



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**INTERRUPCIÓN PROGRESIVA DE LA
FOLICULOGÉNESIS EN OVARIO DE RATA CON
SÍNDROME DIABÉTICO INDUCIDO CON
ESTREPTOZOTOCINA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

ROSA NURIA GALINDO SOLANO



DIRECTOR DE TESIS:

**M. en C. DANIEL DÍAZ ESPINOSA DE LOS
MONTEROS**

2015

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

1. Datos del alumno
Galindo
Solano
Rosa Nuria
55 16 50 73 70
Universidad Nacional Autónoma de México
Faculta de Ciencias
Biología
308209701

2. Datos del asesor
Díaz
Espinosa de los Monteros
Daniel

3. Datos del sinodal 1
Fiordelisio
Coll
Tatiana

4. Datos del sinodal 2
Gutiérrez
Ospina
Gabriel

5. Datos del sinodal 3
Perera
Marín
Gerardo

6. Datos del sinodal 4
Nambo
Venegas
Rafael

7. Datos de la tesis
Interrupción progresiva de la foliculogénesis en ovario de
rata con síndrome diabético inducido con estreptozotocina
37 p.
2015

RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES.....	5
1. <i>Características e integración clínica del síndrome diabético.....</i>	<i>5</i>
2. <i>Alteraciones reproductivas asociadas al síndrome diabético.....</i>	<i>6</i>
3. <i>Implicación de la foliculogénesis en la generación de un estado de disfunción ovárica diabética.....</i>	<i>8</i>
4. <i>Uso de modelos experimentales de diabetes en la búsqueda de sustratos fisiopatológicos de la disfunción ovárica diabética.....</i>	<i>8</i>
3. JUSTIFICACIÓN.....	12
4. HIPÓTESIS	12
5. OBJETIVOS.....	12
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
1. <i>Diseño experimental y animales.....</i>	<i>13</i>
2. <i>Evaluación histológica del ovario y cuantificación de la población folicular.....</i>	<i>14</i>
3. <i>Evaluación de la actividad cíclica del ovario.....</i>	<i>14</i>
4. <i>Determinación de la concentración de hormonas esteroides en suero.....</i>	<i>15</i>
5. <i>Análisis estadístico.....</i>	<i>15</i>
6. RESULTADOS.....	17
1. <i>El tratamiento con estreptozotocina induce síndrome diabético.....</i>	<i>17</i>
2. <i>El síndrome diabético altera las características histológicas del ovario e induce atresia folicular.....</i>	<i>19</i>
3. <i>La condición diabética altera progresivamente el proceso de crecimiento folicular y reduce el número de folículos sanos.....</i>	<i>20</i>
4. <i>En respuesta a los cambios en la foliculogénesis se altera la función del ovario.....</i>	<i>26</i>
7. DISCUSIÓN	30
8. CONCLUSIONES	32
9. LITERATURA CONSULTADA	32

RESUMEN

El síndrome diabético (SD) provoca una disfunción ovárica que se caracteriza por anovulaciones, una baja producción de esteroides y alteraciones en el ciclo menstrual. Dichas características sugieren un posible daño en la foliculogénesis que permite mantener la capacidad reproductiva. Con el objetivo de evaluar si la disfunción ovárica diabética se asocia a fallas en la foliculogénesis y si estas alteran la función del ovario, en el presente trabajo utilizamos un modelo de SD en ratas tratadas con estreptozotocina (STZ). Las ratas tratadas se evaluaron y compararon a los 7, 14 y 21 días post-tratamiento con su respectivo grupo control. Se contaron las poblaciones foliculares y se describieron los cambios histológicos en el ovario. Además, para evaluar la asociación entre las fallas en la foliculogénesis y la generación de cambios en la función ovárica, se contó la cantidad de cuerpos lúteos recién formados, se determinó la concentración de esteroides en suero y se evaluó la actividad cíclica ovárica. El tratamiento con STZ produjo un SD caracterizado por hiperglucemia, pérdida de peso corporal, polidipsia y polifagia. En comparación al grupo control, en las ratas diabéticas aumentó la incidencia de atresia folicular y se interrumpió progresivamente la foliculogénesis, generando en consecuencia la disminución de la población folicular. Además, se presentó un incremento en la frecuencia de los folículos primordiales y la concomitante reducción de los folículos antrales, particularmente los preovulatorios. En consecuencia a estas alteraciones, se observó una reducción gradual de la cantidad de cuerpos lúteos de reciente formación, así como la disminución de esteroides y la pérdida de la actividad cíclica ovárica. En conclusión, el SD generó cambios en los patrones normales de crecimiento folicular, provocando con ello alteraciones en la función de la gónada.

Palabras clave: Síndrome diabético, disfunción diabética ovárica, foliculogénesis, atresia folicular, hormonas esteroides, ciclo estral.

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes es una enfermedad crónico-degenerativa que afecta a más de 347 millones de personas alrededor del mundo (1). Existen dos formas principales de diabetes: la tipo I y la tipo II, sin embargo, esta patología también puede manifestarse durante el embarazo, en estados de toxicidad química, por trastornos genéticos, endocrinopatías, trastornos del receptor de la insulina y/o por asociación con alguna enfermedad pancreática exocrina (2). No obstante, sin considerar cual sea el origen etiológico de la diabetes, esta patología mantiene síntomas clínicos y humorales comunes, los cuales en conjunto integran al síndrome diabético (SD) (3).

El SD es un desorden metabólico de etiología múltiple que se caracteriza por un incremento crónico de la concentración de glucosa en sangre. Esta condición patológica se produce, fundamentalmente, por la insuficiencia insulínica que se asocia a un déficit en la producción, secreción y/o resistencia a la hormona insulina (4). Debido a que la insulina se encarga de incorporar la glucosa al citoplasma celular en donde es consumida o almacenada, el uso ineficiente de la glucosa ocasiona hiperglucemia, la cual se considera el elemento humoral que define a la diabetes. En consecuencia al desarrollo del SD se produce un encadenamiento de hechos patológicos que se relacionan con un trastorno metabólico y que en conjunto se integra clínicamente por la triada sintomática polidipsia, poliuria y polifagia las cuales son seguidas, en su etapa final, por la pérdida de peso corporal (2, 3).

El SD induce fallas en la función de diversos órganos y sistemas (2), dentro de los cuales destacan los daños provocados al sistema reproductor. En este sentido, se conoce una serie de afecciones sexuales y reproductivas que se presentan en hombres y mujeres que padecen diabetes (5-9). Sin embargo, las mujeres resultan particularmente afectadas por ésta patología, ya que presentan deficiencias reproductivas en diferentes etapas de su vida; ya sea en el comienzo de la pubertad, durante su vida fértil o en la llegada de la menopausia (10-12). Dichas alteraciones integran la disfunción reproductiva diabética que surge por el efecto combinado de la insuficiencia insulínica y la hiperglucemia que provoca el daño funcional a diferentes niveles del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (13-15).

Uno de los elementos del eje reproductor que resulta sensiblemente afectado por la condición diabética es la gónada femenina (13); el ovario, el cual es fundamental para mantener la fisiología reproductiva mediante los procesos cíclicos de crecimiento/regresión de sus folículos y cuerpos lúteos (16). Dichas estructuras intraováricas desempeñan un papel crucial dentro de la fisiología reproductiva al producir los gametos femeninos, secretar hormonas esteroides que regulan el ciclo menstrual, además de iniciar y mantener las condiciones propicias para la gestación (17). Es por ello que dada la

importancia del ovario dentro del proceso reproductivo, no resulta sorprendente que en consecuencia a la diabetes existan alteraciones gonadales, las cuales se traducen en un estado de disfunción ovárica que compromete la capacidad reproductiva femenina (7, 13, 14, 18).

En las mujeres diabéticas la disfunción ovárica se caracteriza por diversas alteraciones, entre las que destacan la reducción en la producción de hormonas esteroides, la presencia de anovulaciones, los ciclos foliculares largos y las modificaciones en el ciclo menstrual (13, 14, 19-25). La integración de estos signos de daño en la fisiología del ovario sugieren que parte del déficit reproductivo diabético se puede asociar a fallas en la foliculogénesis. Lo anterior debido a que la foliculogénesis es un proceso cíclico que mantiene la función reproductiva a través del crecimiento de los folículos, asegurando con ello la ovulación y la concomitante producción de las hormonas esteroides que regulan el sistema reproductivo a nivel neuroendocrino (13-15). Es por ello que la disrupción en los patrones normales y cíclicos de crecimiento folicular podrían afectar tanto la formación de folículos preovulatorios, así como la esteroidogénesis que en ellos se realiza, siendo estos cambios reflejados en la pérdida de la ciclicidad ovárica y la consecuente modificación de los ciclos menstruales.

No obstante, el conocimiento acerca del efecto que tiene la hiperglucemia sobre la foliculogénesis es limitado, debido principalmente a que la mayoría de los resultados provienen de estudios clínicos (13). En consecuencia, la búsqueda de mecanismos que permitan incrementar nuestra comprensión sobre el efecto negativo de la diabetes a nivel reproductivo es escasa. Para superar dichas limitantes se han planteado diversos modelos experimentales de diabetes, principalmente con el uso de murinos (26, 27). Sin embargo, el problema se ha abordado con una elevada heterogeneidad de condiciones experimentales (28-36), las cuales han provocado una visión fragmentada de la disfunción ovárica, en la cual se evalúan de forma aislada las unidades y procesos que permiten la continuidad de la función ovárica. Lo anterior trae consigo una carencia de resultados concluyentes que asocien el efecto de la diabetes sobre la foliculogénesis y las alteraciones secundarias en la función ovárica que surgen en respuesta al cambio en el patrón de crecimiento folicular.

Tomando esto en cuenta, en el presente trabajo planteamos abordar el problema mediante un modelo experimental de SD en ratas tratadas con estreptozotocina. A partir de dicho modelo evaluamos de forma sistemática e integral los cambios en el patrón de crecimiento folicular y en la función ovárica que depende del correcto desarrollo de la foliculogénesis. Además, determinamos las características histológicas del ovario y sus folículos en las condiciones diabéticas y control. También comparamos las poblaciones foliculares durante las etapas finales de crecimiento y por último, evaluamos la asociación entre la alteración de la foliculogénesis y los cambios funcionales del ovario: actividad cíclica y producción de estradiol y progesterona.

