



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA HISTOLÓGICA  
DEL OVARIO DEL *NEOTOMODON ALSTONI*,  
INDUCIDOS POR LA OBESIDAD

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARÍA DE LOS ÁNGELES MARTÍNEZ

DE LA LLERA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARÍA DEL CARMEN MIÑANA SOLIS

2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del Alumno

Martínez  
De la Llera  
María de los Ángeles  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
303567268

2. Datos del Tutor

Doctora  
María del Carmen  
Miñana  
Solís

3. Datos del Sinodal 1

Doctora  
María Genoveva  
González  
Morán

4. Datos del Sinodal 2

Doctora  
María Cristina  
Revilla  
Monsalve

5. Datos del Sinodal 3

Doctora  
Rosario  
Ortiz  
Hernández

6. Datos del Sinodal 4

Doctor  
Manuel  
Miranda  
Anaya

7. Datos del Trabajo

Cambios en la estructura histológica del ovario del *Neotomodon alstoni*, inducidos por la obesidad.  
97 pp.  
2013

## DEDICATORIA

"Cuando un ser humano ha experimentado el Universo,  
es imposible que vuelva a ser el de antes".

L. Schweickart.

A mi familia que me ha apoyado toda mi vida y nunca ha dudado de mí.

A mi mamá, María de los Ángeles De la Llera, por ser la persona que me ha enseñado a vivir, a ser trabajadora y honesta. Que siempre me ha guiado, aconsejado y consentido buscando siempre darme las herramientas para ser la persona que quiero ser.

A mi papá, Carlos Martínez, que ha buscado la forma de apoyarme a pesar de todo.

A mi hermano, Carlos Martínez, por ser un ejemplo y un sostén en los momentos más difíciles de este proceso y de muchos otros.

A todos mis amigos y seres queridos que me animaron y apoyaron durante este trabajo de la manera más incondicional y cariñosa. Especialmente para Omar, Betzy y Pável.

## AGRADECIMIENTOS

A mi tutora y amiga, Mary Carmen, por darme la oportunidad de trabajar con ella y por su apoyo y guía en el desarrollo de este proyecto.

A Manuel Miranda por confiar en mi y darme la oportunidad de realizar este trabajo.

A la Dra. Rosario Ortiz, por su tiempo, apoyo y orientación esenciales en el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Cristina Revilla y el Dr. Miguel Ángel Palomino, por permitirme un espacio para trabajar, con las mejores atenciones y apoyo.

Al Laboratorio de Biología Animal Experimental de la Facultad de Ciencias, por permitirnos un espacio de trabajo en sus instalaciones. Principalmente a la Dra. Pilar Durán y al Dr. René Cárdenas.

Al M. en C. Agustín Carmona del bioterio de la Facultad de Ciencias, por su apoyo y orientación.

A los sinodales por su tiempo en la revisión de esta tesis y por sus aportaciones para que ésta se concluyera con éxito.

Al proyecto CONACYT 82514, "Efecto de la Diabetes materna sobre el desarrollo y función del páncreas de fetos y crías de ratas".

Al apoyo económico del proyecto PAPIIT, UNAM IN225311, "Trastornos por la obesidad y el síndrome metabólico sobre los ritmos circadianos y conductuales en el ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni*", con el apoyo de beca para tesis.

A la UNAM por brindarme la oportunidad de desarrollarme intelectualmente y poder formarme como profesionista en la Facultad de Ciencias.

## ÍNDICE

1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCIÓN	9
2.1. Obesidad	10
2.1.1. Fisiopatología de la Obesidad	10
2.1.2. Genética de la Obesidad	14
2.1.3. Síndrome Metabólico	15
2.1.4. Consecuencias de la Obesidad	16
2.1.5. Modelos animales de la Obesidad	18
2.2. Fisiología del aparato reproductor de la hembra	19
2.2.1. Ovarios	19
2.2.1.1. Morfología del ovario	21
2.2.1.2. Estroma	22
2.2.1.3. Folículos	22
2.2.1.4. Cuerpo lúteo	29
2.2.2. Biosíntesis de esteroides ováricos	30
2.2.2.1. Progestinas	31
2.2.2.2. Andrógenos	31
2.2.2.3. Estrógenos	32
2.2.3. Ciclo estral y ovárico	35
2.2.4. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario	39
2.3. Obesidad y Fertilidad	43
3. ANTECEDENTES	45
3.1. El ratón de los volcanes <i>Neotomodon alstoni</i>	46
3.1.1. Clasificación Taxonómica	46
3.1.2. Distribución Geográfica	47

3.1.3. Estado de Conservación	48
3.1.4. Biología General	48
3.2. <i>Neotomodon alstoni</i> como modelo biológico	49
4. JUSTIFICACIÓN	51
5. HIPÓTESIS	52
6. OBJETIVOS	52
7. MATERIAL Y MÉTODO	53
7.1. Animales	53
7.2. Procedimiento experimental	54
7.3. Análisis de datos	55
8. RESULTADOS	57
8.1. Peso de las hembras	57
8.2. Sincronización estral entre hembras delgadas y obesas	58
8.3. Estradiol y Ciclo estral	59
8.4. Histología del Ovario	60
8.4.1. Folículos	60
8.5. Fotomicrografías de los ovarios	64
9. DISCUSIÓN	73
9.1. Peso de las hembras	73
9.2. Sincronización estral entre hembras delgadas y obesas	73
9.3. Estradiol y Ciclo estral	74
9.4. Histología del Ovario	75
9.4.1. Folículos	75
10. CONCLUSIONES	79
11. ANEXOS	80
ANEXO I. CICLO ESTRAL	80

ANEXO II. SANGRADO RETRO-ORBITAL	81
ANEXO III. FORMULARIO	82
ANEXO IV. HISTOLOGÍA	84
12. REFERENCIAS	86



## 1. RESUMEN

La obesidad es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. Diversas investigaciones han demostrado que ésta influye de manera determinante en el metabolismo del individuo provocando alteraciones en la secreción, asimilación y concentración de varias hormonas; algunas de éstas, como el estradiol que son esenciales para el funcionamiento de los procesos reproductivos de las hembras, principalmente en la maduración de los ovocitos a través de la foliculogénesis. El propósito de este trabajo fué determinar si existe relación entre el peso corporal, la concentración de estradiol en sangre y el desarrollo de los folículos ováricos en hembras del ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni*, a partir de la capacidad de sincronización a un estímulo olfativo. Los resultados mostraron que las hembras delgadas requieren menor tiempo para sincronizarse a un estímulo olfativo que las obesas. Así mismo, se registró que la concentración de hormonas está ligada a la etapa del ciclo estral en el que se encuentran los individuos. Para las delgadas esta concentración es igual, debido a que coinciden en la misma etapa del ciclo estral, diestro; respecto a las obesas, se observó gran variación en la concentración de esta hormona, ésto es consistente con la etapa del ciclo en que se encontraba cada una. El análisis histológico de los ovarios demostró que no hay diferencias significativas en el número de folículos en la mayoría de las etapas de desarrollo de los mismos entre las hembras delgadas y obesas, solamente se observó diferencia significativa en los folículos terciarios atrésicos, la cual podría estar relacionada con la condición de obesidad. Por lo anterior este trabajo sirve como antecedente para el estudio más detallado de las posibles diferencias entre organismos delgados y obesos en lo que se refiere a las modificaciones del ciclo reproductivo así como en la posible fertilidad de esta especie. Se requieren más estudios al respecto para ampliar el conocimiento de los efectos anteriormente mencionados.

## 2. INTRODUCCIÓN

Actualmente, el estudio de la obesidad es multidisciplinario y ha trascendido el campo de la biología, por lo que ha alcanzado a influir en la salud pública, sociedad, cultura, conducta y política de la sociedad.

Desde la década de los ochentas, la obesidad se ha incrementado a un ritmo acelerado. Los cambios en la cantidad y calidad de la ingesta de los alimentos, asociados a la falta de actividad física han hecho que ésta sea considerada como pandemia. Cada año mueren alrededor de 2,6 millones de personas a causa de la obesidad o sobrepeso. Aunque anteriormente se consideraba un problema confinado a los países desarrollados, en la actualidad la obesidad también es prevalente en los países de bajos ingresos. En el 2012, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) señaló que México ocupa el primer lugar a nivel mundial en el porcentaje de personas adultas que presentan esta condición.

Esta patología asociada a otras como el síndrome metabólico, son factores de riesgo importantes para el desarrollo de diabetes tipo 2, enfermedades arterialcoronarias y accidentes cerebrovasculares, que son las principales causas de muerte en nuestro país. El control de estas alteraciones metabólicas incide directamente en la morbimortalidad de muchos padecimientos; sin embargo, en la actualidad, no existen estrategias de prevención y tratamiento eficaces para la mayoría de los casos. Por estas razones, la obesidad y el síndrome metabólico se han convertido en un serio problema de salud pública en los países en desarrollo (García-García *et al.*, 2008).

La obesidad puede considerarse como el principal problema de salud pública al cual se enfrenta México, debido a su gran prevalencia, sus consecuencias y su asociación con las principales causas de mortalidad. La salud pública desempeña un papel fundamental tanto en la identificación de factores determinantes y sus posibles soluciones como en la implementación de

medidas para su control y la evaluación de su eficacia. En el año 2012, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) reportó que 35% de los adolescentes presenta sobrepeso u obesidad, en el ámbito nacional esto representa alrededor de 6 325 131 individuos entre 12 y 19 años de edad. Así mismo, la prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos es de 73.9%, del cual el 64% se presenta en hombres y el 82.8% en mujeres. De acuerdo al Índice de Masa Corporal (IMC) establecido para México, en mujeres de 20 a 49 años de edad, se observó que en el periodo de 1988 a 2006 la prevalencia de sobrepeso incrementó 41.2% y la de obesidad 270.5%. Si bien la tendencia de sobrepeso disminuyó 5.1% entre el año 2006 y 2012, la de obesidad aumentó 2.9% (Gutiérrez *et al.*, 2012).

## **2.1. Obesidad**

La obesidad puede ser definida como el desequilibrio entre el consumo y el gasto de energía (Garaulet y Madrid, 2010). Esto puede deberse a la ingesta excesiva de alimento, al bajo consumo energético o actividad física y/o la combinación de ambos fenómenos (Speakman *et al.*, 2008), y está asociada a la concentración excesiva de tejido adiposo (Roth *et al.*, 2004).

### **2.1.1. Fisiopatología de la Obesidad**

El tejido adiposo, comunmente denominado grasa corporal, se concentra en células especializadas conocidas como adipocitos; éstos son derivados del mesénquima cuya principal función es almacenar lípidos, principalmente triglicéridos y colesterol esterificado, como reserva energética. Hay dos tipos de tejido adiposo, el blanco y el pardo. El blanco se caracteriza por tener una sola vesícula de grasa que ocupa casi todo el volumen celular y el citosol, los organelos y el núcleo quedan agrupados en una estrecha franja periférica; este tejido está especializado en

el almacenamiento de lípidos como reserva energética a largo plazo. El pardo tiene menos cantidad de grasa, por lo tanto, posee mayor número de vesículas de menor tamaño además de gran número de mitocondrias; su función principal es generar calor (Trayhurn, 2005).

Se ha demostrado que la grasa se distribuye por todo el cuerpo, incluso fuera de los adipocitos, a esto se le conoce como grasa metastásica (Unger y Orci, 2002). El depósito de ésta ocurre generalmente cuando el tejido adiposo se encuentra saturado. La grasa metastásica puede comprometer o dañar el tejido hospedero donde se deposita (Wanless y Lentz, 1990; Halsted, 1999). Ésta puede ser almacenada en el músculo (Perseghin *et al.*, 2003), e incluso las células  $\beta$  del páncreas pueden presentar depósitos de grasa que interfieren con la secreción de insulina (Unger y Orci, 2002).

También se ha hecho distinción entre los tipos de grasa basándose en su localización en el organismo, se denominan depósitos de grasa periféricos y centrales o, en otras palabras, depósitos subcutáneos y viscerales (Björntorp y Brodoff, 1992).

El tejido adiposo secreta gran número de moléculas de señalización (Figura 1) (Cottam *et al.*, 2004), estas secreciones definen el tipo de depósito. Aquellos cuyas secreciones mantienen el metabolismo normal, por ejemplo la adecuada secreción de insulina, la sensibilidad a la hormona y el aumento en la eficiencia del aprovechamiento de la glucosa, son conocidos como depósitos de grasa “buena”, y a los depósitos cuyas secreciones promueven el mal funcionamiento metabólico se les conoce como depósitos de grasa “mala” (Björntorp y Brodoff, 1992).

Los tres productos peptídicos más importantes que se secretan en este tejido son: la leptina que regula la saciedad entre otros procesos, la adiponectina que aumenta la sensibilidad de las células blanco a la insulina y la resistina que incrementa la resistencia a la insulina, la cual ha sido considerada como benéfica debido a que mejora la sensibilidad a la insulina y promueve la

eliminación de la glucosa (O'Rahilly, 2002). Estos tres productos son exclusivamente generados en el tejido adiposo, mientras que muchas otras moléculas de señalización derivadas de este tejido son también producidas en otros tejidos, es decir, no son elaboradas exclusivamente en el tejido adiposo (Roth *et al.*, 2004).

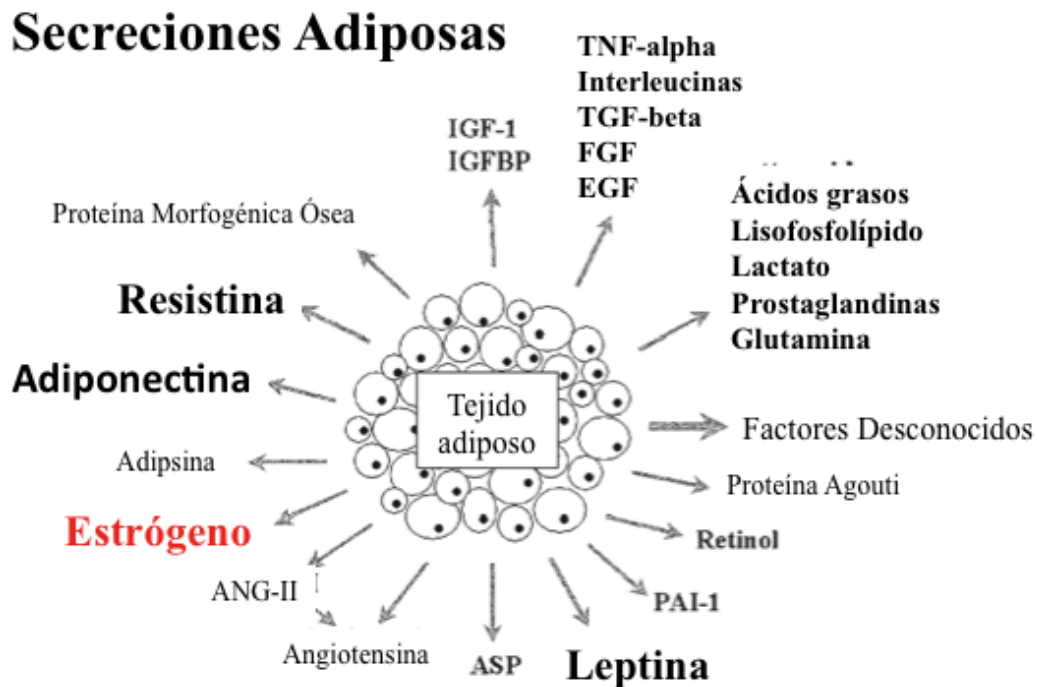


Figura 1. Productos de secreción del tejido adiposo: leptina, adiponectina y resistina; estos péptidos se producen exclusivamente en este tejido. Además, es responsable de la secreción de gran número de moléculas de señalización y contiene adipocitos y macrófagos activados, ambos considerados como células secretoras. (Modificado de: Roth *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que el tejido adiposo normalmente alberga macrófagos que se encuentran agrupados entre los adipocitos (Weisberg *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003). Se ha propuesto que las secreciones de los adipocitos atraen a los macrófagos y estimulan su maduración y activación. La

densidad de los macrófagos en el tejido adiposo de ratones y humanos obesos es mayor que en el tejido adiposo de organismos con peso normal (Roth *et al.*, 2004).

El macrófago activado en el tejido adiposo es el factor determinante para el funcionamiento de la grasa "mala" y genera el estímulo proinflamatorio característico de la obesidad. Los estudios demuestran que las citocinas proinflamatorias son importantes componentes de la resistencia a la insulina y funcionan como mediadoras de la patología en la obesidad, diabetes, arterosclerosis y envejecimiento (Perseghin *et al.*, 2003; Weisberg *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003).

Se creó que la insulina y las citocinas proinflamatorias intervienen en regular la sensibilidad a la insulina en las células blanco icónicas así como en las células secretoras de citocinas de los sistemas inmunes innatos (Liang *et al.*, 2004).

Otra característica de la obesidad es el exceso de ácidos grasos libres secretados por los adipocitos. Cuando éstos estimulan a las células  $\beta$  pancreáticas aumenta la liberación de insulina, que a su vez, en el adipocito, amortigua la lipólisis, mejora la reesterificación de los ácidos grasos y reduce los ácidos grasos libres de plasma a niveles normales. Entre comidas, los ácidos grasos son el principal regulador de la secreción de insulina basal (Bollheimer *et al.*, 1998), lo que en consecuencia es determinante significativo de la "sensibilidad a la insulina" en todo el organismo.

Niveles elevados de ácidos grasos libres también tienen efectos directos en el metabolismo del músculo e hígado, donde amortiguan los efectos de la insulina (Kim *et al.*, 2004; Perseghin *et al.*, 2003; Randle *et al.*, 1963). De esta manera, la masa de grasa hipertrofiada produce sobreabastecimiento de ácidos grasos en sangre que contribuye de muchas maneras a las alteraciones asociadas a la obesidad.

### 2.1.2. Genética de la Obesidad

Diversos estudios han concluido que la obesidad tiene una fuerte base genética (Stunkard *et al.*, 1986; Stunkard *et al.*, 1990).

Los efectos monogénicos (relacionados a un solo gen) que causan obesidad severa, fueron primero identificados en roedores hace varias décadas y, más recientemente, han sido descubiertos en humanos (Farooqi y O'Rahilly, 2004; O'Rahilly *et al.*, 2003). La lista de defectos monogénicos responsable de la obesidad en humanos va en aumento; dos ejemplos de estos genes son los que causan deficiencia de la producción de leptina y mal funcionamiento del receptor de melanocortina 4 (Branson *et al.*, 2003; Farooqi *et al.*, 2003; Farooqi y O'Rahilly, 2004; List y Habener, 2003; O'Rahilly *et al.*, 2003). Cada uno ha sido asociado con sobrealimentación causada por la pérdida de una señal inhibitoria de la alimentación (anorexigénica). Las mutaciones del receptor de melanocortina 4, la más común de las obesidades monogénicas, están asociadas a los "atracones" (Farooqi *et al.*, 2003; Branson *et al.*, 2003; List y Habener, 2003).

En general, los estudios más recientes referentes a la obesidad han determinado que se trata de un desorden complejo que resulta de la interacción de múltiples *genes susceptibles* con *factores ambientales* a lo largo del tiempo (Roth *et al.*, 2004).

El desarrollo de la obesidad está asociado con la incidencia de otras alteraciones en el metabolismo, que demeritan la calidad de vida del individuo. De estos padecimientos, el síndrome metabólico es de los más estudiados.

### 2.1.3. Síndrome Metabólico

En 1988, Gerald Reaven propuso que la presencia del "grupo de resistencia" a la insulina (e hiperinsulinemia), intolerancia a la glucosa, alteraciones de los lípidos plasmáticos (comúnmente un nivel elevado de ácidos grasos libres) y la hipertensión eran los componentes de un sólo síndrome, que llamó *Síndrome x* y que actualmente es conocido como *Síndrome metabólico* (Reaven, 1988; Reaven, 2003).

Actualmente, se han presentado dos avances importantes en el estudio de esta alteración; el primero se refiere a que los componentes del síndrome metabólico están ligados al exceso de producción local de cortisol. Normalmente, esta hormona (producida por la glándula adrenal) es convertida a cortisona inactiva por la 11 $\beta$ -hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 2, producida en los riñones. Sin embargo, la 11 $\beta$ -hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 1, que se produce en los adipocitos, transforma la cortisona inactiva a cortisol activo. Por lo tanto, la sobreproducción de cortisol en el tejido adiposo promueve el síndrome metabólico, al menos en algunos individuos (Masuzaki y Flier, 2003; Rask *et al.*, 2001).

El segundo avance, es el cambio de cuatro (o más) componentes del síndrome metabólico a un sólo enfoque en la resistencia a la insulina; ésto se debe a que esta característica es el predictor dominante e independiente de la mayoría de las enfermedades relacionadas al envejecimiento, que incluye las alteraciones cardiovasculares y el cáncer (Reaven, 1988; Reaven, 2003).

El aumento agudo de insulina estimula el metabolismo, pero la persistencia del nivel elevado de esta hormona circulante desensibiliza las células blanco por diversos mecanismos, que incluyen efectos en el receptor de insulina (Gavin *et al.*, 1974) y en varios sitios más allá del receptor (Le Marchand *et al.*, 1977; Zick, 2003).



La hiperinsulinemia (el exceso de insulina en sangre) causa resistencia a la insulina y disminuye la afinidad de esta hormona a su receptor, así como incrementa la concentración de los triglicéridos. Estudios con ratones transgénicos muestran que la hipersecreción primaria de insulina en ratones delgados produce resistencia a la insulina generalizada y un estado metabólico semejante a las primeras etapas de la diabetes (Marban y Roth, 1996). En resumen, la hipersecreción de insulina puede ser “la causa de” y “el resultado de” la resistencia a la insulina (Roth *et al.*, 2004).

Además de la relación entre la obesidad y el síndrome metabólico, se ha demostrado que ésta forma parte importante en otros padecimientos y alteraciones del metabolismo, como son procesos asociados al envejecimiento, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, incidencia de ciertos tipos de cáncer, entre otras, que se desarrollan a continuación.

#### **2.1.4. Consecuencias de la Obesidad**

La obesidad influye de manera determinante en los procesos de envejecimiento, especialmente cuando está asociada a la diabetes. También acelera el inicio, aumenta la prevalencia e intensifica la severidad de las principales enfermedades asociadas al envejecimiento como son hipertensión, padecimientos cardiovasculares y cerebrovasculares, entre otros, pero no presenta una relación con el desarrollo de la osteoporosis (donde actúa como agente protector) (Bruunsgaard y Pedersen, 2003; Darnton-Hill *et al.*, 2004; Ogden *et al.*, 2003).

Se han desarrollado numerosas teorías para definir el concepto de envejecimiento, pero ninguna ha sido aceptada completamente. Escencialmente se define como la acumulación de cambios adversos en el organismo que aumentan el riesgo de muerte, éstos pueden ser atribuidos

al desarrollo, defectos genéticos, ambiente, enfermedades y los procesos innatos de envejecimiento (Harman, 1998).

De los padecimientos cardiovasculares y cerebrovasculares asociados a la obesidad, algunos de los más importantes son: hipertensión (Hubert *et al.*, 1983; Stamler *et al.*, 1978), infarto al miocardio (Piegas *et al.*, 2003), embolia (Rexrode *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 1996) e incremento en el riesgo de desarrollar demencia (Gustafson *et al.*, 2003; Kanaya *et al.*, 2004).

La obesidad también aumenta el riesgo de cáncer, particularmente en las mamas y el endometrio. Tradicionalmente, ésto se atribuye a la influencia del estrógeno producido en exceso por el tejido adiposo (Huang *et al.*, 1997; Shimizu *et al.*, 1991). Así mismo, otros estudios demostraron que diversos tipos comunes de cáncer (no dependientes de estrógeno) se presentan más en personas con obesidad, como el que se desarrolla en el colón y el riñón (Lew y Garfinkel, 1979).

Muchos otros órganos y sistemas se ven afectados, como sucede con la esteatosis hepática (hígado graso) asociada a la obesidad que puede originar disfunción hepática y cirrosis (Wanless y Lentz, 1990; Halsted, 1999), la apnea del sueño y asma (Luder *et al.*, 2004; Vgontzas *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2003), osteoartritis (Felson *et al.*, 1988; Mokdad *et al.*, 2003; Manek *et al.*, 2003), cálculos biliares (Maclure *et al.*, 1989), problemas de fertilidad, embarazo y parto (Pasquali *et al.*, 2003) y aumento en la depresión y suicidio (Johnston *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004).

Debido a la importancia en el estudio de esta enfermedad, se han desarrollado distintos métodos para estudiarla. Cada uno se enfoca en distintos aspectos de esta alteración.

### 2.1.5. Modelos animales de la Obesidad

Se han desarrollado diversos modelos animales para estudiar los efectos de la obesidad, los más comunes son los inducidos genéticamente en laboratorio, algunos ejemplos son los deficientes en producción de leptina ( $Lep^{ob/ob}$ ); carentes del receptor de leptina ( $LepR^{ob/ob}$ ); el letal amarillo de aguti ( $A^y/a$ ), individuos deficientes del receptor 4 de melanocortina (MCR-4) y del receptor 3 (MCR-3). En contraste, los modelos animales que presentan la condición de obesidad de manera no inducida o natural son muy pocos (Kennedy *et al.*, 2010).

