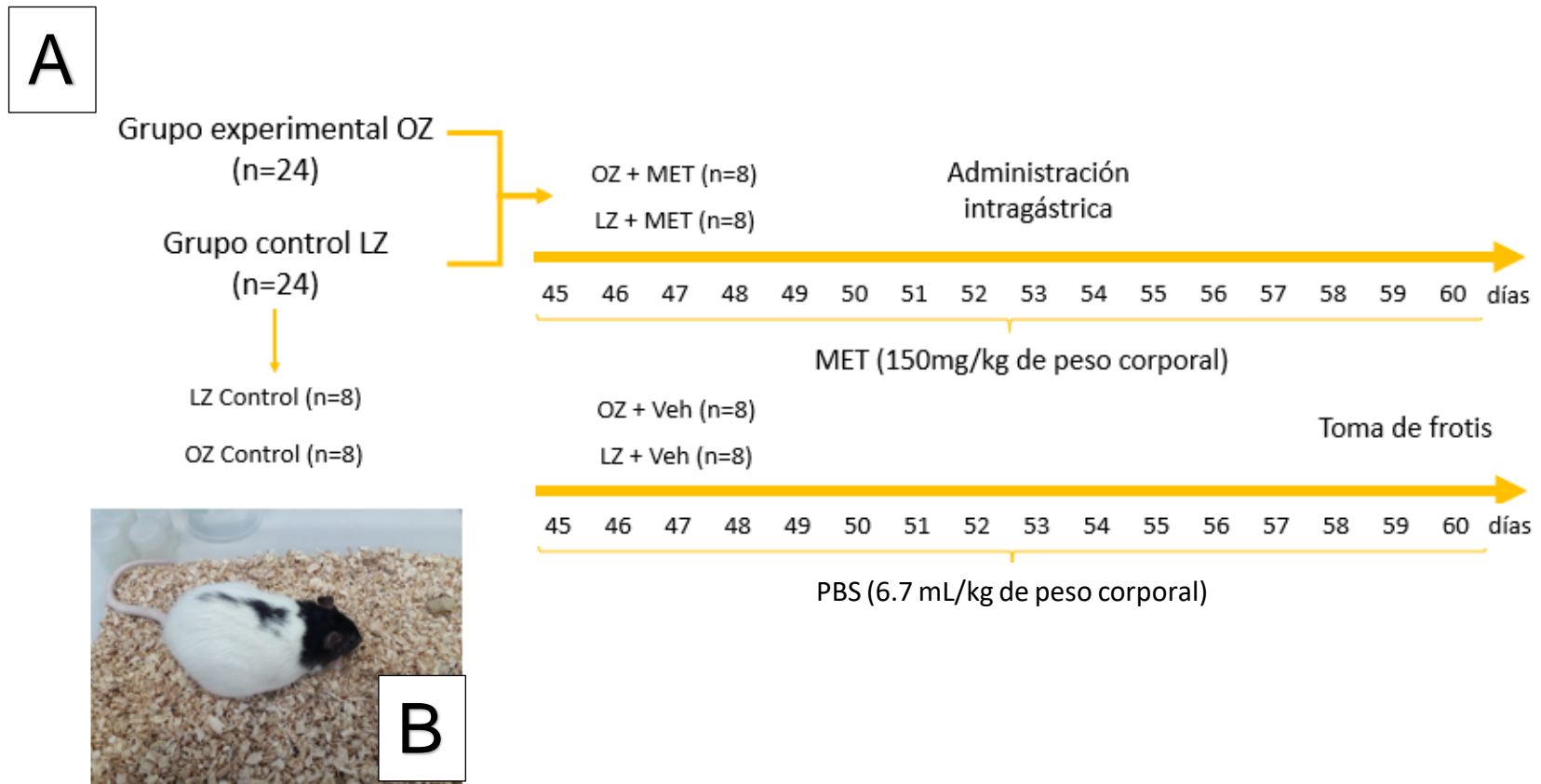
- Grupo de ratas obesas, formado por ratas hembra Zucker *fa/fa* (n=24).
- Grupo de ratas delgadas, conformado por ratas hembra Zucker *fa/-* (n=24).

El grupo de ratas obesas se dividió de manera aleatoria en 3 subgrupos:

- Grupo tratamiento (OZ MET), formado por Zucker *fa/fa* tratadas con metformina (n=8).
- Grupo vehículo (OZ PBS), formado por Zucker *fa/fa* administradas con PBS (n=8).
- Grupo control absoluto (OZ Ctrl), conformado por Zucker *fa/fa* sin ningún tipo de administración (n=8).

Por otro lado, el grupo de ratas delgadas fue dividido aleatoriamente en 3 subgrupos:

- Grupo control con MET (LZ MET), con individuos Zucker *fa/-* con administración de metformina (n=8).
- Grupo vehículo (LZ PBS), conformado por Zucker *fa/-* administradas con PBS (n=8).
- Grupo control absoluto (LZ Ctrl), con Zucker *fa/-* sin administración alguna (n=8).



**Figura 6:** A: Esquema del diseño experimental. Se utilizaron un total de 48 animales, 24 obesos y 24 delgados, los cuales fueron subdivididos en 3 grupos. Control absoluto, vehículo y tratamiento con MET. y B: Fotografía de un organismo obeso en condiciones de bioterio.

### 6.3. *Tratamiento con metformina*

La MET se diluyó en buffer de fosfatos (PBS) pH 7.4 y se administró a las ratas de tratamiento en una dosis de 150mg/kg de peso corporal vía oral con una sonda intragástrica entre las 8:00 horas y 9:00 horas durante 15 días continuos. El tratamiento comenzó a los 45 días de edad. A los grupos de vehículo se les administró únicamente con PBS (a partir de 1 mL, volumen de la administración dependiendo del peso corporal) durante el mismo periodo, mediante la misma vía y en el mismo horario. Se mantuvo un registro constante del peso corporal durante la duración de todo el tratamiento con una báscula, además de la toma del frotis vaginal para un seguimiento del ciclo estral

### 6.4. *Registro de Ciclicidad*

Al inicio del experimento, las ratas fueron examinadas para verificar que presentaran apertura vaginal. Cuando la apertura fue evidente, se tomó diariamente un frotis vaginal a cada animal de cada grupo durante las dos semanas de duración del tratamiento entre las 8:00 horas y las 9:00 horas y hasta que fue el momento de las pruebas de tolerancia a la glucosa. Posteriormente, se dejó una semana de descanso a los animales, y se retomó el registro de la ciclicidad durante tres ciclos completos más. Un ciclo estral completo consiste en el registro de las cuatro etapas continuas en cuatro días diferentes; es decir, estro, diestro 1, diestro 2 y proestro.

### 6.5. *Toma de peso y parámetros zoométricos*

Para la determinación del fenotipo obeso, todos los animales se pesaron al momento de la eutanasia; y se midió el perímetro de la cintura, así como la longitud total (de la punta de la nariz a la punta de la cola) y la longitud naso-anal (de la punta de la nariz al inicio de la cola) de cada individuo, con una cinta métrica.

### 6.6. *Prueba de tolerancia a la glucosa*

En el día 60 de edad, se dejó a los animales en un periodo de ayuno de 2 horas. Una vez transcurrido el tiempo de ayuno la mitad de los animales de cada grupo experimental fueron sometidos a una prueba de tolerancia a la glucosa (n=4). Para llevar a cabo esta

acción se tomó con cuidado a cada animal y con ayuda de una lanceta estéril se realizó una punción en la punta de la cola con la finalidad de obtener muestras de sangre para realizar una curva de tolerancia a la glucosa de 120 minutos. La primera muestra de sangre que se obtuvo se utilizó para determinar la concentración de glucosa basal, inmediatamente se procedió a administrar por vía intraperitoneal una solución saturada de glucosa 3M diluida en PBS con una dosis de 2 mg/kg y se volvió a tomar muestras de sangre a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración de la solución de glucosa.

#### *6.7. Prueba de tolerancia a la insulina*

Para comprobar los efectos de la metformina sobre la RI en los organismos al finalizar el tratamiento, se realizó una prueba de tolerancia a la insulina a la otra mitad de los animales de cada grupo experimental. El día del sacrificio, los organismos fueron puestos en ayuno durante 2 y 3 horas, después se realizó la administración de una dosis de insulina de 0.5 UI/kg diluido en PBS vía intraperitoneal, y se midió la glicemia por punción en la cola y con un glucómetro. Se tomaron los registros de glucosa en sangre a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración. Con los datos, se obtuvo una curva de respuesta de 120 min de acuerdo con la metodología de Bazzano y cols. (Bazzano y cols., 2017).

#### *6.8. Sacrificio y obtención de tejidos*

Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico (concentración de 63 mg/mL, a una dosis de 0.20 mL/100 g de peso corporal) administrado vía intraperitoneal después de terminar el registro de la ciclicidad estral. Se obtuvieron los ovarios, el útero y las glándulas adrenales, los cuales se pesaron con una balanza analítica. Después se obtuvieron los pesos relativos de los órganos en cada organismo, calculado como el producto del peso del órgano multiplicado por 100, dividido entre el peso corporal.

#### 6.9. *Obtención de muestras sanguíneas para medición de glucosa, colesterol, triglicéridos y testosterona*

En el momento del sacrificio se obtuvieron muestras de sangre mediante punción cardiaca. La sangre se dejó coagular durante 30 minutos, se centrifugó a 3400 rpm durante 15 minutos. El suero obtenido se almacenó en tubos Eppendorf a -20°C. La concentración de glucosa, colesterol y triglicéridos se determinó mediante un análisis fotométrico, empleando reactivos de la marca MEXLAB®. Para la cuantificación de la concentración de las muestras se hicieron tres mediciones de éstas. La concentración de testosterona e insulina se obtuvieron mediante el uso de un kit comercial ELISA de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

#### 6.10. *Obtención del índice Triglicéridos - Glucosa como indicativo de Resistencia a la Insulina*

Para medir la RI se utilizó el índice de triglicéridos – glucosa (ITG), el cual es un buen predictor para este parámetro (Simental-Mendía y cols., 2008; Vineetha K Ramdas Nayak y cols., 2022). Dicho índice se calculó como:

$$ITG = \frac{\ln[TG(\text{mg/dL}) \cdot G(\text{mg/dL})]}{2}$$

Donde TG es la concentración de triglicéridos en suero, y G la de glucosa sérica. Se consideraron a los valores por encima del tercer cuartil de los datos como resistencia a la insulina, es decir, en nuestro estudio  $ITG \geq 9.55$

#### 6.11. *Evaluación de morfología ovárica*

Los ovarios fueron fijados en solución Bouin durante 24 h, posteriormente fueron deshidratados con baños de alcohol en concentraciones crecientes (70 %, 96 %, 100%), y finalmente fueron incluidos en parafina. Se obtuvieron cortes seriados de 10 µm de grosor con un microtomo, los cuales fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Con el microscopio óptico, se realizó el conteo de cuerpos lúteos como indicativos de ovulación. Además, se realizó el conteo de quistes y prequistes ováricos. Las estructuras quísticas se clasificaron de acuerdo con los criterios de Brawer de 1986, siendo determinado un quiste folicular como un folículo sin ovocito, con una cavidad antral grande, una capa

gruesa de células de la teca y un compartimiento de células de la granulosa delgado (por lo regular en monocapa) con células aparentemente sanas contenidas; y un folículo prequístico como un folículo grande con o sin ovocito, formados por cuatro o cinco capas de células de la granulosa pequeñas y núcleo densamente empaquetado, rodeando un antro grande, con un compartimiento de células de la teca aparentemente normal (Brawer y cols., 1986).

#### *6.12. Evaluación de la población folicular*

Se realizó un estudio de la población folicular en los cortes del ovario derecho e izquierdo de tres animales de cada grupo tomados al azar. Se tomaron fotografías cada 100  $\mu\text{m}$  utilizando una cámara Nikon D3500 acoplada a un microscopio de fluorescencia. Posteriormente, fueron analizadas con el software Image J (versión 1.54d). Se midieron sólo los folículos que presentaron ovocito. Se midieron utilizando dos líneas para medir dos diámetros, además de cuatro líneas a cada lado para medir el grosor de la capa de las células de la granulosa, como se ejemplifica en la **Figura 7**. Los folículos se clasificaron de acuerdo con su diámetro en folículos preantrales (40 – 200  $\mu\text{m}$ ), folículos antrales pequeños (201 – 350  $\mu\text{m}$ ) y folículos antrales grandes (351 – 500  $\mu\text{m}$ ), usando una modificación de la clasificación de Muñoz-De-La-Torre y cols. (Muñoz-de-la-Torre y cols., 2018).



Folículo	Grosor capa de la granulosa ( $\mu\text{m}$ )	Diámetro del folículo ( $\mu\text{m}$ )
Primario	<20	<100
Secundario	20 – 40	100 – 200
Preantral	40 – 80	200 – 400
Antral	60 – 100	>400

**Figura 7:** Parámetros para la determinación del tipo de folículos con las mediciones de la longitud y del grosor de la capa de la granulosa para su clasificación. Las líneas naranjas representan las mediciones para la obtención del diámetro, y las cuatro líneas cortas amarillas representan las mediciones para la obtención del grosor de la capa de la granulosa. Fotografía tomada por Eliseo Flores Sánchez.

### 6.13. *Análisis de ovulación*

Durante la autopsia, los oviductos fueron disectados y analizados, y con la ayuda de un microscopio estereoscópico, donde se buscó la presencia de ovocitos. Se realizó el cálculo de la tasa de animales ovulantes (TAO), la cual se obtiene calculando el número de animales ovulantes entre el número total de animales.

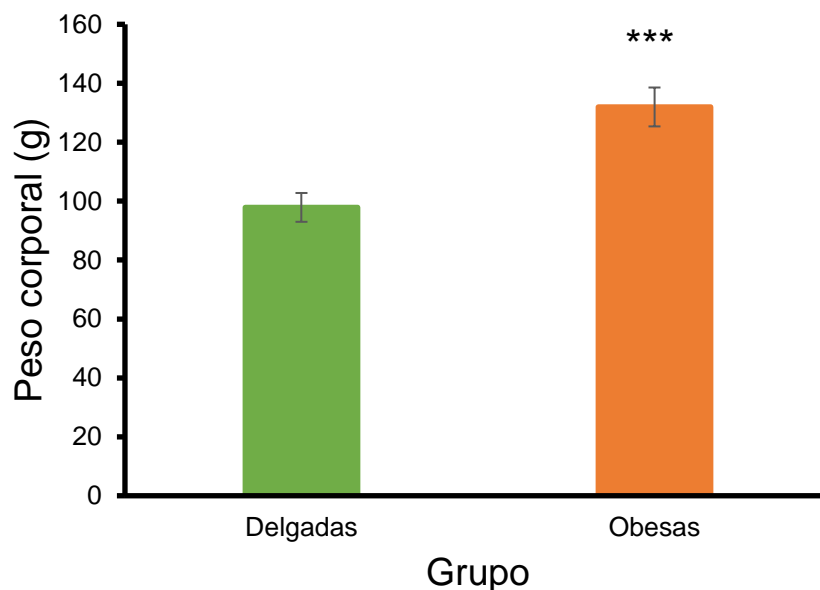
### 6.14. *Análisis estadísticos*

Para las comparaciones del número de ovocitos liberados, número de cuerpos lúteos, número y diámetro de folículos, quistes y prequistes, comparaciones de concentraciones séricas de glucosa, colesterol, insulina y triglicéridos, y de la prueba de tolerancia a la insulina y a la glucosa, y datos zoométricos entre los grupos se utilizaron pruebas de ANOVA en caso de los datos paramétricos, y una Kruskal-Wallis si son no paramétricos, seguido de una prueba de Tukey para las comparaciones múltiples. Se utilizaron pruebas de T-Student para comparaciones entre dos grupos. Para las comparaciones de la TAO se utilizó una prueba de  $J_i^2$ . Se consideraron resultados significativos cuando  $p \leq 0.05$ . Para todos los análisis estadísticos se utilizó el software R (versión 2022.07.1+554).