2. ANTECEDENTES

1. *Características e integración clínica del síndrome diabético*

La diabetes es considerada una epidemia mundial, se estima que en mundo hay más de 347 millones de personas que padecen esta enfermedad (1). La Organización Mundial de la Salud registró en 2012, 1.5 millones de muertes en el mundo a causa de la diabetes y estima que en 2030 las defunciones por esta patología aumentarán más de un 50%, por lo cual será la séptima causa de mortalidad. La diabetes se clasifica con base en las alteraciones fisiológicas que la provocaron. Existen dos tipos principales de diabetes: la tipo I y la tipo II. La primera se caracteriza por una condición hiperglucémica ocasionada por carencia absoluta de insulina. Mientras que la diabetes tipo II se caracteriza por una condición hiperglucemia causada por un defecto en la secreción de insulina, por lo común acompañado de resistencia a esta hormona. Sin embargo existen otras condiciones, menos comunes, en que la diabetes puede manifestarse: durante el embarazo, en estados de toxicidad química, por trastornos genéticos, endocrinopatías, trastornos del receptor de la insulina y/o por asociación con alguna enfermedad pancreática exocrina (2). Sin considerar el origen etiológico de la diabetes, esta patología se caracteriza por signos clínicos y humorales, los cuales son agrupados en una sola patología denominada SD.

El SD es una enfermedad metabólica que se asocia a distintos factores etiopatogénicos. Es integrado por signos clínicos y humorales que surgen en consecuencia a los trastornos metabólicos en la producción y el mantenimiento homeostático de glúcidos, lípidos y proteínas. La alteración humoral que caracteriza al SD es la hiperglucemia crónica, la cual es asociada a la deficiencia y/o resistencia insulínica (4). Tal deficiencia en la producción/uso de la insulina conlleva a la utilización insuficiente de la glucosa como material energético por parte de las células y en consecuencia, a un estado de hiperglucemia que sobrepasa el umbral del epitelio renal para su reabsorción, lo que provoca la glucosuria que es eliminación de glucosa mediante la orina.

En consecuencia al exceso de glucosa eliminada, el organismo requiere un aumento del líquido de disolución, de forma que incrementa la cantidad de orina y se presenta el signo clínico denominado poliuria. La polidipsia, es otro signo clínico, y se caracteriza por el aumento en el consumo de líquidos, el cual es proporcional a la pérdida de agua asociada a la poliuria (3). Aunado a estos síntomas y en consecuencia a la reducción en la incorporación de glucosa en los tejidos, se produce un desequilibrio químico y calórico que genera el consumo de las reservas de lípidos y proteínas, aumentando con ello el apetito y generando el estado conocido como polifagia (3). En conjunto, los síntomas clínicos poliuria, polidipsia y polifagia constituyen la tríada sintomática clásica que integra clínicamente al SD.

Además, en etapas avanzadas el SD se caracteriza por la pérdida considerable de peso, la cual es el reflejo de la intensa gluconeogénesis que se produce a partir de proteínas tisulares y de la movilización excesiva de grasas que se incrementa de forma proporcional a la pérdida de la capacidad del organismo para utilizar de forma eficiente la glucosa.

2. *Alteraciones reproductivas asociadas al síndrome diabético*

El SD genera diversas alteraciones metabólicas que comprometen la función de diferentes órganos y sistemas, dentro de los que destaca el sistema reproductor. Los daños en dicho sistema afectan la capacidad sexual de hombres y mujeres (5, 7-9, 37). En este sentido, se ha documentado una notable disminución en el deseo sexual (libido), desórdenes orgásmicos y excitatorios, así como disfunción eréctil en hombres diabéticos (5, 24). Mientras que la disfunción sexual en la mujer diabética se caracteriza por la pérdida de libido y del interés sexual, problemas en la fase excitatoria, la carencia de lubricación vaginal y anorgasmia (5, 8, 33, 37-39).

Las alteraciones provocadas por la condición diabética no solo afectan la capacidad sexual de hombres y mujeres, sino que también compromete su capacidad reproductiva, razón por la cual se han realizado diversos estudios sobre la repercusión de la diabetes en la capacidad reproductiva. En los hombres con dicha patología se han documentado diversas alteraciones testiculares que conllevan a modificaciones en la espermatogénesis, las cuales se asocian a la modificación en la producción y secreción hormonal (24, 40, 41). No obstante, el caso de las alteraciones reproductivas femeninas es diferente al de los hombres, debido a que hasta la fecha se desconocen la mayoría de los mecanismos que soportan las alteraciones en la capacidad reproductiva femenina. Sin embargo, en términos generales se ha planteado una posible alteración del eje reproductor femenino. Lo anterior debido al descontrol metabólico que caracteriza a la diabetes y que repercute en la actividad de los elementos que conforman al eje hipotálamo-hipófisis-ovario (9, 13-15).

El eje hipotálamo-hipófisis-ovario mantiene la regulación neuroendocrina, la cual comienza con la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por parte del hipotálamo e influye directamente a nivel hipofisiario en la secreción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), las cuales permiten la función del ovario (15). Aunados a estos elementos, el eje reproductor es regulado por co-gonadotropinas como la insulina, las cuales complementan el mantenimiento neuroendocrino del organismo (13, 42).

La insulina es una hormona producida por las células β pancreáticas y cuenta con receptores periféricos en el eje reproductor femenino. Particularmente, esta hormona estimula la actividad

secretora de GnRH en el hipotálamo. Mientras que en el ovario la insulina incrementa la actividad de las enzimas esteroidogénicas, promoviendo la producción de hormonas esteroideas (13, 42). A nivel folicular se ha observado que la insulina participa en el desarrollo folicular mediante la inhibición de la hormona anti-Mulleriana (AMH por sus siglas en inglés) y la supresión de la apoptosis en los folículos (43, 44) (Figura 1). Sin embargo, dicha regulación es afectada por la condición diabética. Lo anterior debido a la hiperglucemia y/o resistencia insulínica que caracterizan a la diabetes, y que en conjunto alteran la regulación neuroendocrina del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (9, 13-15). Esta alteración conlleva a una disminución en la capacidad reproductiva, provocada por la alteración puntual de cada uno de los elementos del eje (15). En el hipotálamo se ha sugerido un estado de intoxicación generada por la hiperglucemia crónica- Dicha intoxicación genera la disminución de la producción de GnRH, la cual afecta directamente en la actividad secretora de la hipófisis mediante el decaimiento de LH y FSH (13, 14) comprometiendo la actividad fisiológica del ovario.

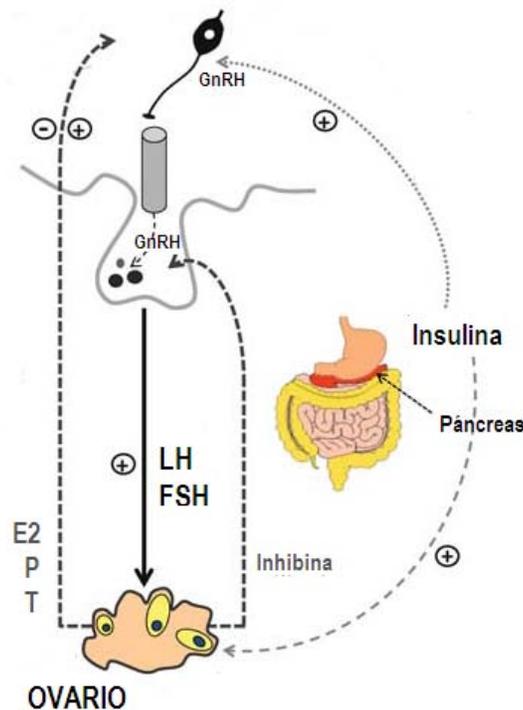


Figura 1. Regulación neuroendocrina del eje reproductor femenino. El hipotálamo secreta GnRH el cual permite la síntesis/liberación de LH y FSH en la hipófisis. En conjunto estas últimas hormonas regulan el crecimiento y regresión de las estructuras intraováricas. Mediante dichos procesos los folículos y cuerpos lúteos producen estradiol (E2) y progesterona (P), respectivamente. Dichas hormonas en conjunto con las inhibinas regulan de forma positiva o negativa la actividad del eje reproductor y la actividad cíclica ovárica. Aunados a dichos elementos, el eje reproductor femenino es también regulado por co-gonadotropinas, tal es el caso de la insulina, la cual es producida en el páncreas y mediante receptores periféricos en el hipotálamo modifica la secreción de GnRH, mientras que en el ovario permite la producción esteroidogénica. Figura modificada de Codner et al. (13).

3. Implicación de la foliculogénesis en la generación de un estado de disfunción ovárica diabética

La gónada femenina mantiene la capacidad reproductiva mediante procesos periódicos de crecimiento y regresión de sus folículos y cuerpos lúteos. Dichas estructuras son responsables de la producción de gametos, de iniciar y mantener la gestación, así como de la síntesis de hormonas esteroides (progesterona, testosterona y estradiol) que regulan el ciclo menstrual (17, 45, 46). Sin embargo, a consecuencia del SD, el ovario presenta diversas alteraciones que conllevan a un estado de disfunción ovárica que limitan la capacidad reproductiva en la mujer (7, 13, 14, 18).

Particularmente, se ha observado que las mujeres diabéticas con pobre o nulo control metabólico se caracterizan por un estado de hipogonadismo (13). Adicionalmente, la literatura señala la ausencia de ovulaciones y el decline prematuro de la reserva folicular del ovario, además de fases foliculares largas y la alteración en el ciclo menstrual que se manifiestan en diferentes etapas en la vida de las mujeres diabéticas (7, 9, 11). En la pubertad se ha observado un retraso en la menarquía, durante la edad fértil irregularidad en los ciclos menstruales y amenorrea, mientras que en mujeres mayores se ha documentado menopausia anticipada (12, 20, 25, 47, 48). Con respecto a la capacidad del ovario para secretar hormonas, se han reportado alteraciones en la esteroidogénesis (20), por ejemplo en la regulación positiva en los efectos del estradiol. En consecuencia a las alteraciones antes mencionadas, las mujeres diabéticas presentan embarazos inusuales y un decremento de la fertilidad (20).