Estos modelos animales utilizados para estudiar la obesidad, muestran niveles elevados de corticosterona (Smith, 1996). También se ha observado que las hembras con obesidad presentan el inicio de la pubertad más temprano que aquellas con peso normal. Así mismo, la obesidad se ha asociado al incremento en el riesgo de hiperandrogenismo y de ciclos anovulatorios (Smith, 1996).

Se ha descrito que los estrógenos mantienen la homeostasis de energía vía sus receptores  $ER\alpha$  y  $ER\beta$ , al limitar el consumo de energía y lipogénesis, lo cual mejora el gasto de energía y disminuye la secreción y sensibilidad a la insulina (Mauvais-Jarvis, 2011).

Debido a la importancia del tejido adiposo en la secreción de hormonas, como la leptina y el estrógeno, se ha demostrado que hay una relación entre el aumento de masa corporal y alteraciones en características reproductivas del organismo. La probabilidad de embarazo en mujeres obesas disminuye sostenidamente conforme el IMC aumenta (Van der Steeg *et al.*, 2008).

Numerosos estudios han demostrado la influencia de la obesidad en aspectos reproductivos de las hembras, principalmente en alteraciones en la composición y concentración de sustancias de

gran importancia en los procesos metabólicos de los individuos (Pandey *et al.*, 2010). Debido a esto, es importante estudiar la fisiología reproductiva de la hembra y el efecto de la obesidad en ésta.

## **2.2. Fisiología del aparato reproductor de la hembra**

El sistema reproductivo de la hembra está compuesto por ovarios, oviductos o trompas de falopio, útero, cervix, vagina y genitales externos (Nalbandov, 1976) (Figura 2). Además, este sistema está controlado por interacciones complejas entre factores hormonales y psicológicos (Gartner y Hiatt, 2002).

### **2.2.1. Ovarios**

Los ovarios son órganos pareados situados dentro de la cavidad abdominal. Se encuentran suspendidos en el ligamento ancho del útero por una inserción llamada mesoovario, un pliegue especial del peritoneo que lleva vasos sanguíneos a los ovarios. Están cubiertos por una capa sencilla de epitelio denominada epitelio germinal. Directamente debajo de éste se encuentra la túnica albugínea, que es una cápsula de tejido conectivo denso irregular, colagenoso, poco vascularizado, cuyas fibras de colágena se orientan en una corteza celular y una médula, que consiste sobre todo en tejido conectivo laxo con vascularización abundante; los vasos sanguíneos de la médula derivan de las arterias ováricas. El ovario se divide en corteza y médula, aunque histológicamente esta división no es completamente definida (Gartner y Hiatt, 2002).

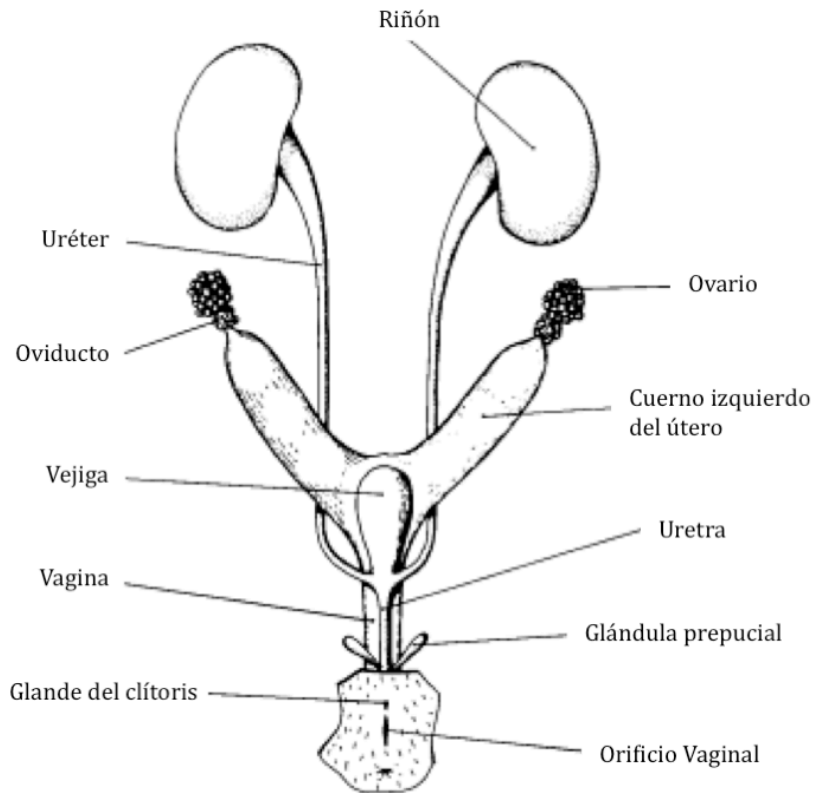


Figura 2. Esquema del aparato reproductor femenino de la rata (Modificado de: Suckow *et al.*, 2005).

Los ovarios tienen dos funciones completamente diferenciadas pero relacionadas entre sí, la primera es la endócrina y la segunda es la gametogénesis (Peters y McNatty, 1980). La función endócrina del ovario se refiere a la producción y secreción de hormonas que aseguran la producción regular de ovocitos sanos en el momento en el que tendrán la máxima oportunidad de ser fertilizados. Sin embargo, la señal de maduración de éstos se origina en la hipófisis anterior, donde se secretan gonadotropinas que estimulan el crecimiento de los folículos (Foliculogénesis), la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Peters y McNatty, 1980). Ésta función, es altamente regulada por un sistema de retroalimentación que involucra al hipotálamo,

la hipófisis y al ovario, que es considerado como un reloj biológico que da la temporalidad al ciclo hormonal de este eje (Peters y McNatty, 1980).

### 2.2.1.1. Morfología del ovario

El ovario adulto se considera compuesto por tres unidades funcionales separadas: (1) el estroma y tejido intersticial, (2) los folículos y (3) el cuerpo lúteo. Estas estructuras están en constante recambio y mientras una se degenera, otra puede ser formada a partir de estos elementos (el folículo se transforma en el cuerpo lúteo, y los folículos atrésicos se agregan al estroma) (Figura 3) (Peters y McNatty, 1980).

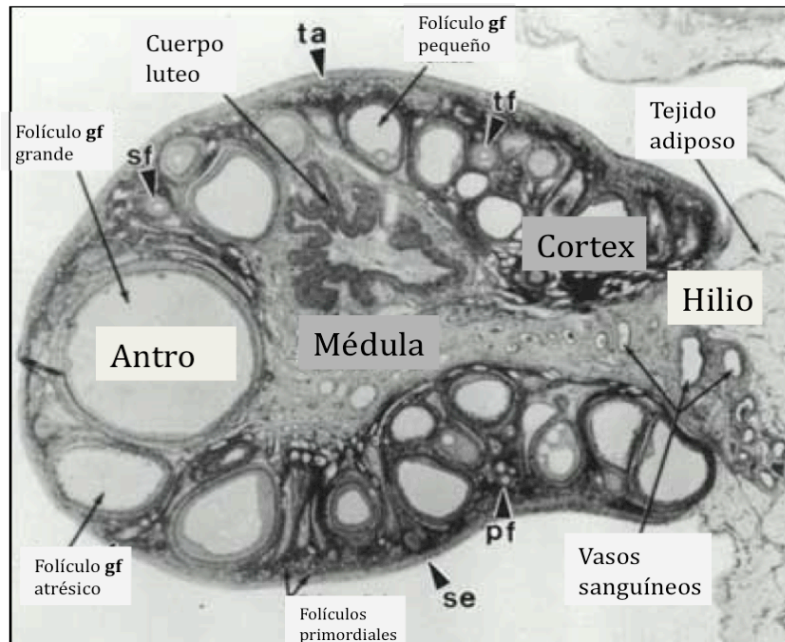


Figura 3. El ovario adulto se subdivide en tres regiones: el cortex, la médula y las regiones del hilio. El cortex consiste en la superficie de epitelio (se), túnica albugínea (ta) y los folículos ováricos primordiales (pf), primarios (pr), secundarios (sf), folículo terciario (tf) y folículo de Graaf (gf). La médula está constituida por grandes vasos sanguíneos y nervios. El hilio se constituye por las grandes arterias espirales y el hilio o células ováricas de Leydig (Modificado de: Bloom y Fawcett, 1975).

La corteza del ovario está compuesta por una red de tejido conectivo, llamada estroma, que contiene células estrómaticas similares a fibroblastos y folículos ováricos en diversas etapas de desarrollo.

#### **2.2.1.2. Estroma**

El estroma es el tejido de sostén de los folículos que se deriva del mesénquima celómico y provee la matriz celular básica en la que los folículos están distribuidos. Dispersos alrededor del córtex del ovario hay miles de folículos primordiales formados a partir del residuo de la provisión de ovocitos presentes en la vida fetal. En cuanto inicia el crecimiento de los folículos, ellos inducen los cambios en las células estrómales circundantes, las cuales se diferencian en células de la granulosa y de la teca. Inversamente cuando los folículos degeneran y se vuelven atrésicos, algunas de las células asociadas se desdiferencian a células estrómales, aunque la mayoría es fagocitada. En algunas especies como los conejos y las liebres, estas células son lo suficientemente prominentes para ser llamadas "glándula intersticial", que secreta grandes cantidades de hormonas esteroideas (Ross y Vande-Wiele, 1974).

#### **2.2.1.3. Folículos**

Todas las hembras de los mamíferos nacen con un exceso de ovocitos. Éstos están localizados en folículos primordiales, cada uno consistente en un oocito primario, rodeado por la capa de células de la granulosa. La mayoría de estos ovocitos se desarrolla hasta cierto grado, se vuelve atrésico y se degrada. Relativamente pocos se desarrollan completamente para ser ovulados. El folículo preovulatorio completamente desarrollado tiene varias capas de células de la granulosa

que rodean la cavidad que contiene fluido folicular, abundante en esteroides, y rodeando a las células de la granulosa se encuentran las células de la teca (Bronson, 1989).

El folículo está formado por el ovocito y su cubierta que está compuesta de células y una membrana externa. Durante el desarrollo folicular la morfología cambia conforme el ovocito madura y las células circundantes se diferencian (Figura 4). Estas etapas en el desarrollo de los folículos se han clasificado con varios términos:

(I) Folículo primordial que describe los folículos en estado de reposo con una sola capa de células de la granulosa; tiene un núcleo acéntrico grande con un nucleolo, los organelos incluyen múltiples mitocondrias, complejos de Golgi en abundancia, retículo endoplásmico rugoso que sólo muestra unos cuantos ribosomas y láminas anulares ocasionales. Las células foliculares escamosas rodean por completo el oocito primario y se unen entre sí mediante desmosomas. Una lámina basal las separa del estroma de tejido conectivo (Gartner y Hiatt, 2002).

(II) El Folículo primario se refiere a los folículos con una sola capa de células de la granulosa que han comenzado el proceso de crecimiento; el oocito primario crece, en la totalidad de las células se encuentran varios complejos de Golgi dispersos, retículo endoplásmico rugoso con abundantes ribosomas, muchos de éstos libres y múltiples mitocondrias dispersas. Las células foliculares se tornan de forma cuboide. El desarrollo de los folículos primarios es independiente de la FSH, en su lugar la diferenciación y proliferación de las células foliculares es estimulada por factores locales secretados por células del ovario (Gartner y Hiatt, 2002).

(III) Folículo secundario o preantral que describe los folículos con una membrana granulosa de grosor variado; las células foliculares proliferan y se estratifican y forman varias capas alrededor del oocito primario, a éstas se les llama células de la granulosa. La actividad proliferativa de éstas se debe a la molécula de señalamiento activina elaborada por el oocito



primario. Durante esta etapa aparece una sustancia amorfa llamada la zona pelúcida que separa el ovocito de las células foliculares circundantes. La zona pelúcida está compuesta por tres glucoproteínas diferentes, ZP<sub>1</sub>, ZP<sub>2</sub> y ZP<sub>3</sub> secretadas por el oocito. Esta zona es invadida por microvellosidades del oocito y filopodios de las células foliculares que entran en contacto entre sí y forman uniones de intersticio a través de las cuales se comunican durante todo el desarrollo folicular. Las células del estroma comienzan a organizarse alrededor del folículo y forman una teca interna, compuesta sobre todo por una capa celular vascularizada en abundancia, y una teca externa compuesta básicamente por tejido conectivo fibroso. Las células que constituyen la teca interna poseen receptores a LH en su plasmalema y asumen las características ultraestructurales de células productoras de esteroides. Su citoplasma acumula múltiples gotitas de lípidos, tiene retículo endoplásmico en abundancia y las crestas de sus mitocondrias son tubulares. Estas células de la teca interna producen androstenediona, que penetra en las células granulosas, donde la enzima aromatasa la convierte en estradiol. Una lámina basal engrosada separa las células granulosas de la teca interna (Gartner y Hiatt, 2002).

(IV) Folículo terciario o antral, son los términos dados a los folículos antrales en varias etapas de desarrollo, donde las células de la granulosa se acumulan en la perifería dando paso al antro folicular que es abundante en fluido folicular; se observa un aumento de tamaño del folículo con múltiples capas de células granulosas alrededor del oocito primario, se desarrollan algunos espacios intercelulares dentro de la masa de células de la granulosa y se llenan con un líquido conocido como líquido folicular. Bajo la influencia de la FSH el número de capas de las células de la granulosa aumenta, igual que la cantidad de licor folicular, este líquido incluye glucosaminoglicanos, proteoglicanos y proteínas de unión de esteroides producidas por las células de la granulosa, así como progesterona, estradiol, inhibina, foliostatina y activina, las

cuales regulan la liberación de LH y FSH. Además, la FSH induce a las células granulosas para que elaboren receptores para LH, que se incorporan en su citoplasma. La mayoría de los folículos que llegan a esta etapa de desarrollo sufren atresia, pero algunas de las células de la granulosa relacionadas con los folículos atrésicos no degeneran y forman glándulas intersticiales, que secretan cantidades pequeñas de andrógenos (Gartner y Hiatt, 2002).

(V) Folículo de Graaf, se refiere al folículo que ha alcanzado su completo desarrollo y está listo para ser ovulado. A medida que se produce más líquido, coalescen gotitas individuales de licor folicular para formar una cámara llena de líquido llamada antro. Las células de la granulosa se reordenan de tal manera que el oocito primario está rodeado por un grupo pequeño de estas células que se proyectan de la pared al antro, esta estructura se denomina cúmulo óforo. Las células de la granulosa cuboides dispuestas de forma laxa adyacentes a la zona pelúcida se alejan del oocito, pero sus filopodios permanecen dentro de la zona pelúcida y conservan el contacto con el oocito, esta configuración se denomina como corona radiata. Las células estromáticas se alargan y la teca interna es invadida por capilares que la nutren al igual que a las células de la granulosa avasculares (Gartner y Hiatt, 2002).

Otra clasificación que ha sido de gran utilidad es la que se basa en el tamaño de los folículos; donde el tamaño de éstos está definido por el número de células en la envoltura folicular y en la morfología del folículo (Pedersen y Peters, 1968; Peters y McNatty, 1980).

En las etapas tempranas del desarrollo ovárico, las células germinales u ovocitos se encuentran juntas en nidos de células, sin membranas celulares claramente definidas. Este sincitio o cenocito está rodeado generalmente por células estromales esbeltas. La transformación de los nidos de células de ovocitos a folículos individuales se define como foliculogénesis (Peters y McNatty, 1980).

El tiempo en el cual se inicia la formación de los folículos varía entre especies; en algunas, comienzan a formarse desde la vida embrionaria (humanos, monos, caballos, vacas, cerdos, cueros), mientras que en otras, la foliculogénesis inicia durante el periodo neonatal (rata, ratón, ratones de campo) y en otras especies, inicia aún más tarde (hámster, visón, gato, hurón, conejo, perro). La formación del folículo involucra la separación de los ovocitos, la fijación de algunas células (de la granulosa) a su superficie y el cierre de la membrana basal alrededor de esta unidad. Diferentes tejidos en el ovario temprano han sido considerados como progenitores de las células de la granulosa. Las células de la red de túbulos que crecen para ser las gónadas tempranas, así como el epitelio de la superficie contribuyen elementos celulares que se vuelven parte del folículo (Peters, 1978). La formación del folículo es dependiente de la presencia de esta red y, si es removida antes de que inicie la foliculogénesis, no se formarán los folículos (Byskov, 1975; Byskov, 1978).

La formación de los folículos siempre inicia en la parte más interna del cortex. Ocurre en la parte del ovario donde los ovocitos están en contacto íntimo con la red de túbulos. Las células de ésta forman pseudopodios, microtúbulos y microfilamentos (elementos que caracterizan a las células capaces de desplazarse); ellas se mueven, aparentemente, entre los ovocitos y se adhieren a su superficie (Byskov, 1975).

La foliculogénesis se extiende de la parte más interna del cortex y, conforme alcanza la superficie, en este proceso el epitelio contribuye células para la cubierta del folículo. Los cordones epiteliales se extienden sobre la superficie y penetran hacia el ovario (Wagenen y Simpson, 1965; Winiwarter y Sainmont, 1909) y muchos de ellos pierden su conexión con la superficie y se internalizan. Los ovocitos se sitúan entre los cordones y se forman folículos

pequeños (O'Shea, 1966). En algunas especies, aparentemente, el epitelio de la superficie no es esencial para la foliculogénesis (el ratón) (Byskov, 1978).

La formación de los folículos siempre inicia en la parte más interna del cortex. Ocurre en la parte del ovario donde los ovocitos están en contacto íntimo con los *rete ovarii*. Las *rete* células forman pseudopodios, microtúbulos y microfilamentos (elementos que caracterizan a las células capaces de desplazarse); ellas se mueven, aparentemente, entre los ovocitos y se adhieren a su superficie (Byskov, 1975).

La foliculogénesis se extiende de la parte más interna del cortex y, conforme alcanza la superficie, el epitelio contribuye células para la cubierta del folículo. Los cordones epiteliales se extienden sobre la superficie y penetran hacia el ovario (Winiwarter y Sainmont, 1909; Wagenen y Simpson, 1965) y muchos de ellos pierden su conexión con la superficie y se internalizan. Los ovocitos se sitúan entre los cordones y se forman folículos pequeños (O'Shea, 1966). En algunas especies, aparentemente, el epitelio de la superficie no es esencial para la foliculogénesis (el ratón) (Byskov, 1978).

La mayoría de los folículos se vuelven atrésicos, a través del proceso de apoptosis controlado hormonalmente. Se ha propuesto que el TNF- $\alpha$ , Fas ligando, que actúa a través de receptores con dominios apoptóticos, y los andrógenos son factores atrsiogénicos; que, en conjunto con todo el complejo hormonal encargado de la maduración folicular, regulan el proceso de apoptosis (Kaplan y Hsueh, 1997). Cuando un folículo maduro se rompe y libera su oocito, los folículos maduros restantes experimentan atresia y son fagocitados por macrófagos (Gartner y Hiatt, 2002).

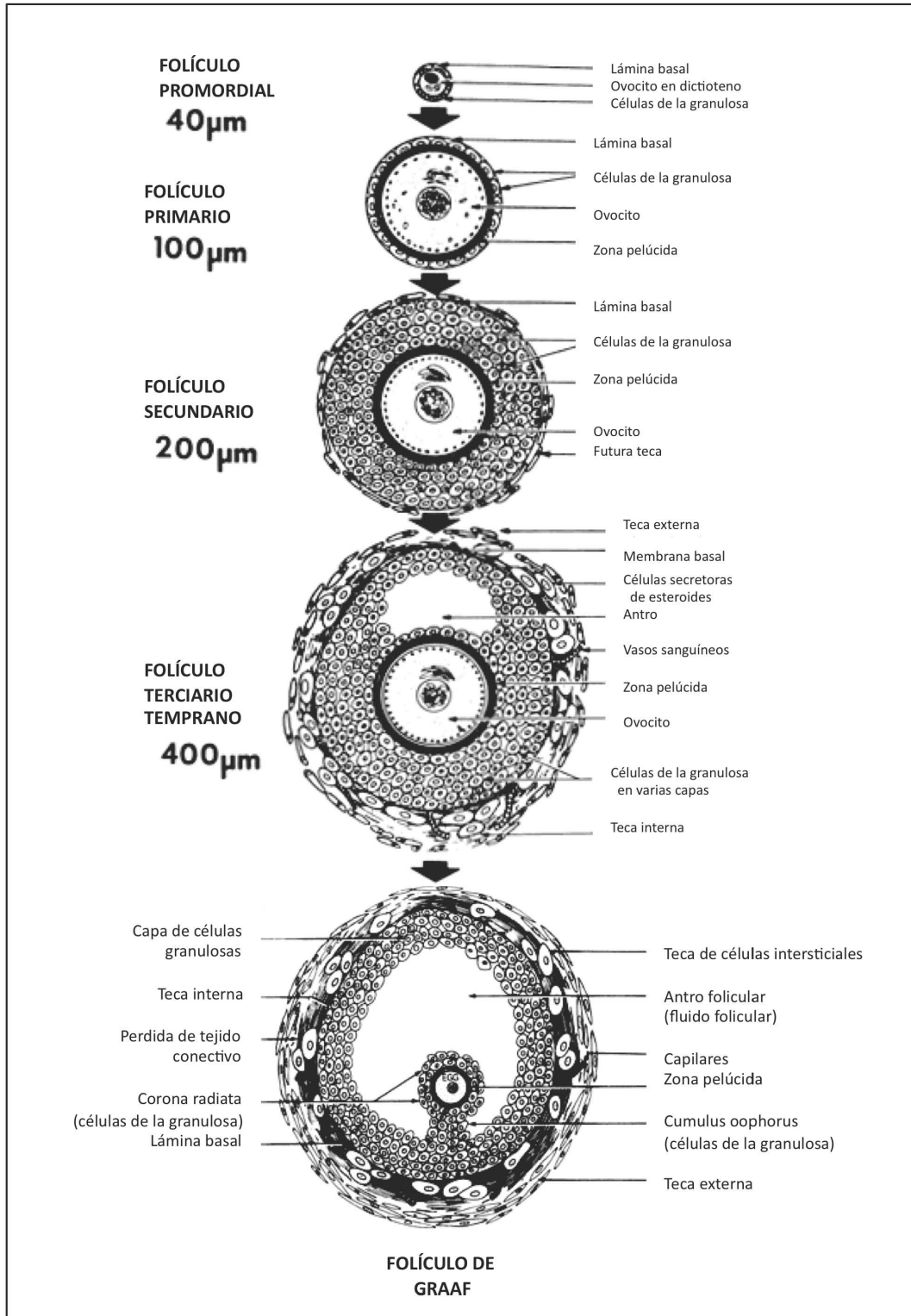


Figura 4. Esquema del desarrollo folicular de los ovocitos. (Modificado de: Erickson *et al.*, 1985)

Los folículos en proceso de atresia se caracterizan por la presencia de leucocitos y células de la granulosa picnóticas, además de manifestar la pérdida en el arreglo celular en esta capa granulosa (Ortiz, 1990).

#### **2.2.1.4. Cuerpo Lúteo**

Después de la ovulación, la pared del folículo se *cicatriz*a. En algunas especies (e.g.: primates, cerdos, ovejas) el antro se llena de sangre y linfáticos, mientras que en otras la acumulación de fluido es insignificante y el cuerpo lúteo rápidamente se vuelve un cuerpo sólido (como en el caso de hamsters, ratas, ratones), a esto se le conoce como cuerpo hemorrágico. Los componentes celulares del cuerpo lúteo provienen principalmente de las células de la granulosa con contribuciones variantes de la teca y el estroma que lo rodea. Durante la formación del cuerpo lúteo se da gran vascularización: los linfáticos y vasos de la teca crecen en el cuerpo lúteo joven y se ramifican para formar una red fina de capilares. Además los fibroblastos y tejido conectivo se vuelven parte del cuerpo lúteo (Peters y McNatty, 1980). En consecuencia de esta vascularización, se atraen fagocitos que eliminan el coágulo; concentraciones constantes de LH convierten el cuerpo hemorrágico en una estructura temporal que se denomina cuerpo amarillo, que actúa como glándula endócrina. Esta estructura muy vascularizada se compone de células de la granulosa y de la teca luteínicas. Las células de la granulosa luteínica que permanecen en la región central del folículo constituyen alrededor del 80% de la población celular del cuerpo amarillo, éstas se modifican en células grandes, de tinción pálida que tienen múltiples microvellosidades largas y desarrollan todos los organelos necesarios para la producción de esteroides, incluso retículo endoplásmico liso y rugoso en abundancia, múltiples mitocondrias, varios complejos de Golgi bien desarrollados y algunas gotitas de lípidos dispersas en la

totalidad del citoplasma. Estas células producen progesterona y convierten los andrógenos elaborados por las células de la teca luteínicas en estrógenos. Posteriormente, si no ocurre la implantación, el cuerpo amarillo es invadido por fibroblastos, se torna fibroso y deja de secretar. Sus remanentes se autolisan, proceso conocido como luteólisis, y son fagocitados por macrófagos. El tejido conectivo fibroso que se forma en su sitio se conoce como cuerpo blanco y persiste durante algún tiempo antes de reabsorberse. Los remanentes de éste persisten como cicatriz en la superficie del ovario (Gartner y Hiatt, 2002).