## 7. Resultados

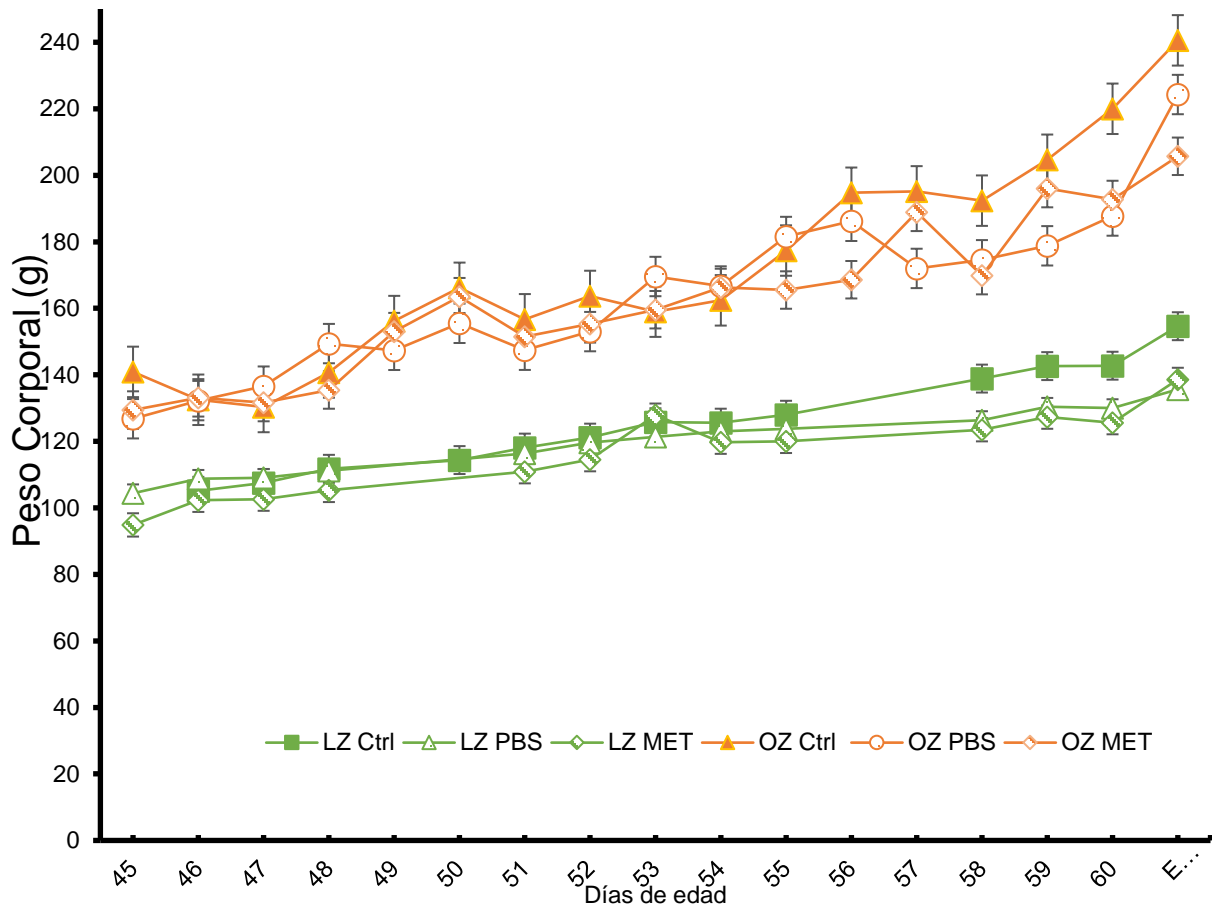
### 7.1. Peso corporal

Al inicio del tratamiento, a los  $45 \pm 1$  días de edad, el peso de las ratas obesas (OZ) fue mayor que el de las ratas delgadas (LZ). [Gráfica 1].



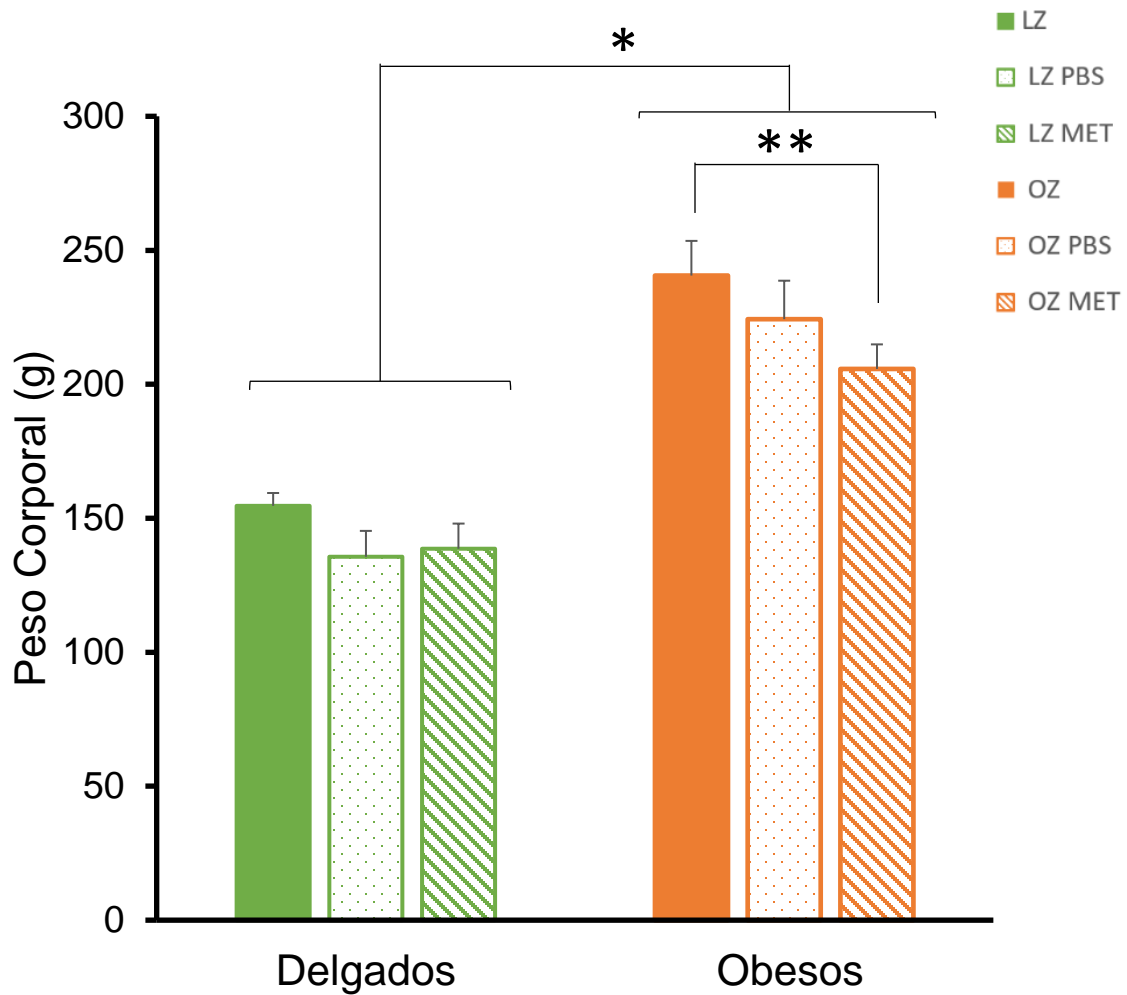
**Gráfica 1:** Peso Corporal de los organismos al inicio del tratamiento, con 45 días de edad. Presentados como medias  $\pm$  E. E. M. \*\*\*: Obesas vs Delgadas,  $p=2.185 \times 10^{-5}$ , T-Student.

Como se esperaba, las ratas obesas presentaron un aumento de peso más evidente a lo largo del desarrollo que las delgadas. Dentro del grupo de animales delgados, el grupo tratado con MET no tuvo cambios en el peso corporal comparando con los del grupo con PBS y con el control. En el grupo de animales obesos con tratamiento de MET, a los 60 días de edad, el peso corporal fue menor respecto a las ratas control, en tanto que no hubo diferencia al compararlas con el grupo con PBS [Gráfica 2].



**Gráfica 2:** Peso corporal de los animales durante el transcurso del tratamiento. Presentados como medias  $\pm$  E. E. M.

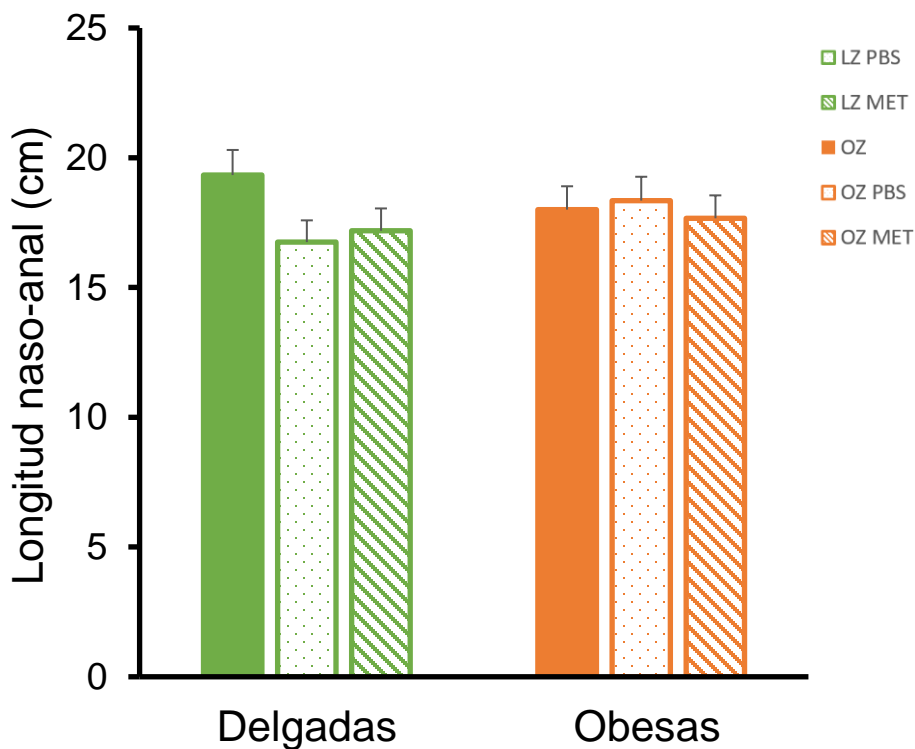
En el día del sacrificio, el peso de los animales obesos fue significativamente mayor que el de los delgados. El tratamiento con MET en las ratas delgadas no modificó el peso corporal en comparación con el grupo tratado con PBS o el grupo control. El peso de las ratas obesas control fue similar al de las obesas con PBS. En las ratas obesas, el tratamiento con MET disminuyó el peso corporal al compararse con las ratas obesas control [Gráfica 3].



**Gráfica 3:** Peso corporal de los animales en el día del sacrificio. Presentados como medias  $\pm$  E. E. M. \*: Delgados vs Obesos, T-Student.  $p=1.15 \times 10^{-10}$ . \*\*: OZ vs OZ MET, T-Student.  $p=0.04$

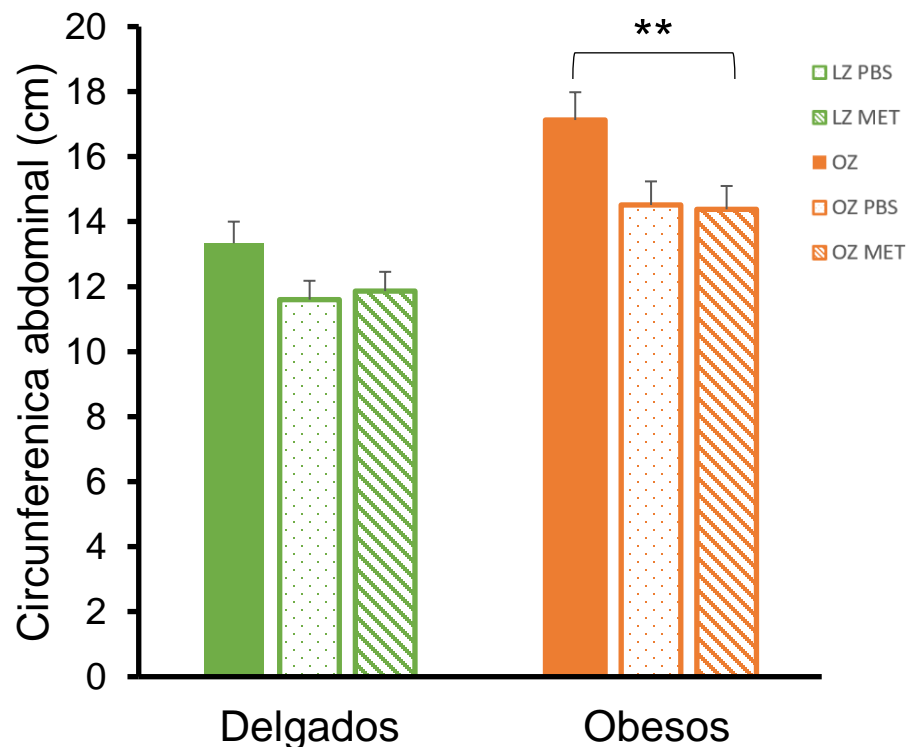
## 7.2. Parámetros zoométricos

No se encontraron diferencias significativas en la longitud naso-anal ni en la longitud total [Gráfica 4] en animales delgados ni obesos. El tratamiento con metformina no modificó los parámetros zoométricos cuando se comparó con su grupo control o con PBS ni en los delgados comparándose con sus respectivos grupos control.