En conjunto, dichas alteraciones señalan un posible daño en la foliculogénesis, esto debido a que en condiciones fisiológicas la foliculogénesis mantiene la capacidad reproductiva mediante el desarrollo de folículos que culminan en la ovulación, así como la síntesis de hormonas esteroides que regulan al sistema reproductor a nivel neuroendocrino. En consecuencia, es posible pensar que la disrupción de los patrones cíclicos de desarrollo folicular conllevan a la pérdida o disminución de folículos preovulatorios que se refleja en anovulaciones, así como a una reducida producción esteroidogénica que puede explicar parte de las anomalías en el ciclo menstrual o bien, la presencia de hipogonadismo.

4. Uso de modelos experimentales de diabetes en la búsqueda de sustratos fisiopatológicos de la disfunción ovárica diabética

A pesar de los efectos adversos que genera la diabetes en el ovario y que sugieren una posible alteración de la foliculogénesis, no existe evidencia clínica que demuestre dicha asociación. Lo anterior puede ser a causa de las dificultades y limitantes que presenta el estudio de los casos clínicos.

Por ello, se ha propuesto el uso de modelos experimentales con murinos en el afán por comprender parte de los mecanismos que conllevan a la disfunción ovárica de la mujer diabética (13, 26). En este sentido, los modelos murinos resultan de especial utilidad pues son más económicos y de mayor accesibilidad que los estudios clínicos. Aunadas a estas características, los roedores presentan ciclos reproductivos cortos y de fácil observación, es posible caracterizar los cambios reproductivos que ocurren bajo la condición diabética (49, 50). No obstante, los modelos de diabetes presentan una elevada heterogeneidad de condiciones experimentales como son: el fármaco, la dosis y la vía de administración empleados, el tiempo de exposición, la severidad de la enfermedad, así como la cepa, edad y estado fisiológico de los animales (26).

En el Cuadro 1 se resume la información de una selección de estudios que evalúan diferentes características de la disfunción ovárica diabética y de las consecuencias de dicha alteración. La integración de la información presentada en el Cuadro 1 resalta lo contrastante, no sólo de las condiciones experimentales para abordar el problema de la disfunción ovárica, sino de la manera en la que se comparan e integran los resultados de investigaciones tan diferentes. En consecuencia, en la actualidad tenemos una visión fragmentada de la disfunción ovárica, lo cual implica un abordaje experimental independiente entre las posibles alteraciones histológicas, morfológicas y funcionales que pudieran estar afectando al mismo tiempo a las unidades funcionales del ovario, en nuestro caso: el folículo. Lo anterior ha traído como resultado la carencia de estudios concluyentes que asocien el efecto de la diabetes sobre la foliculogénesis y las alteraciones secundarias en la función ovárica que surgen en respuesta al cambio en el patrón de crecimiento folicular.

Cuadro 1. Disfunción reproductiva evaluada en modelos murinos de diabetes

Estudio ^a	Modelo animal ^b	Tratamiento ^c	Fenotipo ^d / confirmación de diabetes	Momento de inducción / tiempo de exposición	Actividad reproductiva tejido o estructura evaluada	Variables estudiadas	Respuesta obtenida
Actividad cíclica / capacidad reproductiva							
Sinden (1949)	- Ratas Wistar de 12-16 semanas	- 1 dosis de 50 mg/kg i.v. aloxano	- Diabetes severa / ND ^e	- Antes del apareamiento / 22-24 días	- Ciclo estral, fertilidad, características de la descendencia	- Actividad cíclica, tasa de preñez, número de crías y peso de las crías	- Aparición retardada del estro, deterioro del rendimiento reproductivo, reducción del número de crías
Castellano (2009)	- Ratas Wistar adultas	- 2 dosis consecutivas de 50 mg/kg de STZ	- Diabetes severa / glucemia > 450 mg/l	- ND / 28 días	- Ciclo estral, ovario	- Niveles de LH, actividad del ciclo estral, peso del ovario	- Anestro persistente, decremento de LH basal, reducción de peso del ovario
Blades (1985)	- Ratas Wistar Porton adultas	- 1 dosis de 40 u 80 mg/kg i.p. STZ	- Diabetes severa / glucosuria > 14 mM/l	- Diferentes fases del ciclo estral/ 14-56 días	- Ciclo estral, ovario	- Actividad cíclica, niveles de LH, ovulación	- Pérdida de la actividad cíclica, inhibición de la ovulación, decremento en la respuesta de LH
Spadotto (2002)	- Ratas Wistar de 13 semanas	- 1 dosis de 40 mg/kg i.v. STZ	- Diabetes moderada/ glucemia > 200 mg/l	- 8 días antes del apareamiento / 21 días	- Rendimiento reproductivo de la descendencia	- Fisiología reproductiva de la descendencia	- Retraso del inicio de la pubertad y de la aparición del primer estro, menor peso del ovario
Función ovárica							
Garris (1988)	- Ratas adultas Sprague-Dawley	- 1 dosis de 40 mg/kg i.v. Aloxano	- Diabetes severa / ND	- 1 día de pseudopreñez / 4-9 días	- Ovario, CL, útero	- Peso del útero y flujo sanguíneo, tejido decidual, concentración de progesterona	- Flujo de sangre limitado, baja producción de progesterona, atrofia uterina y pobre decidualization endometrial
Chabrolle (2008)	- Ratas Wistar de 8 semanas	- 1 dosis de 55 mg/kg i.p. STZ	- Diabetes severa / glucemia > 3 g/l	- ND / 7 días	- Ovario, cultivo de células de la granulosa	- Concentración de progesterona y estradiol, expresión de enzimas esteroideogénicas	- Bajos niveles de progesterona y estradiol, esteroidogénesis reducida
Vomachka (1982)	- Ratas Holtzman de 4 semanas	- 1 dosis de 60 mg/kg i.v. STZ	- Diabetes severa / glucemia dos veces superior al control	- 3- 4 días antes del tratamiento con eCG para inducir crecimiento gonadal/ 3-4 días	- Ovario, CL, útero	- Secreción de LH, concentración de estradiol y progesterona, peso del ovario, número de ovocitos ovulados	- Baja producción de esteroides, sin efecto en el peso de la gónada y menor tasa de ovulación

Continúa

Continuación Cuadro 1. Disfunción reproductiva evaluada en modelos murinos de diabetes

Estudio ^a	Modelo animal ^b	Tratamiento ^c	Fenotipo ^d / confirmación de diabetes	Momento de inducción / tiempo de exposición	Actividad reproductiva tejido o estructura evaluada	VARIABLES estudiadas	Respuesta obtenida
Folículos/ovocito							
Diamond (1989)	- Ratonos B ₆ C ₃ F ₁ de 8-10 semanas	- 1 dosis de 330 mg/kg i.p. STZ o 1 dosis de 300 mg/kg i.p. Alloxano	- Diabetes moderada / glucemia > 180 mg/l	- 4 días antes del tratamiento con eCG para inducir superovulación / 5 días	- Folículos y ovocitos	- Vesícula germinal folicular, maduración del ovocito, desarrollo de cigotos	- Menor número de complejos ovocito cumulus, incremento en la ruptura de la vesícula germinal folicular, retraso en la maduración del ovocito
Colton (2002)	- Ratonos C57BL/6J x SJL/J F1 de 3 semanas	- 1 dosis de 200 mg/kg i.p. STZ	- Diabetes severa / glucemia > 300 mg/l	- 3 días antes del tratamiento con eCG para inducir superovulación / 5-7 días	- Ovocitos	- Maduración del ovocito, tasa ovulatoria	- Maduración alterada de ovocitos, ovocito detenido en fase meiótica, decremento en la tasa de ovulación
Cheng (2011)	- Ratonos C57BL/6 de 6-8 semanas	- 1 dosis de 180-220 mg/kg i.p. STZ	- Diabetes severa / glucemia > 16.7 mM	- 4-9 días antes del tratamiento con eCG para inducir superovulación / 7-12 días	- Ovocitos	- Número de ovocitos obtenidos, activación del ovocito, propagación cromosómica	- Disminución de la ovulación, aumento de defectos del huso meiótico y de la desalinación cromosómica, incremento de la activación partenogenética de ovocitos
Chang (2005)	- Ratonos C57BL/6JXSL/J F1 de 3 semanas	- 1 dosis de 190 mg/kg STZ	- Diabetes moderada / glucemia > 240 mg/dl	- 4 días antes del tratamiento con eCG para inducir superovulación / 4 días	- Folículos y ovocitos	- Frecuencia de folículos antrales, apoptosis en células de la granulosa, tamaño y maduración del ovocito	- Reducción de tamaño y del número de folículos antrales, incremento de apoptosis en células de la granulosa, reducción en el tamaño de ovocitos y retrasos en maduración
Kim (2007)	- Ratas BBdp adultas	- NA ^f	- Diabetes severa / glucemia > 300 mg/l	- NA / 14 a 42 días	- Folículos y ovocitos	- Vesícula germinal folicular intacta, estatus nuclear del ovocito	- En función del tiempo, aumento de la ruptura en la vesícula germinal, ruptura de la vesícula de folículos grandes, menor progresión meiótica durante la foliculogénesis

^a La lista de referencias incluye estudios representativos de modelos experimentales de diabetes cuyo objetivo es inducir una disfunción reproductiva, por lo tanto no intenta aportar una lista completa de la literatura disponible

^b Cepa y edad de los roedores

^c Dosis, repeticiones y vía de administración

^d De acuerdo con Jawerbaum (2010): diabetes moderada <250 mg/dl y diabetes severa >250 mg/dl

^e ND = no definido

^f NA = no aplica

STZ = estreptozotocina

3. JUSTIFICACIÓN

La evidencia clínica sugiere que parte de los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a la disfunción ovárica diabética se asocian a una alteración en la foliculogénesis. Sin embargo, hasta el momento no existe evidencia que muestre dicha asociación, esto debido a la limitante que presentan los estudios clínicos y a la heterogeneidad de los modelos experimentales. Debido a la necesidad de conocer más sobre los mecanismos que subyacen a la disfunción diabética ovárica, en la presente investigación propusimos la evaluación de las posibles alteraciones que ocurren en el proceso de foliculogénesis en el ovario de la rata con SD inducido con STZ.