Respecto a la función de endócrina del ovario, éste secreta gran variedad de péptidos que influyen en el mismo ovario y en otros órganos, para la regulación de la función reproductiva del organismo (Peters y McNatty, 1980). Los cuales se refieren a continuación.

### **2.2.2. Biosíntesis de Esteroides Ováricos**

El ovario puede ser considerado como un agregado de tres tejidos endócrinos: el tejido intersticial, el folículo y el cuerpo lúteo. Los tres tienen la capacidad de sintetizar y secretar hormonas esteroideas que están compuestas de una estructura ciclopentahidrofenantrena común, llamada colesterol. Los principales esteroides producidos por el ovario son progestinas, andrógenos y estrógenos. Las cantidades secretadas varían durante la infancia, la pubertad y la vida adulta, y estas variaciones están relacionadas causalmente a los cambios continuos de proporciones de los tejidos endócrinos dentro del ovario (Peters y McNatty, 1980).

El precursor esteroideo común para la biosíntesis de progestinas, andrógenos y estrógenos es el colesterol, que puede ser sintetizado a partir del acetato. Las enzimas necesarias para la biosíntesis del colesterol están localizadas en los microsomas (Flint y Armstrong, 1971). La

mayoría del colesterol almacenado en la célula se encuentra en gotas de lípidos citoplasmáticos en forma de derivados esterificados (Claesson, 1954).

La pregnenolona es un esteroide que se deriva del colesterol y es un precursor intermedio para la biosíntesis de progestinas, andrógenos y estrógenos. Ésta es sintetizada en la mitocondria (Hall y Koritz, 1964; Sulimovici y Boyd, 1967, 1969). Los pasos biosintéticos de colesterol a pregnenolona involucran al menos tres enzimas:  $20\alpha$ -hidroxilasa, 22-hidroxilasa y  $20,22$ -desmolasa; las cuales escinden la cadena lateral en la molécula de colesterol (Peters y McNatty, 1980).

#### **2.2.2.1. Progestinas**

La principal progestina sintetizada por el ovario es la progesterona; otras son  $17\alpha$ OH-progesterona,  $20\alpha$ -dihidroprogesterona y  $20\beta$ -dihidroprogesterona. La progesterona, uno de los mayores productos de conversión de la pregnenolona es sintetizado en grandes cantidades por el cuerpo lúteo (Peters y McNatty, 1980), y en algunas especies (rata, conejo y hamster) es también sintetizado por la glándula intersticial del estroma o por las células de la granulosa del folículo preovulatorio (Leavitt y Blaha, 1970).

#### **2.2.2.2. Andrógenos**

El ovario es una fuente importante de andrógenos, androstenediona y testosterona. Existen dos rutas importantes para su biosíntesis y ambas parten de la pregnenolona a androstenediona (Ryan y Smith, 1961, 1965; Short et al, 1961).



Los tres tejidos endócrinos del ovario tienen la capacidad de sintetizar andrógenos. Los tejidos del estroma y la teca son los mayores sitios de producción éstos a partir del acetato (Savard, 1968; YoungLai, 1973; Seamark *et al.*, 1974).

La androstenediona es un andrógeno biológico débil, pero es un precursor importante de la testosterona más activa. El ovario secreta abundantes cantidades de androstenediona, que puede ser convertida en otra parte a testosterona y dihidrotestosterona. La conversión de androstenediona a testosterona es reversible (Davenport y Malette, 1966). Otros andrógenos identificados en el tejido ovárico son 19-norandrostenediona y epitestosterona (Short, 1961).

### **2.2.2.3. Estrógenos**

El estradiol-17 $\beta$  y la estrona son los principales estrógenos producidos por el ovario. Todos éstos son derivados del andrógeno, androstenediona y testosterona, los cuales son los principales precursores para la biosíntesis de estrógenos (Engel, 1973). Las enzimas aromatasas que promueven esta conversión se encuentran en los microsomas (Areco y Ryan, 1967). Las células de la teca y de la granulosa del folículo y, en algunas especies, el cuerpo lúteo son los principales sitios para la biosíntesis de los estrógenos (Ryan y Short, 1965; Ryan y Petro, 1966; Lisse y Schürenkämper, 1968; YoungLai, 1973; Dorrington *et al.*, 1975), pero el estroma no puede sintetizar estrógeno a partir del andrógeno (Channing, 1969; Somma *et al.*, 1969). Otro tipo de estrógeno que ha sido aislado del tejido ovárico es el estriol, el cual se ha demostrado que se sintetiza en los ovarios de mujeres postmenopausicas (Wotiz *et al.*, 1956; Ryan y Smith, 1965; Savard *et al.*, 1965).

La biosíntesis de hormonas esteroideas es un proceso complejo y varias rutas biosintéticas pueden llevar a los mismos productos (Figura 5). La multitud de conversiones bioquímicas puede dar origen a precursores intermediarios (prehormonas) que se pueden convertir a hormonas biológicamente más activas en un tejido blanco distante. Muchos esteroides ováricos y adrenales funcionan como prehormonas, algunas de las más comunes son pregnenolona, dehidroepiandrosterona y su derivado de sulfato, androstenediona y testosterona (Tagatz y Gurpide, 1973). La pregnenolona puede experimentar conversión extraglandular a progesterona mientras que la dehidroepiandrosterona, androstenediona y testosterona pueden ser convertidas en andrógenos o estrógenos biológicamente más potentes. Las prehormonas hacen generalmente la contribución significativa a la concentración total de hormonas en sangre (Siiteri y McDonald, 1973).

Dependiendo del tipo celular ovárico se sintetizan diferentes hormonas: las células de la teca producen principalmente androstenediona y las células luteas progesterona. Además, cada una de éstas sintetiza otros esteroides, pero en cantidades más bajas. El tipo de hormona que la célula productora de esteroides secreta cambia con su maduración progresiva.; por ejemplo, las células de la granulosa de un folículo sano en crecimiento secretan principalmente estradiol y poca o nada progesterona, mientras que después de la ovulación las células de la granulosa luteinizada secretan principalmente progesterona (Peters y McNatty, 1980).

Los estrógenos que se producen durante la maduración sexual en la pubertad, son responsables del crecimiento y desarrollo de la vagina, el útero, y los oviductos, que son los órganos esenciales para el transporte de los ovarios, la maduración final del ovocito y la implantación del producto. Además, los estrógenos afectan la distribución de los depósitos de

grasa. El crecimiento y desarrollo de las glándulas mamarias también es iniciado por la acción de los estrógenos en conjunto con otras hormonas (Hadley, 1996).

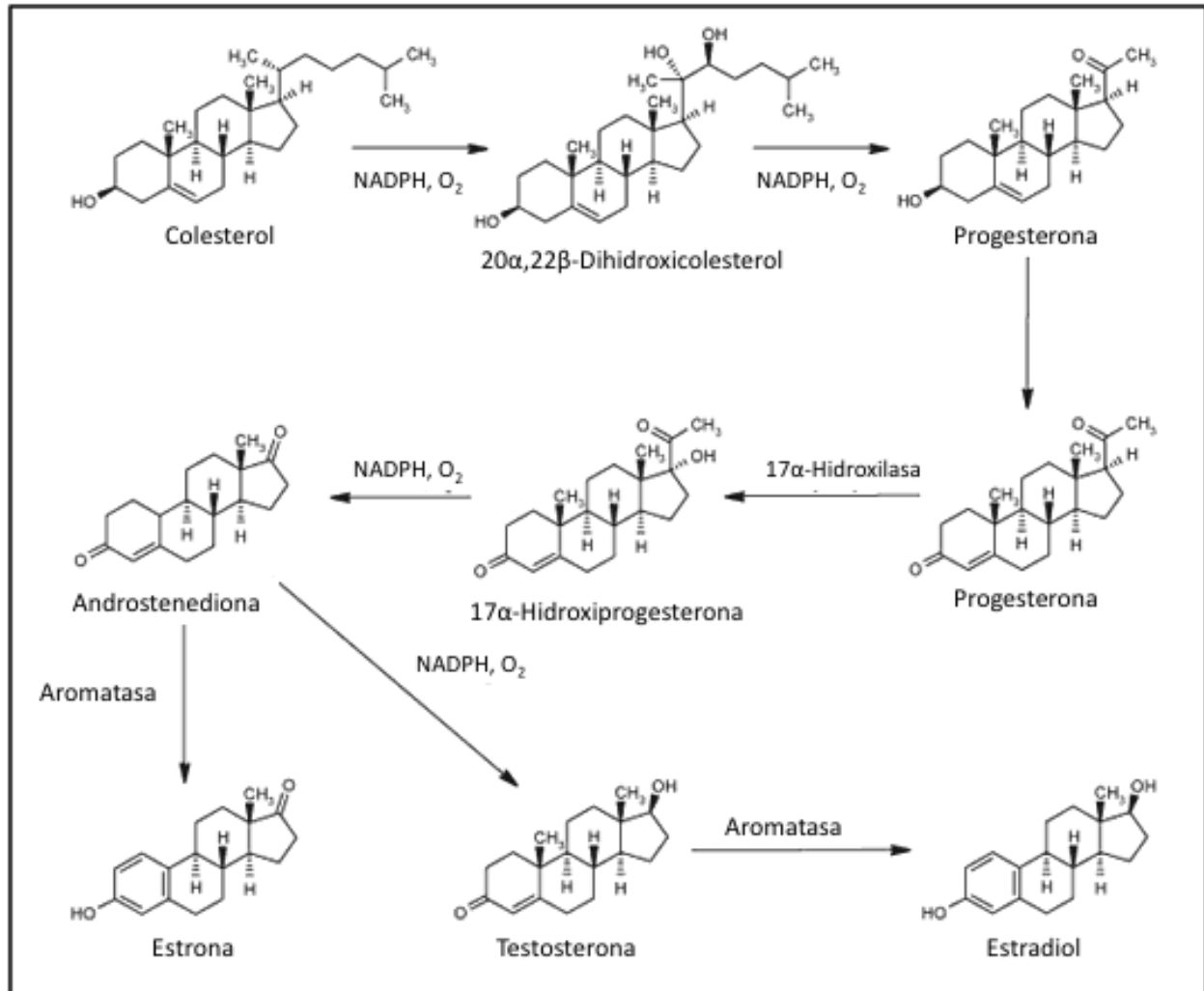


Figura 5. Ruta de biosíntesis de estrógenos (Modificado de: Gupta, 2006).

En la mayoría de los mamíferos, los estrógenos son aromatizados y secretados por las células de la granulosa del folículo maduro, pero pueden ser elaborados, en menores cantidades, por el cuerpo lúteo. También se ha demostrado que la síntesis del estrógeno resulta de la cooperación de las células de la teca interna y las de la granulosa. En algunos mamíferos, la placenta se

convierte en la mayor fuente de estrógenos; de igual manera, también pueden ser sintetizados por el blastocisto y, en menores cantidades, por las glándulas mamarias (Jameson *et al.*, 1988).

Los órganos blanco del estrógeno incluyen el tejido mamario y uterino, los oviductos, y el hipotálamo. Una de las principales funciones del estrógeno es el desarrollo rápido de algunas estructuras como el epitelio uterino y mamario a través de la estimulación de la síntesis de proteínas. En algunos mamíferos, los estrógenos promueven el depósito de grasa en zonas específicas del cuerpo, así como el crecimiento de vello axilar y púbico; en estos procesos, los estrógenos actúan en conjunto con otras hormonas. Los estrógenos tienen efectos inmediatos en órganos blanco, donde puede persistir hasta por dos horas, pero es rápidamente metabolizado en otras partes del cuerpo (Heap e Illingworth, 1977).

La concentración de estrógenos y otras hormonas responsables de la función reproductiva en el organismo de las hembras aumenta y disminuye de manera cíclica en el metabolismo, este ciclo hormonal está relacionado con el desarrollo de los folículos ováricos y los cambios en las estructuras reproductivas.

### **2.2.3. Ciclo estral y ovárico**

El ciclo estral se refiere a la progresión secuencial de ciclos fisiológicos y conductuales que da como resultado la capacidad reproductiva de la hembra. Ésto implica la maduración periódica de los folículos y del ovocito, que será liberado en la ovulación y la posterior luteinización del folículo para formar el cuerpo lúteo. Coordinado con este ciclo ovárico hay cambios cíclicos en el útero de preparación para la eventual implantación en el caso de que ocurra la fecundación. Aunado a ésto, hay cambios en la conducta de receptividad femenina hacia el macho. Los

agentes que sincronizan estos tres aspectos del ciclo estral son los productos hormonales resultantes del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Bronson, 1989).

En la rata y el ratón, el ciclo estral se ha dividido en cuatro etapas o estadios que son: el proestro, estro, metaestro y diestro. Los cuales se identifican a partir del examen de frotis vaginal, que refleja las características citológicas específicas que dependen de la concentración de estrógenos. Los tres tipos de células que se observan en una muestra de frotis vaginal son los leucocitos, las células epiteliales cornificadas y las células epiteliales nucleadas. La abundancia relativa de estos tipos celulares es lo que define el estadio estral (Marcondes *et al.*, 2002).

El ciclo estral completo en ratones y ratas tiene un periodo de cuatro a cinco días. Sus 4 etapas se definen de la siguiente manera (Figura 6):

El proestro es la etapa donde predominan las células epiteliales nucleadas, éstas pueden observarse agrupadas o de manera individual. Ocasionalmente pueden encontrarse algunas células cornificadas. Esta etapa corresponde al estado preovulatorio, donde la concentración de estradiol aumenta (Walmer *et al.*, 1992) y consecuentemente, FSH y LH (hormona folículo estimulante y hormona luteinizante respectivamente, por sus siglas en inglés) aumentan y ocurre la ovulación (Parkening *et al.*, 1982).

El estro se caracteriza por la presencia de las células epiteliales cornificadas escamosas, que se presentan en aglomerados. Los núcleos no son visibles, el citoplasma es granular y son de forma irregular. La concentración de estradiol se mantiene elevada y baja al final del estro (Walmer *et al.*, 1992).

En el metaestro se observa la mezcla de tipos celulares con predominancia de leucocitos y algunas células epiteliales nucleadas y epiteliales cornificadas escamosas. La concentración de estradiol es baja (Walmer *et al.*, 1992).

El Diestro consiste predominantemente de leucocitos. Durante esta etapa, los niveles de estradiol comienzan a elevarse (Walmer *et al.*, 1992).

Durante el estro, metaestro y diestro, la concentración de LH y FSH plasmática son bajas (Parkening *et al.*, 1982).

El proestro y estro son considerados como estadios anabólicos, en los cuales hay actividad de crecimiento progresiva en varias partes del tracto genital; estos cambios coinciden en el ovario con la ovulación, para favorecer la fertilización.

El metaestro se considera una etapa catabólica, en la que se presentan cambios degenerativos en el tracto genital. Finalmente, el diestro es un periodo de quiescencia o de poco crecimiento (Bronson *et al.*, 1966).

Los cambios en la estructura citológica vaginal están asociados a los cambios en la concentración de las hormonas de la hembra que son las responsables de la maduración del folículo y su eventual ovulación. A estas variaciones hormonales se les conoce también como ciclo hormonal u ovárico (Bronson *et al.*, 1966).

Otro enfoque de clasificación de estas características es el ciclo ovárico, que en los mamíferos ha sido dividido en cuatro fases: folicular, proliferativa, ovulatoria y lutea (Morgan, 1982).

La fase folicular se caracteriza por el incremento en la concentración de los niveles plasmáticos de FSH, aunado a el ascenso muy leve en los niveles de LH; la concentración de estrógeno se mantiene baja con cambios pequeños, al igual que las otras hormonas gonadales. En

esta etapa se da el crecimiento de algunos de los folículos de reserva. Se puede relacionar con la etapa del diestro del ciclo estral (Morgan, 1982).

La fase proliferativa corresponde al final del diestro y al proestro. En esta etapa se observa el aumento en el nivel de estrógeno, que inicialmente es lento y después se acelera, y alcanza la concentración más elevada justo antes de la ovulación. La concentración de FSH disminuye y la de LH aumenta lentamente de manera constante, los niveles de progesterona son bajos durante toda esta fase y la secreción de GnRH (por sus siglas en inglés, hormona liberadora de gonadotrofinas) se libera a manera de pulsos constantes (Morgan, 1982).

En la fase ovulatoria la concentración de LH aumenta de manera brusca, así mismo se da el aumento en la FSH pero de menor magnitud. La cantidad de estrógeno y de 17-hidroxiprogesterona disminuye y la progesterona se incrementa lentamente. El nivel alto de LH dura aproximadamente por 24 horas y después baja bruscamente. Estos cambios dan origen a la maduración folicular y a la ovulación de los ovocitos que alcanzaron el desarrollo completo (Griff y Vande-Wiele, 1974). Esta fase corresponde al inicio del estro.

La fase lutea está caracterizada por altas concentraciones de progesterona, estradiol, estrona y 17-hidroxiprogesterona. La FSH y LH disminuye hasta alcanzar su nivel mínimo, que corresponde con el máximo del de la progesterona (Griff y Vande-Wiele, 1974). Esta fase se define por la formación del cuerpo lúteo o amarillo.

La dinámica hormonal necesaria para el adecuado funcionamiento folicular está altamente regulada por un complejo sistema de retroalimentación que involucra al hipotálamo, la hipófisis y al ovario (Peters y McNatty, 1980).

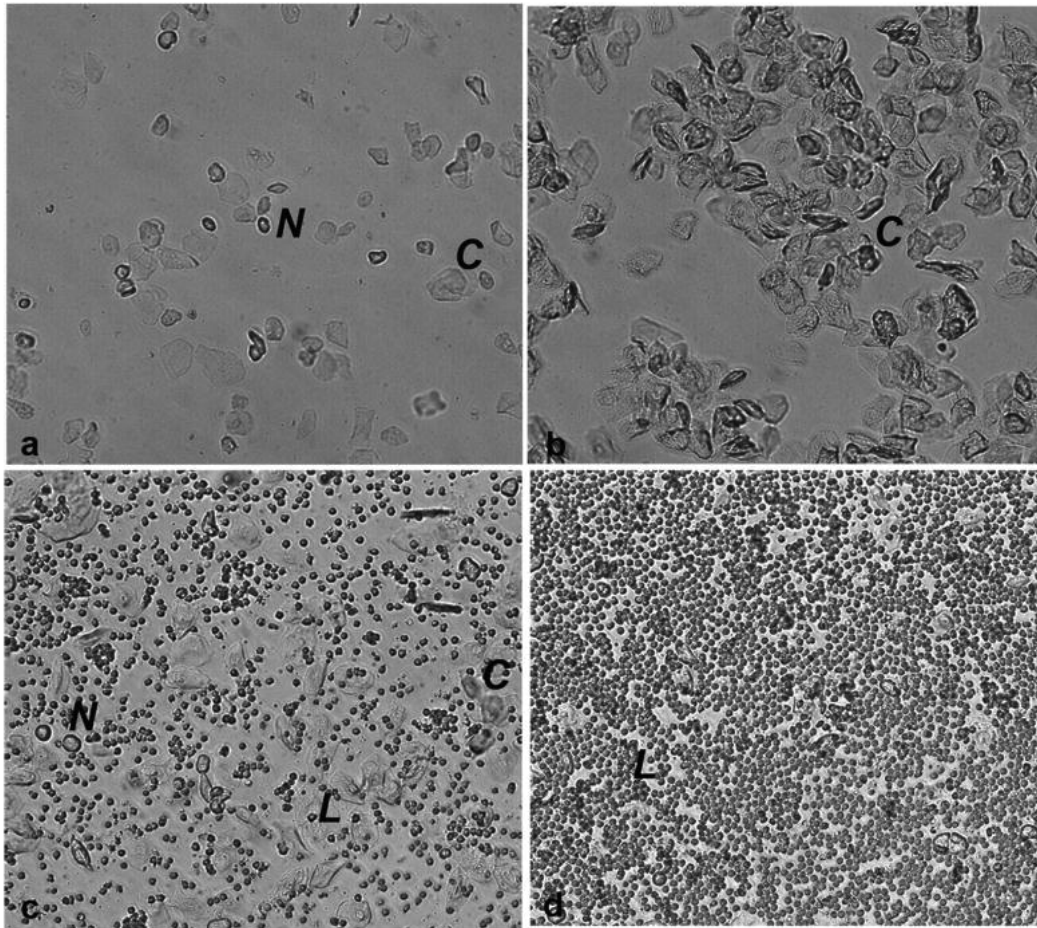


Figura 6. Fotomicrografías de frotis vaginales de ratón, sin tinción. (a) Proestro, consistente predominantemente de células epiteliales nucleadas, (b) estro, con células cornificadas sin núcleo, (c) metaestro, con los tres tipos celulares presentes, leucocitos, cornificadas y epiteliales, y (d) diestro, con predominancia de leucocitos. Células epiteliales nucleadas (N), Leucocitos (L), células cornificadas (C) (Caligioni, 2009).

#### 2.2.4. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario

La señal de crecimiento y diferenciación de un folículo es dependiente de la hipófisis, de las hormonas ováricas y de la interrelación funcional entre estos y el hipotálamo. Los esteroides ováricos son los mensajeros entre el ovario y la unidad hipotalámica-hipofisial, los cuales son



liberados del ovario hacia la sangre periférica donde actúan en el hipotálamo y la hipófisis para modular la secreción de gonadotropinas (Peters y McNatty, 1980).

Los requerimientos de las hormonas hipofisiales cambian conforme el folículo se desarrolla. Para que un folículo antral en crecimiento pueda alcanzar las etapas finales de su desarrollo, el hipotálamo y la hipófisis deben ser altamente sensibles a los requerimientos del folículo. Durante la fase folicular, estas interacciones se deben mantener hasta la ovulación (Peters y McNatty, 1980).

El hipotálamo y la hipófisis forman la unidad funcional que secreta las gonadotropinas en pulsos, es decir, hay una secreción pulsátil tónica (baja) al igual que un patrón de secreción pulsátil cíclico (alto). Los niveles en sangre resultante de la secreción tónica son suficientes para mantener el crecimiento folicular por determinado tiempo, pero las secreciones cíclicas resultan en la diferenciación final del folículo y la ovulación.

El hipotálamo regula la liberación pulsátil de FSH y LH hipofisial a través de la neurosecreción de GnRH (Figura 7) (Carmel *et al.*, 1976). Investigaciones en ratas han demostrado que algunos estímulos ambientales al igual que hormonas, actúan en ciertas áreas del hipotálamo donde modulan la liberación de GnRH (Barraclough, 1973; Sarkar *et al.*, 1976; Goodman, 1978). Sin embargo, estudios en el mono rhesus y el hombre indican que el patrón de liberación de FSH y LH también está influenciado por la acción de las hormonas ováricas (Knobil, 1974; Yen *et al.*, 1975; Nakai *et al.*, 1978; Plant *et al.*, 1978).

El efecto del estradiol en la liberación de FSH y LH es críticamente dependiente de la concentración de este esteroide en el plasma. Cuando el nivel plasmático del estradiol es bajo, la secreción hipotalámica-hipofisaria de gonadotropinas es alta. Esto es resultado de la alta sensibilidad de la hipófisis a GnRH y de suficientes reservas de gonadotropinas en la misma.

Bajo estas condiciones la mayor influencia en la síntesis y liberación de gonadotropinas es ejercida por la GnRH. Los bajos niveles de estradiol circulantes están presentes durante la etapa luteal tardía o fase menstrual del ciclo, cuando el ovario está desprovisto de folículos estrogénicos o de un cuerpo lúteo funcional.

Cuando las concentraciones plasmáticas de estradiol aumentan hay una disminución de la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH que da origen a una liberación reducida de GnRH (retroalimentación negativa). La secreción hipofisial de FSH es más susceptible al efecto de esta retroalimentación que la de LH (Yen *et al.*, 1975). Por lo tanto, el aumento en la concentración de estrógenos producidos por los folículos en desarrollo resulta en una disminución mayor de FSH que de LH en niveles de plasma (Tsai y Yen, 1971; Cargille *et al.*, 1973). El efecto de la supresión de la secreción de FSH inducido por el estradiol es doble: primero hay la reducción en la cantidad de FSH disponible para los folículos en etapas tempranas de desarrollo, que les impide desarrollarse en grandes estructuras sanas productoras de esteroides; y segundo, permite la síntesis de LH y FSH resultante en la acumulación de reservas hipofisiarias de estas hormonas. Ésto asegura que suficientes reservas de gonadotropinas estén disponibles para las eventuales descargas preovulatorias (Peters y McNatty, 1980).

En adición a la influencia inhibidora de la producción de FSH, el estradiol es capaz de estimular la liberación de gonadotropinas (retroalimentación positiva) (Knobil, 1974). El efecto de esta retroalimentación opera sólo cuando el estímulo de estradiol es de la intensidad y duración apropiada, y cuando hay suficientes reservas de gonadotropinas en la hipófisis (Yen *et al.*, 1975). Bajo estas condiciones, el estradiol permite la liberación preovulatoria de gonadotropinas.