**Gráfica 4:** Longitud naso-anal de los animales experimentales. Presentados como medias  $\pm$  E. E. M.

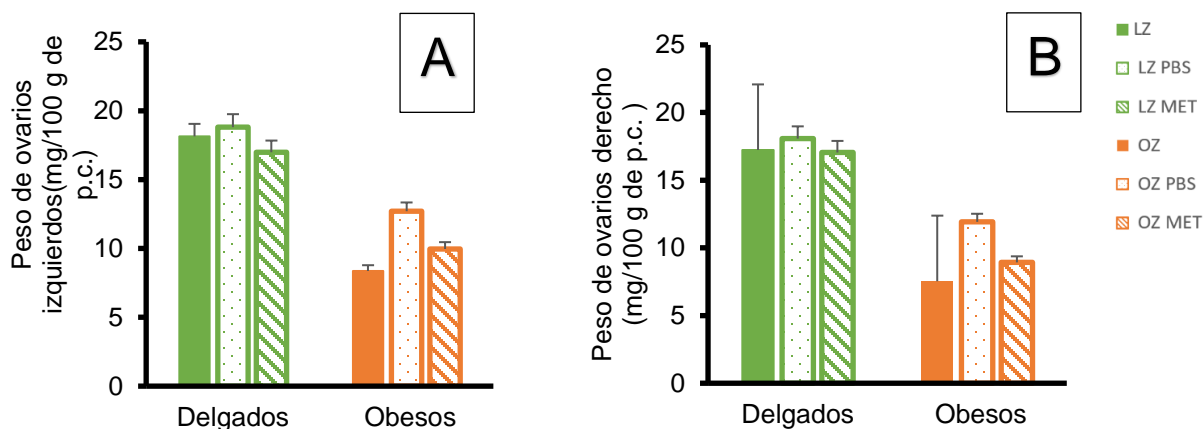
En los animales delgados, la metformina no modificó la longitud de la circunferencia de la cintura respecto a la que presentaron los animales con vehículo. En los animales obesos, el tratamiento con metformina o con PBS disminuyó la longitud de la circunferencia de la cintura respecto a la que presentaron el grupo de ratas obesas control [Gráfica 5].



**Gráfica 5:** Longitud de la circunferencia abdominal de cada grupo experimental. Presentados como medias E. E. M. \*\*: OZ vs. OZ MET,  $p=0.005$ , ANOVA de dos vías, Tukey.

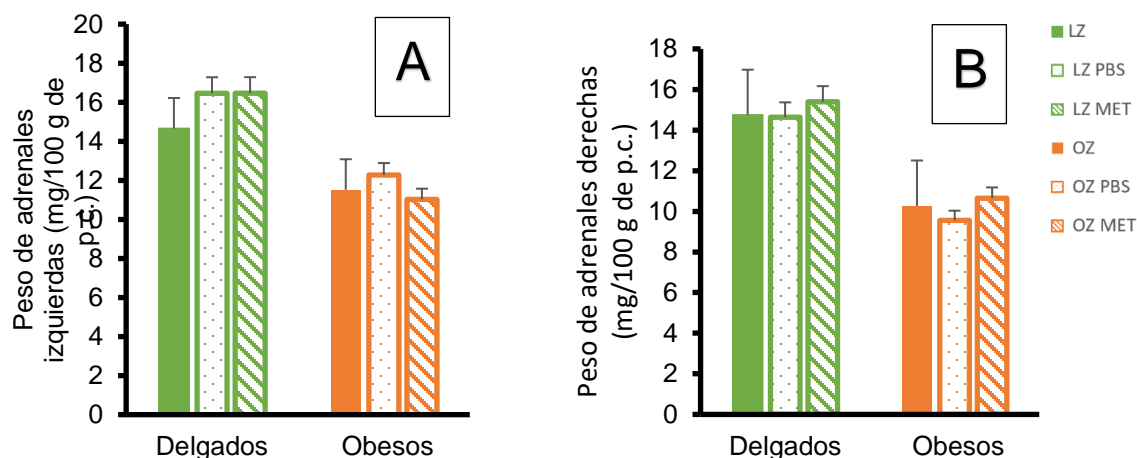
### 7.3. Peso de órganos

El tratamiento con MET en los animales obesos o delgados no modificó el peso del ovario izquierdo [Gráfica 6A] ni derecho [Gráfica 6B] comparado con sus respectivos grupos con PBS o control [Gráfica 6].



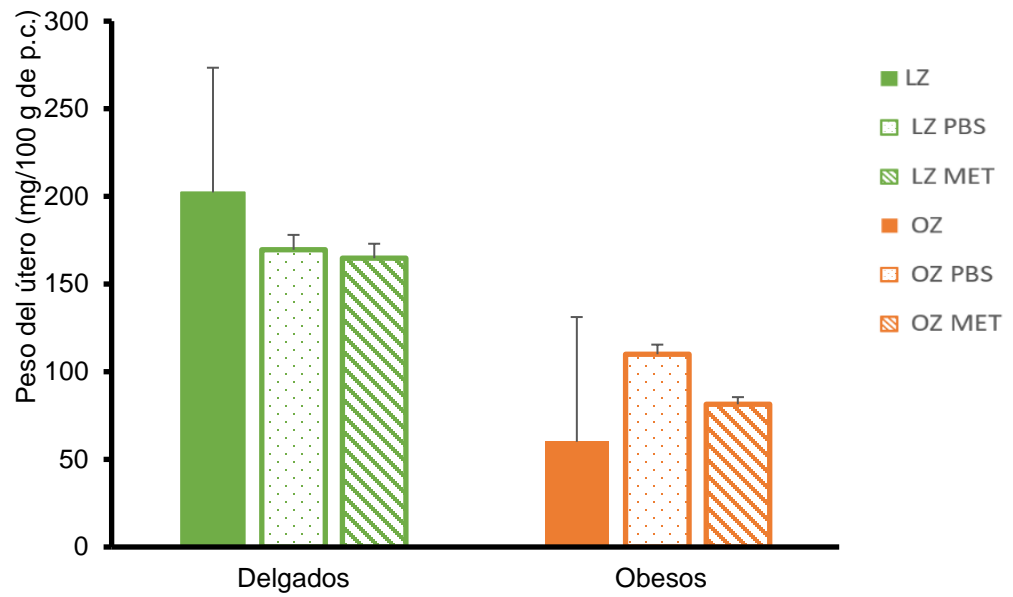
**Gráfica 6:** Peso relativo de los ovarios izquierdos (A) y derechos (B) de cada uno de los grupos experimentales. Medias  $\pm$  E. E. M.

Tampoco hubo diferencias significativas en el peso de las glándulas adrenales izquierdas [Gráfica 7A] o derechas [Gráfica 7B] entre los grupos de animales delgados y obesos tratados con MET comparándose con sus respectivos grupos control y con PBS [Gráfica 7].



**Gráfica 7:** Peso relativo de las glándulas adrenales izquierdas (A) y derechas (B) de cada uno de los grupos experimentales. Medias  $\pm$  E. E. M.

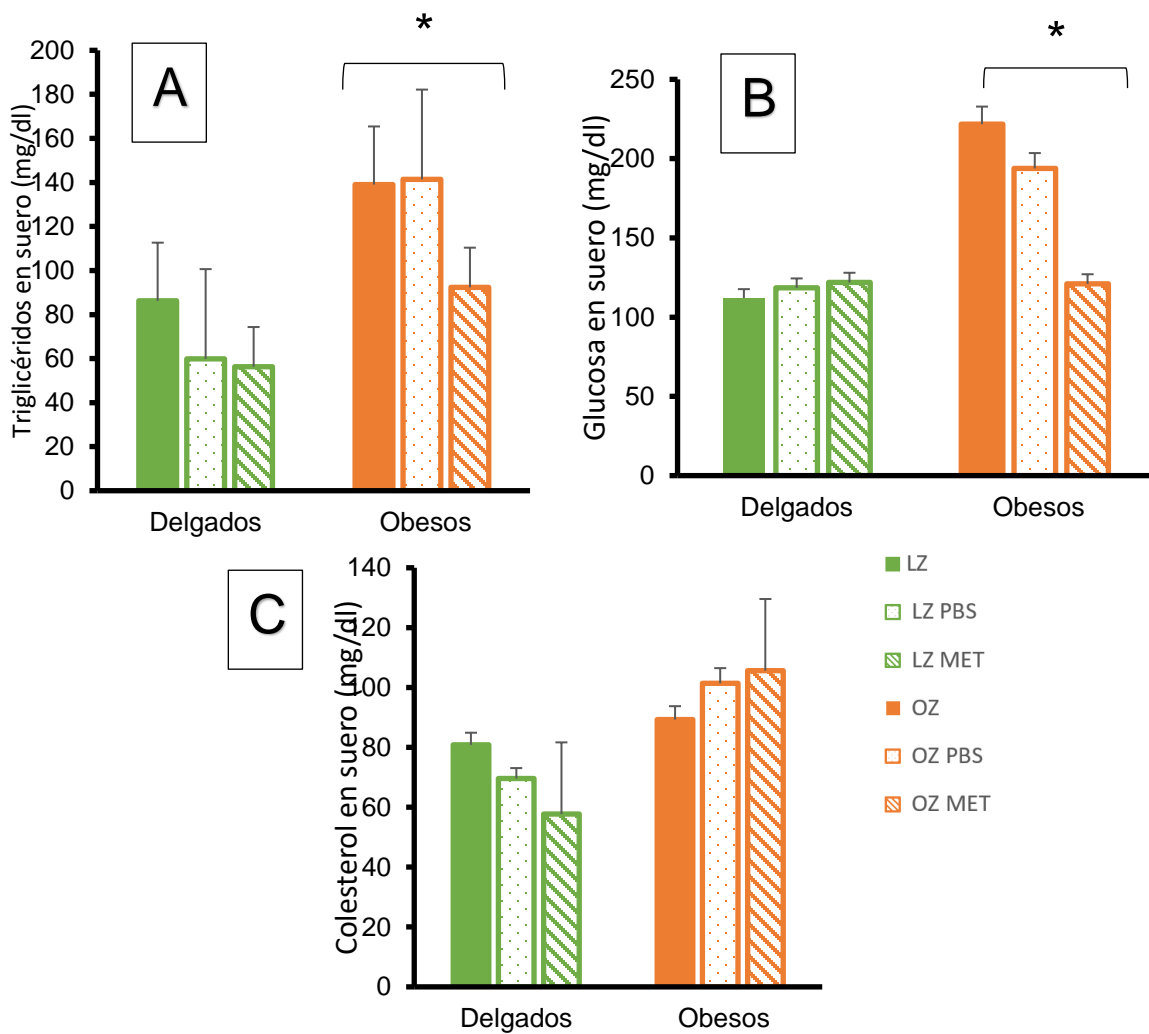
El tratamiento con MET no modificó el peso del útero ni en los animales obesos o delgados al compararlo con sus respectivos grupos control o con PBS [**Gráfica 8**].



**Gráfica 8:** *Peso relativo de los úteros de cada uno de los grupos experimentales. Medias  $\pm$  E. M.*

#### 7.4. Concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol sérico.

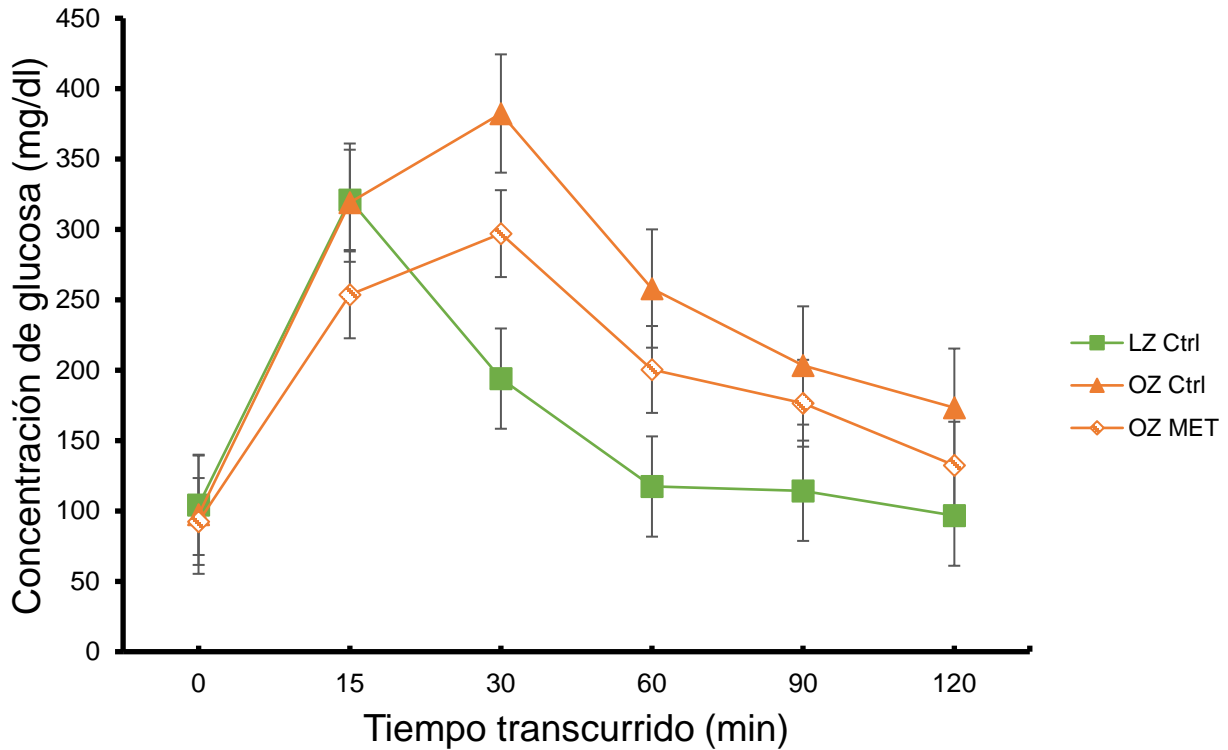
Después de realizar el estudio espectrofotométrico, se encontró que el tratamiento con MET no tuvo efecto en el grupo de animales delgados. En el grupo de animales obesos, el tratamiento con MET disminuyó de manera significativa las concentraciones de glucosa [Gráfica 9A] y triglicéridos [Gráfica 9B] al compararse con los controles, pero no afectó las concentraciones de colesterol [Gráfica 9C].



**Gráfica 9:** Concentraciones de triglicéridos (superior izquierda), glucosa (superior derecha), y colesterol (inferior) de suero de cada uno de los grupos experimentales.  $n=4$  Medias  $\pm$  E. E. M. \*: OZ vs. OZ MET,  $p < 0.05$ . ANOVA de dos vías, Tukey (ambos casos).