4. HIPÓTESIS

Las ratas con SD inducido con STZ presentarán una alteración en el proceso de foliculogénesis, el cual se asociará con fallas en la función del ovario. Específicamente serán de esperarse cambios en la actividad cíclica del ovario y una reducción en la producción de hormonas esteroides.

5. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo consistió en demostrar que las ratas con SD inducido con STZ presentan una alteración en la foliculogénesis, la cual se asocia a cambios funcionales del ovario. Para cumplir con este objetivo planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Inducir un modelo de síndrome diabético mediante la administración de estreptozotocina en ratas de la cepa Wistar.
- Documentar y comparar las características histológicas del ovario mediante microscopia de campo claro en cortes de ovario teñido con H&E tanto en condiciones fisiológicas como en ratas con SD.
- Determinar mediante un análisis morfométrico y descriptivo de los folículos si la condición diabética induce una alteración del proceso normal de crecimiento y desarrollo folicular.
- Evaluar si la existencia de posibles alteraciones en la foliculogénesis inducen un estado de disfunción ovárica que se refleje en alteraciones reproductivas. Para ello se pretende seguir el ciclo estral y medir la concentración de hormonas esteroides en suero de animales sanos y diabéticos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño experimental y animales

Utilizamos 75 ratas hembra de la cepa Wistar de 6-8 semanas de edad (200-250 gr de peso corporal) provenientes del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Las hembras se mantuvieron en pares y se colocaron en la colonia de ratas a 21°C con ciclos de 12 horas luz/oscuridad (encendido de luz 7:00 am). Los animales tuvieron un período de aclimatación de 4 días con acceso libre de agua y alimento (LabDiet, USA). Todos los procedimientos experimentales se realizaron bajo las condiciones establecidas por la NOM-062-ZOO-1999 para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio y con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE) correspondiente.

Realizamos tres experimentos independientes con 25 animales cada uno, en los cuales dividimos a los animales 10 del grupo Control y 15 del grupo SD. Dichos experimentos se realizaron de forma posterior al periodo de aclimatación conforme al diseño experimental (Figura 2). Con respecto a la administración del tratamiento, las hembras del grupo SD recibieron una dosis única de 75 mg/kg (p/v) i.p. de estreptozotocina (U-9889, Santa Cruz Biotechnology, USA) disuelto en 1 µl/gr (p/v) de buffer de Citrato de Sodio 50 mM, pH 4.5. El grupo Control únicamente recibió el vehículo bajo las mismas condiciones que el grupo SD.

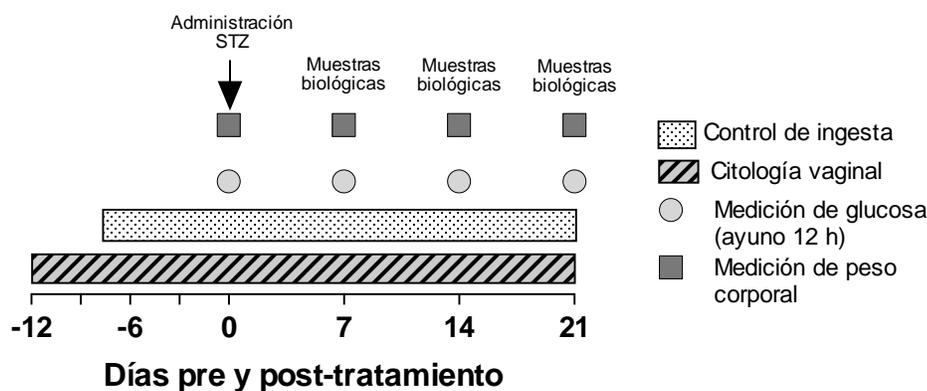


Figura 2. Diseño experimental. Inducción del modelo de SD con estreptozotocina en el día 0. Medición de glucosa y peso corporal y obtención de muestras biológicas en los días 0, 7, 14 y 21 post-tratamiento. Monitoreo de la actividad cíclica ovárica mediante citologías vaginales y control de ingesta 12 y 7 días previos, respectivamente, a la inducción del modelo y durante el tiempo que persistió el mismo. Los días previos a la inducción del tratamiento se consideraron de forma posterior al periodo de aclimatación. Una glucemia de 80-100 mg/dL se consideró como fisiológica, mientras que una hiperglucemia >250 mg/dL se consideró como criterio de confirmación de la condición diabética.

Durante los días 7, 14 y 21 post-tratamiento, las ratas de cada grupo se eutanasiaron mediante una sobredosis de pentobarbital-sódico 6.3% conforme a lo establecido en la *NOM-062-ZOO-1999*. Inmediatamente después de la muerte se obtuvo 1 ml sangre mediante punción cardiaca. Las muestras se conservaron a 4°C para su posterior tratamiento. Por otra parte, los ovarios de cada animal se disectaron, limpiaron y post-fijaron durante 24 horas.

2. Evaluación histológica del ovario y cuantificación de la población folicular

Para evaluar la histología del ovario, agrupamos animales del grupo Control y SD con base en la fase del ciclo estral que presentaron al momento de la eutanasia. Procesamos histológicamente un ovario a fin de evaluar los posibles cambios histopatológicos provocados por el SD. El ovario restante se conservó como referencia en solución de PBS adicionado con 30% de sacarosa. Obtuvimos cortes seriales de 3 µm, recuperando un corte por cada cinco seriales, posteriormente los colocamos en laminillas cargadas y los teñimos con la tinción Hematoxilina/Eosina (H/E). Posteriormente se tomaron microfotografías de los cortes a 20x en un microscopio de campo claro (Olympus BX51WI, USA).

Para determinar si el SD puede resultar en alteraciones en la foliculogénesis, evaluamos la distribución de los folículos contenidos en los ovarios. Buscamos diferencias entre los grupos durante las etapas finales del desarrollo folicular (diestro-proestro). Utilizamos el software ImageJ (NIH, USA) para realizar el análisis morfométrico de cada ovario. Contamos y medimos el diámetro de los folículos entre 25-650 µm. Posteriormente, clasificamos a los folículos de acuerdo a su diámetro en: folículo preantral, (FP, 25-150 µm); folículo antral temprano, (FaT, 150-400 µm); y folículo preovulatorio (FPo, >400 µm). Adicionalmente, clasificamos a los folículos en sanos o atrésicos de acuerdo a las características señaladas en el Cuadro 2. Por último contamos y clasificamos a los CL con base en la descripción del Cuadro 3, a fin de tener un reflejo de la actividad folicular.

3. Evaluación de la actividad cíclica del ovario

Para evaluar la actividad cíclica del ovario, se siguió el ciclo estral en ambos grupos 12 días previos a la inducción del modelo y durante el curso temporal del tratamiento. Todos los días entre las 14 -15 horas realizamos una citología vaginal a cada una de las hembras. Las muestras obtenidas se teñieron con Giemsa y posteriormente se observaron en un microscopio óptico a fin de identificar la fase del ciclo estral. Para el reconocimiento de las fases del ciclo estral utilizamos el criterio de clasificación de Marcondes (51).

4. Determinación de la concentración de hormonas esteroides en suero

A fin de observar los posibles cambios en la concentración de hormonas esteroides, determinamos la concentración de progesterona y estradiol en suero. Para ello centrifugamos cada una de las muestras de sangre a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C, recuperamos el suero y lo centrifugamos nuevamente a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Finalmente realizamos la determinación cuantitativa de las hormonas esteroides sexuales mediante radioinmunoensayo (RIA). En ambos casos se utilizó el RIA comercial en fase sólida, (COAT-A-COUNT, SIEMENS, Los Angeles, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo para el estradiol de 0.1 pg/ml y progesterona de 0.1 ng/ml. En todos los sistemas, el coeficiente de variación intraensayo fue menor del 10%.

5. Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados experimentales utilizamos estadística paramétrica de acuerdo a los resultados obtenidos de las pruebas de homogeneidad de varianza (test de Levene) y de distribución normal (prueba Shaphiro-Wilk) incluidos en el programa estadístico Prism 6.0 (GraphPad, Software Inc., USA).

Utilizamos ANOVA de dos vías, seguida de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni para comparar los cambios semanales en el consumo de agua y alimento, así como en la concentración de glucosa en sangre y el peso corporal. Adicionalmente, utilizamos ANOVA de dos vías seguida de la prueba de comparación múltiple de Tukey para contrastar los valores promedio del número de folículos sanos, así como la incidencia de atresia en cada grupo a lo largo del experimento. La comparación de la distribución del tamaño de los folículos se realizó por medio de la suma de dos curvas tipo Lorentzianas o de una curva tipo Gaussiana para el grupo SD y Control, respectivamente. Dichas curvas se ajustaron sobre los histogramas construidos para las distribuciones de frecuencia relativa del diámetro folicular. Adicionalmente, comparamos las concentraciones de hormonas esteroides entre cada grupo y a lo largo del período de evaluación mediante ANOVA de dos vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Por último, utilizamos el análisis de X^2 para determinar la diferencia en las proporciones de los diferentes estadios de desarrollo del CL entre los grupos experimentales. Los valores se presentan como el promedio \pm EE y en todos los casos se consideró un valor de $p < 0.05$ como significativo.

Cuadro 2. Características de las estructuras foliculares de acuerdo al estado de salud de los folículos.

Estado	Estructuras del folículo*		
	Ovocito	Pared folicular	Antro folicular
Sano	<ul style="list-style-type: none"> - Zona pelúcida bien definida - Sin signos de degeneración - Núcleo visible 	<ul style="list-style-type: none"> - Células de la granulosa con forma redonda y formando una capa gruesa - Teca interna y externa bien definidas - Ausencia de núcleos picnóticos 	<ul style="list-style-type: none"> - Sin detritos celulares
Atrésico	<ul style="list-style-type: none"> - Zona pelúcida fragmentada - Procesos de degeneración: apariencia distorsionada o encogida - Pérdida de la membrana nuclear 	<ul style="list-style-type: none"> - Células de la teca hipertrofiadas - Pérdida, adelgazamiento o deformación de las células de la granulosa y/o del cumulus oophorus - Incremento de núcleos picnóticos 	<ul style="list-style-type: none"> - Incremento de detritos celulares - Infiltración de macrófagos

* Criterio modificado de Hirshfield (52).