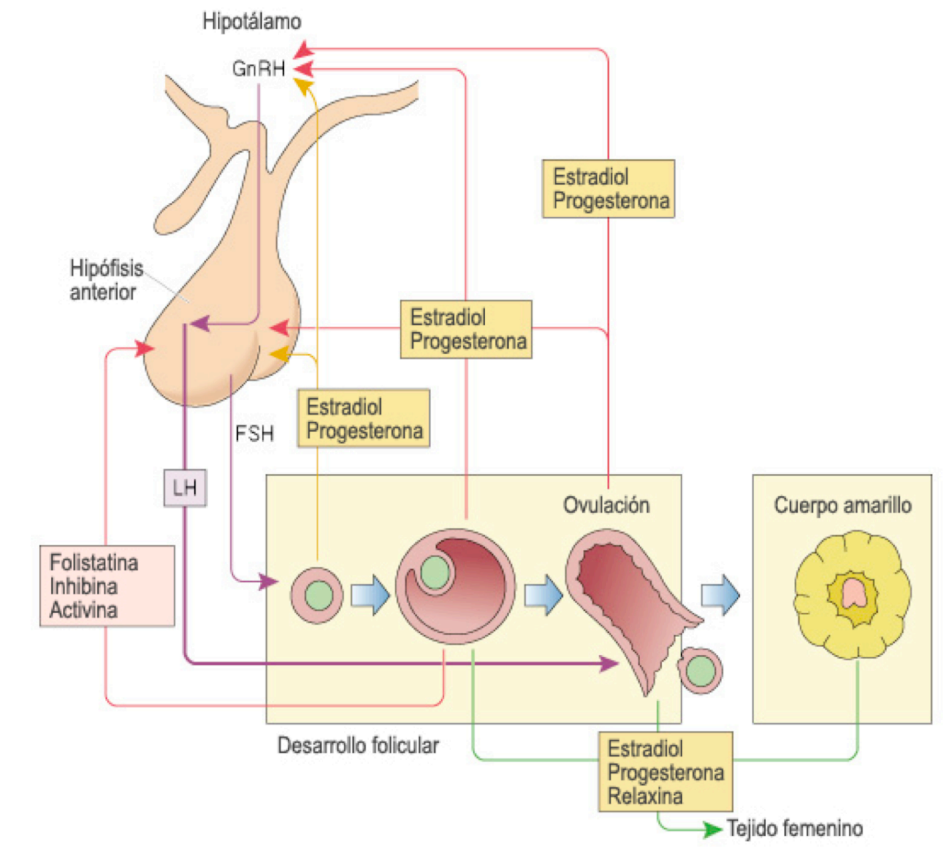


Figura 7. Esquema que ilustra las interacciones hormonales entre el eje hipotálamo-hipófisis y el sistema reproductor femenino (Foldvary-Schaefer y Falcone, 2003).

La acción independiente de la progesterona tiene poco efecto en la secreción de LH y FSH (Franchimont, 1971; Scaramuzzi *et al.*, 1971; Knobil, 1974). Bajas concentraciones de progesterona producida por el folículo preovulatorio mejora la retroalimentación positiva del estrógeno en la liberación de LH (Leyendecker *et al.*, 1972).

La androstenediona o sus metabolitos pueden modular el efecto del estradiol en la secreción de gonadotropina (Martensz *et al.*, 1975, 1976). Y las gonadotropinas influyen la sensibilidad de la unidad hipotálamo-hipófisis a los esteroides (Figura 7).

### 2.3. Obesidad y Fertilidad

Se ha demostrado que existe relación entre la obesidad y la infertilidad en hembras (Gnoth *et al.*, 2005). Los mecanismos por los que la obesidad causa o exacerba la subfertilidad son múltiples. El incremento en el IMC está asociado con el aumento en la concentración de leptina en suero y en el líquido folicular, y a la disminución en los niveles de adiponectina en plasma. La leptina actúa a través de los receptores de las células de la teca y de la granulosa, al inhibir la esteroidogénesis ovárica. Los niveles bajos de adiponectina están asociados con el aumento de la insulina circulante, que puede causar hiperandrogenismo, en parte por inhibir la producción de la hormona SHBG (por sus siglas en inglés, globulina fijadora de hormonas sexuales). Además, cuando la insulina actúa vía IGF<sub>1</sub> (por sus siglas en inglés, factor de crecimiento de insulina tipo 1) mejora la esteroidogénesis mediada por la LH en el sistema de las células de la teca del ovario, por lo tanto aumenta los andrógenos ováricos. La hiperandrogenaemia resulta en apoptosis de las células de la teca, mientras que la conversión periférica de andrógenos a estrógenos en el tejido adiposo inhibe la secreción de gonadotropinas (Pandey *et al.*, 2010).

La obesidad también está asociada con el Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP), que es una condición heterogénea caracterizada por la oligo-ovulación (irregular) o anovulación, hiperandrogenismo, irregularidades menstruales y subfertilidad. La obesidad se presenta en 30-75% de las mujeres con SOP y aumenta la magnitud de la disfunción hormonal y metabólica de estas mujeres (Pandey *et al.*, 2010).

Las hembras obesas sufren perturbaciones en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, en el ciclo estral y son más susceptibles a presentar oligo o anovulación. El balance hormonal encargado del desarrollo folicular y la maduración del ovocito es altamente sensible y se ha observado que la obesidad puede alterar la dinámica de estos elementos. En resumen, la obesidad produce

alteraciones en la ovulación, el desarrollo del endometrio y la implantación (Brewer y Balen, 2010).

### 3. ANTECEDENTES

La dificultad para someter al humano a estudios durante largos periodos de tiempo, con la precisión, manipulación y ética necesaria para la investigación, ha sido la razón clave para el enfoque en modelos animales, especialmente en roedores (Trayhurn, 2005). Estos contribuyen de manera fundamental al desarrollo histórico de la comprensión de los procesos básicos que regulan nuestro equilibrio energético.

Se han empleado cinco tipos diferentes de modelos animales en el estudio de las bases fisiológicas y genéticas de la obesidad. El primero refleja mutaciones monogénicas que han aparecido de forma no inducida en colonias de roedores, y consecuentemente se han caracterizado. El segundo consiste en aumentar el índice de mutaciones aleatorias de forma artificial, al dar tratamiento a los roedores con mutágenos o exponiéndolos a radiación. El tercer modelo son ratones y ratas en los que un gen específico ha sido alterado o sobreexpresado deliberadamente. Estas manipulaciones genéticas pueden expresarse de manera general en el organismo o en un tipo celular específico, así como en un periodo determinado o durante toda la vida (manipulaciones transgénicas globales) o restringirse a determinado periodo de desarrollo y de tejido o tipo celular. En estos casos, hay dos tipos de situaciones que permiten nuevos descubrimientos: cuando se tiene como objetivo el gen específico que posiblemente se asocia a una función específica en la regulación del equilibrio energético, y cuando se altera el gen con propósito diferente y el resultado es el fenotipo obeso o delgado. El cuarto grupo de modelos animales abarca experimentos donde se ha utilizado la cría selectiva para obtener cepas de roedores que difieren en su grado de acumulación grasa. Por último, se han hecho estudios de otras especies que incluyen primates no humanos y perros. Junto con los estudios de las bases genéticas y fisiológicas de la obesidad, los estudios de modelos animales han dado información

sobre los aspectos ambientales de esta condición. Los estudios en este contexto incluyen el análisis de las respuestas de los animales a dietas altas en grasas o altas en grasas y en azúcares (dieta de cafetería), investigaciones sobre los efectos de la restricción dietética en la masa corporal y la pérdida de peso, y por último, estudios sobre el impacto de fármacos potenciales sobre algunos componentes del equilibrio energético (Speakman *et al.*, 2008).

El modelo del ratón de los volcanes presenta la ventaja de una mayor variabilidad genética debido a las poblaciones silvestres con las que se trabaja (Carmona-Alcocer *et al.*, 2012); así mismo, es un ratón dócil y susceptible a la reproducción en condiciones de cautiverio (Chávez, 2005).

### **3.1. El ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni***

El estudio de la obesidad en modelos animales facilita la manipulación y estandarización de las variables a analizar (Speakman *et al.*, 2008). Para el presente estudio se propone al ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni*, debido a que se ha demostrado que las poblaciones de este animal tienden a mostrar alteraciones no inducidas en su peso corporal cuando se les mantiene en condiciones de cautiverio (Carmona-Alcocer *et al.*, 2012).

#### **3.1.1. Clasificación Taxonómica**

El ratón de los volcanes, *Neotomodon alstoni*, fué descrito por primera vez por C.H. Merriam en 1898. Esta especie pertenece al Orden Rodentia, familia Muridae y subfamilia Sigmodontinae (Chávez, 2005). Es una especie monotípica endémica de México restringida al Eje Neovolcánico Transversal. Dentro de esta especie se reconocen 3 subespecies: *Neotomodon alstoni alstoni* que

son las poblaciones pertenecientes al oeste del Río Balsas y la sierra del volcán del Ajusco, *Neotomodon alstoni perotensis* perteneciente a la población de Perote y *Neotomodon alstoni orizabae* correspondiente a la población del Pico de Orizaba (Figura 8) (Alvarez y Mayo-Aceves, 1993).



Figura 8. Imagen de un individuo de la especie *Neotomodon alstoni* (Ceballos y Oliva, 2005).

### 3.1.2. Distribución Geográfica

Su distribución está restringida al Eje Neovolcánico Transversal, desde el centro de Michoacán hasta el centro de Puebla y Veracruz (Figura 9) (Chávez, 2005).

Habita principalmente en pastizales de gramíneas amacolladas (*Muhlenbergia macroura*) pero también se encuentra en bosque de coníferas y de encino. Se distribuye entre los 2,400 y 4,960 msnm. (Chávez, 2005).



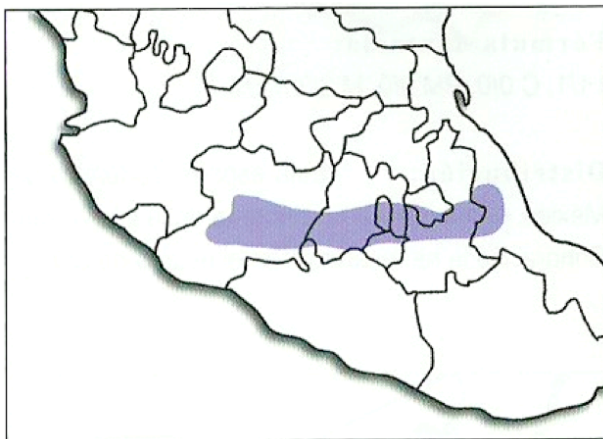


Figura 9. Distribución del ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni*, restringida al eje Neovolcánico Transversal; Distrito Federal, Michoacán, Morelia, Estado de México, Puebla, Tlaxcala y Veracruz (Ceballos y Oliva, 2005).

### 3.1.3. Estado de Conservación

A pesar de ser una especie endémica de México no se encuentra en riesgo de extinción. Su distribución es relativamente amplia; es abundante en diversas localidades y tiene poblaciones en áreas naturales protegidas como los parques nacionales Popo-Izta y el Nevado de Toluca (Chávez, 2005).

### 3.1.4. Biología General

El ratón de los volcanes es un roedor de tamaño mediano, de apariencia robusta y comportamiento dócil. La coloración del dorso es gris oscuro, hacia los lados del cuerpo presenta dominancia de color amarillo ocre y blanco en el vientre; su cola es relativamente corta (menos que la cabeza y el cuerpo) y ligeramente bicolor (Davis y Follansbee, 1945).

Es un roedor de hábitos nocturnos. Construye sus madrigueras principalmente entre las raíces de las gramíneas amacolladas donde muestra preferencia de microhábitat en el zacatonal y el bosque zacatonal (Rojas, 1984).

En condiciones naturales su dieta está constituida por tallos, brotes y hojas de herbáceas (Prieto, 1988). Tanto en condiciones naturales como de cautiverio presenta actividad reproductiva durante todo el año. Su periodo del ciclo estral es de 4 días y 16 horas aproximadamente, el periodo de gestación es de 25 a 35 días, presentan mayor cantidad de partos de abril a septiembre. Las crías son altriciales y la lactancia es de 20 a 30 días (Martín y Álvarez, 1982); esta especie presenta cuidado parental (Luis *et al.*, 2000).

### **3.2. *Neotomodon alstoni* como modelo biológico**

El ratón de los volcanes ha sido objeto de numerosos estudios en cautiverio al abordar aspectos de conducta (Luis *et al.*, 2004), crecimiento (Granados y Ramírez, 1987), cronobiología (Ayala-Guerrero *et al.*, 1998), densidad poblacional (Chávez, 1988), ecología (Fa *et al.*, 1996; Granados *et al.*, 1996), fisiología (Villalpando *et al.*, 2000 y 2005) y reproducción (Granados y Hott, 1989; Granados y Luis; 1987; Luis y Granados, 1990; Luis *et al.*, 1993 y 2000).

Cuando el ratón de los volcanes se mantiene en cautiverio y su dieta se basa en pellet para roedor (dieta comercial para roedores), se puede observar que después de 6 meses algunos de los individuos (50 a 60% tanto de machos como hembras) muestran incremento significativo en su peso corporal. Así mismo, algunos de estos animales obesos muestran signos de síndrome metabólico, como esteatosis hepática, hipertriacilgliceridemia, intolerancia a la glucosa e

hiperleptinemia; además, estas alteraciones se observan también en las generaciones resultantes de estos individuos silvestres (Carmona-Alcocer *et al.*, 2012).

Debido a lo anterior, se ha considerado que este roedor puede ser un modelo adecuado para el estudio de alteraciones originadas por el incremento de peso y la obesidad.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Los efectos de la obesidad son múltiples y van desde alteraciones en la ingesta de alimento, hasta el incremento en la probabilidad de padecer enfermedades cardiovasculares, hipertensión o síndrome metabólico (Roth *et al.*, 2004).

El estudio de la obesidad abarca principalmente aspectos relacionados con el metabolismo en general, las patologías más comunes como las alteraciones cardíacas y circulatorias, etc. En contraste, los efectos de la obesidad sobre la estructura histológica de los ovarios y su importancia en la reproducción no han sido tan ampliamente abordados.

Es importante conocer el efecto que tiene la obesidad en la reproducción desde el punto de vista hormonal e histológico, los cuales no han sido abordados de manera significativa en el ratón de los volcanes, *Neotomodon alstoni*, para el entendimiento del desarrollo del sobrepeso y la obesidad en esta especie. Ésto podría facilitar su futuro aprovechamiento como potencial modelo de investigación. Debido a que, comúnmente, los protocolos utilizados para el estudio de la obesidad se basan en animales genéticamente modificados (Speakman *et al.*, 2008), o bien en la ingesta de dietas altas en hidratos de carbono o lípidos (Trayhurn, 2005). Sin embargo, son pocos los estudios que abordan la problemática en individuos que la presentan de manera natural o no inducida (Kennedy *et al.*, 2010).

El estudio de la relación entre la obesidad y algunos aspectos de la biología reproductiva de las hembras en este modelo permitirá describir nuevos efectos de la obesidad en los organismos.

## **5. HIPÓTESIS**

La obesidad en hembras de *Neotomodon alstoni* induce alteraciones en la estructura histológica del ovario y en la concentración de estradiol.

## **6. OBJETIVOS**

- Determinar la influencia de la obesidad en la estructura histológica del ovario y la concentración de estradiol en *Neotomodon alstoni*.
1. Determinar si existe efecto de la obesidad en la histología del ovario.
  2. Evaluar la existencia de la posible relación entre la obesidad y la concentración de estradiol.

## 7. MATERIAL Y MÉTODO

### 7.1. Animales

Se utilizaron hembras de la especie *Neotomodon alstoni* de una edad y peso similares para ser divididas en dos grupos: control y experimental (individuos delgados y obesos). El rango de edad de los individuos se encontraba entre los 8 meses y los 2 años de edad, donde ya se presenta madurez sexual y condiciones reproductivas. Respecto al peso, los animales de 60 g. en adelante fueron considerados como obesos de acuerdo con datos preliminares basados en el índice de Lee (Carmona, 2006), el cual se establece mediante la siguiente formula:

$$\text{Índice de Lee} = (\sqrt[3]{\text{peso corporal-g} / \text{longitud naso anal -mm-}}) \times 10^4$$

Los animales se obtuvieron del bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM; donde se les mantenía en cajas individuales de acrílico translucido de 27x18x15 cm. bajo un fotoperiodo LO 12:12, con temperatura ambiente de 23°C y humedad relativa de 50 a 60%. El alimento (nutricubos Rodent Laboratory Chow 5001) y agua fueron proporcionados *ad libitum*.

El tamaño de muestra se determinó a partir de la disponibilidad de individuos en el bioterio, por lo que el estudio se realizó con 10 animales en total, 5 hembras de peso normal (grupo de las delgadas) y 5 con sobrepeso (grupo de las obesas).

## 7.2. Procedimiento experimental

Durante todo el periodo experimental se evaluó el peso de las hembras cada semana. Así mismo, para poder tomar las muestras de sangre y de ovario se requería que los individuos estuvieran sincronizados respecto al ciclo estral (ANEXO I) (Caligioni, 2009); para lograr lo anterior se les cicló con la ayuda de un estímulo olfativo-hormonal (Aron, 1974) (se colocó una porción de azerrín en cada caja, proveniente del contenedor de un macho, la cual estaba impregnada con la orina del mismo; se utilizó al mismo macho para sincronizar a todas las hembras). Posterior al estímulo olfativo, se realizaron frotis vaginales cada tres días para estimar el estado del ciclo estral en el que se encontraban las hembras. Una vez que todos los individuos del grupo de las delgadas se encontraban sincronizadas entre sí se procedió a sacrificar a los animales.

El día que se les sacrificó, se les anestesió con éter en un recipiente de plástico sellado, en promedio tardaban tres minutos en ser anestesiados profundamente. Con capilares heparinizados se extrajo la sangre de la vena ocular por el seno retro-orbital (ANEXO II) (Evans, 1994), siempre del lado derecho, se sellaron y fueron centrifugados 7 min. a 1000 rpm. El plasma fue extraído con una jeringa Hamilton y colocado en tubos eppendorff de 0.5 ml. a -40°C en un ultracongelador marca So-low modelo CH45-5, para cuantificar el estradiol por medio de la técnica de ELISA con anticuerpo policlonal R4972, donado por la Dra. Coralie Munro de la Universidad de Davis California, E.U.A. Posteriormente se les anestesió profundamente con pentobarbital, se les abrió la cavidad abdominal y se les extrajeron los 2 ovarios, se etiquetaron con identificación de individuo y distinción entre el ovario izquierdo y derecho.

Con la ayuda de un microscópio estereoscópico marca Zeiss modelo 475022 se disectaron los ovarios, se retiró el tejido adiposo y conectivo que se encontraba rodeando los organos, se

colocaron las muestras en cassetes con su identificación y se fijaron en paraformaldehído al 4% (ANEXO III). Posteriormente se procesaron por la técnica de inclusión en parafina (ANEXO IV) La inclusión se hizo en parafina marca Leica Surgipath Paraplast en un horno marca Binder modelo ED-115. Se utilizó un microtomo marca Kedeo modelo KD-3358 con el que se hicieron cortes de las muestras de 4 $\mu$ m de espesor (ANEXO IV), los cortes se hicieron seriados y se montaron en su totalidad. Posteriormente se tiñieron con la técnica de Hematoxilina-Eosina (ANEXO III).

### **7.3. Análisis de los datos**

Una vez obtenidas las laminillas, se regionalizó el ovario, se seleccionaron los cortes cada 250 $\mu$ m, con la finalidad de minimizar la repetición de estructuras en el análisis y se contabilizó toda el área del ovario en cada corte elegido. Se analizaron al microscopio marca Iroscope modelo MG-11F, para obtener un conteo de los folículos ováricos en las distintas etapas de desarrollo folicular.

La identificación de los folículos se realizó a partir de los criterios de la Tabla 1.

De las preparaciones histológicas de ovario se eligieron campos representativos para las fotomicrografías que ilustran este trabajo, las cuales se tomaron en un microscopio marca Nikon Eclipse modelo E400, con una cámara marca Olympus modelo DP71, con el software Olympus PP Controller.

Después de haber realizado el conteo de folículos se analizaron los datos mediante la prueba de "t" de Student para identificar si había diferencias significativas entre el grupo de las delgadas y las obesas, con un valor de significancia de  $p < 0.05$ . Los datos se representaron en una tabla y



en gráficas como valores promedio con desviación estandar, con el software SigmaPlot, para tener mejor representación de la información.

Tipo de Folículo	Descripción
Primordial	El ovocito está rodeado por una única capa de células foliculares planas, que individualizan al folículo.
Primario	Se observa el engrosamiento y posterior proliferación de las células foliculares. Envolviendo al ovocito, empieza a formarse la membrana pelúcida. Comienza a formarse la teca folicular a partir de tejido conectivo.
Secundario	Se forma una capa estratificada de células de la granulosa, a partir de las células foliculares. Se forma la cavidad folicular. La teca se subdivide en 2 capas interna y externa.
Terciario	Comienzan a observarse cavidades llenas de líquido (ácido hialurónico) entre las capas de las células de la granulosa.
De Graaf	Las cavidades de las células de la granulosa empiezan a coalescer hasta formar una sola cavidad central semilunar denominada antro folicular. En uno de los extremos del antro, se observa un montículo grueso de células de la granulosa que rodea al ovocito llamado cúmulo oóforo.
Cuerpo Lúteo	Principalmente células de la granulosa, con pequeñas aportaciones de células de la teca y del estroma.
Atrésico	El folículo presenta el antro folicular lleno de líquido sin ovocito, las células de la granulosa comienzan a desorganizarse. Se observan cuerpos pignóticos.

Tabla 1. Características estructurales de los folículos en sus distintas etapas de desarrollo (Ross *et al.*, 1997).

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Peso de las hembras

Se evaluó el peso a lo largo del tiempo (3 meses) hasta el día del sacrificio, los valores se presentan en la Tabla 2.

	3 meses	P	Sacrificio	P
Delgadas	47.3 g. $\pm$ 6.4	p < 0.0001*	47.4 g. $\pm$ 7.0	p = 0.022*
Obesas	61.1 g. $\pm$ 7.6		61.6 g. $\pm$ 7.9	

Tabla 2. Valores de peso de las hembras delgadas y obesas durante los 3 meses de estudio y el día del sacrificio. Los valores se expresan en  $\bar{x} \pm ds$  y P se refiere a la significancia calculada con la "t" de Student, se indica con asterisco los valores de P que fueron significativos.

Estos valores se representan gráficamente en la figura 10 para los 3 meses de registro y el día de sacrificio (Figura 10A y B respectivamente).

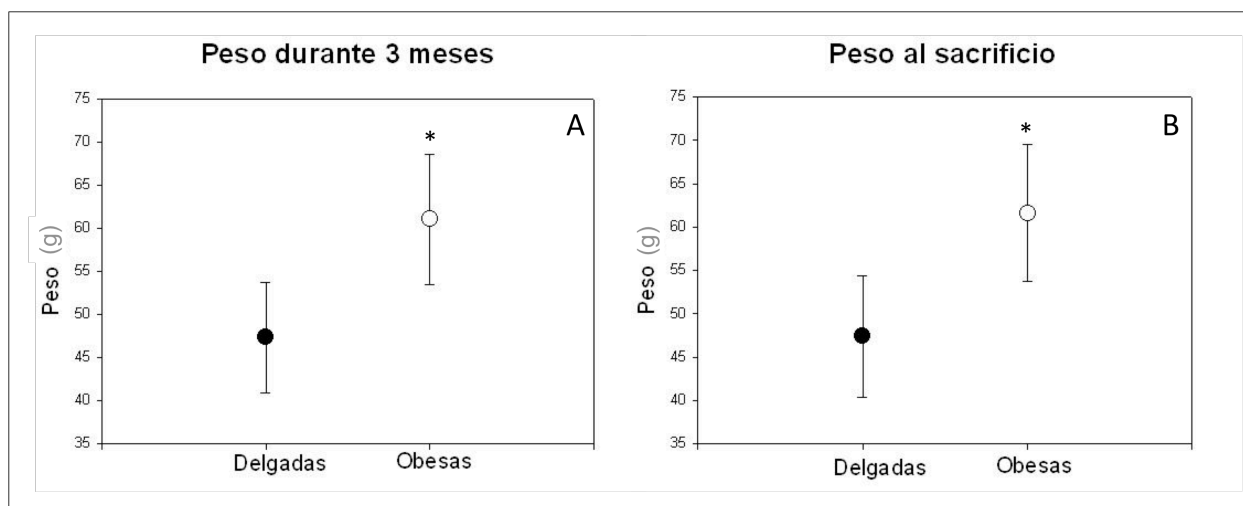


Figura 10. Peso entre hembras delgadas y obesas (A) a lo largo de 3 meses de muestreo y (B) el día que se les sacrificó, expresadas en  $\bar{x} \pm ds$ .

## 8.2. Sincronización estral entre hembras delgadas y obesas

Se consideró como el día 1 la fecha en que se comenzó a presentar el estímulo olfativo del macho. Las hembras pertenecientes al grupo de las delgadas se sincronizaron en la etapa del ciclo estral diestro el día 17.

Al día 18 posterior al inicio del estímulo olfativo, las hembras obesas no se sincronizaron entre sí, solamente dos individuos de éstas coincidieron en la etapa de diestro. Se obtuvieron los siguientes datos por medio del frotis vaginal (Tabla 3).