### 7.5. Prueba de Tolerancia a la Glucosa

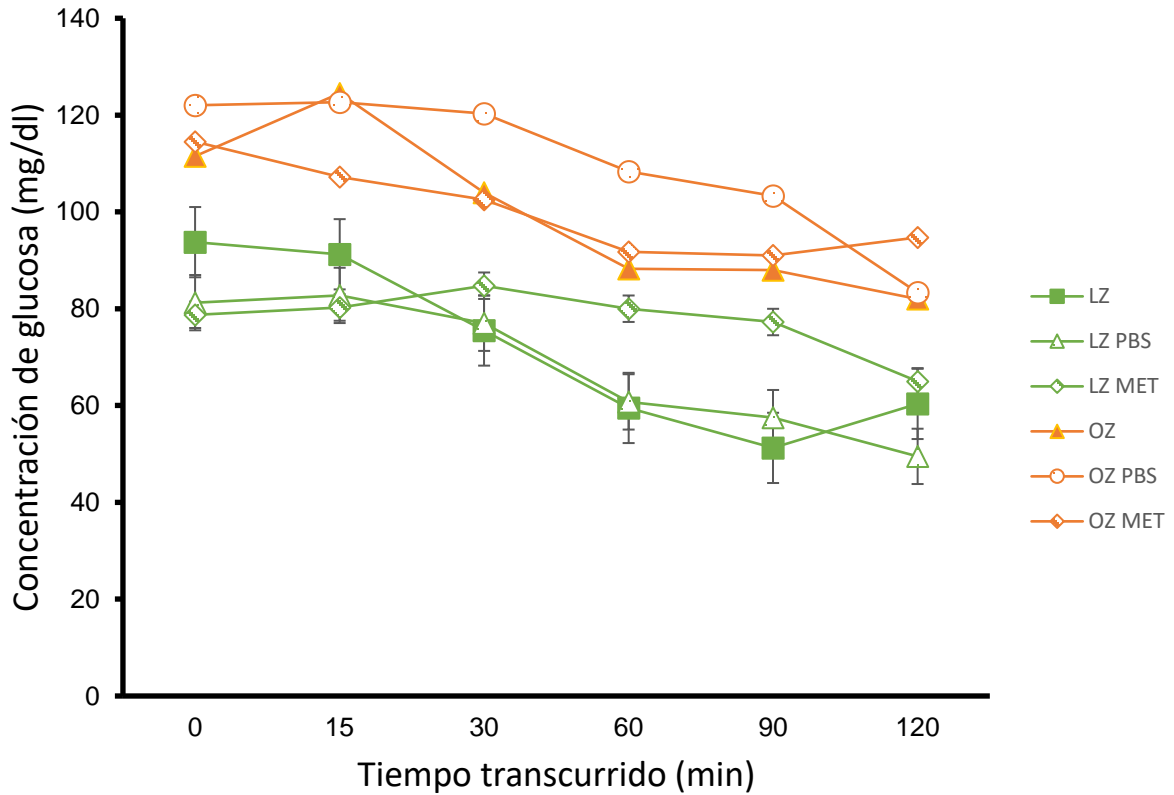
Al analizar la curva de respuesta de la prueba de tolerancia a la glucosa, no se encontraron diferencias entre las curvas de los animales obesos ni en la de los delgados. Dentro de los grupos de animales obesos, no se encontró diferencias significativas entre el grupo tratado con MET en comparación con el grupo control, en ninguno momento de los minutos registrados [Gráfica 10].



**Gráfica 10:** Prueba de Tolerancia a la Glucosa. Presentada como Medias  $\pm$  E. E. M.

### 7.6. Prueba de Tolerancia a la Insulina

Con respecto a la curva de respuesta de la prueba de tolerancia a la insulina, se encontró diferencia entre las ratas obesas y delgadas, pero no hubo diferencia significativa entre el ajuste de la curva de los animales obesos tratados con MET en comparación con los del grupo control o con PBS. El grupo de animales delgados presentó una respuesta semejante [Gráfica 11]



**Gráfica 11:** Prueba de Tolerancia a la Insulina. Presentada como. Medias  $\pm$  E. E. M.

### 7.7. Índice de Triglicéridos y Glucosa

Para la determinación de la RI, se calculó el índice de triglicéridos y glucosa en suero. Los valores iguales o mayores a 9.55 fueron considerados como RI. Los animales obesos presentaron un ITG significativamente mayor que los animales delgados, dicho índice tuvo tendencia a disminuir con el tratamiento con metformina, aunque estadísticamente no se presentaron significancias [Tabla 1].

**Tabla 1:** Índice de Triglicéridos y Glucosa (ITG) como indicativo de RI

Grupo	ITG
LZ	8.22 ± 0.35
LZ PBS	7.63 ± 0.87
LZ MET	8.11 ± 0.12
OZ	9.62 ± 0.11*
OZ PBS	9.38 ± 0.31
OZ MET	8.24 ± 0.72

Datos presentados como medias E. E. M. \*: OZ vs. LZ,  $p=0.004$ , T-Student.

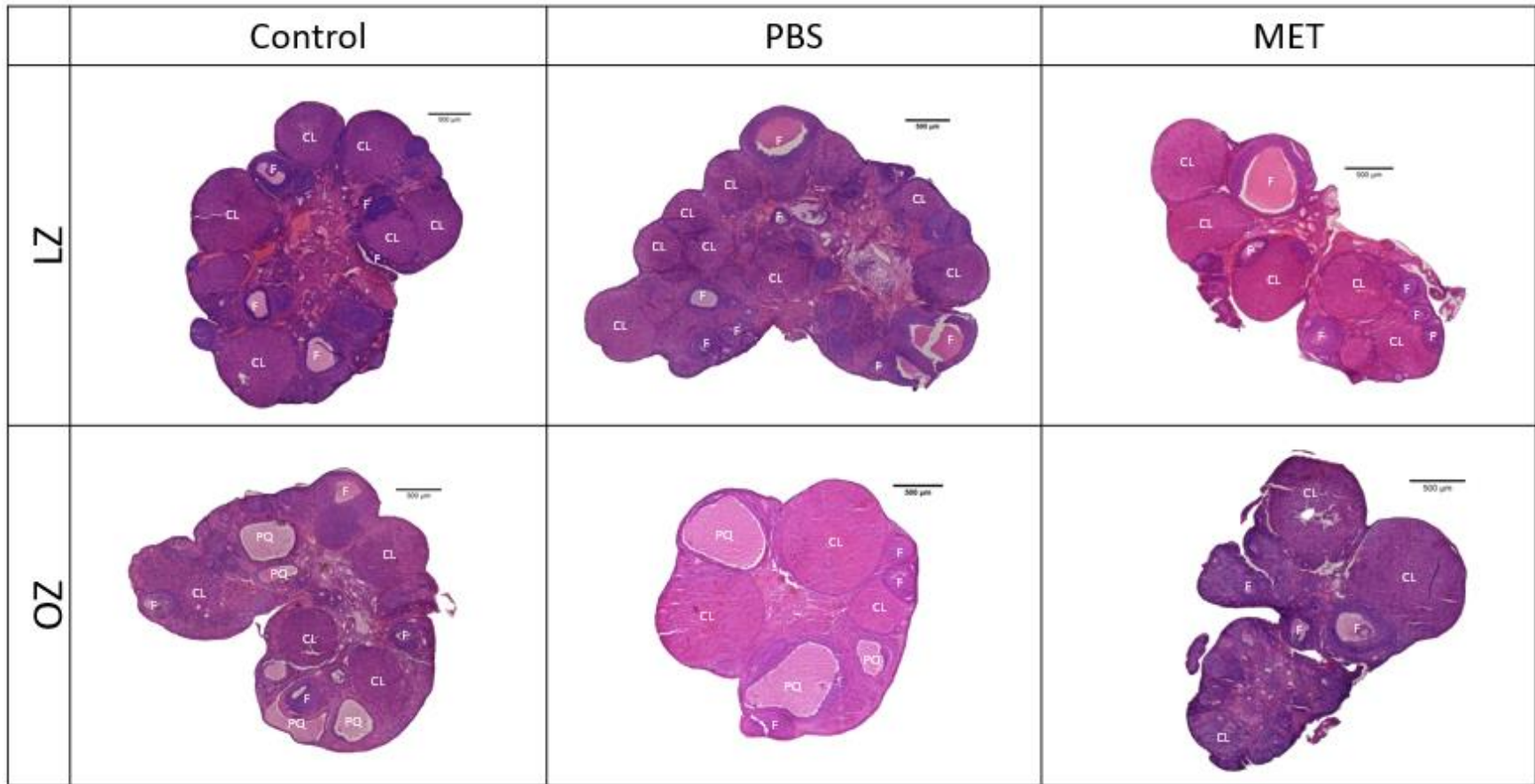
### 7.8. Morfología ovárica.

No se encontraron prequistes en los animales delgados. Los animales obesos presentaron prequistes, como puede observarse en la **Figura 8**. Dentro de los animales obesos, el tratamiento con MET no modificó la cantidad de prequistes. No se encontraron quistes en los ovarios de estos animales [Tabla 2].

**Tabla 2:** Número de prequistes en el grupo de animales obesos y delgados, en los grupos con MET y los controles.

Grupo	Prequistes
LZ	0
LZ MET	0
OZ	8.33±6.36
OZ MET	4.67±2.33

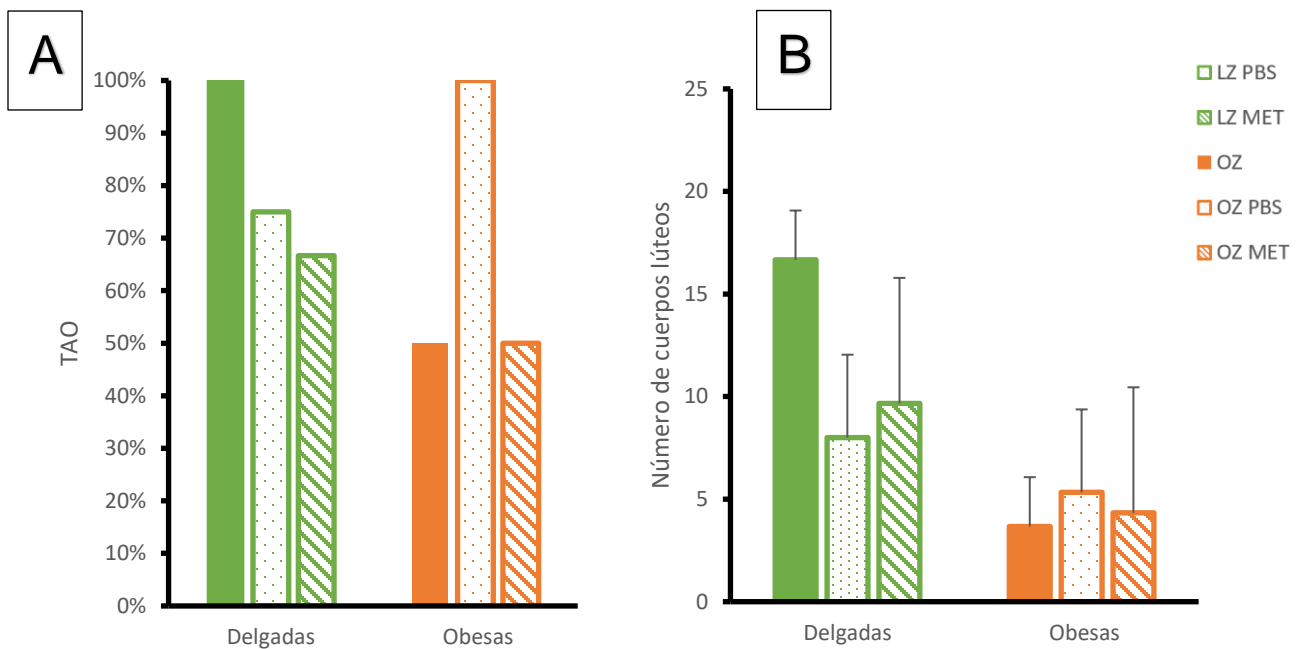
Datos presentados como medias± E. E. M.



**Figura 8:** Cortes ováricos de cada uno de los grupos experimentales, donde puede observarse la morfología típica encontrada. Abreviaturas: CL: Cuerpo lúteo; F: Folículo; PQ: Prequiste.

### 7.9. Respuesta ovulatoria

Al analizar la tasa de animales ovulantes se observó que los animales obesos sin tratamiento presentan una reducción del 50% en la ovulación en comparación con los animales delgados, sin embargo, el tratamiento con MET en los animales obesos no resultó en una recuperación de la TAO. Por su parte, los animales obesos con vehículo presentaron una TAO del 100% [Gráfica 12A]. A pesar de que las ratas obesas con el tratamiento con MET ovularon, el número de cuerpos lúteos fue menor [Gráfica 12B].



**Gráfica 12:** Tasa de animales ovulantes (TAO)(A) y número de cuerpos lúteos (B). Presentados como medias  $\pm$  E. E. M.

### 7.10. Población folicular

No se presentaron diferencias significativas en la cantidad de folículos totales entre los grupos de animales delgados, así como en el grupo de animales obesos. El número de folículos totales de los animales obesos fue significativamente menor que el de los animales delgados. El tratamiento con MET no tuvo efecto en animales delgados. En los animales obesos, el tratamiento con MET mostró un aumento en el número de folículos totales con respecto a los animales obesos control. Sin embargo, dicho aumento no fue estadísticamente significativo [Tabla 3].

**Tabla 3:** Número de folículos en cada uno de los estadios reportados (Primarios, Secundarios, Preantrales y Antrales)

Grupo	Primario	Secundarios	Preantrales	Antrales	Folículos Totales
LZ	9.67 ± 1.86	26.33 ± 4.10	16 ± 2.08	3 ± 1	55 ± 7.94*
LZ PBS	14.33 ± 2.19	30.33 ± 9.94	21.33 ± 3.18	4.00 ± 2.31	70 ± 14.42
LZ MET	6.67 ± 2.73	21 ± 7.55	11 ± 5.13	4.33 ± 1.86	43 ± 17
OZ	2.67 ± 2.67	4.67 ± 4.67	5.67 ± 3.71	4.67 ± 1.76	17.67 ± 6.67*
OZ PBS	3.67 ± 1.45	25.33 ± 13.84	24.33 ± 13.64	11.33 ± 6.44	31 ± 5
OZ MET	19.33 ± 7.13	24 ± 11.24	16.67 ± 8.21	3.33 ± 0.33	63.33 ± 25.85

Datos presentados como media ± E. E. M.

Tampoco se encontraron diferencias significativas en los diámetros de los folículos entre los grupos de ratas delgadas ni obesas [Tabla 4]

**Tabla 4:** Diámetros promedio de los folículos en cada uno de los estadios de desarrollo de los animales delgados y obesos, tanto grupos experimentales como grupos control.