Cuadro 3. Características histológicas de los cuerpos lúteos durante las fases del ciclo estral.

Característica ^a	Fase del ciclo estral			
	Estro	Metaestro	Diestro	Proestro
Tamaño	- Cuerpos lúteos degenerados y estructuras recién formadas	- Pequeño (<1000 µm)	- Grande (>1000 µm)	- Reducción en tamaño debido a la degeneración de la estructura
Vacuolación	- NP ^b	- NP	- Finamente vacuolado	- Vacuólas citoplasmáticas
Tejido fibroso	- NP	- NP	- Formación inicial	- Proliferación en la cavidad central
Cavidad central	- Llena de fluido ^c	- Llena de fluido ^c	- NP	- NP
Células basófilas	- Abundante ^c	- Pocas ^c	- NP	- NP

^a Modificado de la guía histológica propuesta por Wetswood (49).

^b NP = No presenta.

^c Referente al cuerpo lúteo formado después de la ovulación durante el proestro.

6. RESULTADOS

1. El tratamiento con estreptozotocina induce síndrome diabético

La administración de estreptozotocina (STZ) indujo un modelo de SD con una eficiencia del 80-93%. En los animales del grupo SD los valores de glucemia se incrementaron entre 4.2-5.6 veces con respecto al grupo Control en los períodos evaluados (Cuadro 4). A diferencia de sus pares del grupo Control, los animales tratados con STZ mostraron un aumento progresivo y variable de la concentración de glucosa en sangre (Fig. 3A). En consecuencia, las ratas tratadas con STZ desarrollaron una diabetes severa, la cual se caracterizó por hiperglucemia (> 200 mg/dl) a partir de los 7 días post-tratamiento y hasta el final del experimento (Fig. 3A). Adicionalmente, el SD se caracterizó por la pérdida progresiva del peso corporal de las ratas tratadas, el cual se redujo 9.1, 10 y 14.7% a los 7, 14 y 21 días post-tratamiento, respectivamente. Lo anterior en comparación al peso inicial que se tomó como el 100%. Por el contrario, las ratas del grupo Control presentaron un ligero aumento de peso con respecto a la evaluación inicial (Fig. 3B). Finalmente, los animales del grupo SD presentaron de forma consistente polidipsia y polifagia a los 7 y 14 días post-tratamiento, respectivamente (Fig. 3C y D). El incremento en el consumo de agua fue entre 2.7-3.5 veces mayor en las ratas diabética que en las control. Mientras que en comparación al grupo control, la ingesta de alimento aumentó 29 y 24% a los 14 y 21 días post-tratamiento, respectivamente.

Cuadro 4. Promedio (\pm EE) de la concentración de glucosa en sangre de ratas Control y ratas tratadas con estreptozotocina para inducir síndrome diabético (SD) evaluadas a diferentes tiempos después del tratamiento.

Grupo	Días post-tratamiento		
	7 (n)	14 (n)	21 (n)
Control	79.1 \pm 6.5 (10) ^a	72.2 \pm 2.6 (10) ^a	74.8 \pm 1.8 (10) ^a
SD	385 \pm 21.9 (12) ^b	319.4 \pm 31.1 (13) ^a	423.3 \pm 14.6 (14) ^b
<i>p</i> (Control vs. SD)	0.001	0.001	0.001
Efectividad del tratamiento	80% (12/15)	86.6% (13/15)	93.3 (14/15)

^{a,b} En cada grupo, literales distintas entre los tiempos indican diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$.

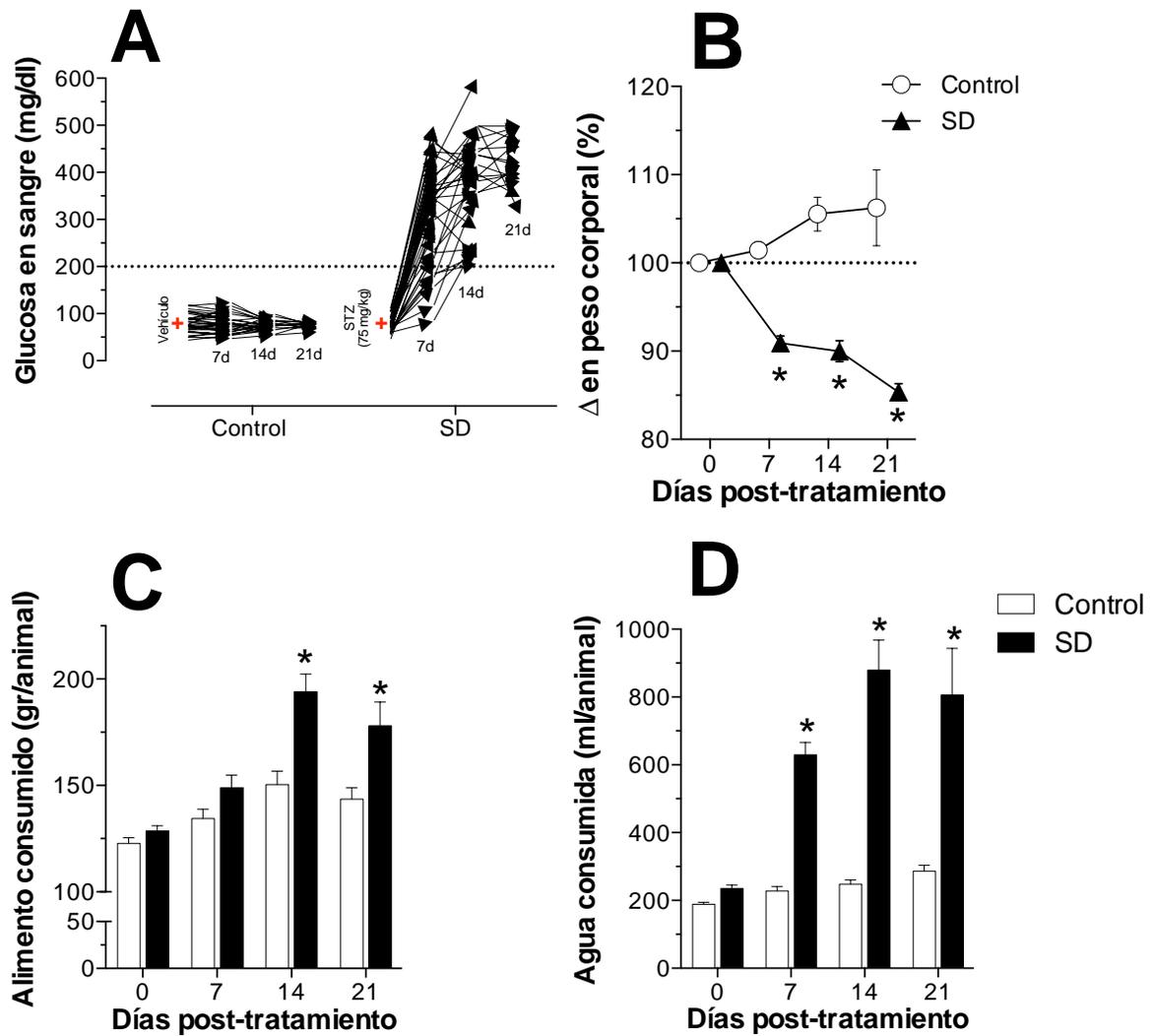


Figura 3. **A)** Graficas antes-después de los valores individuales de glucosa en sangre, **B)** Graficas de puntos y líneas del cambio porcentual (Δ) del peso corporal con respecto al valor inicial normalizado al 100% y **C)** Graficas de columnas de la ingesta de alimento y **D)** agua en ratas Control y ratas tratadas con estreptozotocina (STZ) para inducir un modelo experimental de síndrome diabético, el cual se evaluó a los 7, 14 y 21 días post-tratamiento. La condición diabética se confirmó con un nivel de glucosa en sangre >200 mg/dl (línea punteada en A). En B y C se presentan los valores promedios (\pm EE). * Indica diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$).

2. *El síndrome diabético altera las características histológicas del ovario e induce atresia folicular*

En condiciones fisiológicas el ovario presenta una serie de cambios histológicos que se asocian a los procesos cíclicos de crecimiento y regresión de sus folículos y cuerpos lúteos. En particular durante el proestro, los folículos entran en la fase final de crecimiento con lo cual se asegura el desarrollo de folículos con capacidad ovulatoria. Es por ello que en las Figuras 4, 5 y 6 se presenta una comparación de las características histológicas de cortes de ovario y de sus folículos preovulatorios durante la fase de proestro en ratas Control y con SD evaluadas a los 7, 14 y 21 días post-tratamiento.

En general, los ovarios de las ratas Control y SD evaluadas a los 7 y 14 días post-tratamiento mostraron una diversidad de estructuras intraováricas: folículos en diferentes estadios de crecimiento y cuerpos lúteos con diversos signos de desarrollo (Fig. 4A y D y Fig. 5A y D). En ambos grupos se presentaron folículos preovulatorios (Fig. 4B y E y Fig. 5B y E), los cuales se distinguieron por el diámetro folicular ($> 400 \mu\text{m}$), la presencia de una capa gruesa y bien diferenciada de células de la granulosa y una capa externa de células de la teca, la cual se observó compacta y bien vascularizada (Fig. 4C y F y Fig. 5C y F). Característicamente, los folículos preovulatorios de ambos grupos no presentaron signos de atresia a juzgar por los criterios descritos en el Cuadro 2. De forma contrastante, únicamente las ratas diabéticas evaluadas 21 días después de la administración de STZ presentaron alteraciones en las características del ovario (Fig. 6). El resultado más sobresaliente consistió en una evidente disminución de la población folicular y en particular, la dramática reducción de los folículos antrales y preovulatorios (Fig. 6A y D). Adicionalmente, la mayor parte de los folículos preovulatorios de las ratas diabéticas mostraron signos de daño histológico característicos del proceso de atresia folicular (Fig. 6B y E). A diferencia del grupo Control, en el SD los folículos preovulatorios mostraron un adelgazamiento en la capa de células de la granulosa, restos celulares en el antro folicular, hipertrofia de las células de la teca, así como infiltración de macrófagos (Fig. 6C y F).