Delgadas (De)	Etapa del ciclo estral	Obesas (Ob)	Etapa del ciclo estral
1	Diestro	1	Metaestro
2	Diestro	2	Diestro*
3	Diestro	3	Diestro*
4	Diestro	4	Proestro
5	Diestro	5	Estro

Tabla 3. Etapas del ciclo estral en el que se encontraba cada hembra al día del sacrificio. Se indica con asterisco las hembras obesas que coincidieron en la etapa de ciclo estral.

### 8.3. Estradiol y Ciclo estral

Las concentraciones totales de estradiol para cada hembra se presentan en la Tabla 4, los individuos obesos en diestro se marcan con un asterisco en la Tabla 4.

Debido a que todas las hembras delgadas se encontraban en diestro y solamente dos de las hembras obesas se encontraban en esta etapa, la comparación y análisis de los resultados histológicos se realizó entre estos individuos, y se excluyó de éstos a las 3 hembras del grupo de las obesas que se encontraban en otras etapas del ciclo estral.

Delgadas (De)	Estradiol (pm)	Obesas (Ob)	Estradiol (pm)
1	22	1	74
2	22	2	22*
3	22	3	22*
4	22.5	4	948.5
5	22	5	197

Tabla 4. Concentración de estradiol el día del sacrificio, expresada en picomoles (pm). Se indica con asterisco las hembras del grupo de las obesas que se encontraban en diestro, al igual que las 5 hembras delgadas.

## 8.4. Histología del Ovario

Al realizar la disección de los individuos, se observó que la hembra Ob1, en metaestro, sólo tenía el ovario derecho; en el espacio donde tenía que localizarse el ovario izquierdo se encontraba solamente un cúmulo de tejido adiposo. Aún así, se incluyó en parafina esta parte y en el análisis microscópico se confirmó que era solamente grasa. El ovario derecho de esta hembra se incluyó en los análisis.

### 8.4.1. Folículos

El conteo de todos los folículos para los individuos delgados y obesos en diestro se resume en la Tabla 5.

	Primordiales	Primarios	Secundarios	Terciarios	Terciarios atrésicos	Graaf	Graaf atrésicos	Cuerpo Lúteo
<b>Delgadas</b>	276.2 ± 103.5	79 ± 58.7	12 ± 9.2	17.8 ± 12.4	1 ± 1.22	0 ± 0	1.4 ± 1.5	19.8 ± 6.5
<b>Obesas</b>	278 ± 257.4	28.5 ± 33.2	12.5 ± 6.4	12.5 ± 0.7	4 ± 1.4	1 ± 1.4	2 ± 2.8	8.5 ± 4.9
<b>P</b>	p = 0.989	p = 0.319	p = 0.948	p = 0.592	p = 0.037 *	p = 0.117	p = 0.715	p = 0.081

Tabla 5. Conteo de folículos para cada etapa del desarrollo folicular de delgadas y obesas. Los datos se expresan en  $\bar{x} \pm ds$  y P se refiere a la significancia calculada con la "t" de Student, se indica con asterisco los valores de P que fueron significativos.

En la figura 11 se representan gráficamente los valores de el conteo de los folículos primordiales, primarios y secundarios (Figura 11A, B y C respectivamente).

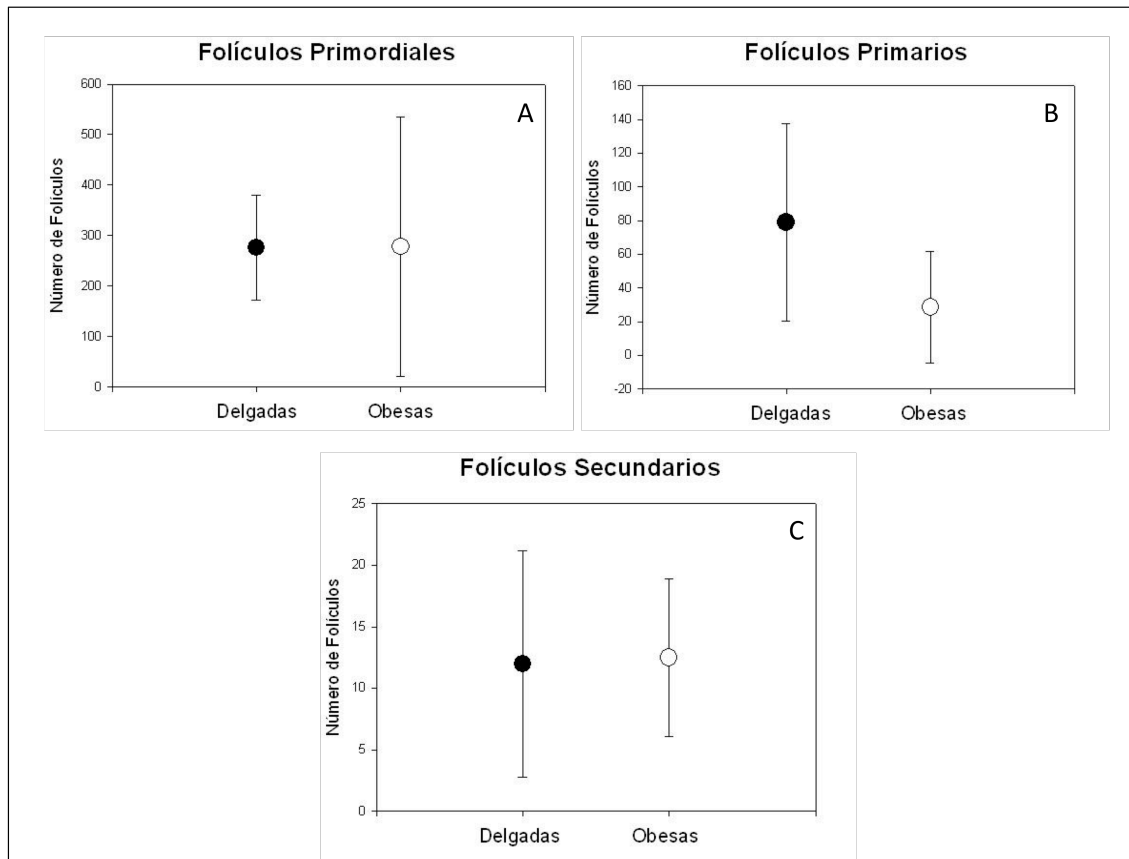


Figura 11. Gráficas del conteo de folículos en las primeras etapas de desarrollo del ciclo folicular entre hembras delgadas y obesas. Folículos (A) primordiales, (B) primarios y (C) secundarios. Los datos de cada gráfica se representaban como  $\bar{x} \pm ds$ .

En la figura 12 se representan gráficamente los valores de el conteo de los folículos terciarios, terciarios atrésicos, de Graaf y de Graaf atrésicos (Figura 12A, B, C y D respectivamente).

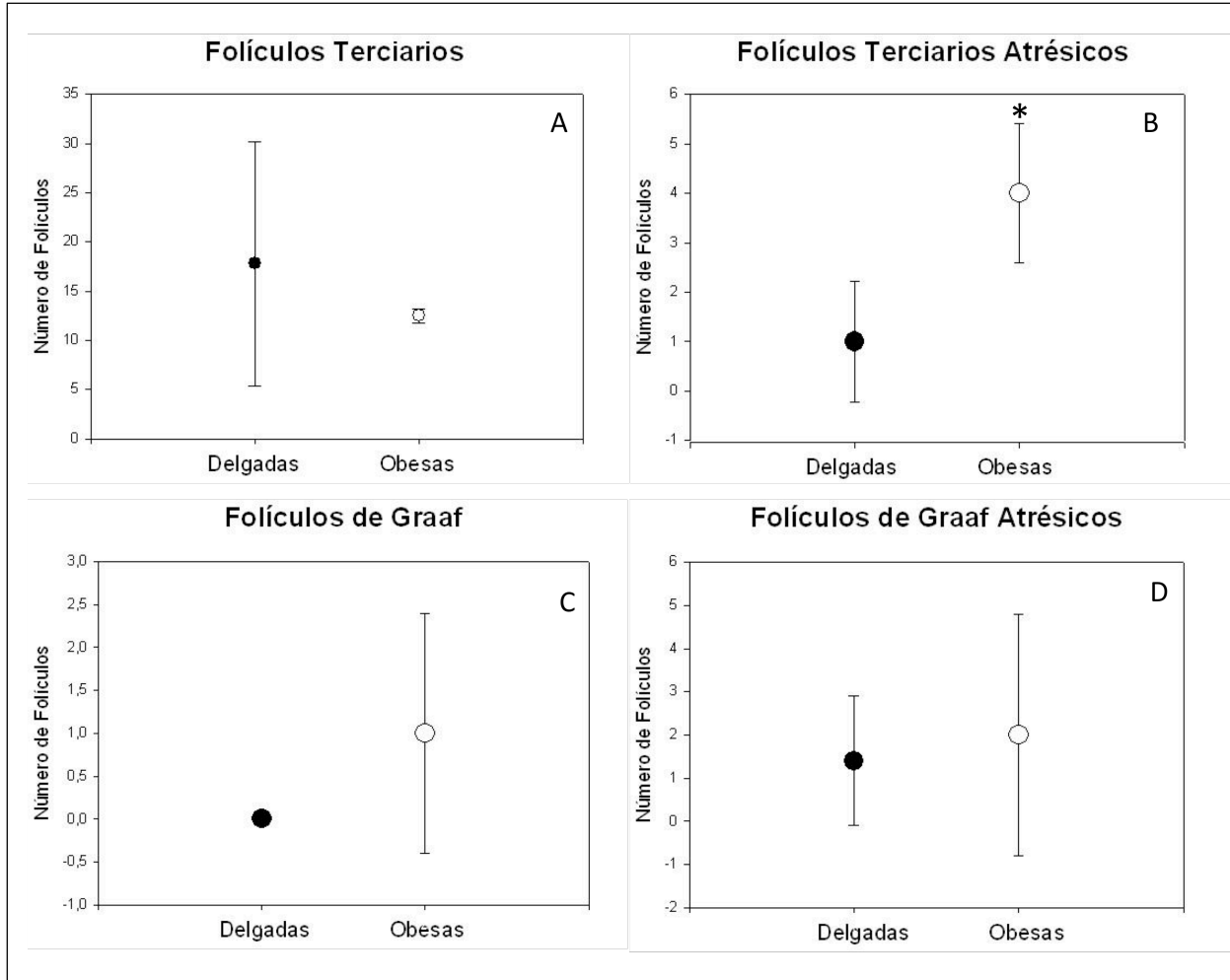


Figura 12. Gráficas entre hembras delgadas y obesas del conteo de folículos en las últimas etapas de desarrollo del ciclo folicular, en desarrollo normal y en estado atrésico. (A) terciarios, (B) terciarios atrésicos, (C) de Graaf y (D) de Graaf atrésicos. Los datos de cada gráfica se representanan como  $\bar{x} \pm ds$ .

La representación gráfica de los valores del cuerpo lúteo se observa en la figura 13.

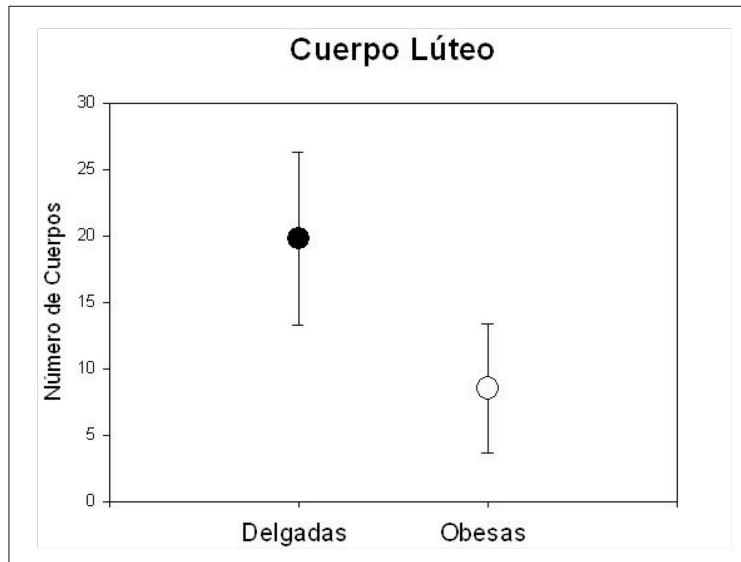


Figura 13. Conteo de cuerpos lúteos de delgadas y obesas. Los datos de la gráfica se representanan como  $\bar{x} \pm ds$ .



## 8.5. Fotomicrografías de los ovarios

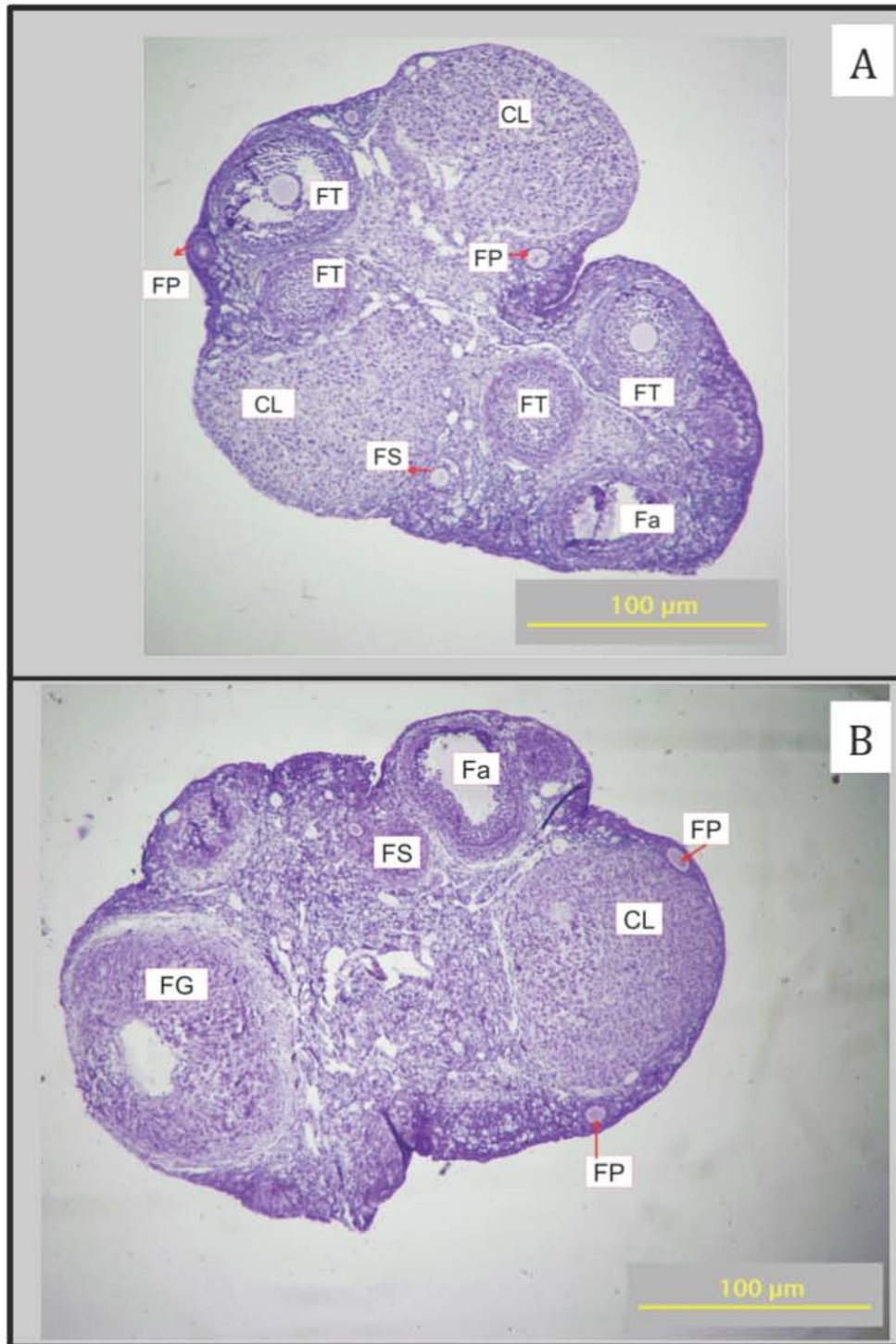


Figura 14. Panorámica de ovario de una hembra delgada (A) y una obesa (B) en Diestro. Se pueden observar folículos de tipo primario (FP), secundario (FS), terciario (FT), atrésico (Fa), de Graaf (FG) y cuerpo lúteo (CL). (Técnica Hematoxilina-Eosina).

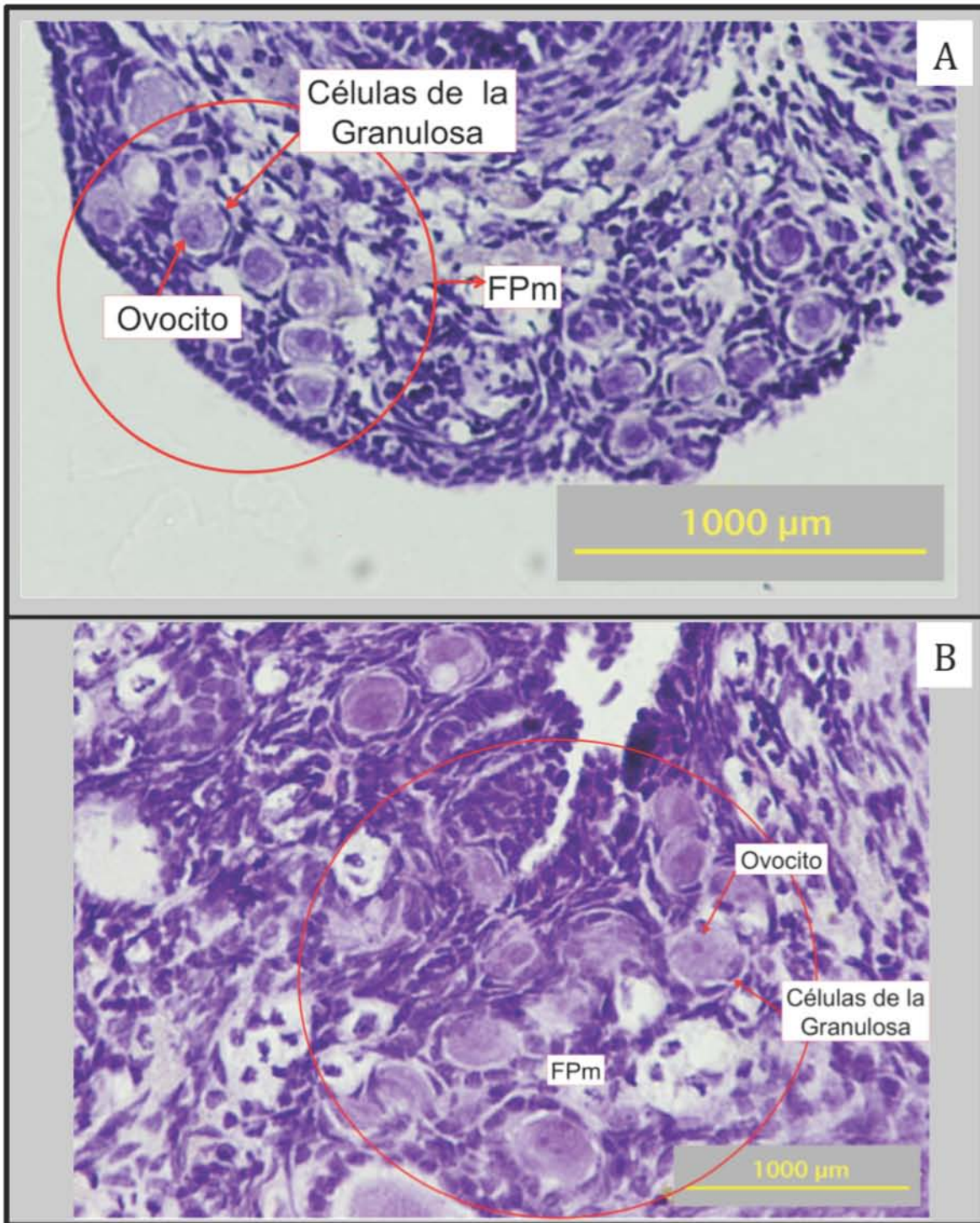


Figura 15. Folículos primordiales (FPm) en detalle de ovario de hembra delgada (A) y obesa (B) en Diestro. (Técnica Hematoxilina-Eosina).

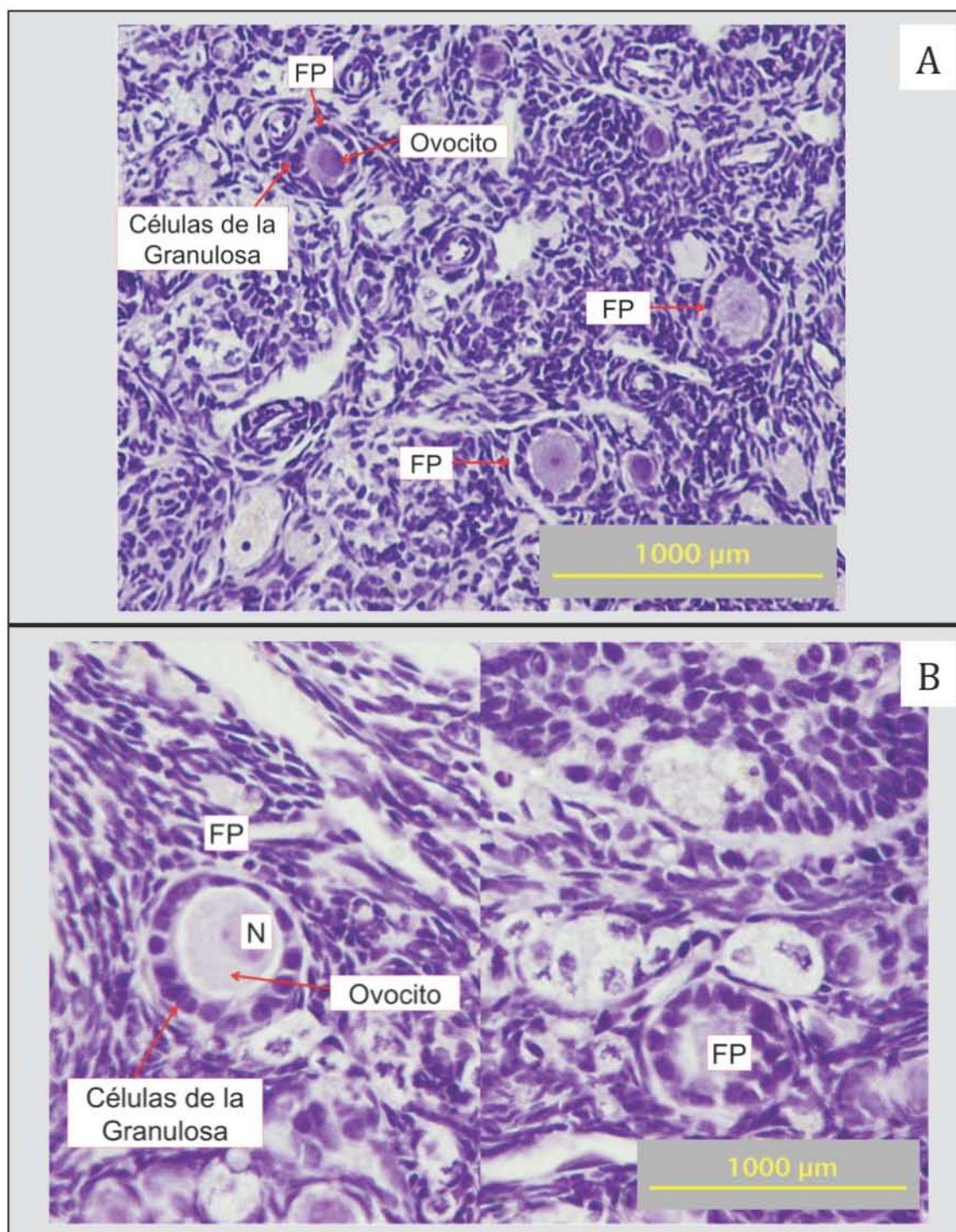


Figura 16. Folículos primarios (FP) en detalle de ovario de hembra delgada (A) y obesa (B) en Diestro, en la imagen inferior se observa el núcleo (N) del ovocito. (Técnica Hematoxilina-Eosina).