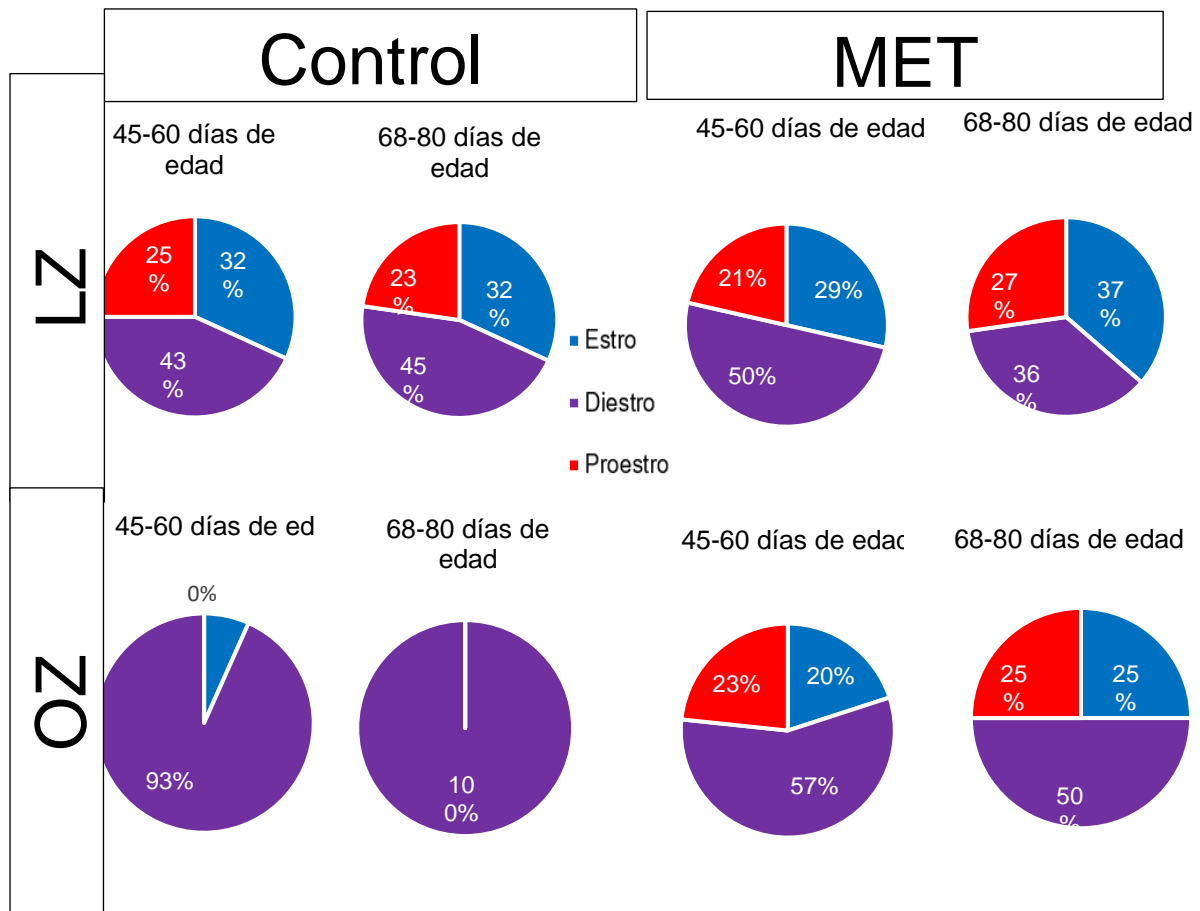
Grupo	Primarios	Secundarios	Preantrales	Antrales
LZ	79.81 ± 2.90	133.18 ± 3.14	287.90 ± 10.05	447.31 ± 18.10
LZ PBS	66.82 ± 2.82	140.98 ± 3.81	293.15 ± 9.19	419.41 ± 20.06
LZM	80.00 ± 3.48	125.65 ± 3.16	258.21 ± 10.41	433.78 ± 12.96
OZ	74.52 ± 3.93	136.83 ± 5.45	265.21 ± 15.52	518.64 ± 24.21
OZ PBS	71.21 ± 6.49	130.86 ± 2.39	232.39 ± 7.28	549.98 ± 22.56
OZM	66.17 ± 2.91	138.41 ± 3.14	266.96 ± 9.01	502.39 ± 28.29

Datos presentados como medias ± E. E. M.

### 7.11. Ciclo Estral

Durante el periodo que se registró la citología vaginal las ratas delgadas presentaron ciclos estrales regulares de 4 días de duración. En las ratas obesas control o con PBS, se puede notar una pérdida total de la ciclicidad. En las ratas del grupo OZ, el tratamiento con metformina mejoró la ciclicidad en la segunda mitad del periodo del tratamiento [Gráfica 14].

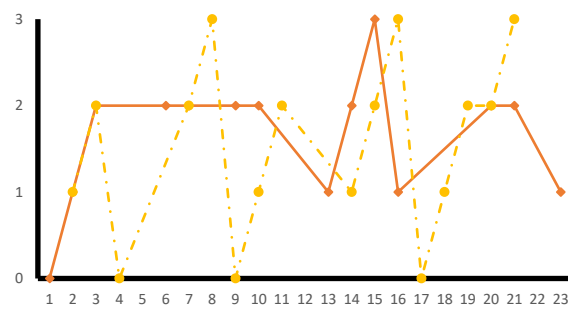
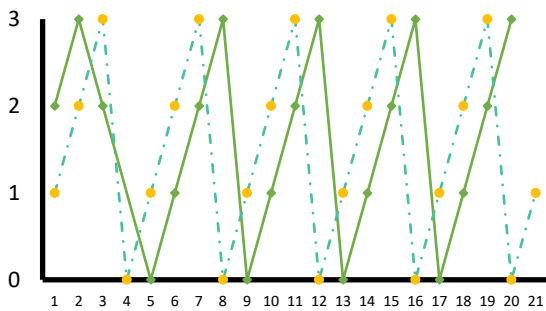
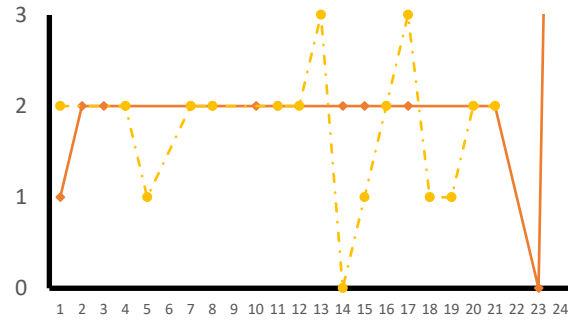
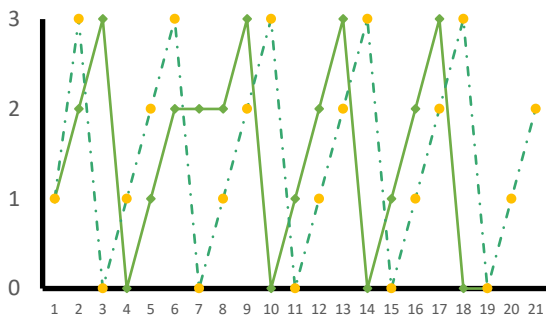
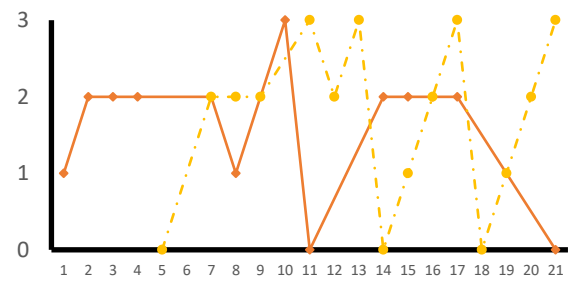
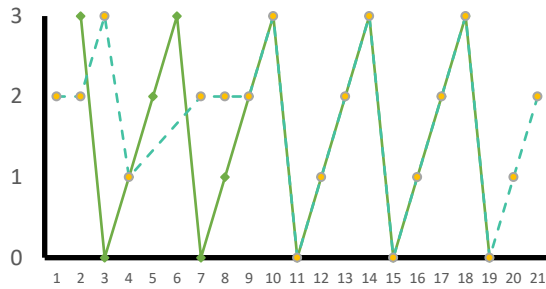
Después de una semana se espera después del final del tratamiento, no hubo algún cambio evidente en los ciclos de los animales delgados. La mejora de la ciclicidad es notoria después de dicha semana en los animales obesos, pues los animales obesos control presentaron diestros más prolongados que los animales obesos con MET [Gráfica 13].



**Gráfica 13:** Gráficas de la permanencia en cada una de las etapas del ciclo estral de grupos de ratas obesas y delgadas, con tratamiento con MET y control. Se presentan los registros de los 45 días de edad a los 60, y de los 68 a los 80 días de edad.

## Delgadas

## Obesas



—●— LZ  
- -●- - LZ MET

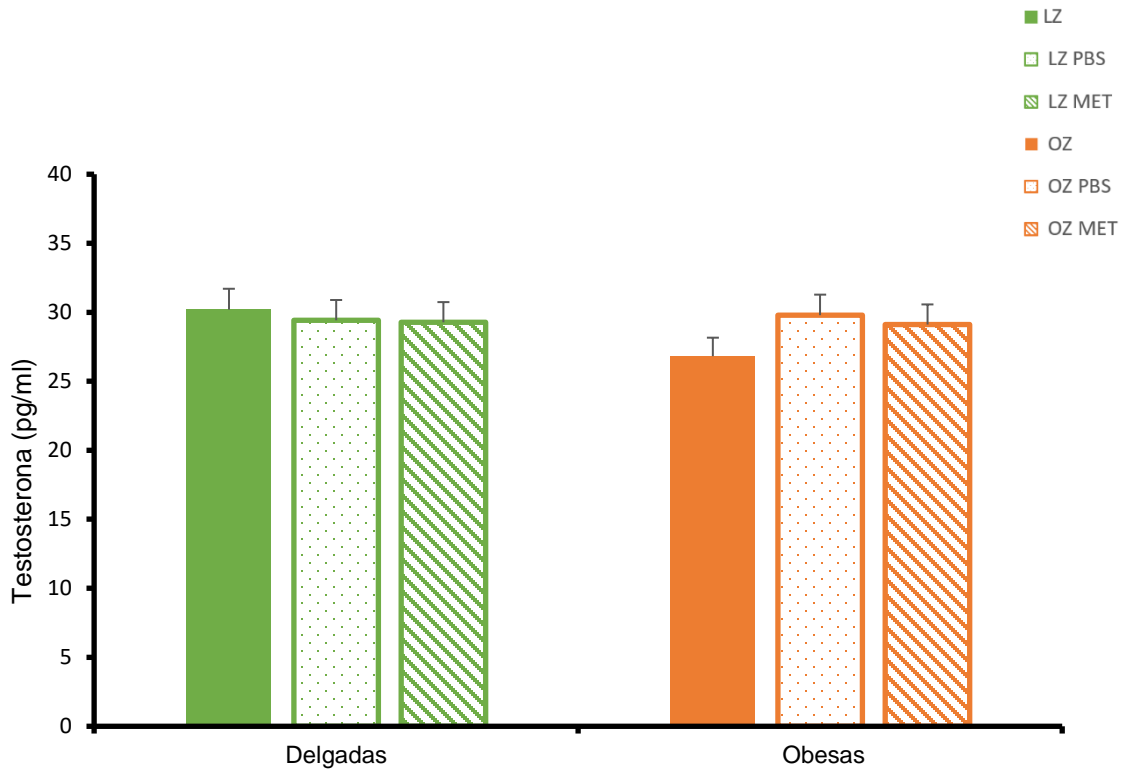
0=Estro  
1=Metaestro  
2= Diestro  
3=Proestro

—●— OZ  
- -●- - OZ MET

**Gráfica 14:** Gráficas del Ciclo estrol de los grupos con tratamiento comparándose con el control. Cada serie de puntos representa el ciclo de un organismo diferente. Se presentan 3 animales delgadas control diferentes y 3 animales con MET diferentes. De igual forma, se presentan 3 animales obesos con MET y 3 animales obesos control.

### 7.12. Concentración sérica de Testosterona

En cuanto a la concentración de testosterona, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de animales obesos y delgados, ni se observó algún efecto del tratamiento con MET [Gráfica 15].



**Gráfica 15:** Concentración de testosterona libre en suero de cada uno de los grupos experimentales. Medias  $\pm$  E. E. M.

## 8. Discusión

En este trabajo se tuvo como finalidad analizar el papel del tratamiento con metformina sobre el perfil lipídico y los parámetros reproductivos en la rata hembra Zucker obesa como modelo de síndrome de ovario poliquístico con resistencia a la insulina. Los resultados de nuestro estudio muestran que la rata hembra Zucker obesa presenta prequistes ováricos y oligoovulación, así como obesidad central, concentraciones elevadas de glucosa y triglicéridos, e incremento en el índice de triglicéridos y glucosa, lo cual nos permite postular a la rata hembra Zucker obesa como un modelo animal de Síndrome de Ovario Poliquístico asociado a la resistencia a la insulina, pues de acuerdo con los criterios de Rotterdam estaría clasificado como un síndrome de fenotipo D, en donde se considera a la oligoanovulación y quistes ováricos sin hiperandrogenismo (Azziz, 2018).

El fenotipo obeso de la rata Zucker *fa/fa* empieza a diferenciarse de manera evidente del fenotipo *fa/-* desde etapas tempranas de su crecimiento, aproximadamente a los 30 días de edad (Zucker & Antoniades, 1972). En el presente estudio, los pesos de los animales obesos OZ a los 45 días de edad fue mayor que el de los animales delgados LZ de la misma edad. El aumento de peso corporal en este modelo es consecuencia de la mutación que presenta la cepa, lo que ocasiona la pérdida de la señalización de leptina, y provoca hiperfagia desde las primeras semanas de vida (Zucker & Antoniades, 1972).

El peso corporal de los animales obesos tratados con metformina fue significativamente menor que los obesos controles al final del tratamiento; caso contrario a los organismos delgados, pues la administración no hizo efecto alguno en este parámetro. De igual forma, el tratamiento con metformina redujo la circunferencia abdominal de las ratas obesas tratadas al compararse con su control. Nuestros hallazgos nos permiten indicar que la metformina es efectiva para la disminución del peso corporal y la circunferencia abdominal en la rata hembra Zucker obesa. El papel de metformina sobre la rata Zucker, y el mecanismo mediante el cual lleva a cabo sus funciones no es del todo claro, pero se ha demostrado que metformina incrementa la actividad de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) en los hepatocitos y músculo esquelético de ratas (Zhou y cols.,

2001). Además, en el hígado, AMPK estimula la oxidación de ácidos grasos, gracias a la inactivación de la acetil-Co-A carboxilasa (ACC) (Carlson & Kim, 1973), lo cual podría explicar la manera en la cual la metformina podría participar en la reducción de la acumulación de grasa visceral, y, por lo tanto, en la reducción del peso corporal. También se ha sugerido que los efectos de MET sobre el peso corporal son debido más a la reducción de la ingesta calórica que en el gasto energético (Yerevanian & Soukas, 2019).

Aubert y cols. hipotetizaron que la metformina también podría actuar a nivel del sistema nervioso central, pues se ha demostrado que es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, pues en su estudio el tratamiento disminuyó la expresión de NPY, AgRP y POMC en el hipotálamo, (Aubert y cols., 2011). Ellos administraron 75 mg/kg de metformina a ratas Long – Evans alimentadas con dieta alta en grasa. La administración en este experimento aumentó la expresión de ARNm de LEP-R, provocando una disminución en la ingesta de alimentos. Dicho aumento en la expresión del receptor no se presentó a nivel de la grasa ni a nivel hepático, lo que sugiere que metformina participa de manera directa o indirecta en la señalización de leptina a nivel hipotalámico (Aubert y cols., 2011). Dado que la expresión de dicho receptor se ve suprimida en la rata Zucker obesa, podemos asumir que el tratamiento con metformina en nuestro experimento podría tener una participación en la regularización de la señalización de leptina fomentando la expresión de su receptor, lo que también podría participar en la disminución del peso corporal de los organismos disminuyendo la hiperfagia.