Debido al efecto que provocó el SD sobre la histología de los folículos preovulatorios en las ratas de 21 días post-tratamiento, comparamos las categorías foliculares que se definieron con base en su diámetro folicular. Lo anterior se hizo para determinar si la condición diabética afectó por completo a la población folicular o si fue un efecto específico sobre los folículos preovulatorios. Las imágenes representativas se muestran en la Figura 7. En general, los folículos de las ratas del grupo Control mostraron una capa de células de la pared folicular bien organizada y con incrementos en el grosor concomitantes con el crecimiento folicular. Además, los folículos mostraron un ovocito de apariencia sana, el cual se acompañó de una zona pelúcida bien definida, así como de la presencia de un

cumulus oophorus íntegro y un antro folicular sin detritos celulares (Fig. 7A-D). Por el contrario, los folículos del grupo SD mostraron signos evidentes de daño en todas las categorías evaluadas. Específicamente, observamos folículos con células de la teca hipertrofiadas, un considerable adelgazamiento y desorganización de las células de la granulosa, la presencia de macrófagos, detritos celulares en el antro folicular, alteraciones en la zona pelúcida y fragmentación del ovocito (Fig. 7E-H). En conjunto, estos signos de atresia se presentaron consistentemente en los folículos de todos los tamaños.

3. La condición diabética altera progresivamente el proceso de crecimiento folicular y reduce el número de folículos sanos

El SD impidió el crecimiento de los folículos sanos al provocar la interrupción de la transición de los folículos en sus primeros estadios de desarrollo (25-150 μ m) a folículos antrales y preovulatorios (Fig. 8A). En consecuencia, las ratas diabéticas del grupo de 14 y 21 días post-tratamiento mostraron un incremento en la frecuencia de los folículos preantrales, el cual fue concomitante con la reducción de los folículos antrales (>150 μ m). Este resultado se aprecia fácilmente al observar el incremento en el pico de la frecuencia en los diámetros pequeños en conjunto con el desplazamiento hacia la izquierda de la curva de ajuste del histograma. De forma contraria, el grupo Control mostró dos picos en la distribución de frecuencias de su población folicular, los cuales son representativos de la ganancia de tamaño en los folículos, los cuales pasan de antrales tempranos a preovulatorios (Fig. 8A).

Adicionalmente, el número promedio de folículos sanos dentro del grupo SD se redujo paulatinamente a lo largo del periodo de evaluación. De hecho, la reducción porcentual entre los 7 y 21 días post-tratamiento en el grupo SD correspondió al 64% de la población inicial (245.5 ± 29.2 vs. 87.8 ± 12.6 folículos para 7 y 21 días, respectivamente). Sin embargo, las diferencias significativas entre los grupos de animales únicamente se presentaron a los 21 días post-tratamiento (Fig. 8B). Por último, en los ovarios del grupo Control el porcentaje de folículos atrésicos fue consistente durante el periodo de evaluación (14-17% de la población folicular total), mientras que en el grupo SD el porcentaje de atresia presentó un incremento significativo hacia el final de la evaluación (49.5 % de atresia a los 21 días post-tratamiento), con lo cual se obtuvo un aumento de 3.5 y 3.1 veces en la incidencia de atresia, en comparación a los 7 y 14 días post-tratamiento (14.2 y 15.9 % de atresia, respectivamente; Fig. 8C).

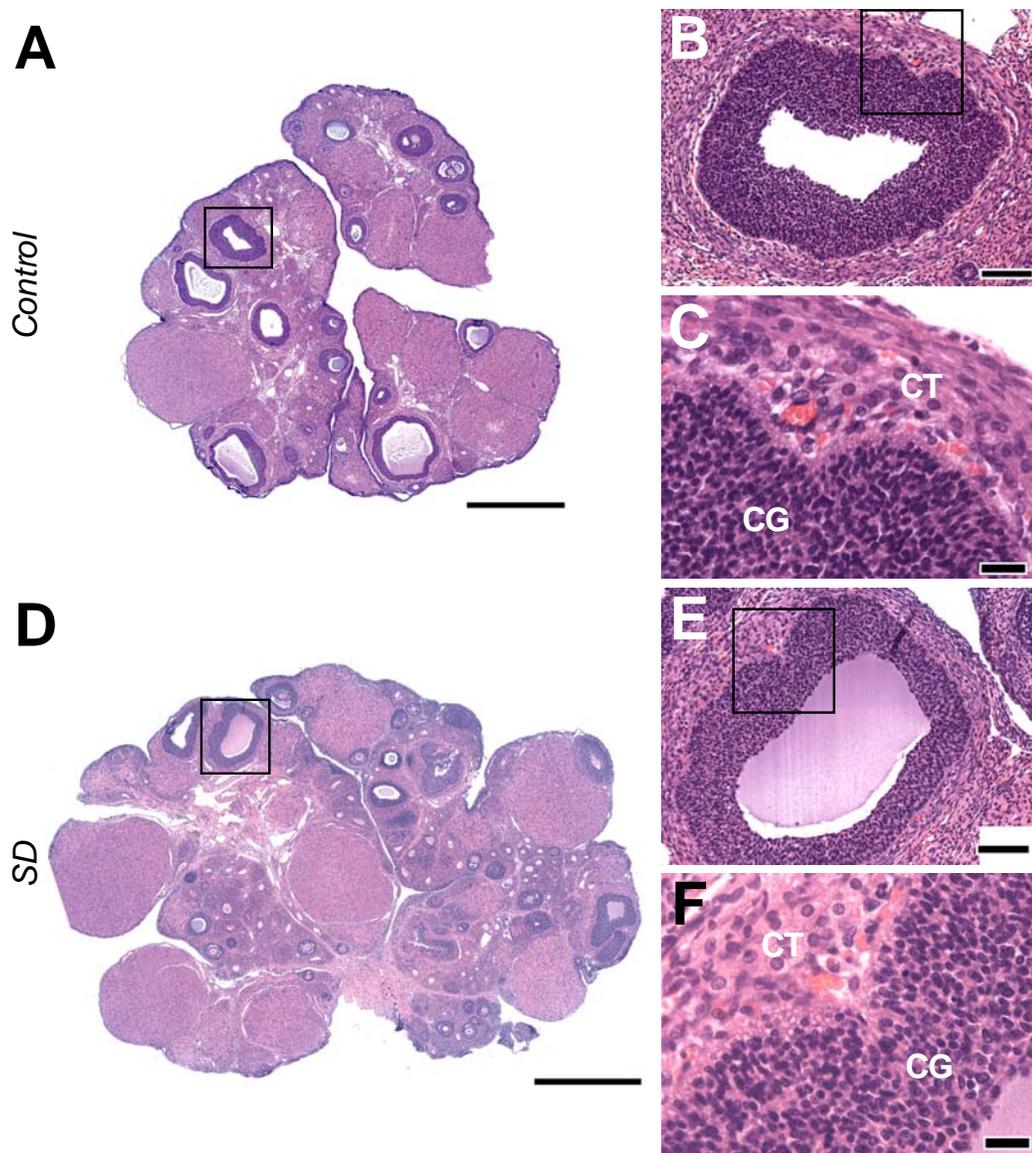


Figura 4. Microfotografías representativas de secciones de ovario de rata Control (**A-C**) y con SD (**D-F**) evaluadas a los 7 días post-tratamiento y teñidas con H&E. Nótese en A y D la diversidad de estructuras intraováricas en diferentes estados de desarrollo. En los acercamientos de las zonas seleccionadas del grupo Control (**B-C**) y SD (**E-F**) se presenta un folículo preovulatorio con sus capas gruesas y bien definidas de células de la teca, así como células de la granulosa. No se observan signos de atresia folicular. CT, células de la teca; CG, células de la granulosa. Barras de escala: A y D = 1000 μ m, B y E = 100 μ m y C y F = 25 μ m.