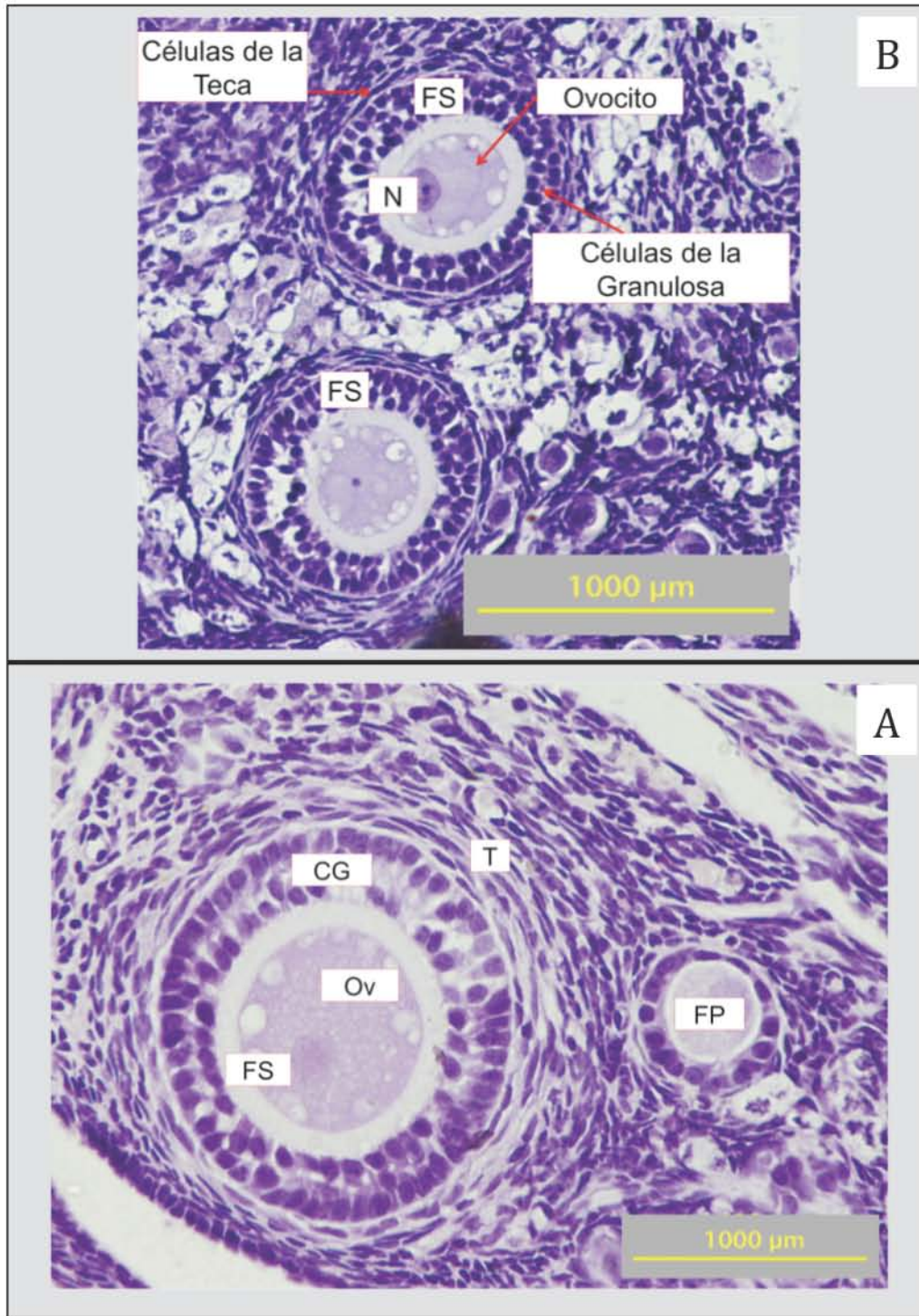


Figura 17. Folículos secundarios (FS) en detalle de ovario de hembra delgada (A) y obesa (B) en Diestro, se observa el ovocito (Ov), células de la granulosa (CG) y de la teca (t), y en la imagen de arriba el núcleo (N) del ovocito. (Técnica Hematoxilina-Eosina).

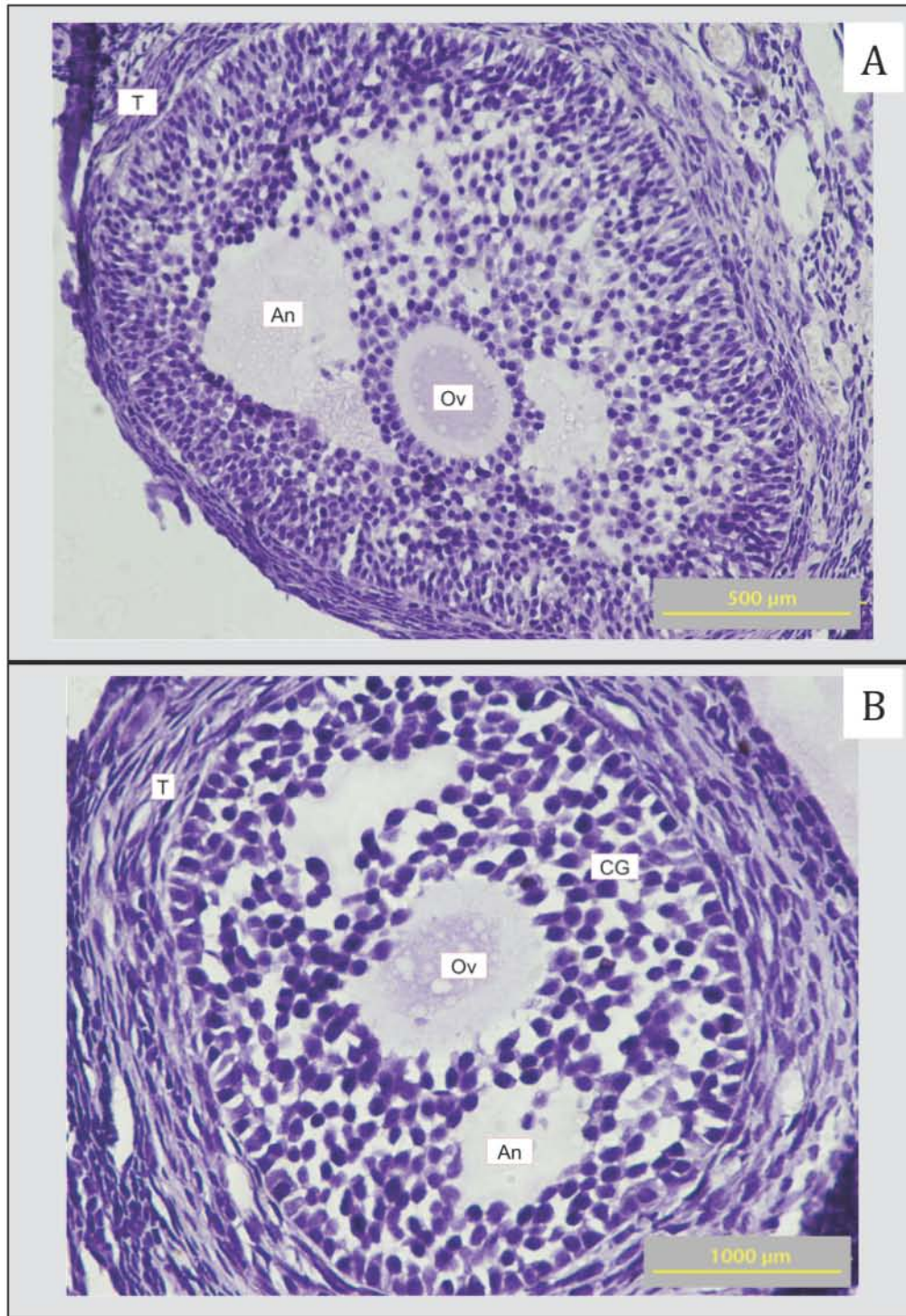


Figura 18. Foliculo terciario en detalle de ovario de hembra delgada (A) y obesa (B) en Diestro, se observa en el centro el ovocito (Ov), el antro folicular (An), alrededor las células de la granulosa y en la parte superior izquierda se observa parte de las células de la teca (T). (Técnica Hematoxilina-Eosina).

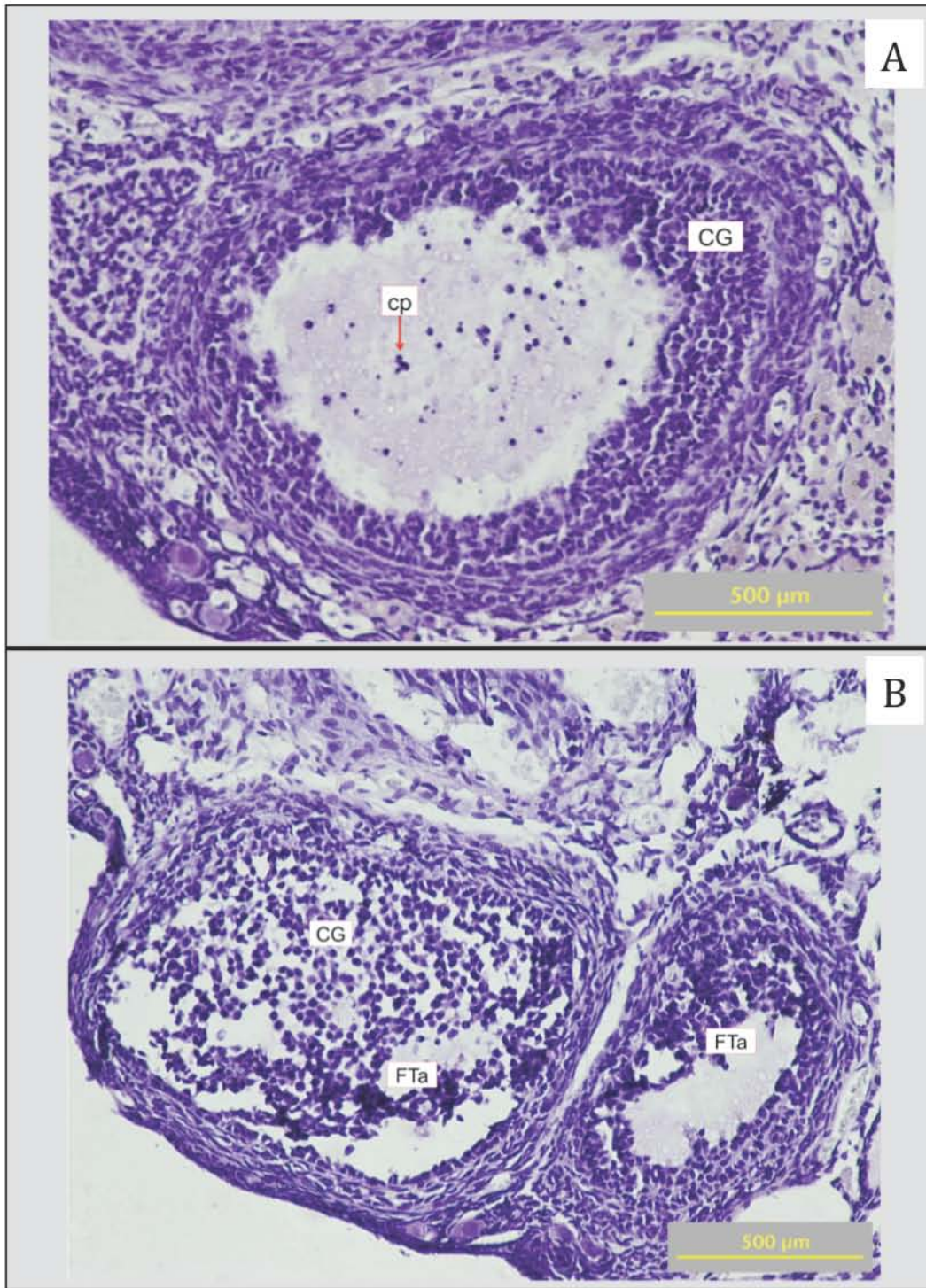


Figura 19. Folículos terciarios atrésicos (FTa) en detalle de ovario de hembra delgada (A) y obesa (B) en Diestro. Se pueden observar las células de la granulosa pignóticas (cp) y la capa de células de la granulosa (CG). (Técnica Hematoxilina-Eosina).

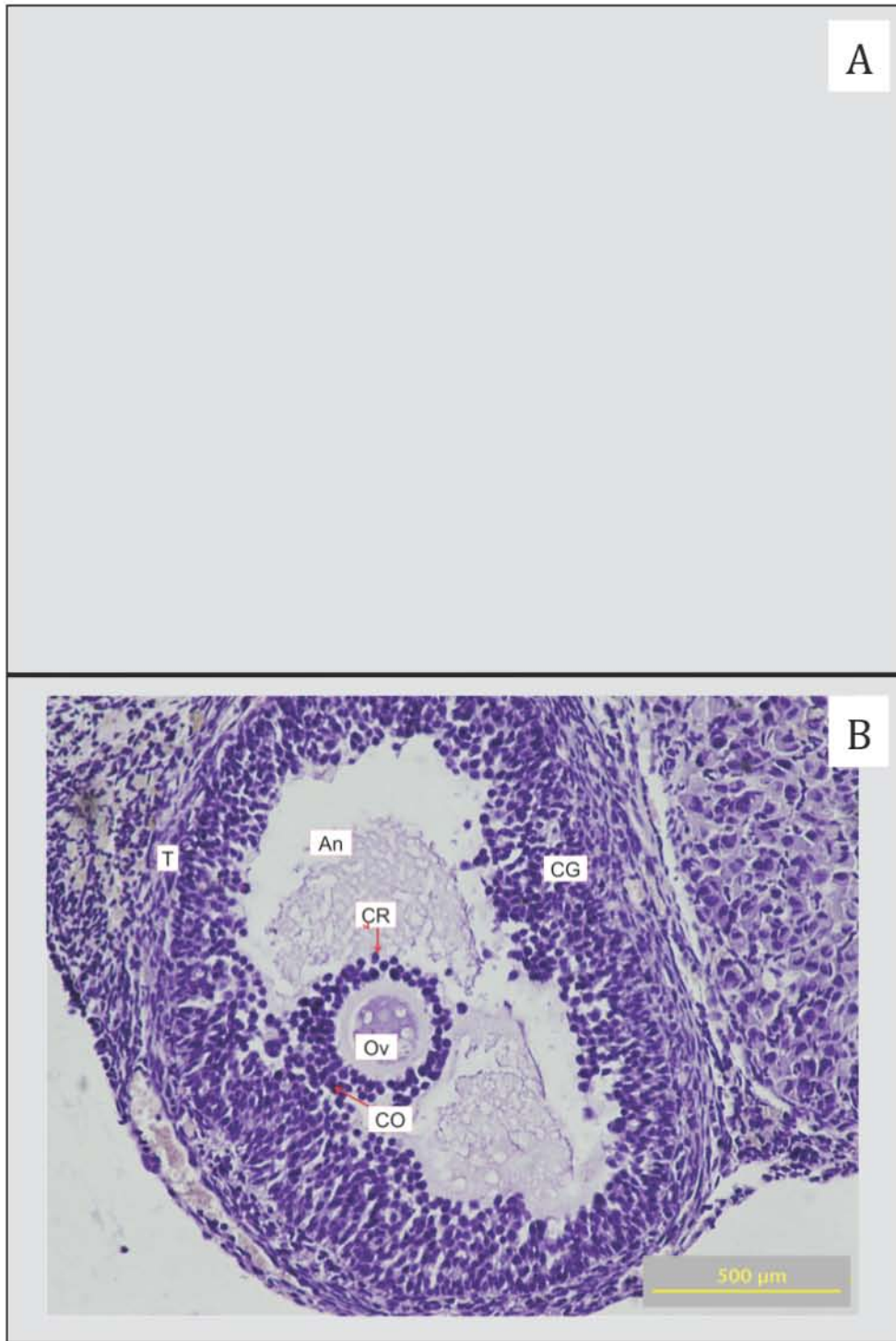


Figura 20. Folículo de Graaf en detalle de ovario de hembra delgada (A) y obesa (B) en Diestro. Las delgadas no presentaron este tipo de folículo. Se observa el ovocito (Ov), la corona radiata (CR), el cúmulo oóforo (CO), antro folicular (An), las células de la granulosa (CG) y de la teca (T). (Técnica Hematoxilina-Eosina).

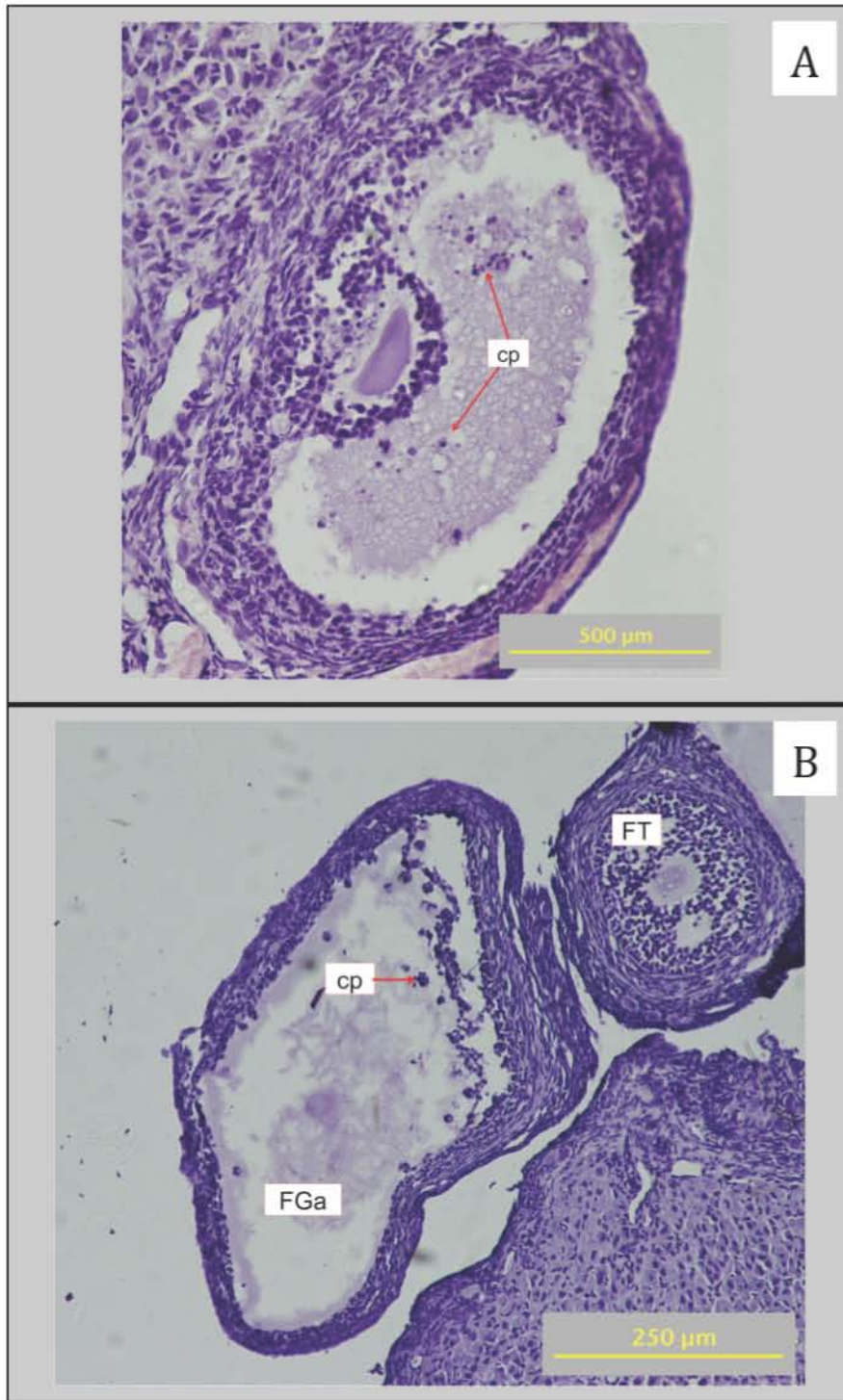


Figura 21. Folículo de Graaf atrésico en detalle de ovario de hembra delgada (A) y obesa (B) en Diestro. Se observan células de la granulosa pignóticas (cp), así como una pérdida en el arreglo de la capa de la granulosa. (Técnica Hematoxilina-Eosina).



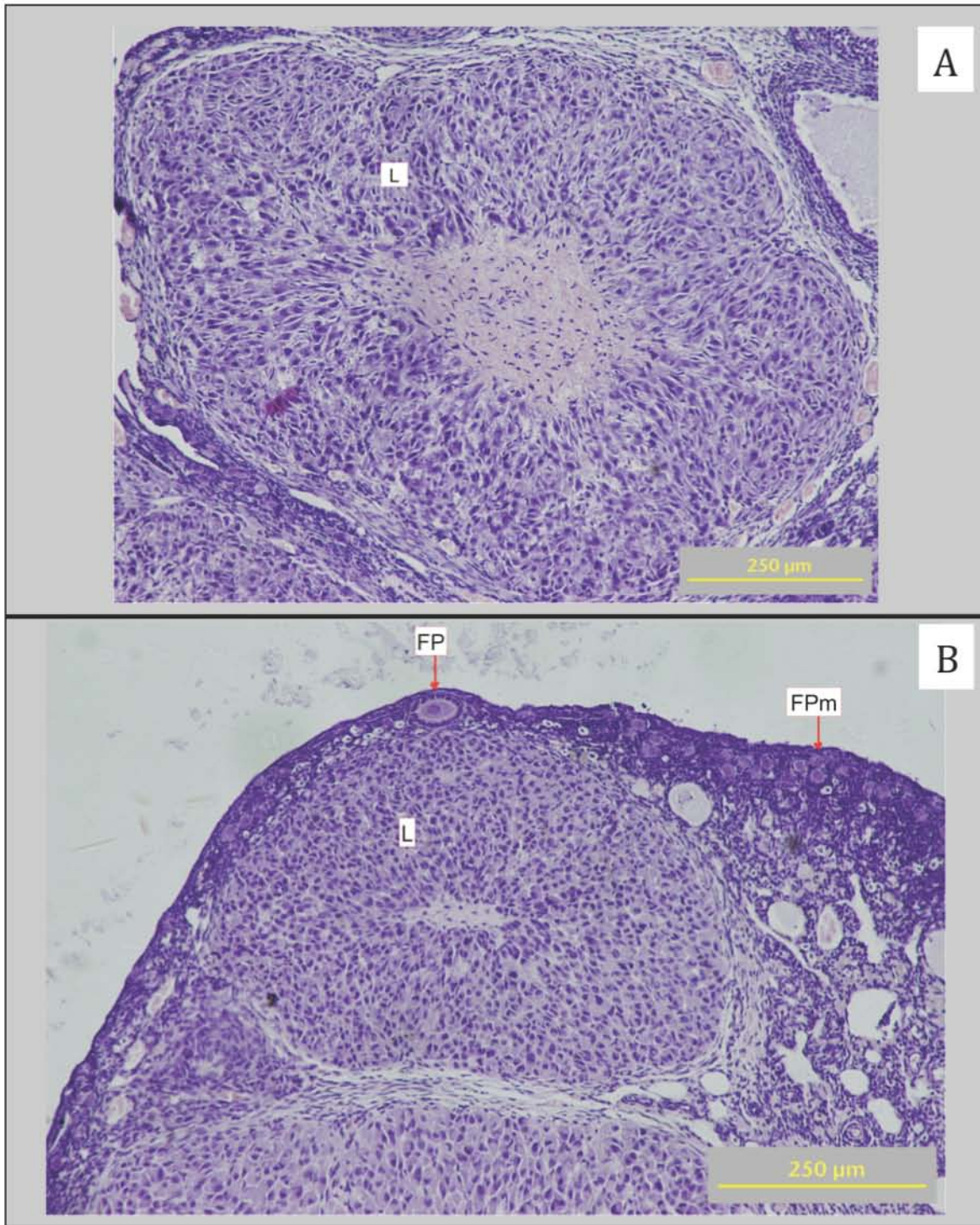


Figura 22. Cuerpo lúteo en detalle de ovario de hembra delgada (A) y obesa (B) en Diestro. Se observan las células luteales (L) claramente diferenciadas con núcleo grande y citoplasma vacuoldado. (Técnica Hematoxilina-Eosina).

## **9. DISCUSIÓN**

### **9.1. Peso de las Hembras**

El uso de modelos animales silvestres para diversas investigaciones científicas tiene implícita amplia variabilidad interindividual en los resultados, lo cual es típico de las poblaciones naturales (Heideman, 2004). Es probable que esto ocurra con el ratón de los volcanes ya que los valores de peso de cada individuo tuvieron variación considerable a lo largo del tiempo de registro, como se puede ver en la desviación estandar de los valores promedio en las gráficas de peso durante los 3 meses de registro y al día del sacrificio.

Respecto al peso, se mantuvieron las diferencias significativas entre los dos grupos del estudio, delgadas y obesas, durante los 3 meses de registro y en el día del sacrificio, a partir del criterio del Índice de Lee (Rogers y Webb, 1980). Estos resultados coinciden con trabajos previos en los que se ha utilizado al ratón de los volcanes como modelo de obesidad (Speakman, 2008). Cabe recalcar la importancia de esta especie, debido a que desarrolla la condición de obesidad de manera natural y no es necesario inducirla a partir de manipulaciones en la dieta o mutaciones (Speakman, 2008; Carmona-Alcocer *et al.*, 2012).

### **9.2. Sincronización estral entre hembras delgadas y obesas**

Las hembras del grupo control, delgadas, se sincronizaron en la misma etapa del ciclo estral, diestro, el día 17 posterior al estímulo olfativo. Para el caso del grupo de las obesas, en ningún momento del muestreo coincidieron todas las hembras en la misma etapa del ciclo estral. Para el día del sacrificio, las hembras obesas aún se encontraban en distintas etapas del ciclo, donde sólo

2 estaban en la misma etapa, diestro, y las tres hembras restantes se encontraban cada una en etapa distinta.