Nuestros estudios indican que las ratas Zucker obesas muestran una reducción en el peso de órganos como los ovarios, el útero y las glándulas adrenales. Esta observación es consistente con resultados previos de otros grupos de investigación (Aleixandre De Artiñano & Miguel Castro, 2009; Saiduddin y cols., 1973) Por el momento, no contamos con una explicación definitiva para este fenómeno, pero proponemos que pudiera deberse a alteraciones en la secreción de hormonas esenciales como la hormona de crecimiento o las hormonas tiroideas. Específicamente, en las ratas Zucker obesas se ha evidenciado una disminución en la secreción de la hormona de crecimiento en ambos sexos (Aguilar Benítez de Lugo

& Pinilla Jurado, 2006), lo cual podría influir negativamente en el desarrollo de órganos periféricos. Además, se plantea la posibilidad de que la falta de señalización por parte de la leptina afecte de manera significativa, considerando que los receptores de leptina están presentes en varios tejidos periféricos. Esta hipótesis se ve reforzada por la investigación de Botella-Carretero y cols. (Botella Carretero y cols., 2001), así como por los estudios de Barash y cols. (Barash y cols., 1996), quienes encontraron que ratones hembra ob/ob deficientes en leptina tienen un peso reducido de los ovarios y el útero, y que el tratamiento con leptina incrementa el peso de estos órganos.

Se ha reportado que las ratas Zucker presentan hiperglucemia, lo que coincide con lo observado en este estudio, pues la rata hembra Zucker obesa de 60 días de edad presentó altas concentraciones de glucosa sérica; las cuales fueron reguladas después del tratamiento con metformina. Se sabe que metformina tiene acción a nivel mitocondrial, fomentando la activación de la señalización de insulina y aumentando la translocación del transportador de glucosa dentro de la célula (Foretz y cols., 2023; Lamoia & Shulman, 2021). A nivel de músculo esquelético, se tiene evidencia de que estimula la activación del AMPK, el cual es el segundo mensajero de la cadena de señalización de la insulina (Foretz y cols., 2023). De igual manera, la metformina inhibe la síntesis de glucosa *de novo* a nivel hepático, y se postula que el principal mecanismo por el cual metformina tiene un efecto inhibitorio en la gluconeogénesis es mediante la inhibición del complejo I, el cual es el sitio de contribución de NADH al gradiente de protones mitocondrial, contribuyendo así al decremento de la gluconeogénesis (Lamoia & Shulman, 2021). Otro mecanismo propuesto en el que la metformina participaría en la reducción de la gluconeogénesis es mediante la inhibición de la enzima GPD2, la cual cataliza la conversión de glicerol – 3 – fosfato (G3P); el cual tiene origen del glicerol procedente de la lipólisis del tejido adiposo blanco, a dihidroxiacetona fosfato (DHAP). El DHAP es un intermediario del proceso de gluconeogénesis (Lamoia & Shulman, 2021). Se realizó una prueba de curva de tolerancia a la glucosa y a la insulina. A pesar de que los ajustes de las curvas de tolerancia a la glucosa no presentaron diferencias significativas, puede observarse en nuestros resultados que las concentraciones de

glucosa en cada uno de los tiempos de medición en el grupo de organismos obesos con tratamiento de metformina tuvieron tendencia a la disminución, dado por los mecanismos de acción de fármaco sobre la hiperglucemia.

Para comprobar los efectos del tratamiento con metformina sobre la resistencia a la insulina se realizó la comparación del ITG. Se ha reportado en numerosos estudios que la rata Zucker obesa presenta resistencia a la insulina, tanto en machos como en hembras (Aguilar Benítez de Lugo & Pinilla Jurado, 2006; Kasiske y cols., 1992; Mathé, 1995; Wang y cols., 2022). Los animales obesos de nuestro estudio tuvieron un ITG significativamente mayor que los animales delgados; resultados que nos permiten establecer a la rata hembra Zucker obesa como un modelo de SOP asociado a resistencia a la insulina, y el tratamiento con MET en los animales obesos disminuyó el ITG con valores debajo del punto crítico, establecido en este estudio ( $\text{ITG} \geq 9.55$ ), aunque estadísticamente no resultó significativamente diferente.

Las concentraciones de triglicéridos en los animales Zucker obesos están incrementados, y los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con metformina disminuyó la concentración de éstos en los animales experimentales al compararse con sus controles. Se ha demostrado que el incremento de la actividad de AMPK por metformina en el hígado también favorece la disminución en la producción de triglicéridos y colesterol (Velasco y cols., 1997), por lo que podemos suponer que este mismo incremento en la actividad de AMPK favoreció la disminución vista de estas concentraciones en nuestro estudio. En nuestro experimento, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de colesterol. Estos resultados coinciden con los presentados por Sui y cols., quienes utilizaron animales Zucker macho de ocho semanas de edad tratados con metformina para evaluar su efecto sobre el hígado graso (Sui y cols., 2019). En lo que respecta a los humanos, Cheng y cols realizaron un estudio con pacientes diagnosticados con síndrome metabólico y tratados también con metformina, en donde encontraron resultados similares (Cheng y cols., 2021). Honnma y colaboradores presentan que las ratas Zucker obesas jóvenes presentan un aumento considerable de adiponectinas, que disminuyen con la edad; desde las 5

hasta las 16 semanas de vida (Honnma y cols., 2010). Esta hormona también ha sido relacionada con la biogénesis de colesterol (Hafiane & Daskalopoulou, 2020). Por lo tanto, el aumento descrito por Honnma podría estar participando en las altas concentraciones de colesterol en nuestros organismos. Se sabe que el colesterol, tanto de alta densidad como de baja densidad; tiene un papel importante en el metabolismo de insulina, pues al ser importantes en la estructura de las membranas plasmáticas, y, por ende, en la de las células  $\beta$ , su alteración también participa en la desregulación de las funciones  $\beta$ -pancreáticas, y en consecuencia una disminución en la liberación de insulina (Perego y cols., 2019).

Los cambios en insulina observados en este estudio podrían estar contribuyendo en las disrupciones de las funciones y morfología ováricas observadas, como los prequistes. En nuestros resultados se observa que los animales obesos presentaron una menor cantidad de folículos que los animales delgados, lo que indica que el desarrollo folicular se ve alterado en estos organismos y también podría explicar la disminución observada en el tamaño de los ovarios. El tratamiento con metformina no fue capaz de reestablecer dichas disrupciones, aunque podría tratarse de efectos de la corta duración del tratamiento, o de la necesidad de una dosis más alta, como algunos estudios sugieren, pues a pesar de no presentar significancia estadística en las diferencias, es notorio el aumento en la cantidad de folículos totales en los animales obesos después del tratamiento.

Además del cambio morfológico observado en nuestros resultados, se pudo registrar una disrupción del ciclo estral en las ratas obesas al compararse con las delgadas. El tratamiento en las ratas obesas ayudó a la mejoría de la ciclicidad estral. En algunos trabajos en los que utilizó metformina para el tratamiento de características de Síndrome de Ovario Poliquístico, se muestra una mejoría también en este parámetro (Lohrasbi y cols., 2022; Xing y cols., 2021). Hay evidencia que demuestra que el tratamiento con metformina también tiene un papel en la regulación de la esterodogénesis, pues disminuye la expresión de la enzima CYP17A1, disminuyendo la síntesis de andrógenos (Mahamed y cols., 2018; Mansfield y cols., 2003). No hay demasiados trabajos que hablen sobre las alteraciones en la síntesis de hormonas esteroideas a nivel ovárico en la rata

hembra Zucker obesa; aun cuando se ha observado que la leptina tiene un papel importante en la esteroideogénesis (Hausman y cols., 2012; Poretsky y cols., 2023). Se ha mostrado que estos animales no presentan alteraciones ni en la expresión de testosterona, ni de estradiol, así como en la expresión de LH o FSH (Honma y cols., 2010; Puga y Colmenares y cols., 2021), lo que podría sugerir que las disrupciones reproductivas vistas en este modelo animal podrían ser independientes a estas alteraciones, además de no estar relacionadas con el hiperandrogenismo. Nuestros resultados también muestran que sólo la mitad de las ratas obesas ovularon, en comparación con el 100% de los animales delgados. Sin embargo, todos los animales obesos con vehículo ovularon. Aún no tenemos una explicación para este fenómeno, aunque se podría especular que la vía de administración pudiera haber afectado los resultados. A pesar de que los animales obesos ovularon, el número de cuerpos lúteos fue menor que el de los animales delgados, y el tratamiento con metformina no tuvo efectos en este parámetro. Se tiene evidencia que metformina es un fármaco eficaz para la inducción de la ovulación (Penzias y cols., 2017). Los resultados vistos en nuestro trabajo pudieron deberse a la corta duración del tratamiento. Aun así, faltan un mayor número de estudios para poder confirmar o descartar estas afirmaciones. Nuestros resultados con respecto a las concentraciones de testosterona coinciden con dichas observaciones. De verse alterada la síntesis hormonal ovárica en algún nivel de la cascada de señalización, en nuestro estudio la aparente disminución de los prequistes ováricos, y el aumento de los folículos secundarios podría significar una mejora en la síntesis de hormonas esteroideas, lo que podría estar involucrado en la retroalimentación a nivel central. Las regularizaciones dadas por esta retroalimentación de liberación de las gonadotropinas podrían entonces estar participando en la regulación del ciclo estral, aunque bien, no se vieron reflejadas en el número de cuerpos lúteos como indicativos de ovulación ni en la tasa de animales ovulantes, la mejoría en el ciclo estral podría tener un papel importante en la mejoría de la ovulación en este modelo.

Se ha sugerido que los mecanismos de inflamación podrían tener una participación importante en la etiología del SOP, pues se han reportado que marcadores

inflamatorios, como interleucina 6 (IL-6) o el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) se ven aumentados en pacientes con SOP (Repaci y cols., 2011). Se ha reportado que tanto TNF- $\alpha$  como IL-6 se ve también aumentado en las ratas Zucker obesas, intuyendo que los mecanismos inflamatorios estarían involucrados en el aumento de peso, así como en las disrupciones reproductivas observadas en estos animales (Martín-Cordero y cols., 2010). En un experimento llevado a cabo por Rencber y cols. en 2018, se demostró que el tratamiento con MET a ratas inducidas a SOP por administración de DHEA presentaban una disminución en la expresión de TNF- $\alpha$  tanto en plasma como en tejido ovárico, lo que podría estar participando en la mejoría de la sintomatología en ese modelo (Furat Rencber y cols., 2018). Dado que la expresión de los marcadores inflamatorios está aumentada en nuestro modelo animal, también podríamos especular acerca de que el tratamiento con metformina estaría disminuyendo la expresión del marcador TNF- $\alpha$ , lo que contribuiría a la tendencia de mejoría vista en la morfología ovárica en nuestro trabajo. Existen reportes cuyos resultados señalan que factores transcripcionales como FOXO1 podrían estar relacionados con las alteraciones morfológicas foliculares en el SOP. Este factor es un miembro de la familia de factores Forkhead box de la clase O, el cual tiene una importante participación en diferentes funciones celulares, incluyendo la regulación del ciclo celular, reparación de ADN, muerte celular y estrés oxidativo (Tran y cols., 2003). También se ha demostrado que FOXO1 está ampliamente expresado en células de la granulosa, por lo que participa en la regulación del desarrollo folicular y en el desarrollo del cuerpo lúteo (Liu y cols., 2015; Shi & LaPolt, 2003). En la rata hembra Zucker obesa, se demostró que un aumento en la actividad del FOXO1 estaría participando en el aumento de la atresia folicular y en las alteraciones morfológicas ováricas (Kajihara y cols., 2009). En los resultados presentados por Guo y cols, MET fue capaz de reducir la actividad del factor FOXO1, controlando su participación en la homeostasis de glucosa (Guo y cols., 2021). En nuestro estudio, podemos postular que el tratamiento con metformina podría estar participando en la regulación de FOXO1, lo que podría tener un papel en la tendencia al aumento de la población folicular, así como su participación en la disminución de las concentraciones de glucosa.

Peng y cols. hipotetizaron sobre la participación de un mecanismo diferente que podría estar involucrado en la sintomatología del SOP. La ferroptosis es un mecanismo de muerte celular programada que está involucrada en el desarrollo de distintas enfermedades, y está vinculada con un aumento en el estrés oxidativo y el aumento de peróxidos (Li y cols., 2020). En los últimos años también se ha especulado sobre la participación de este proceso en el desarrollo del SOP, pues el nivel de ferroptosis es alto en condiciones de este padecimiento. En el estudio realizado por el grupo de investigación mencionado, se administró MET a ratones inducidos a SOP por medio de dieta alta en grasas y letrozol. Ellos reportaron que, en los ratones enfermos, se observó una disminución considerable de glutatión peroxidasa 4 (GPX4); el cual es un regulador importante en la inhibición de la ferroptosis. Después del tratamiento con MET, los animales mostraron un aumento de GPX4, lo que disminuyó la ferroptosis y contribuyó a la mejora de las características vinculadas al SOP, como la regulación del ciclo estral y la disminución de quistes ováricos (Peng y cols., 2023). Podríamos suponer que estos mismos mecanismos podrían estar involucrados en la mejoría vista en nuestros organismos, aunque faltan aún más estudios para poder relacionar los efectos observados en este trabajo con las posibles explicaciones plasmadas aquí.

## **9. Conclusiones**

- La rata hembra Zucker obesa a los 60 días de edad presenta prequistes en los ovarios, oligoovulación, alteración del ciclo estral y resistencia a la insulina, por lo que puede considerarse un modelo de síndrome de ovario poliquístico asociado a resistencia a la insulina.
- En la rata hembra Zucker obesa adulta, el tratamiento con metformina durante 15 días disminuye el peso corporal y la circunferencia abdominal. Además, disminuye la hiperglicemia y la concentración en suero de triglicéridos.
- El tratamiento con metformina durante 15 días mejora la ciclicidad estral en este modelo después de una semana terminado el tratamiento.

## **10. Perspectivas**

Algunos resultados presentados en este trabajo no mostraron diferencias estadísticamente significativas, aunque sí se observó una tendencia. Puede que el número de observaciones haya quedado limitado, o que el tratamiento haya sido de corta duración para poder observar los cambios más significativamente. Se podría proponer un estudio de mayor duración del tratamiento para reafirmar los resultados obtenidos en este trabajo. Se pueden reforzar aún más las observaciones y las hipótesis planteadas si se proponen las mediciones de marcadores como TNF- $\alpha$ , IL-6, FOXO1 y GPX4; así como tratamientos y observaciones en diferentes edades.