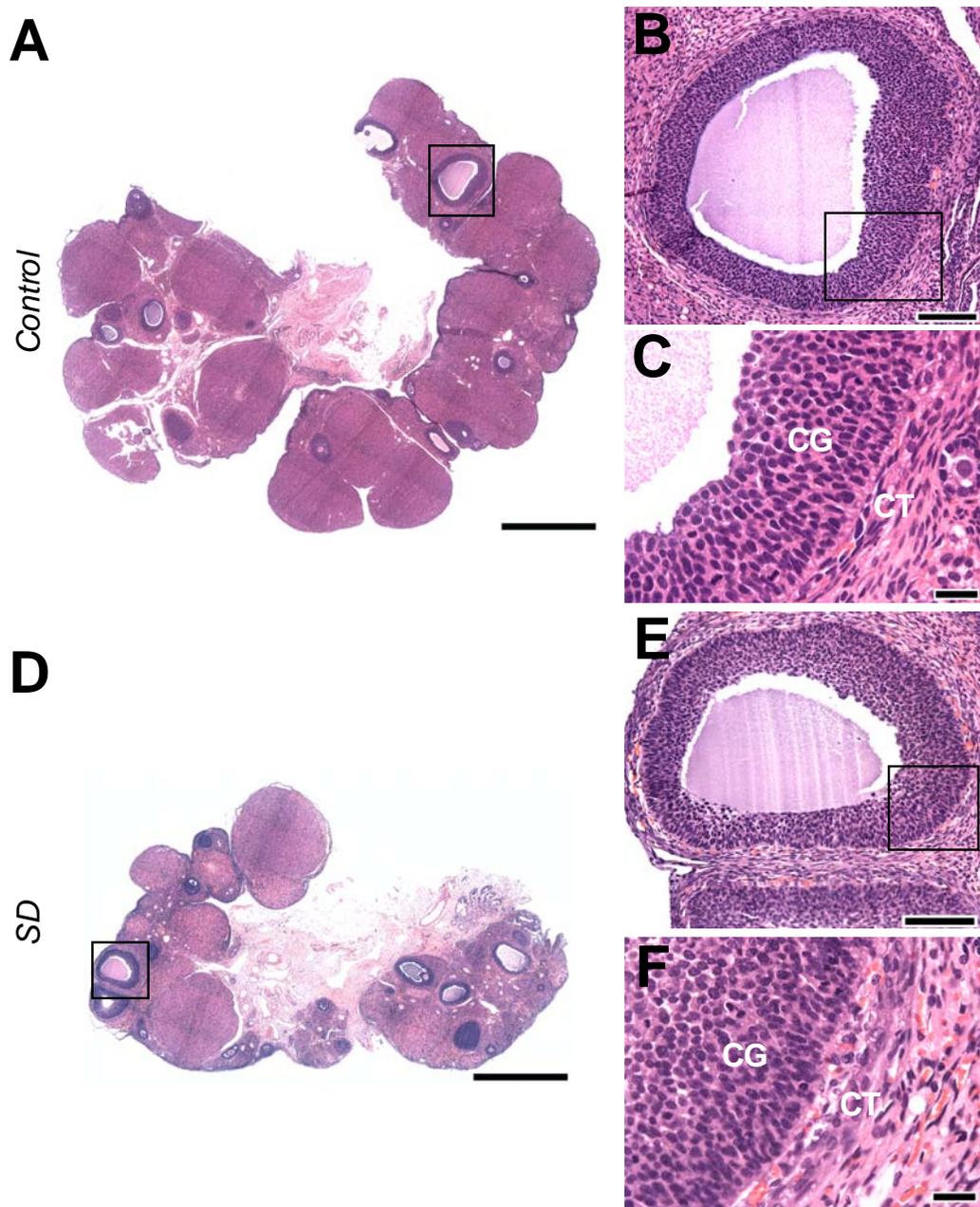


Figura 5. Microfotografías representativas de secciones de ovario de rata Control (**A-C**) y con SD (**D-F**) evaluadas a 14 días post-tratamiento y teñidas con H&E. Nótese en A y D la diversidad de estructuras intraováricas en diferentes estados de desarrollo. En los acercamientos de las zonas seleccionadas del grupo Control (**B-C**) y SD (**E-F**) se presenta un folículo preovulatorio con sus capas gruesas y bien definidas de células de la teca, así como células de la granulosa. No se observan signos de atresia folicular. CT, células de la teca; CG, células de la granulosa. Barras de escala: A y D = 1000 μm , B y E = 100 μm y C y F = 25 μm .

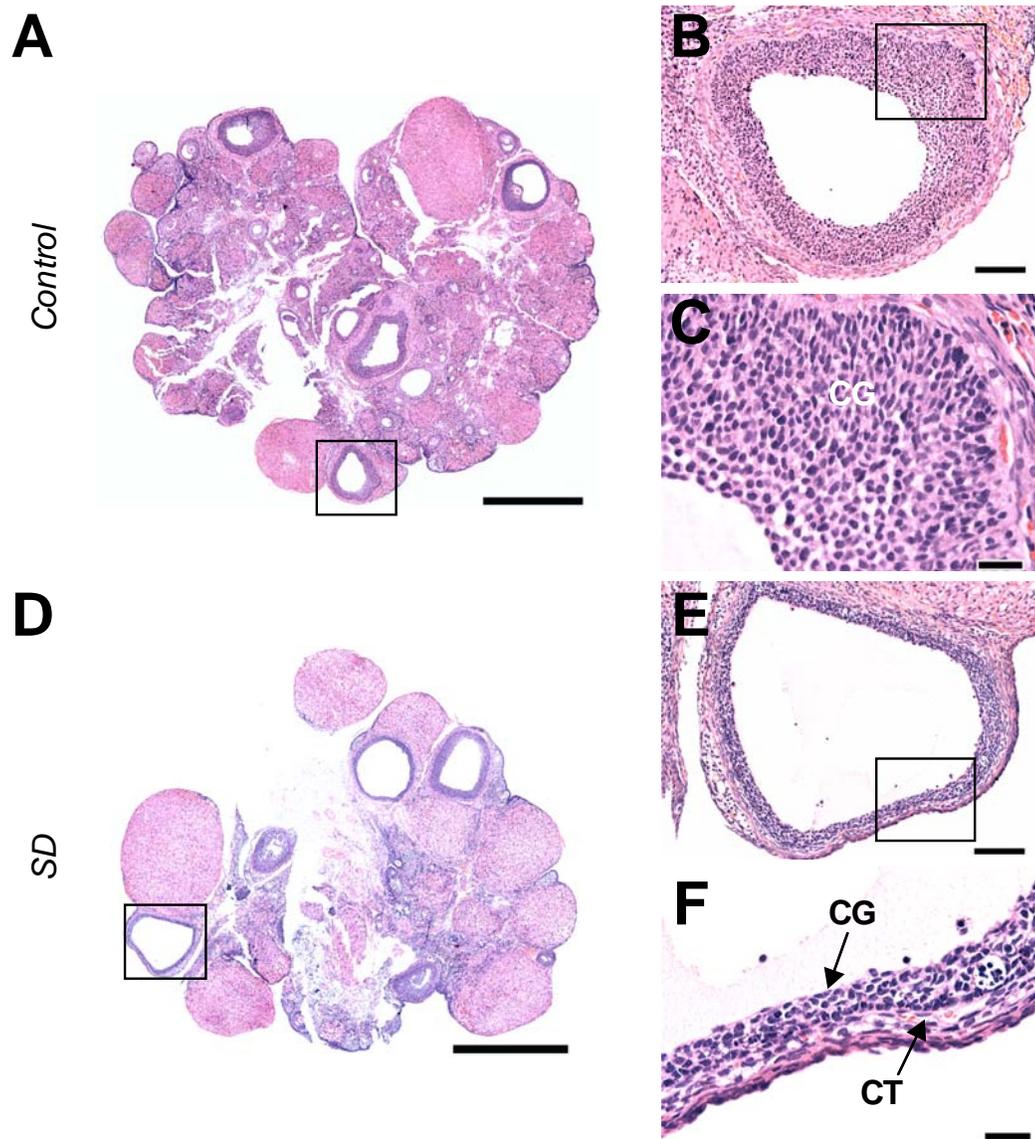


Figura 6. Microfotografías representativas de secciones de ovario de rata Control (**A-C**) y con SD (**D-F**) evaluadas a los 21 días post-tratamiento y teñidas con H&E. Únicamente en A se presenta diversidad de estructuras intraováricas en diferentes estados de desarrollo. Por el contrario en D se observa la disminución de la población folicular. En los acercamientos de las zonas seleccionadas del grupo Control (**B-C**) y SD (**E-F**) se presenta un folículo preovulatorio, el cual sólo en el grupo Control presenta una capa gruesa y bien definida de células de la teca y de la granulosa. En E se muestra un folículo preovulatorio con signos avanzados de atresia: adelgazamiento de las capas celulares, detritos celulares, cuerpos picnóticos, infiltración de macrófagos e hipertrofia de la capa de células de la teca. CT, células de la teca; CG, células de la granulosa. Barras de escala: A y D = 1000 μ m, B y E = 100 μ m y C y F = 25 μ m.