Lo anterior pudo deberse a la alteración en la secreción de hormonas ováricas relacionada con el incremento del IMC, que induce el aumento en la concentración de leptina y la disminución de adiponectina (Pandey *et al.*, 2010). El cambio en la concentración de estas hormonas, tiene como consecuencia la alteración en la temporalidad y funcionalidad del ciclo estral. Esto puede tener repercusiones en el éxito reproductivo de estos individuos, debido a que estas alteraciones se encuentran asociadas a la infertilidad (Pandey *et al.*, 2010).

### **9.3. Estradiol y Ciclo estral**

La concentración de estradiol en las hembras delgadas fué igual para todos los individuos del grupo, esto es consistente con que todas se encontraban en la misma etapa del ciclo estral, diestro.

En las hembras del grupo de las obesas, hay gran variación en el valor de la concentración de esta hormona. Dentro de esta variación se encuentra una relación entre los valores individuales y la etapa del ciclo estral a la que están asociados; la distribución relativa de la concentración hormonal de cada individuo con respecto a su ciclo estral coincide con lo publicado por Zheng y colaboradores en el 2013, que reporta que la concentración de esta hormona presenta su valor máximo durante el proestro y disminuye progresivamente durante el estro y metaestro hasta alcanzar su valor más bajo en el diestro.

En este caso, las hembras delgadas, en diestro, y las obesas que se encontraban también en el diestro, presentan los mismos valores en la concentración de estradiol.

#### **9.4. Histología del Ovario**

Para el caso del individuo Ob1 que carecía del ovario izquierdo, a partir de la descripción anatómica realizada al momento de la disección, donde se reportó en la inspección visual que las estructuras del sistema reproductor del individuo se encontraban en un adecuado desarrollo y solamente se observó la falta del ovario; ésto coincide con la alteración conocida como "aplasia ovárica unilateral", que es una condición genética donde hay ausencia del desarrollo de uno de los ovarios, pero el resto de las estructuras adyacentes, trompa de falopio y vasos sanguíneos, presentan desarrollo normal (Nelson y Gambone, 2010). No se ha reportado una relación entre esta alteración y la condición de obesidad.

##### **9.4.1 Folículos**

Respecto a los folículos primordiales no se observó diferencia significativa entre el número promedio de folículos de las hembras delgadas y las obesas. Así mismo, tampoco se observaron alteraciones histológicas en este tipo de folículos, en ninguno de los 2 grupos.

En el conteo de los folículos primarios, se observó que el grupo de las delgadas presentó la tendencia a un mayor número de éstos con respecto al grupo de las obesas, pero la diferencia no fué significativa.

En los folículos secundarios no se observó ninguna diferencia en el conteo entre grupos, con valores muy similares entre ellos. No hubo registro de alteraciones histológicas para este tipo de folículo; ésto coincide con lo que se ha reportado en la rata, donde los folículos secundarios o en menor etapa de desarrollo no presentan atresia (Butcher y Kirkpatrick-Keller, 1984).

Para el caso de los folículos terciarios, no se observaron diferencias significativas en el conteo de estos folículos entre los dos grupos, pero sí se observó que las delgadas presentaron una mayor variación intragrupo en su conteo. Los folículos terciarios se observan principalmente durante el diestro y proestro (Butcher y Kirkpatrick-Keller, 1984) y aún cuando todas las hembras del grupo de las delgadas y solamente 2 del grupo de las obesas se encontraban en diestro, la gran variación de valores entre las delgadas probablemente se debió a que éstas no estaban en el mismo momento del diestro, ya que se tiene un periodo relativamente largo dentro esta etapa del ciclo (65 hrs.) y el desarrollo folicular varía dentro de la misma.

En los folículos terciarios se realizó el conteo de éstos en estado atrésico, aquí se observó una diferencia significativa entre grupos, donde el grupo de las delgadas los presenta en menor frecuencia en comparación con las obesas. Se ha reportado que la atresia folicular en folículos terciarios se observa principalmente durante el diestro (Butcher y Kirkpatrick-Keller, 1984). Pero esta diferencia significativa puede ser evidencia de un efecto de la obesidad en la histología ovárica. A futuro sería necesario realizar la cuantificación de hormonas, como los andrógenos, para determinar si hay una alteración endocrinológica en el proceso de atresia asociada a la obesidad. No se registraron otras alteraciones histológicas en este tipo de folículo para ninguno de los 2 grupos.

El conteo de los folículos de Graaf dió como resultado que las delgadas no presentaron este tipo de folículo mientras que las obesas los presentaron en una frecuencia muy baja. Ésto puede relacionarse con la etapa del ciclo estral en el que se encontraban las hembras, los folículos de Graaf se observan principalmente entre el proestro y el estró (Butcher y Kirkpatrick-Keller, 1984), por lo que no se espera observar este tipo de folículo en esta etapa, los que se observan en

las obesas pertenecen a una hembra y podrían deberse a que ésta se encontraba en el proceso de salir de diestro y entrar a proestro.

Respecto a la atresia en este tipo de folículo no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos, aunque cabe mencionar, que en las delgadas la atresia se observó en tres individuos mientras que en las obesas sólo una de las hembras la presentó. La atresia de folículos de graaf solamente se observó en individuos en diestro, delgadas y obesas, esto coincide con lo reportado por Butcher y Kirkpatrick-Keller en 1984.

En el conteo del cuerpo lúteo se encontró que las hembras del grupo de las delgadas presentaron tendencia hacia el mayor número de cuerpos lúteos que las obesas, sin embargo este resultado no fué significativo. Previamente se ha reportado que se observa mayor incidencia de cuerpos lúteos en formación al final del metaestro y durante todo el diestro (Butcher y Kirkpatrick-Keller, 1984), por lo que éste resultado es congruente con el hecho de que todas las hembras delgadas se encontraban en diestro mientras que entre las obesas hay solamente dos en diestro. En este caso la significancia es cercana a  $p=0.05$ , por lo que es probable que con un mayor número de muestra en proyectos posteriores se pueda determinar esta diferencia. Ésto es importante debido a que se ha reportado que la obesidad está asociada a la alteración en la secreción de progesteronas por el cuerpo lúteo, esto forma parte de las causas de infertilidad relacionadas a las alteraciones de peso corporal; así mismo, esta alteración hormonal está relacionada con la variación en la temporalidad del ciclo estral de hembras obesas (Sherman y Korenman, 1974).

Para la futura experimentación se recomendaría, si la disponibilidad lo permite, tener un mayor número de muestra que facilitaría la obtención de datos concluyentes; de tal manera que

se pueda seguir el estudio de animales que presentan obesidad de manera natural para el análisis de los orígenes y efectos de esta patología.

Así mismo, se propone evaluar entre hembras delgadas y obesas de esta especie la concentración hormonal en cada etapa del ciclo estral, para determinar si los valores obtenidos en este trabajo coinciden para cada etapa del mismo entre las controles y experimentales. Además se propone describir la relación entre la condición de obesidad, la concentración hormonal y el desarrollo folicular con cada etapa del ciclo estral.

## 10. CONCLUSIONES

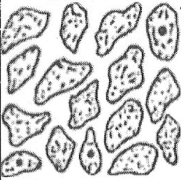
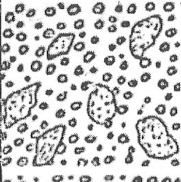
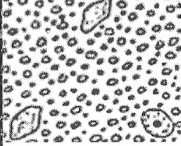
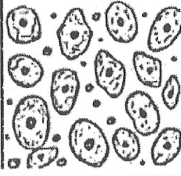
- Las diferencias en peso entre los dos grupos fueron significativas y se mantuvieron durante todo el periodo experimental.
- Las hembras delgadas presentaron la capacidad de sincronización olfativa-hormonal, mientras que las obesas no la presentaron durante los 18 días de estímulo.
- La distribución de la concentración de estradiol está relacionada con el ciclo estral, donde se observa un valor máximo de esta hormona durante el proestro y éste disminuye hasta alcanzar su valor mínimo en el diestro.
- No se encontraron diferencias significativas entre el grupo de las delgadas y las obesas en el conteo de folículos primordiales, primarios, secundarios, terciarios, de Graaf y de Graaf atrésicos y en el cuerpo lúteo, para el diestro.
- En los folículos atrésicos terciarios si se observaron diferencias significativas entre delgadas y obesas en el diestro que pueden estar relacionadas a la condición de obesidad.



## 11. ANEXOS

### ANEXO I. CICLO ESTRAL

Para determinar el estado estral en el que se encontraban las hembras a partir del frotis vaginal se utilizó el siguiente esquema (Marcondes *et al.*, 2002, Caligioni, 2009).

FASE DEL CICLO	GENITALES EXTERNOS	FROTIS VAGINAL DESCRIPCIÓN	CUADRO HISTOLÓGICO	COMPORTAMIENTO	DURACIÓN
ESTRO	LABIOS VAGINALES HINCHADOS (ENGROSADOS) VAGINA SECA	GRAN CANTIDAD DE CÉLULAS EPITELIALES QUERATINIZADAS (EN PLACAS O ESCAMAS CORNICADAS SIN NÚCLEO VISIBLE) Y MUY POCAS CÉLULAS NUCLEADAS		CALOR SEXUAL (ACEPTACIÓN DEL MACHO) CÓPULA LORDOSIS LOS NIVELES DE ESTRÓGENOS SON ELEVADOS	12 HRS
METAESTRO	LABIOS VAGINALES LIGERAMENTE HINCHADOS MASA CASEINOSA EN LA VAGINA	BUENA CANTIDAD DE LEUCOCITOS Y POCAS CÉLULAS EPITELIALES QUERATINIZADAS		OCURRE LA OVULACIÓN. NO HAY CALOR SEXUAL, NO HAY ACEPTACIÓN DEL MACHO. LOS NIVELES DE ESTRÓGENOS ESTÁN MENOS ELEVADOS.	21 HRS
DIESTRO	LABIOS VAGINALES NORMALES MUCOSA VAGINAL HÚMEDA	GRAN CANTIDAD DE LEUCOCITOS, POCAS CÉLULAS QUERATINIZADAS Y, A VECES, ALGUNAS CÉLULAS NUCLEADAS.		NO HAY CALOR SEXUAL, NO HAY ACEPTACIÓN DEL MACHO. LOS NIVELES DE LH Y PROGESTERONA ESTÁN ELEVADOS.	65 HRS
PROESTRO	LABIOS VAGINALES LIGERAMENTE HINCHADOS VAGINA SECA	GRAN CANTIDAD DE CÉLULAS EPITELIALES NUCLEADAS Y MUY POCOS LEUCOCITOS.		PUEDE OCURRIR CALOR SEXUAL (PUEDE HABER ACEPTACIÓN DEL MACHO). LOS NIVELES DE FSH Y DE ESTRÓGENOS SON ELEVADOS	12 HRS

## ANEXO II. SANGRADO RETRO-ORBITAL

El animal se anestesia y se sujeta suavemente por el cuello a la altura de la nuca (pescuezo) en una superficie sólida, de forma que sobresalgan los ojos. Esto puede ayudar a ocluir el retorno venoso de la cabeza y el cuello.

Hay que tener cuidado de no impedir la respiración. Se penetra entonces el seno orbital con una micropipeta, pipeta de Pasteur o tubo microcapilar (de 100  $\mu$ l). Se le empuja a través de la conjuntiva, lateralmente (parte externa), dorsalmente (encima) o medialmente (parte interna) hasta la pared posterior de la órbita donde se pincha el seno venoso y por lo tanto se llena de sangre. Al retirar la pipeta o el tubo, la sangre exuda desde el canto (comisura) donde puede ser recogida. (Puede haber contaminación de la muestra con residuos de superficie al utilizar esta técnica). Se puede liberar momentáneamente el cuello antes de retirar la pipeta para minimizar la hemorragia del lugar de la punción. También hay que tener cuidado de no dañar la córnea mientras se presiona el globo para limitar la hemorragia después de haber obtenido la muestra. En un ratón se puede recoger 100-200  $\mu$ l con este método.

Hay discrepancia sobre si es mejor usar el canto interno (medial o lado nasal) o externo (lateral) para penetrar en la conjuntiva. Algunos consideran que el daño se minimiza al utilizar la vía lateral. En la rata, se ha sugerido que la conjuntiva sea penetrada en la parte dorsal o superior del ojo. Eso se debe a que en esta especie hay un plexo dorsal venoso más que un seno retro-orbital.

Esta técnica tiene muchos efectos adversos potenciales. Puede aparecer hemorragia después de la obtención de sangre, con el resultado de un hematoma retro-orbital y presión excesiva en el ojo. La presión es casi con certeza dolorosa para el animal y el daño al nervio óptico y otras estructuras intra-orbitales pueden llevar a deficiencias en la visión e incluso a la ceguera. La presión del hematoma también podría llevar a que el animal sea incapaz de cerrar el ojo, lo que a su vez puede llevar a una ulceración y rotura corneal. Otros factores adversos incluyen la posibilidad de que la micropipeta atraviese los huesos de la órbita y cause daño neural, la penetración del propio globo con una pérdida de humor vítreo, e infección que provoca la inflamación y posterior degeneración del ojo. La queratitis (inflamación de la córnea) con formación de *pannus* (proliferación de vasos sanguíneos) también es un efecto adverso común y puede ser causada por el operador al frotar las córneas mientras presiona el globo para limitar la hemorragia después de haber obtenido la muestra de sangre. Las secuelas frecuentes de algunos de estos efectos adversos es un ojo encogido (microftalmia) que es inoperante y es probable que el animal haya tenido muchos dolores en el periodo intermedio (Evans, 1994).

## ANEXO III. FORMULARIO

### 1. Paraformaldehido

Buffer fosfato 0.1 M pH. 7.2..... 1 lt.  
Paraformaldehido..... 40 gr.

Se calientan 3/4 del volumen total del buffer a 60°C en baño maría y se agrega el paraformaldehido a que se disuelva bien (utilizando una mosca). No permitir que se pase de esta temperatura el buffer. Se afora al volumen deseado agregando la cantidad de buffer restante. Verificar el pH a 7.2-7.4. Se guarda en frasco ambar en el refrigerador.

### 2. Hematoxilina de Harris (Luna, 1968)

Cristales de Hematoxilina ..... 5 gr.  
Alcohol 100° ..... 50 ml.  
Amonio o aluminio de potasio (alumbre)..... 100 gr.  
Agua destilada..... 1 lt.  
Oxido de mercurio (rojo)..... 2.5 gr.

Se disuelve la hematoxilina en el alcohol y, a parte, se disuelve el alumbre en agua caliente. Se retira del fuego la segunda solución y se mezcla con la primera. Se calienta de nuevo. Se saca del calor y se adiciona el óxido de mercurio lentamente. Se vuelve a colocar al fuego lentamente hasta que tome un tono morado oscuro. Remover inmediatamente del calor. Precipitar el vaso en una palangana con agua fría hasta que se enfríe (ya se puede usar el colorante). Una vez frío, adicionar 2-4 ml. de ácido acético glacial por cada 100ml. de solución (incrementa la precisión de la tinción nuclear). Filtrar antes de usar.

### 3. Eosina alcohólica (Luna, 1968)

Se prepara inicialmente una solución stock y posteriormente se prepara la solución de trabajo.

Solución stock de eosina alcohólica 1%:

Eosina Y, soluble en agua..... 1 gr.  
Agua destilada..... 20 ml.  
Alcohol 96°..... 80ml.

Se mezclan la eosina y con el agua destilada y se agita hasta que se disuelva completamente la eosina. Se agrega el alcohol. Se almacena en frasco ambar.

Solución de trabajo de eosina alcohólica:

Solución stock de eosina alcohólica..... 100 ml.  
Alcohol 80°..... 300 ml.

Antes de usarla se añaden 0.5 ml. de ácido acético glacial por cada 100 ml. de solución y se agita.

## ANEXO IV. HISTOLOGÍA

### Protocolo general (Luna, 1968)

**a. Fijación:** fijación de las muestras en paraformaldehído.

**b. Deshidratación e inclusión en parafina:**

-Alcohol 30°.....	1 hr.
-Alcohol 50°.....	1 hr.
-Alcohol 70°.....	1 hr.
-Alcohol 80°.....	1 hr.
-Alcohol 90°.....	1 hr.
-Alcohol 100°.....	1 hr.
-Alcohol 100°.....	1 hr.
-Alcohol 100°-Xilol 1:1 .....	1 hr.
-Aceite de cedro-Xilol 1:1 .....	1 hr.
-Xilol.....	15-30 min.
-Parafina-Xilol 1:.....	30 min.
-Parafina I.....	30 min.
-Parafina II.....	30 min.
-Inclusión en cubo	

**c. Corte:** para preparar las muestras se requiere un baño de flotación, en 1lt. de agua entre 58-60°C, con un poco de grenetina en estado reactivo. El corte se realiza en un microtomo.

**d. Tinción:**

-Horno 58-59°.....	20 min.
-Xilol.....	15 min.
-Alcohol 100°.....	5 min.
-Alcohol 96°.....	5 min.
-Alcohol 70°.....	5 min.
-Alcohol 50°.....	5 min.

- Agua destilada..... Baño.
- Hematoxilina..... 3 min.
- Agua corriente..... Enjuague.
- Alcohol 70°..... 5 min.
- Eosina..... 10 min.
- Alcohol 70°..... Enjuague.
- Alcohol 96°..... Enjuague.
- Alcohol 100°..... Enjuague.
- Xilol..... 10 minutos.

**e. Montaje:**

- Se escurre un poco el portaobjetos (sin quitarle todo el xilol).
- Fijarse de que lado del portaobjetos está la muestra.
- Se limpian los restos de parafina y tinte con un hisopo.
- Se traza una línea de resina debajo de la muestra y se monta el cubreobjetos, bajandolo poco a poco para sacar las burbujas de aire.

## 12. REFERENCIAS

- Alvarez T. y Mayo-Aceves E. 1993. Contribución al conocimiento de los hábitos alimenticios del ratón de los volcanes, *Neotomodon alstoni* (Merriam, 1898). *Acta Zoológica Mexicana*. 59: 1-51.
- Areco R.B. y Ryan K.J. 1967. Conversion of androst-4-ene-3.17-dione-4-<sup>14</sup>C to oestrogens by subcellular fractions of the human corpus luteum of the normal cycle. *Acta Endocrinologica*. 56: 225-230.
- Aron C. 1974. "Olfactory stimuli and their role in the regulation of oestrous cycle duration and sexual receptivity in the rat". En: Olfaction and taste V. D.A. Denton and J.P. Coghlan (eds.) Academic Press. E.U.A. pp 397-402.
- Ayala-Guerrero F., Vargas-Reyna L., Ramos J.I. y Mexicano G. 1998. Sleep patterns of the volcano mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*). *Physiology and Behavior*. 64(4): 577-580.
- Barraclough C.A. 1973. "Sex steroid regulation of reproductive neuroendocrine processes". En: Handbook of Physiology. Secc 7 Vol II. R. O. Greep (ed.). American Physiological Society. E.U.A. pp. 29-56.
- Björntorp P., Brodoff B.N. 1992. Obesity. J. B. Lippincott, cop. E.U.A. pp. 67-81.
- Bloom W. y Fawcett D.W. 1975. A textbook of histology. W. B. Saunders company. E.U.A.
- Bollheimer L.C., Skelly R.H., Chester M.W., McGarry J.D. y Rhodes C.J. 1998. Chronic exposure to free fatty acid reduces pancreatic beta cell insulin content by increasing basal insulin secretion that is not compensated for by a corresponding increase in proinsulin biosíntesis translation. *Journal of Clinical Investigation*. 101: 1094-1101.
- Branson R., Potoczna N., Kral J.G., Lentes K.U., Hoehe M.R. y Horber F.F. 2003. Binge eating as a major phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *New England Journal of Medicine*. 348: 1096-1103.
- Brewer C.J. y Balen A.H. 2010. The adverse effects of obesity on conception and implantation. *Journal of Reproduction*. 140: 347-364.
- Bronson F.H. 1989. Mammalian reproductive biology. University of Chicago Press. E.U.A. pp. 67-75.
- Bronson F.H., Dagg P.C. y Snell D.G. 1966. "Reproduction". En: Biology of Laboratory Mouse. E.L. Green (ed.). E.U.A. pp. 376.
- Bruunsgaard H. y Pedersen B.K. 2003. Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. 23:15-39.
- Butcher R.L. y Kirkpatrick-Keller D. 1984. Patterns of follicular growth during the four-day estrous cycle of the rat. *Biology of Reproduction*. 31: 280-286.
- Byskov A.G. 1975. The role of the rete ovarii and follicle formation in the cat, mink and ferret. *Journal of Reproduction and fertility*. 45: 210-219.

- Byskov A.G. 1978. The anatomy and ultrastructure of the rete system in the fetal mouse ovary. *Biology of the Reproduction*. 19: 720-735.
- Caligioni C. 2009. Assessing reproductive status/stages in mice. *Current Protocols in Neuroscience*. Appendix 41.
- Cargille C.M., Vaitukaitis J.L., Bermudez J.A. y Ross G.T. 1973. A differential effect of ethinyl estradiol on plasma FSH and LH related to time of administration in the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 36: 87-94.
- Carmel P.W., Araki S. y Ferin M. 1976. Pituitary stalk portal blood collection in rhesus monkeys: evidence for pulsatile release of gonadotropin-releasing-hormone (GnRH). *Endocrinology*. 99: 243-248.
- Carmona A. 2006. Obesidad, esteatosis hepática y parámetros sanguíneos en el ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni*) mantenido en cautiverio. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Carmona-Alcocer V., Fuentes-Granados C., Carmona-Castro A., Aguilar-González I., Cardenas-Vázquez R. Miranda-Anaya M. 2012. Obesity alters circadian behavior and metabolism differentially in sex dependent manner in mice *Neotomodon alstoni*. *Physiology and Behavior*. 105: 727-733.
- Ceballos G. y Oliva G. 2005. Los Mamíferos Silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Fondo de Cultura Económica. México. pp. 700-701.
- Channing C.P. 1969. Steroidogenesis and morphology of human ovarian cell types in tissue culture. *Journal of Endocrinology*. 45: 297-308.
- Chávez C.B. 2005. "Ratón de los volcanes". En: Los Mamíferos Silvestres de México. G. Ceballos y G. Oliva (coords.). FCE, CONABIO. México. pp. 699-701.
- Claesson L. 1954. Quantitative relationship between gonadotrophic stimulation and lipid changes in the interstitial gland of the rabbit ovary. *Acta Physiologica Scandinavica*. 31(113): 23-51.
- Cottam D.R., Mattar S.G., Barinas-Mitchell E., Kelley D.E. y Schauer P.R. 2004. The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obesity Surgery*. 14: 589-600.
- Darnton-Hill I., Nishida C., y James W.P. 2004. A life course approach to diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *Public Health Nutrition*. 7: 101-121.
- Davenport G.R. y Malette L.E. 1966. Some biochemical properties of rabbit ovarian hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocrinology*. 78: 672-678.
- Davis B.W. y Follansbee A.L. 1945. The mexican volcano mouse, *Neotomodon*. *Journal of Mammalogy*. 26(4): 401-411.
- Dong C., Sánchez L.E. y Price R.A. 2004. Relationship of obesity to depression: a family-based study. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 28: 790-795.



- Dorrington J.H., Moon Y.S. y Armstrong D.T. 1975 Estradiol-17 $\beta$  biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats; stimulations by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*. 97(5): 1328-1331.
- Engel L.L. 1973. "The biosynthesis of estrogens". En: Handbook of Physiology, Section 7, Voll II. R.O. Greep (ed.). American Physiological Society. E.U.A. pp. 467-483.
- Erickson G.F., Magoffin D.A., Dyer C.A. y Hofeditz C. 1985. The ovarian androgen producing cells: A review of structure/function relationships. *Endocrine Reviews*. 6(3): 371-399.
- Evans G.O. 1994. Removal of blood from laboratory mammals and birds. *Laboratory animals*. 27: 1-22.
- Fa J.E., Sanchez-Cordero V. y Mendez A. 1996. Interspecific agonistic behavior in small mammals in a mexican high-elevational grassland. *Journal of Zoology*. 239(2): 396-401.
- Farooqi I.S. y O'Rahilly S. 2004. Monogenic human obesity síndromes. *Recent Progress in Hormone Research*. 59: 409-424.
- Farooqi I.S., Keogh J.M., Yeo G.S., Lank E.J., Cheetham T. y O'Rahilly S. 2003. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *New England Journal of Medicine*. 348: 1085-1095.
- Felson D.T., Anderson J.J., Maimark A., Walker A.M. y Meenan R.F. 1988. Obesity and knee osteoarthritis: the Framingham study. *Annals of Internal Medicine*. 109: 18-24.
- Flint A.P.F. y Armstrong D.T. 1971. The compartment of non-esterified and esterified cholesterol in the superovulated rat ovary. *Biochemical Journal*. 123: 143-152.
- Foldvary-Schaefer N. y Falcone T. 2003. Catamenial Epilepsy, pathophysiology, diagnosis, and management. *Neurology*. 61: S2-S15.
- Franchimont P. 1971. "The regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone secretion in humans". En: Frontiers in Neuroendocrinology. L. Martini y W. F. Ganong (eds.) Oxford University Press. E.U.A. pp 331-358.
- Garaulet M. y Madrid J.A. 2010. Cronobiological aspects of nutrition, metabolic syndrome and obesity. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 62(9): 967-978.
- García-García E., De la Llata-Romero M., Kaufer-Horwitz M., Tusié-Luna M.T., Calzada-León R., Vázquez-Velázquez V., Baquera-Cervera S., Caballero-Romo A.J., Orozco L., Velázquez-Fernández D., Rosas-Peralta M., Barriguete-Meléndez A., Zacarias-Castillo R. y Sotelo-Morales J. 2008. La obesidad y el síndrome metabólico como problema de Salud Pública. *Salud Pública de México*. 50(6): 530-547.
- Gartner L.P. y Hiatt J.L. 2002. Texto Atlas de Histología. McGraw Hill Interamericana. E.U.A. pp: 439-449.
- Gavin J.R. III, Roth J., Neville D.M.Jr., de Metys P. y Buell D.N. 1974. Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations: a direct demonstration in cell culture. *Proceedings of the National Academy of Science*. 71(1): 84-88.