## Bibliografía

- Agius, L. (2008). Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. En *Biochemical Journal* (Vol. 414, Número 1, pp. 1–18). <https://doi.org/10.1042/BJ20080595>
- Aguilar Benítez de Lugo, E., & Pinilla Jurado, L. (2006). La rata Zucker como modelo para el estudio de la función reproductora. *Endocrinología y Nutrición*, 53(10), 592–598. [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(06\)71155-X](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(06)71155-X)
- Ajayi, A. F., & Akhigbe, R. E. (2020). Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertility Research and Practice*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40738-020-00074-3>
- Aleixandre De Artiñano, A., & Miguel Castro, M. (2009). Experimental rat models to study the metabolic syndrome. En *British Journal of Nutrition* (Vol. 102, Número 9, pp. 1246–1253). <https://doi.org/10.1017/S0007114509990729>
- American Diabetes Association. (2019). 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes—2019. *Diabetes Care*, 42(Supplement\_1), S90–S102. <https://doi.org/10.2337/dc19-S009>
- Aubert, G., Mansuy, V., Voirol, M. J., Pellerin, L., & Pralong, F. P. (2011). The anorexigenic effects of metformin involve increases in hypothalamic leptin receptor expression. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 60(3), 327–334. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2010.02.007>
- Azziz, R. (2018). Reproductive endocrinology and infertility: Clinical expert series polycystic ovary syndrome. *Obstetrics and Gynecology*, 132(2), 321–336. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000002698>
- Baerwald, A. R., Adams, G. P., & Pierson, R. A. (2012). Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Human reproduction update*, 18(1), 73–91. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr039>
- Bailey, C. J. (2017). Metformin: historical overview. En *Diabetologia* (Vol. 60, Número 9, pp. 1566–1576). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4318-z>
- Baird, D. T., & Fraser, I. S. (1975). CONCENTRATION OF OESTRONE AND OESTRADIOL IN FOLLICULAR FLUID AND OVARIAN VENOUS BLOOD OF

- WOMEN. *Clinical Endocrinology*, 4(3), 259–266. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.1975.tb01533.x>
- Baker, T. G. (1963). A QUANTITATIVE AND CYTOLOGICAL STUDY OF GERM CELLS IN HUMAN OVARIES. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 158, 417–433. <https://doi.org/10.1098/rspb.1963.0055>
- Barash, I. A., Cheung, C. C., Weigle, D. S., Ren, H., Kabigting, E. B., Kuijper, J. L., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (1996). Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*, 137(7), 3144–3147. <https://doi.org/10.1210/endo.137.7.8770941>
- Barber, T. M., & Franks, S. (2021). Obesity and polycystic ovary syndrome. En *Clinical Endocrinology* (Vol. 95, Número 4, pp. 531–541). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/cen.14421>
- Barquera, S., Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Pedroza, A., & Rivera-Dommarco, J. A. (2013). [Prevalence of obesity in Mexican adults 2000-2012]. *Salud publica de Mexico*, 55 Suppl 2, S151-60.
- Bazzano, M. V., Paz, D. A., & Elia, E. M. (2017). Obesity alters the ovarian glucidic homeostasis disrupting the reproductive outcome of female rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 42, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.01.003>
- Bloom, M. S., Mok-Lin, E., & Fujimoto, V. Y. (2016). Bisphenol A and ovarian steroidogenesis. En *Fertility and Sterility* (Vol. 106, Número 4, pp. 857–863). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.08.021>
- Boden, G., Chen, X., Mozzoli, M., & Ryan, I. (1996). EFFECT OF FASTING ON SERUM LEPTIN IN NORMAL HUMAN SUBJECTS. *JCE & M*, 81(9). <https://academic.oup.com/jcem/article/81/9/3419/2651139>
- Botella Carretero, J. I., Lledín Barbancho, M. D., Valero González, M. A., & Varela Dacosta, C. (2001). [Leptin: physiological and clinical role]. *Anales de medicina interna (Madrid, Spain : 1984)*, 18(3), 152–160.

- Brawer, J. R., Munoz, M., & Farookhi, R. (1986). Development of the Polycystic Ovarian Condition (PCO) in the Estradiol Valerate-Treated Rat. *Biology of Reproduction*, 35(3), 647–655. <https://doi.org/10.1095/biolreprod35.3.647>
- Burbridge, S., Stewart, I., & Placzek, M. (2016). Development of the neuroendocrine hypothalamus. *Comprehensive Physiology*, 6(2), 623–643. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150023>
- Caballero, B. (2019). Humans against Obesity: Who Will Win? *Advances in Nutrition*, 10, S4–S9. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy055>
- Campbell, J. E., & Newgard, C. B. (2021). Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. En *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 22, Número 2, pp. 142–158). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00317-7>
- Canipari, R., Cellini, V., & Cecconi, S. (2012). The Ovary Feels Fine when Paracrine and Autocrine Networks Cooperate with Gonadotropins in the Regulation of Folliculogenesis. *Current Pharmaceutical Design*, 18(3), 245–255. <https://doi.org/10.2174/138161212799040411>
- Carlson, C. A., & Kim, K. H. (1973). Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 248(1), 378–380.
- Cassar, S., Misso, M. L., Hopkins, W. G., Shaw, C. S., Teede, H. J., & Stepto, N. K. (2016). Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis of euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp studies. *Human Reproduction*, 31(11), 2619–2631. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew243>
- Cheng, L., Fu, Q., Zhou, L., Fan, Y., Liu, F., Fan, Y., Zhang, X., Lin, W., & Wu, X. (2021). Dapagliflozin, metformin, monotherapy or both in patients with metabolic syndrome. *Scientific Reports*, 11(1), 24263. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03773-z>
- DeFronzo, R. A., Tobin, J. D., & Andres, R. (1979). Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 237(3), E214. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1979.237.3.E214>

- Dunaif, A., Xia, J., Book, C. B., Schenker, E., & Tang, Z. (1995). Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 96(2), 801–810. <https://doi.org/10.1172/JCI118126>
- Dupont, J., Reverchon, M., Bertoldo, M. J., & Froment, P. (2014). Nutritional signals and reproduction. En *Molecular and Cellular Endocrinology* (Vol. 382, Número 1, pp. 527–537). <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.028>
- Dupont, J., & Scaramuzzi, R. J. (2016). Insulin signalling and glucose transport in the ovary and ovarian function during the ovarian cycle. En *Biochemical Journal* (Vol. 473, Número 11, pp. 1483–1501). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160124>
- el-Roeiy, A., Chen, X., Roberts, V. J., Shimasakai, S., Ling, N., LeRoith, D., Roberts, C. T., & Yen, S. S. (1994). Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptors, and IGF-binding proteins-1-6 and the localization of their gene products in normal and polycystic ovary syndrome ovaries. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 78(6), 1488–1496. <https://doi.org/10.1210/jcem.78.6.7515389>
- Felső, R., Lohner, S., Hollódy, K., Erhardt, É., & Molnár, D. (2017). Relationship between sleep duration and childhood obesity: Systematic review including the potential underlying mechanisms. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 27(9), 751–761. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2017.07.008>
- Foretz, M., Guigas, B., & Viollet, B. (2023). Metformin: update on mechanisms of action and repurposing potential. *Nature Reviews Endocrinology*, 19(8), 460–476. <https://doi.org/10.1038/s41574-023-00833-4>
- Friedenreich, C. M., Ryder-Burbidge, C., & McNeil, J. (2021). Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Molecular Oncology*, 15(3), 790–800. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12772>

- Fruhwürth, S., Vogel, H., Schürmann, A., & Williams, K. J. (2018). Novel Insights into How Overnutrition Disrupts the Hypothalamic Actions of Leptin. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00089>
- Furat Rençber, S., Kurnaz Ozbek, S., Eraldemir, C., Sezer, Z., Kum, T., Ceylan, S., & Guzel, E. (2018). Effect of resveratrol and metformin on ovarian reserve and ultrastructure in PCOS: An experimental study. *Journal of Ovarian Research*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13048-018-0427-7>
- Gershon, E., & Dekel, N. (2020). Newly identified regulators of ovarian folliculogenesis and ovulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21124565>
- Gluszak, O., Stopinska-Gluszak, U., Glinicki, P., Kapuscinska, R., Snochowska, H., Zgliczynski, W., & Debski, R. (2012). Phenotype and Metabolic Disorders in Polycystic Ovary Syndrome. *ISRN Endocrinology*, 2012, 1–7. <https://doi.org/10.5402/2012/569862>
- Goldman, J. M., Murr, A. S., & Cooper, R. L. (2007). The rodent estrous cycle: Characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. En *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology* (Vol. 80, Número 2, pp. 84–97). <https://doi.org/10.1002/bdrb.20106>
- Graham, G. G., Punt, J., Arora, M., Day, R. O., Doogue, M. P., Duong, J. K., Furlong, T. J., Greenfield, J. R., Greenup, L. C., Kirkpatrick, C. M., Ray, J. E., Timmins, P., & Williams, K. M. (2011). Clinical Pharmacokinetics of Metformin. *Clinical Pharmacokinetics*, 50(2), 81–98. <https://doi.org/10.2165/11534750-000000000-00000>
- Guerrero-Romero, F., Simental-Mendía, L. E., González-Ortiz, M., Martínez-Abundis, E., Ramos-Zavala, M. G., Hernández-González, S. O., Jacques-Camarena, O., & Rodríguez-Morán, M. (2010). The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(7), 3347–3351. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0288>
- Guo, X., Li, X., Yang, W., Liao, W., Shen, J. Z., Ai, W., Pan, Q., Sun, Y., Zhang, K., Zhang, R., Qiu, Y., Dai, Q., Zheng, H., & Guo, S. (2021). Metformin Targets

- Foxo1 to Control Glucose Homeostasis. *Biomolecules*, 11(6), 873. <https://doi.org/10.3390/biom11060873>
- Hafiane, A., & Daskalopoulou, S. S. (2020). Adiponectin's mechanisms in high-density lipoprotein biogenesis and cholesterol efflux. *Metabolism*, 113, 154393. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154393>
- Hausman, G. J., Barb, C. R., & Lents, C. A. (2012). Leptin and reproductive function. *Biochimie*, 94(10), 2075–2081. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.02.022>
- Hong, G. K., Payne, S. C., & Jane, J. A. (2016). Anatomy, Physiology, and Laboratory Evaluation of the Pituitary Gland. En *Otolaryngologic Clinics of North America* (Vol. 49, Número 1, pp. 21–32). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2015.09.002>
- Honma, H., Endo, T., Kiya, T., Shimizu, A., Nagasawa, K., Baba, T., Fujimoto, T., Henmi, H., Kitajima, Y., Manase, K., Ishioka, S., Ito, E., & Saito, T. (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>
- Hubbard, S. R. (2013). The insulin receptor: Both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008946>
- Jaacks, L. M., Vandevijvere, S., Pan, A., McGowan, C. J., Wallace, C., Imamura, F., Mozaffarian, D., Swinburn, B., & Ezzati, M. (2019). The obesity transition: stages of the global epidemic. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 7(3), 231–240. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(19\)30026-9](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30026-9)
- Jakobsen, S., Busk, M., Jensen, J. B., Munk, O. L., Zois, N. E., Alstrup, A. K. O., Jessen, N., & Frøkiær, J. (2016). A PET Tracer for Renal Organic Cation Transporters, <sup>11</sup>C-Metformin: Radiosynthesis and Preclinical Proof-of-Concept Studies. *Journal of Nuclear Medicine*, 57(4), 615–621. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.169292>
- Johnson, T., Kaplan, L., Ouyang, P., & Rizza, P. (2012). *Evidence-based Methodology Workshop on Polycystic Ovary Syndrome*. <https://prevention.nih.gov/sites/default/files/2018-06/FinalReport.pdf>

- Kajbaf, F., De Broe, M. E., & Lalau, J. D. (2016). Therapeutic Concentrations of Metformin: A Systematic Review. En *Clinical Pharmacokinetics* (Vol. 55, Número 4, pp. 439–459). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s40262-015-0323-x>
- 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>
- Kasiske, B. L., O'Donnell, M. P., & Keane, W. F. (1992). The Zucker rat model of obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, and renal injury. *Hypertension*, 19(1\_supplement). [https://doi.org/10.1161/01.HYP.19.1\\_Suppl.I110](https://doi.org/10.1161/01.HYP.19.1_Suppl.I110)
- Kelley, D. E. (2002). Skeletal muscle triglycerides: an aspect of regional adiposity and insulin resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 967, 135–145.
- Kim, E., Seok, H. H., Lee, S. Y., Lee, D. R., Moon, J., Yoon, T. K., Lee, W. S., & Lee, K. A. (2014). Correlation between expression of glucose transporters in granulosa cells and oocyte quality in women with polycystic ovary syndrome. *Endocrinology and Metabolism*, 29(1), 40–47. <https://doi.org/10.3803/EnM.2014.29.1.40>
- Kirpichnikov, D., Samy, ;, Mcfarlane, I., & Sowers, J. R. (2002). *Metformin: An Update*. [www.annals.org](http://www.annals.org)
- Kodaman, P. H., & Behrman, H. R. (1999). *Hormone-Regulated and Glucose-Sensitive Transport of Dehydroascorbic Acid in Immature Rat Granulosa Cells\**. <https://academic.oup.com/endo/article/140/8/3659/2990814>
- Kolaczynski, J. W., Considine, R. V., Ohannesian, J., Marco, C., Opentanova, I., Nyce, M. R., Myint, M., & Caro, J. F. (1996). Responses of Leptin to Short-Term Fasting and Refeeding in Humans A Link With Ketogenesis but Not Ketones Themselves. *Diabetes*, 45. <http://diabetesjournals.org/diabetes/article-pdf/45/11/1511/361963/45-11-1511.pdf>

- Kurtz, T. W., Morris, R. C., & Pershadsingh, H. A. (1989). The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension. *Hypertension*, 13(6\_pt\_2), 896–901. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.13.6.896>
- La Sala, L., & Pontiroli, A. E. (2020). Prevention of Diabetes and Cardiovascular Disease in Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8178. <https://doi.org/10.3390/ijms21218178>
- Lambert, G. W., Schlaich, M. P., Eikelis, N., & Lambert, E. A. (2019). Sympathetic activity in obesity: a brief review of methods and supportive data. En *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1454, Número 1, pp. 56–67). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/nyas.14140>
- Lamoia, T. E., & Shulman, G. I. (2021). Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. En *Endocrine Reviews* (Vol. 42, Número 1, pp. 77–96). Endocrine Society. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa023>
- Li, J., Cao, F., Yin, H. liang, Huang, Z. jian, Lin, Z. tao, Mao, N., Sun, B., & Wang, G. (2020). Ferroptosis: past, present and future. En *Cell Death and Disease* (Vol. 11, Número 2). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2298-2>
- Liu, Z., Ren, Y. A., Pangas, S. A., Adams, J., Zhou, W., Castrillon, D. H., Wilhelm, D., & Richards, J. S. (2015). FOXO1/3 and PTEN Depletion in Granulosa Cells Promotes Ovarian Granulosa Cell Tumor Development. *Molecular Endocrinology*, 29(7), 1006–1024. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1103>
- Lizneva, D., Suturina, L., Walker, W., Brakta, S., Gavrilova-Jordan, L., & Azziz, R. (2016). Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome. En *Fertility and Sterility* (Vol. 106, Número 1, pp. 6–15). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.05.003>
- Lohrasbi, P., Karbalay-Doust, S., Tabei, S. M. B., Azarpira, N., Alaee, S., Rafiee, B., & Bahmanpour, S. (2022). The effects of melatonin and metformin on histological characteristics of the ovary and uterus in letrozole-induced polycystic ovarian syndrome mice: A stereological study. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 20(11), 973–988. <https://doi.org/10.18502/ijrm.v20i11.12365>

- Mahamed, R. R., Maganhin, C. C., Sasso, G. R. S., de Jesus Simões, M., Baracat, M. C. P., Baracat, E. C., & Soares, J. M. (2018). Metformin improves ovarian follicle dynamics by reducing theca cell proliferation and CYP-17 expression in an androgenized rat model. *Journal of Ovarian Research*, 11(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s13048-018-0392-1>
- Mansfield, R., Galea, R., Brincat, M., Hole, D., & Mason, H. (2003). Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis. *Fertility and Sterility*, 79(4), 956–962. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)956-962](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)956-962)
- Martín-Cordero, L., García, J. J., Hinchado, M. D., Bote, E., Manso, R., & Ortega, E. (2010). Habitual physical exercise improves macrophage IL-6 and TNF- $\alpha$  deregulated release in the obese Zucker rat model of the metabolic syndrome. *NeuroImmunoModulation*, 18(2), 123–130. <https://doi.org/10.1159/000322053>
- Martini, F. H., Nath, J. L., & Bartholomew, E. F. (2012). *Fundamentals Of Anatomy & Physiology* (Novena Edición). Pearson Education Inc.
- Maruthini, D., Harris, S. E., Barth, J. H., Balen, A. H., Campbell, B. K., & Picton, H. M. (2014). The effect of metformin treatment in vivo on acute and long-term energy metabolism and progesterone production in vitro by granulosa cells from women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*, 29(10), 2302–2316. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu187>
- Mathé, D. (1995). Dyslipidemia and diabetes: animal models. *Diabete & métabolisme*, 21(2), 106–111.
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., & Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7), 412–419. <https://doi.org/10.1007/BF00280883>
- McCreight, L. J., Bailey, C. J., & Pearson, E. R. (2016). Metformin and the gastrointestinal tract. En *Diabetologia* (Vol. 59, Número 3, pp. 426–435). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3844-9>
- Melkonian, E. A., Asuka, E., & Schury, M. P. (2024). *Physiology, Gluconeogenesis*. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541119/>

- Moran, C., Tena, G., Moran, S., Ruiz, P., Reyna, R., & Duque, X. (2010). Prevalence of polycystic ovary syndrome and related disorders in mexican women. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 69(4), 274–280. <https://doi.org/10.1159/000277640>
- Muñoz-de-la-Torre, L. P., Eguibar, J. R., Cortés, C., Ugarte, A., & Trujillo, A. (2018). Follicular Development and Secretion of Ovarian Hormones during the Juvenile and Adult Reproductive Lives of the Myelin Mutant *taiep* Rat: An Animal Model of Demyelinating Diseases. *International Journal of Endocrinology*, 2018, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/5718782>
- Musumeci, G., Castorina, S., Castrogiovanni, P., Loreto, C., Leonardi, R., Aiello, F. C., Magro, G., & Imbesi, R. (2015). A journey through the pituitary gland: Development, structure and function, with emphasis on embryo-foetal and later development. En *Acta Histochemica* (Vol. 117, Números 4–5, pp. 355–366). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2015.02.008>
- Nardo, L. G., & Rai, R. (2001). Metformin therapy in the management of polycystic ovary syndrome: endocrine, metabolic and reproductive effects. En *Gynecol Endocrinol* (Vol. 15).
- 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. En *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.585887>
- OMS. (2021, junio 9). *Obesidad y sobrepeso*. World Health Organization. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- OMS. (2023). *Model List of Essential Medicines*. World Health Organization. <https://list.essentialmeds.org>
- Peng, Q., Chen, X., Liang, X., Ouyang, J., Wang, Q., Ren, S., Xie, H., Wang, C., Sun, Y., Wu, X., Liu, H., Hei, C., Sun, M., Chang, Q., Liu, X., Li, G., & He, R. (2023). Metformin improves polycystic ovary syndrome in mice by inhibiting ovarian ferroptosis. *Frontiers in Endocrinology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1070264>

- Penzias, A., Bendikson, K., Butts, S., Coutifaris, C., Falcone, T., Fossum, G., Gitlin, S., Gracia, C., Hansen, K., La Barbera, A., Mersereau, J., Odem, R., Paulson, R., Pfeifer, S., Pisarska, M., Rebar, R., Reindollar, R., Rosen, M., Sandlow, J., & Vernon, M. (2017). Role of metformin for ovulation induction in infertile patients with polycystic ovary syndrome (PCOS): a guideline. *Fertility and Sterility*, *108*(3), 426–441. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.026>
- Pepling, M. E., & Spradling, A. C. (2001). Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Developmental biology*, *234*(2), 339–351. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0269>
- Perego, C., Da Dalt, L., Pirillo, A., Galli, A., Catapano, A. L., & Norata, G. D. (2019). Cholesterol metabolism, pancreatic  $\beta$ -cell function and diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1865*(9), 2149–2156. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.04.012>
- Pitetti, J. L., Torre, D., Conne, B., Papaioannou, M. D., Cederroth, C. R., Xuan, S., Kahn, R., Parada, L. F., Vassalli, J. D., Efstratiadis, A., & Nef, S. (2009). Insulin receptor and IGF1R are not required for oocyte growth, differentiation, and maturation in mice. *Sexual Development*, *3*(5), 264–272. <https://doi.org/10.1159/000252813>
- Plant, T. M. (2015). The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. En *Journal of Endocrinology* (Vol. 226, Número 2, pp. T41–T54). BioScientifica Ltd. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0113>
- Poretsky, L., Yeshua, A., Cantor, T., Avtanski, D., Stojchevski, R., Ziskovich, K., & Singer, T. (2023). The effects of irisin and leptin on steroidogenic enzyme gene expression in human granulosa cells: In vitro studies. *Metabolism Open*, *17*, 100230. <https://doi.org/10.1016/j.metop.2023.100230>
- Poretsky, L., & Kalin, M. F. (1987). *The Gonadotropic Function of Insulin\** (Vol. 8, Número 2).
- Puga y Colmenares, M. C., Trujillo Hernández, A., & 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*. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113636>

- Repaci, A., Gambineri, A., & Pasquali, R. (2011). The role of low-grade inflammation in the polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 335(1), 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.08.002>
- Richards, J. S., & Pangas, S. A. (2010). New insights into ovarian function. *Handbook of experimental pharmacology*, 198, 3–27. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-02062-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-02062-9_1)
- Robertson, D. M., Burger, H. G., & Fuller, P. J. (2004). Inhibin/activin and ovarian cancer. *Endocrine-related cancer Endocr Relat Cancer Endocr. Relat. Cancer*, 11(1), 35–49. <https://doi.org/10.1677/erc.0.0110035>
- Rojas, L. B. A., & Gomes, M. B. (2013). Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes. *Diabetology & metabolic syndrome*, 5(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-5-6>
- Romero, T. F., Gipsis, I., Román, S., & Clapés Hernández, S. (2021). Protocolo para la citología vaginal directa de ratas de laboratorio Protocol for direct vaginal cytology of laboratory rats. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 20(3). <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/4086>
- Rosenfield, R. L. (2020). Current concepts of polycystic ovary syndrome pathogenesis. *Current Opinion in Pediatrics*, 32(5), 698–706. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000945>
- Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*, 4(1), 177–197. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>
- Saiduddin, S., Bray, G. A., York, D. A., & Swerdloff, R. S. (1973). Reproductive Function in the Genetically Obese “Fatty” Rat. *Endocrinology*, 93(6), 1251–1256. <https://doi.org/10.1210/endo-93-6-1251>
- Samoto, T., Maruo, T., Ladines-Llave, C. A., Matsuo, H., Deguchi, J., & Barnea, E. R. (1993). Insulin Receptor Expression in Follicular and Compartments of the Human Ovary over the Follicular Growth, Regression and Atresia Stromal Course of. En *Endocrine Journal* (Vol. 40, Número 6).
- Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2016). The pathogenesis of insulin resistance: Integrating signaling pathways and substrate flux. En *Journal of Clinical*

- Investigation* (Vol. 126, Número 1, pp. 12–22). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI77812>
- Saper, C. B., & Lowell, B. B. (2014). The hypothalamus. En *Current Biology* (Vol. 24, Número 23, pp. R1111–R1116). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.023>
- Scaramuzzi, R., Zouaïdi, N., Menassol, J.-B., & Dupont, J. (2015). The effects of intravenous, glucose versus saline on ovarian follicles and their levels of some mediators of insulin signalling. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-13-6>
- Secretaría de Agricultura, G. D. R. P. y A. (2001). *NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*. SAGARPA.
- Shi, F., & LaPolt, P. (2003). Relationship between FoxO1 protein levels and follicular development, atresia, and luteinization in the rat ovary. *Journal of Endocrinology*, 179(2), 195–203. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1790195>
- Simental-Mendía, L. E., Rodríguez-Morán, M., & Guerrero-Romero, F. (2008). The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 6(4), 299–304. <https://doi.org/10.1089/met.2008.0034>
- Srinivasan, K., & Ramarao, P. (2007). Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *The Indian journal of medical research*, 125(3), 451–472.
- Sui, Y., Kong, X., Fan, R., Ye, Y., Mai, H., Zhuo, S., Lu, W., Ruan, P., Fang, S., & Yang, T. (2019). Long-term treatment with metformin in the prevention of fatty liver in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13098-019-0491-1>
- Sutton-McDowall, M. L., Gilchrist, R. B., & Thompson, J. G. (2010). The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *REPRODUCTION*, 139(4), 685–695. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0345>
- Taniguchi, C. M., Emanuelli, B., & Kahn, C. R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: Insights into insulin action. En *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 7, Número 2, pp. 85–96). <https://doi.org/10.1038/nrm1837>

- Tao, X., Cai, L., Chen, L., Ge, S., & Deng, X. (2019). Effects of metformin and Exenatide on insulin resistance and AMPK $\alpha$ -SIRT1 molecular pathway in PCOS rats. *Journal of ovarian research*, 12(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0555-8>
- Teede, H., Deeks, A., & Moran, L. (2010). Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Medicine*, 8(1), 41. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-8-41>
- Tokarz, V. L., MacDonald, P. E., & Klip, A. (2018). The cell biology of systemic insulin function. *Journal of Cell Biology*, 217(7), 2273–2289. <https://doi.org/10.1083/jcb.201802095>
- Tosi, F., Bonora, E., & Moghetti, P. (2017). Insulin resistance in a large cohort of women with polycystic ovary syndrome: a comparison between euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp and surrogate indexes. *Human Reproduction*, 32(12), 2515–2521. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex308>
- Tran, H., Brunet, A., Griffith, E. C., & Greenberg, M. E. (2003). The Many Forks in FOXO's Road. *Sci STKE*, 2003(172), RE5.
- Tsatsanis, C., Dermitzaki, E., Avgoustinaki, P., Malliaraki, N., Mytaras, V., & Margioris, A. N. (s/f). The impact of adipose tissue-derived factors on the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. En *HORMONES* (Vol. 2015, Número 4).
- Velasco, G., Geelen, M. J. H., & Guzmán, M. (1997). Control of Hepatic Fatty Acid Oxidation by 5'-AMP-Activated Protein Kinase Involves a Malonyl-CoA-Dependent and a Malonyl-CoA-Independent Mechanism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 337(2), 169–175. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.9784>
- Vineetha K Ramdas Nayak, Praseeda Satheesh, Mohan T Shenoy, & Sanjay Kalra. (2022). Triglyceride Glucose (TyG) Index: A surrogate biomarker of insulin resistance. *Journal of the Pakistan Medical Association*, 72(5), 986–988. <https://doi.org/10.47391/JPMA.22-63>

- Vink, J. M., Sadrzadeh, S., Lambalk, C. B., & Boomsma, D. I. (2006). Heritability of Polycystic Ovary Syndrome in a Dutch Twin-Family Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(6), 2100–2104. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1494>
- Wade, G. N., & Schneider, J. E. (1996). *Control of fertility by metabolic cues*. [www.physiology.org/journal/ajpendo](http://www.physiology.org/journal/ajpendo)
- Wang, A. N., Carlos, J., Fraser, G. M., & McGuire, J. J. (2022). Zucker Diabetic-Sprague Dawley (ZDSD) rat: Type 2 diabetes translational research model. *Experimental Physiology*, 107(4), 265–282. <https://doi.org/10.1113/EP089947>
- Wood, I. S., & Trayhurn, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition*, 89(1), 3–9. <https://doi.org/10.1079/bjn2002763>
- Wu, Y., Li, P., Zhang, D., & Sun, Y. (2018). Metformin and pioglitazone combination therapy ameliorate polycystic ovary syndrome through AMPK/PI3K/JNK pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(2), 2120–2127. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5650>
- Xing, C., Lv, B., Zhao, H., Wang, D., Li, X., & He, B. (2021). Metformin and exenatide upregulate hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$ , sex hormone binding globulin levels and improve hepatic triglyceride deposition in polycystic ovary syndrome with insulin resistance rats. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 214, 105992. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2021.105992>
- Yaribeygi, H., Farrokhi, F. R., Butler, A. E., & Sahebkar, A. (2019). Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. En *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 234, Número 6, pp. 8152–8161). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.27603>
- Yerevanian, A., & Soukas, A. A. (2019). Metformin: Mechanisms in Human Obesity and Weight Loss. En *Current Obesity Reports* (Vol. 8, Número 2, pp. 156–164). Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s13679-019-00335-3>
- Zeleznik, A. J., & Plant, T. M. (2015). Control of the Menstrual Cycle. En T. M. Plant & A. J. Zeleznik (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (Fourth, Vol. 2, pp. 1307–1361). Elsevier.

- Zhang, S., Tu, H., Yao, J., Le, J., Jiang, Z., Tang, Q., Zhang, R., Huo, P., & Lei, X. (2020). Combined use of Diane-35 and metformin improves the ovulation in the PCOS rat model possibly via regulating glycolysis pathway. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00613-z>
- Zhang, T., Wang, S., Lin, Y., Xu, W., Ye, D., Xiong, Y., Zhao, S., & Guan, K. L. (2012). Acetylation negatively regulates glycogen phosphorylase by recruiting protein phosphatase 1. *Cell Metabolism*, *15*(1), 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.005>
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J., & Moller, D. E. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *Journal of Clinical Investigation*, *108*(8), 1167–1174. <https://doi.org/10.1172/JCI13505>
- Zucker, L. M., & Antoniades, H. N. (1972). Insulin and Obesity in the Zucker Genetically Obese Rat “Fatty”. *Endocrinology*.