- Gnath G., Godehardt E., Frank-Hermann P., Friol K., Tigges J. y Freundl G. 2005. Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Human Reproduction*. 20(5): 1144-1147.
- Goodman R. L. 1978. The site of the positive feedback action of estradiol in the rat. *Endocrinology*. 102: 151-159.
- Granados H. y Hott J. 1989. Estudio sobre la biología del ratón de los volcanes (*N. a. alstoni*). XVI. Comparación de la capacidad reproductora de hembra silvestres en el laboratorio siguiendo 3 sistemas de apareamiento. *Archivos de Investigación Médica*. México. 20: 95-105.
- Granados H. y Luis J. 1987. Estudio sobre la biología del ratón de los volcanes (*N. a. alstoni*). XI. Investigación comparativa sobre la reproducción de las hembras silvestres en el laboratorio apareadas durante uno y dos ciclos estrales. *Archivos de Investigación Médica*. México. 18: 111-118.
- Granados H., Luis J., Carmona A., Espinosa G. y Arenas T. 1996. Aggressive behavior of male *Neotomodon alstoni* (Rodentia: Cricetidae). *Revista de Biología Tropical*. 44(2B): 861-865.
- Griff T.R. y Vande-Wiele R.L. 1974. "The Ovaries". En: Textbook of Endocrinology. H.R. Williams (ed.). Academy of Science. E.U.A.
- Gupta R.S. 2006. Structure-function similarity between vitamin D3 and estrogens: Scope for effective drug design for vitamin D3 and estrogen dependent disorders. *Drugs of the Future*. 31(1): 65.
- Gustafson D., Rithenberg E., Blennow K., Steen B. y Skoog I. 2003. An 18-year follow-up of overweight and risk of Alzheimer disease. *Archives of Internal Medicine*. 163:1524-1528.
- Gutiérrez J.P., Rivera-Dommarco J., Shamah-Levy T., Villalpando-Hernández S., Franco A., Cuevas-Nasu L., Romero-Martínez M. y Hernández-Ávila M. 2012. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Instituto Nacional de Salud Pública. México.
- Hadley M.E. 1996. Endocrinology. Prentice Hall. E.U.A.
- Hall P.F. y Koritz S.B. 1964. The conversion of cholesterol and 20 $\alpha$ -hydroxycholesterol to steroids by acetone powder of particles from bovine corpus luteum. *Biochemistry*. 3: 129-134.
- Halsted C.H. 1999. Obesity: effects on the liver and gastrointestinal system. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2: 425-429.
- Harman D. 1998 Aging: Phenomena and Theories. *Annals of the New York Academy of Science*. 854: 1-7.
- Heap R.B. e Illingworth D.V. 1977. "The mechanism of action of estrogens and progesterone". En: The ovary. Vol 3. Regulation of oogenesis and steroidogenesis. L. Zuckerman y B.J. Weir. (eds.) Academic Press. E.U.A. pp. 59-150.

- Heideman P.D. 2004. Top down approaches to the study of natural variation in complex physiological pathways using the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*) as a model. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*. 45: 4-13.
- Huang Z., Hankinson S.E., Colditz G.A., Stampfer M.J., Hunter D.J. Manson J.E., Hennekens C.H., Rosner B., Speizer F.E. y Willett W.C. 1997. Dual effects of weight and weight gain on breast cancer risk. *Archives of Internal Medicine*. 278(17): 1407-1411.
- Hubert H.B., Feinleib M., McNamara P.M. y Castelli W.P. 1983. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease; a 26-year follow-up of participants in the Framing-ham heart study. *Circulation*. 67: 968-977.
- Jameson J.L., Becker C.B., Lindell C.M. y Habener J.F. 1988. Human follicle-stimulating hormone  $\beta$ -subunit gene encodes multiple messenger ribonucleic acids. *Molecular Endocrinology*. 2(9): 806-815.
- Johnston E., Johnson S., McLeod P. y Johnston M. 2004. The relation of body mass index to depressive symptoms. *Canadian Journal of Public Health*. 95: 179-183.
- Kanaya A.M., Barrett-Connor E., Gildendorin G. y Yaffe K. 2004. Change in cognitive function by glucose tolerance status in older adults: a 4-year prospective study of the Rancho Bernardo study cohort. *Archives of Internal Medicine*. 164: 1327-1333.
- Kapia A. y Hsueh A. 1997. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annual Review of Physiology*. 59: 349-363.
- Kennedy A.J., Ellacott K.L., King V.L. y Harty A.H. 2010. Mouse models of the metabolic syndrome. *Disease Models and Mechanisms*. 3(3-4): 156-166.
- Kim J.K., Gimeno R.E., Higashimori T., Kim H.J., Choi H., Punreddy S., Mozell R.L., Tan G., Stricker-Kongrad A., Hirsch D.J., Fillmore J.J., Liu Z.X., Dong J., Cline G., Stahl A., Lodish H.F. y Shulman G.I. 2004. Inactivation of fatty acid transport proteína 1 prevents fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Jornal of Clinical Investigation*. 113(5): 756-763.
- Knobil E. 1974. On control of gonadotrophin secretion in the rhesus monkey. *Recent progress in hormone research*. 30: 1-46.
- Le Marchand Y., Loten E.G., Assimacopoulos-Jeannet F., Forgue M.E., Freychet P. y Jeanrenaud B. 1977. Effect of fasting and streptozotocin in the obese-hyperglycemic (ob/ob) mouse. Apparent lack of a direct relationship between insulin binding and insulin effects. *Diabetes*. 26: 582-590.
- Leavitt W.W. y Blaha G.C. 1970. Circulating progesterone levels in the golden hamster during the estrous cycle, pregnancy and lactation. *Biology of Reproduction*. 3(3): 353-368.
- Lew E.A. y Garfinkel L. 1979. Variations in mortality by weight among 750,000 men and women. *Journal of Chronic Diseases*. 32(8): 563-576.
- Leyendecker G., Wardlaw S. y Nocke W. 1972. "Steroid-induced positive feedback in the human female: new aspects on the control of ovulation". En: *Gonadotrophins*. B. B.

Saxena, C. G. Beling y H. M. Gandy (eds.). Wiley-International-Science. Reino Unido. pp.702-709.

- Li A.M., Chan D., Wong E., Yin J., Nelson E.A. y Fok T.F. 2003. The effects of obesity on pulmonary function. *Archives of Disease in Childhood*. 88: 361-363.
- Liang C.P., Hans S., Okamoto H., Carnemolla R., Tabas I., Accili D. y Tall A.R. 2004. Increased CD36 protein as a response to defective insulin signaling in macrophages. *Journal of Clinical Investigation*. 113(5): 764-773.
- Lisse K. y Schürenkämper P. 1968. Pruebas in vitro para la formación de hormonas esteroides en el cuerpo lúteo, estroma e hilio en los folículos del ovario humano normal. *Endocrinology*. 53(1): 78-92.
- List J.F. y Habener J.F. 2003. Defective melanocortin 4 receptors in hyperphagia and morbid obesity. *New England Journal of Medicine*. 348: 1160-1163.
- Luder E., Ehrlich R.I., Lou W.Y., Melnik T.A. y Kattan M. 2004. Body mass index and the risk of asthma in adults. *Respiratory Medicine*. 98: 29-37.
- Luis J., Arenas T., López G. y Granados H. 1993. Estudio sobre la biología del ratón de los volcanes (N. a. alstoni). XXVIII. Existencia de estro postparto. *Revista de la Facultad de Medicina*. UNAM. México. 36: 41-44.
- Luis J. y Granados H. 1990. Estudio sobre la biología del ratón de los volcanes (N. a. alstoni). XXI. Capacidad reproductora de hembras silvestres en 15 apareamientos sucesivos. *Archivos de Investigación Médica*. México. 21: 51-56.
- Luis J., Carmona A., Delgado F., Cervantes A. y Cárdenas R. 2000. Parental Behavior of the volcano mouse, *Neotomodon alstoni* (Rodentia: Muridae) in captivity. *Journal of Mammalogy*. 81(2): 600-605.
- Luis J., Cervantes F. A., Martínez M., Cardenas R., Delgado J. y Carmona A. 2004. Male influence on maternal behavior and offspring of captive volcano mice (*Neotomodon alstoni*) from Mexico. *Journal of Mammalogy*. 85(2): 268-272.
- Luna L.G. 1968. Manual of Histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. McGraw Hill. E.U.A.
- Maclure K.M., Hayes K.C., Colditz G.A., Stampfer M.J., Speizer F.E. y Willet W.C. 1989. Weight, diet, and the risk of symptomatic gallstones in middle-aged women. *The New England Journal of Medicine*. 321: 563-569.
- Manek N.J., Hart D., Spector T.D. y MacGregor A.J. 2003. The association of body mass index and osteoarthritis of the knee joint: an examination of genetic and environmental influences. *Arthritis and Rheumatism*. 48(4): 1024-1029.
- Marban S.L. y Roth J. 1996. "Transgenic hyperinsulinemia: a mouse model of insulin resistance and glucose intolerance without obesity". En: Lessons from animal diabetes VI. E. Shafrir (ed.). E.U.A. 201-224 pp.
- Marcondes F.K., Bianchi F.J. y Tanno A.P. 2002. Determination of the oestrus cycle phases of the rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*. 62: 604-614.

- Martensz N.D., Baird D.T., Scaramuzzi R.J. y Vanlook P. 1976. Androstenedione and the control of luteinizing hormone in the ewe during anoestrus. *Endocrinology*. 69: 227-237.
- Martensz N.D., Scaramuzzi R.J., Vanlook P. y Baird D.T. 1975. A physiological role for ovarian androstenedione. *Endocrinology*. 64: 46P-47P.
- Martín F.E. y Álvarez S. 1982. Crecimiento y desarrollo en el laboratorio de *Neotomodon alstoni* (Rodentia:Cricetidae). *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*. 26: 55-84.
- Masuzaki H. y Flier J.S. 2003. Tissue-specific glucocorticoid reactivating enzyme, 11 beta-hydroxysteroid deshydrogenase type 1 (11 beta-HSD1) a promising drug target for the treatment of metabolic syndrom. *Current Drug Targets of ImmuneEndocrine and Metabolism Disorders*. 3: 255-262.
- Mauvais-Jarvis F. 2011. Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis, and emerging targets for diabetes and obesity. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 22(1): 24-33.
- Mokdad A.H., Ford E.S., Bowman B.A., William H.D., Vinicor F., Bales V.S. y Marks J.S. 2003. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors. *Journal of the American Medical Association*. 289(1): 76-79.
- Morgan H.E. 1982. "Control hormonal de la función testicular". En: Bases fisiológicas de la práctica médica. R.J. Brobek y C.H. Rorer (eds.). Médica Panamericana. México.
- Nakai Y., Plant T.M., Hess D.L., Keogh E.J. y Knobil E. 1978. On the sites of the negative and positive feedback actions of estradiol in the control of gonadotrophin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology*. 102: 1008-1014.
- Nalbandov A.V. 1976. Reproductive physiology of mammals and birds: A comparative physiology of domestic and laboratory animals and man. Freeman. E.U.A.
- Nelson A.L. y Gambone J.C. 2010. "Congenital anomalies and benign conditions of the ovaries and fallopian tubes". En: Essentials of obstetrics and gynecology. N.F. Hacker, J.C. Gambone y C.J. Hobel. Saunders Elsevier (eds.). E.U.A.p. 247-249.
- Ogden C.L., Carrol M.D. y Flegal K.M. 2003. Epidemiologic trends in overweight and obesity. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 32: 741-760.
- Ortiz R. 1990. Estudio histológico de la madurez gonadal del ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni alstoni*) en el laboratorio (F1). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- O'Rahilly S. 2002. Leptin: Refining its role in humans by the clinical study of genetic disorders. *Nutrition Reviews*. 60: 30-34.
- O'Rahilly S., Farooqi I.S., Yeo G.S. y Challis B.G. 2003. Minireview: Human obesity-lessons from monogenic disorders. *Endocrinology*. 144: 3757-3764.
- O'Shea J. D. 1966. Histochemical observations on mucin secretion by surface epithelial structures in the canine ovary. *Journal of Morphology*. 120: 347-358.

- Pandey S., Pandey S., Maheshwari A. y Bhattacharya S. 2010. The impact of female obesity on the outcome of fertility treatment. *Journal of Human Reproductive Sciences*. 3(2): 62-67.
- Parkening T.A., Collins T.J. y Smith E.R. 1982. Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH and prolactin in aging C57BL/6 mice at various times of the estrous cycle. *Neurobiology of Aging*. 3: 31-35.
- Pasquali R., Pelusi C., Genghini S., Cacciari M. y Gambineri A. 2003. Obesity and reproductive disorders in women. *Human Reproduction Update*. 9(4): 359-372.
- Pedersen T. y Peters H. 1968. Proposal for a classification of oocytes and follicles in mouse ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*. 17: 555-557.
- Perseghin G., Petersen K. y Shulman G.I. 2003. Cellular mechanism of insulin resistance: potencial links with inflammation. *Internal Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 27(3): 6-11.
- Peters H. 1978. "Folliculogenesis in mammals". En: the vertebrate ovary. R.E. Jones (ed.). Plenum Press. E.U.A. pp. 121-144.
- Peters H. y McNatty K.P. 1980. The ovary: A correlation of structure and function in mammals. University of California Press. E.U.A. pp. 12-34, 44-57, 70-74, 98-104.
- Piegas L.S., Avezum A. Pereira J.C., Rossi-Neto J.M., Hoepfner C., Farran J.A., Ramos R.F., Timerman A. y Esteves J.P. 2003. Risk factors for myocardial infarction in Brazil. *American Heart Journal*. 146(2): 331-338.
- Plant T.M., Nakai Y., Belchetz P., Keogh E. y Knobil E. 1978. The stress of action of estradiol and phentolamine in the inhibition of the pulsatile, circhoral discharges of luteinizing hormone in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology*. 102: 1015-1025.
- Prieto B.M. 1988. Hábitos alimenticios de tres especies de roedores cricétidos. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Randle P.J., Garland P.B. Hales C.N. y Newsholme E.A. 1963. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes *miellitus*. *The Lancet*. 1: 785.789.
- Rask E., Olsson T., Soderberg S., Andrew R., Livingstones D.E.W., Johnson O. y Walker B.R. 2001. Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 86(3): 1418-1421.
- Reaven G.M. 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 37: 1595-1607.
- Reaven G.M. 2003. Insulin resistance/compensatory hyperinsulinemia, essential hypertension and cardiovascular disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 88: 2399-2403.
- Rexrode K.M., Hennekens C.H., Willett W.C., Colditz G.A., Stampfer M.J., Rich-Edwards J.W., Speizer F.E. y Manson J.E. 1997. A prospective study of body mass

index, weight change, and risk of stroke in women. *Journal of the American Medical Association*. 277(19): 1539-1545.

- Rogers P. y Webb G.P. 1980. Estimation of body fat in normal and obese mice. *British Journal of Nutrition*. 43: 83-86.
- Rojas M.E. 1984. Descripción del microhábitat de cinco especies de ratones en la Sierra del Ajusco. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Ross M.H., Romrell L.J. y Kaye C.I. 1997. Histología: Texto y atlas a color. Panamericana. E.U.A. pp. 1-17, 674-689.
- Ross G.T. y Vande-Wiele R.L. 1974. "The Ovaries". En: Textbook of Endocrinology. R.H. Williams (ed.) W.B. Saunders. Canadá. pp. 368-422.
- Roth J., Qiang X., Marban S.L., Redelt H. y Lowell C. 2004. The obesity pandemic: where have we been and where are we going?. *Obesity Research*. 12: 88S-101S.
- Ryan K.J. y Petro Z. 1966. Steroid biosynthesis by human ovarian granulosa and theca cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 26: 46-52.
- Ryan K.J. y Short R.V. 1965. Formation of estradiol by granulosa and theca cells of the equine ovarian follicle. *Endocrinology*. 76: 108-114.
- Ryan K.J. y Smith O.W. 1961. Biogenesis of steroids by the human ovary. III. Conversion of cholesterol-4-C<sup>14</sup> to estrone. *Journal of Biological Chemistry*. 236: 2204-2206.
- Ryan K.J. y Smith O.W. 1965. Biogenesis of steroid hormones in the human ovary. *Recent Progress in Hormone Research*. 21: 367-403.
- Sarkar D. K., Chiappa S. A., Fink G. y Sherwood N. M. 1976. Gonadotrophin releasing hormone surge in pro-oestrus rats. *Nature*. 264: 461-463.
- Savard K. 1968. "The biogenesis of steroids in the human ovary". En: The Ovary. H.C. Mack (ed.) Ch. C. Thomas. E.U.A. pp. 10-26.
- Savard K., Marsh J. y Rice B.F. 1965. Gonadotropins and ovarian steroidogenesis. *Recent Progress in Hormone Research*. 21: 285-365.
- Scaramuzzi R.J., Tillson S.A., Thorneycroft I.H. y Caldwell B.V. 1971. Action of exogenous progesterone and estrogen on behavioural estrus and luteinizing hormone levels in the ovariectomized ewe. *Endocrinology*. 88: 1184-1189.
- Seaman R.F., Moor R.M. y McIntosh J.E.A. 1974. Steroid hormone production by sheep ovarian follicles cultured *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 41: 143-158.
- Sherman B.M. y Korenman S.G. 1974. Measurement of serum LH, FSH, estradiol and progesterone in disorders of the human menstrual cycle: the inadequate luteal phase. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 39(1): 145-149.
- Shimizu H., Ross R.K., Bernstein L., Yatani R., Henderson B.E. y Mark T.M. 1991. Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *British Journal of Cancer*. 63: 963-966.

- Short R.V. 1961.  $\Delta^6$ -3 $\beta$ -hydroxysteroid in the follicular fluid of the mare. *Journal of Endocrinology*. 23: 277-283.
- Siiteri P.K. y McDonald P.C. 1973. "Role of extraglandular estrogen in human endocrinology". En: Handbook of Physiology, Section 7. Vol 2. Part. 1. R.O. Greep (ed.) America Physiological Society. E.U.A. pp. 615-630.
- Smith S.R. 1996. The endocrinology of obesity. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 25: 921-942.
- Somma M., Sandor T. y Lanthier A. 1969. Site of origin of androgen and estrogenic steroids in the normal human ovary. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 29: 457-466.
- Speakman J., Hambly C., Mitchell S. y Król E. 2008. Contribución de los modelos animales al estudio de la obesidad. *Laboratory Animals*. 42: 413-432.
- Stamler R., Stamler J., Riedlinger W.F., Algera G. y Roberts R.H. 1978. Weight and blood pressure. Findings in hypertension screening of 1 million americans. *Journal of the American Medical Association*. 240: 1607-1610.
- Stunkard A.J., Harris J.R., Pedersen N.L. y McClearn G.E. 1990. The body-mass index of twins who have been reared apart. *New England Journal of Medicine*. 322: 1483-1487.
- Stunkard A.J., Sorensen T.I., Hanis C., Teasdale T.W., Chakraborty R., Schull W. J. y Schulsinger F. 1986. An adoption study of human obesity. *New England Journal of Medicine*. 314(4): 192-198.
- Suckow M.A., Veisbroth S.H. y Franklin C.L. 2005. The laboratory rat. Academic Press. E.U.A. pp. 147-164.
- Sulimovici S. y Boyd G.S. 1967. Steroid hydroxylation and the cholesterol side-chain cleavage system in rat ovary. *Biochemistry Journal*. 103: 16p-17p.
- Sulimovici S. y Boyd G.S. 1969. The  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase of rat ovarian tissue. *European Journal of Biochemistry*. 7: 549-558.
- Tagatz G.E. y Gurbide E. 1973. "Hormone secretion by the normal human ovary". En: Handbook of Physiology, Section 7. Vol 2. Part. 1. R.O. Greep (ed.). America Physiological Society. E.U.A. pp. 603-613.
- Trayhurn P. 2005. The biology of obesity. *Proceedings of the Nutrition Society*. 64: 31-38.
- Tsai C.C. y Yen S S.C. 1971. The effect of ethinyl estradiol administration during early follicular phase of the cycle on gonadotrophin levels and ovarian function. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 33: 917-923.
- Unger R.H. y Orci L. 2002. Lipoapoptosis: its mechanism and its disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1585: 202-212.
- Van Der Steeg W.A., Holme I., Boekholdt S.M, Larsen M.L., Lindahl C., Stroes E.S., Tikkanen M.J., Wareham N.J., Faergeman O., Olson A.G., Pedersen T.R., Khaw K.T. y Kastelein J.J.P. 2008. High-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein



particle size, and apolipoprotein A1: Significance for cardiovascular risk the ideal and epic-Norfolk studies. *Journal of the American College of Cardiology*. 51(6): 634-642.

- Vgontzas A.N., Tan T.L., Bixler E.O., Martin L.F., Shubert D. y Kales A. 1994. Sleep apnea and sleep disruption in obese patients. *Archives of Internal Medicine*. 154(15): 1705.
- Villalpando I., Villafan-Monroy H., Aguayo D., Zepeda-Rodrigue A., Granados-Espitia H. y Chavez-Olivares A. 2000. Ultrastructure and motility of the caudal epididymis spermatozoa from the volcano mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*; Merriam, 1898). *Journal of Experimental Zoology*. 287(4): 316-326.
- Villalpando I., Ramirez M., Zepeda-Rodriguez A., Carmona-Castro A., Cardenas-Vazquez R. y Vilchis F. 2005. The Harderian gland of the mexican volcano mouse *Neotomodon alstoni alstoni* (Merriam, 1898): A morphological and biochemical approach. *Journal of Experimental Zoology*. 303A(1): 13-25.
- Wagenen G. & Simpson M.E. 1965. Embryology of the ovary and testis in *Homo sapiens* and *Macaca mulatta*. Yale University Press. Reino Unido. pp. 678-679.
- Walker S.P., Rimm E.B., Ascheriio A., Kawachi I., Stampfer M.J. y Willett W.C. 1996. Body size and fat distribution as predictors of stroke among U.S. men. *American Journal of Epidemiology*. 144: 1143-1150.
- Walmer D.K., Wrona M.A., Hughes C.L. y Nelson K.G. 1992. Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology*. 131: 1458-1466.
- Wanless I.R., Lentz J.S. 1990. Fatty liver hepatitis (Steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology*. 12: 1106-1110.
- Weisberg S.P., McCann D., Desai M., Rosenbaum M., Leible R.L. y Ferrante A.W. Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*. 112: 1796-1808.
- Winiwarter H. y Sainmont G. 1909. Nouvelles recherches sur l'ovogenèse et l'organogenèse de l'ovaire des mammifères. *Archives Biologiques (Paris et Liège)*. 17: 33-199.
- World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation. World Health Organization. 2003. 916:1-149.
- Wotiz H.H., Davis J.W., Lemon H.M. y Gut M. 1956. Studies in steroid metabolism. V. The conversion of testosterone-4-C<sup>14</sup> to estrogens by human ovarian tissue. *Journal of Biological Chemistry*. 222: 487-495.
- Xu H., Barnes G.T., Yang Q., Tan G., Yang D., Chou C.J., Sole J., Nichols A., Ross J.S., Tartaglia L.A. y Chen H. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 112: 1821-1830.

- Yang G.H., Zhou L.N., Huang Z.J. y Chen A.P. 2004. The trend and geographic distribution of suicide in chinese population. *Chinese Journal of Preventive Medicine*. 34: 206-208.
- Yen S.S.C., Lasley B.L., Wang C.F., Leblanc H. y Siler T.M. 1975. The operating characteristics of the hypothalamic-pituitary system during the menstrual cycle and observations of biological action of somatostatin. *Recent Progress in Hormone Research*. 31: 321-363.
- YoungLai E.V. 1973. Biotransformation of pregnenolone and progesterone by rabbit ovarian follicles and corpora lutea. *Acta Endocrinologica*. 74: 775-782.
- Zheng Z., Xian L., Shiva P.D.S.K., Jing Z. y Haifei S. 2013. Central expression and anorectic effect of brain-derived neurotrophic factor are regulated by circulating estradiol levels. *Hormones and Behaviour*. 63(3): 533-542.
- Zick Y. 2003. Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling. *Internal Jornal of Obesity and Related Metabilsn Disorders*. 27: 56-60.