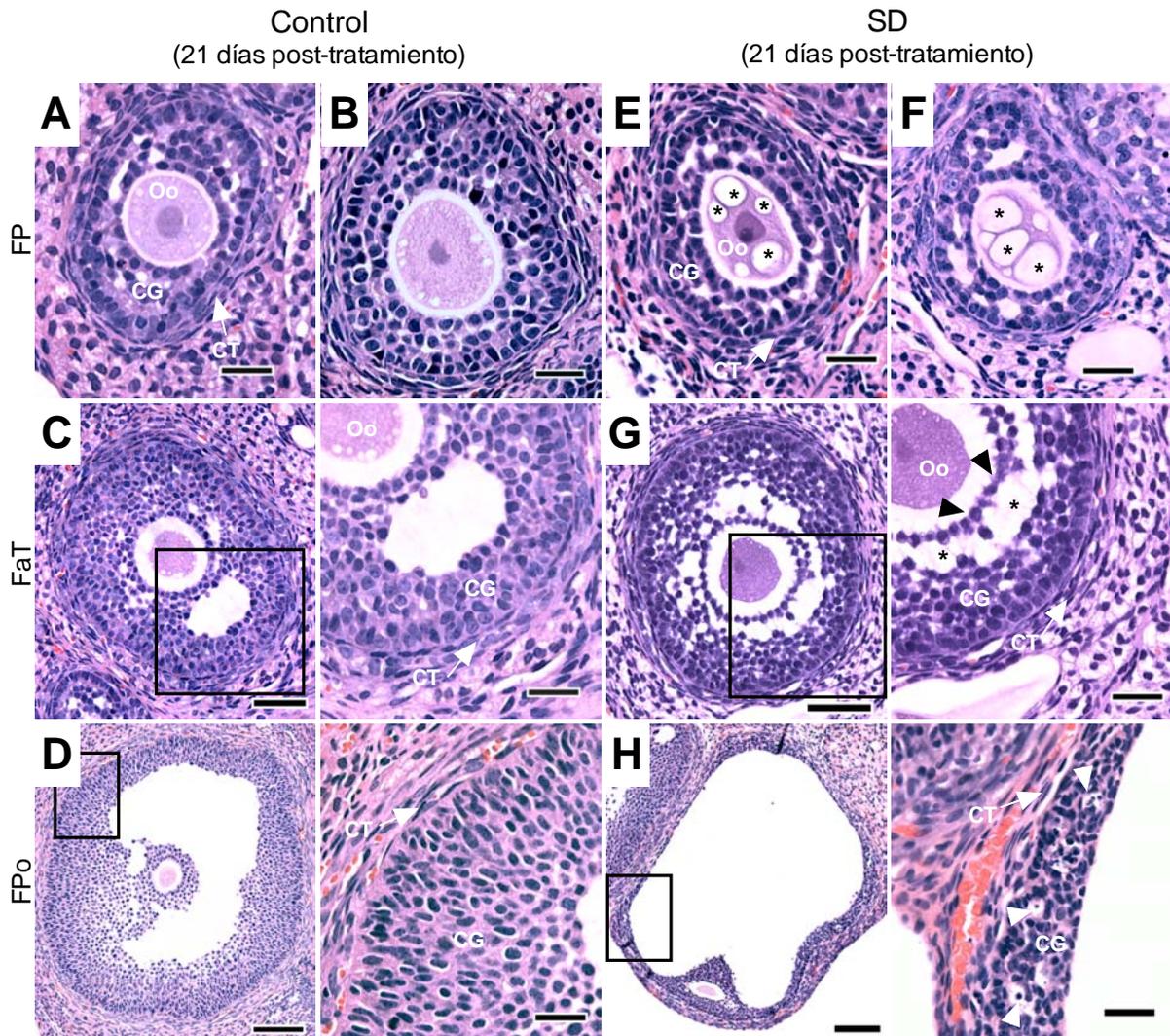


Figura 7. Microfotografías representativas de tinciones H&E de secciones de ovario con folículos preantrales (FP), folículos antrales tempranos (FaT) y folículos preovulatorios (FPO) de ratas del grupo Control (**A-D**) y con SD (**E-H**) evaluadas a los 21 días post-tratamiento. Nótese en el grupo Control la apariencia sana del ovocito, de la zona pelúcida, así como de las capas de células de la granulosa y de la teca que forman una pared folicular bien definida y que se engrosa de forma proporcional al diámetro folicular. De forma opuesta, en los folículos del grupo SD se aprecian estados avanzados de atresia. En particular nótese la reducción dramática de la capa de células de la granulosa, el daño en el cúmulo oóforo, así como las alteraciones en el ovocito. CT, células de la teca; CG, células de la granulosa; Oo, ovocito. Las puntas de flecha y los asteriscos muestran diferentes signos de atresia: vacuolas, cavidades en las capas celulares, desprendimientos de células de la granulosa, hipertrofia de las células de la teca, núcleos picnóticos, infiltración de macrófagos. Barras de escala: 25 μm en A, B, E, F y acercamientos; 50 μm en C y G, y 100 μm en D y H.

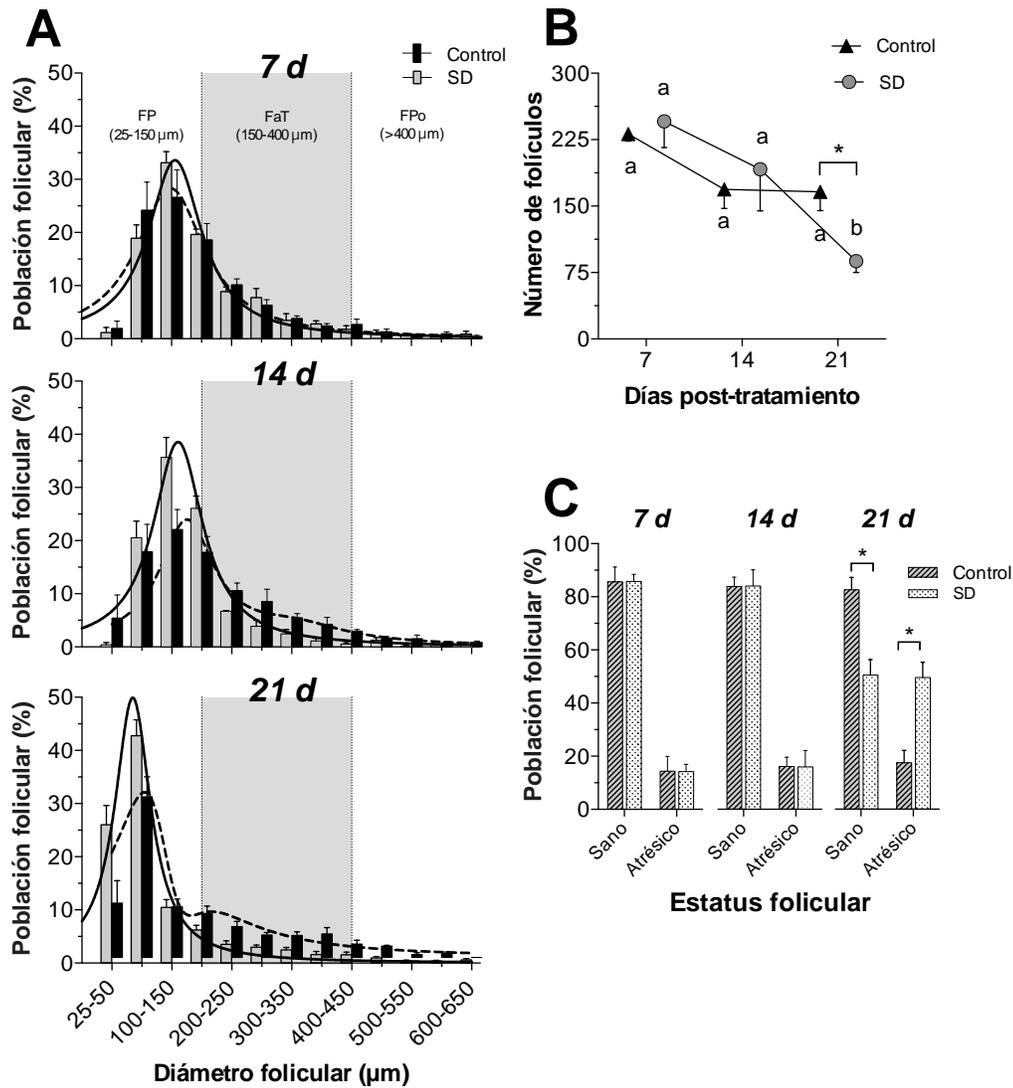


Figura 8. **A)** Histogramas y curvas de ajuste no lineal de la distribución del diámetro folicular durante la etapa final de crecimiento folicular, **B)** graficas de puntos y líneas del número promedio de folículos sanos y **C)** graficas de barras de la incidencia de atresia folicular en ratas Control y con SD evaluadas a diferentes tiempos. En A los histogramas se ajustaron con curvas de la suma de dos Lorentzianas (Control) o una Gaussiana (SD). Nótese en A que el desplazamiento progresivo de la curva hacia la izquierda en el grupo SD sugiere la interrupción del patrón normal de desarrollo folicular. ^{a,b} Para cada grupo, literales distintas entre los días indican diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$. * En las categorías de estatus folicular indica diferencias entre los grupos al nivel de $p < 0.05$.

4. *En respuesta a los cambios en la foliculogénesis se altera la función del ovario*

Para determinar la existencia de fallas en la función ovárica surgidas en respuesta a la alteración del crecimiento folicular, evaluamos tres aspectos fundamentales indicativos de la fisiología del ovario: formación de CL, producción de hormonas esteroides y actividad cíclica. Los resultados de dicha evaluación se presentan a continuación.

El SD produjo de forma progresiva alteraciones en las características histológicas del CL a lo largo de su desarrollo (*ver* Cuadro 3). En la Figura 9A se muestran imágenes representativas de los estadios de desarrollo de un CL en condición Control: CL recién formado, con una diversidad de células de diferentes tamaños y coloración basofílica; CL maduro, con células luteales bien diferenciadas mostrando un citoplasma homogéneo y coloración eosinofílica y CL en degeneración, mostrando una ligera vacuolación en el tejido luteal. De forma contrastante, en el grupo SD se presentaron cambios paulatinos en la apariencia de las células luteales, las cuales se evidenciaron a partir de 14 días post-tratamiento y se incrementaron en la etapa final de evaluación (Fig. 9B-D). Las alteraciones incluyeron hipertrofia de las células luteales, apariencia desorganizada de las células y cambio de su forma redonda a poligonal, pérdida de la coloración eosinofílica vacuolación prominente del citoplasma celular y la formación de signos prematuros de la etapa de degeneración. Además, en respuesta a la disminución de los folículos pre-ovulatorios, la cantidad de CL disminuyó de forma concomitante y progresiva durante el curso temporal de la condición diabética. Las ratas del grupo Control presentaron un porcentaje similar de CL recientes a lo largo de la evaluación (29-36%), mientras que en los animales diabéticos el porcentaje de éstas estructuras pasó de 29% a los 7 días post-tratamiento a un 6% a los 21 días post-tratamiento (Fig. 9G).

Con respecto a la producción de estradiol y progesterona, encontramos que la concentración de las hormonas esteroides en el grupo Control se mantuvo sin cambios durante el periodo de evaluación. Mientras que el grupo SD presentó una disminución en la concentración de progesterona a los 14 y 21 días post-tratamiento y de estradiol a partir de 7 días post-tratamiento y hasta el final del mismo (Cuadro 5). Estos resultados se asocian, probablemente con la disminución de la población folicular y la consecuente escasa formación de CL recientes.

Finalmente, observamos un patrón similar en la actividad cíclica del ovario en los grupos Control y SD durante el periodo pre-tratamiento. Sin embargo, el grupo SD produjo una alteración gradual en la actividad del ciclo estral (Fig. 10). En particular, el grupo SD evaluado a los 7 días post-tratamiento mostró un patrón regular en las fases del ciclo estral, de forma similar a lo observado en el grupo Control (Fig. 10A). De forma opuesta al grupo Control, los animales con SD evaluados a los 14

días post-tratamiento mostraron alteraciones en la actividad cíclica del ovario, las cuales se reflejaron en la pérdida de la continuidad del ciclo (Fig. 10B). Por último, el 71% de las ratas con SD del grupo de 21 días post-tratamiento mostraron ciclos estrales irregulares, de los cuales 35 y 65% de los animales presentaron proestro y diestro sostenido, respectivamente, mientras que el 29% de los animales restantes mostraron un comportamiento semejante al grupo control; es decir, sin alteraciones en la progresión del ciclo (Fig. 10C).

Cuadro 5. Promedio (\pm EE) de la concentración de hormonas esteroides en suero de ratas Control y ratas con síndrome diabético (SD) inducido con estreptozotocina y evaluadas a diferentes tiempos después del tratamiento.

Hormona	Grupo	Días post-tratamiento		
		7	14	21
Progesterona	Control	17.9 \pm 0.9	19.7 \pm 2.9	21.0 \pm 3.3
	SD	23.6 \pm 3.5 *	13.1 \pm 1.8 *	14.2 \pm 2.0 *
Estradiol	Control	40.2 \pm 15.0	64.3 \pm 22.5	40.2 \pm 6.3
	SD	25.4 \pm 5.1 *	39.9.7 \pm 21.4 *	30.5 \pm 3.3 *

* Para cada hormona y día, indica diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$ entre los grupos.

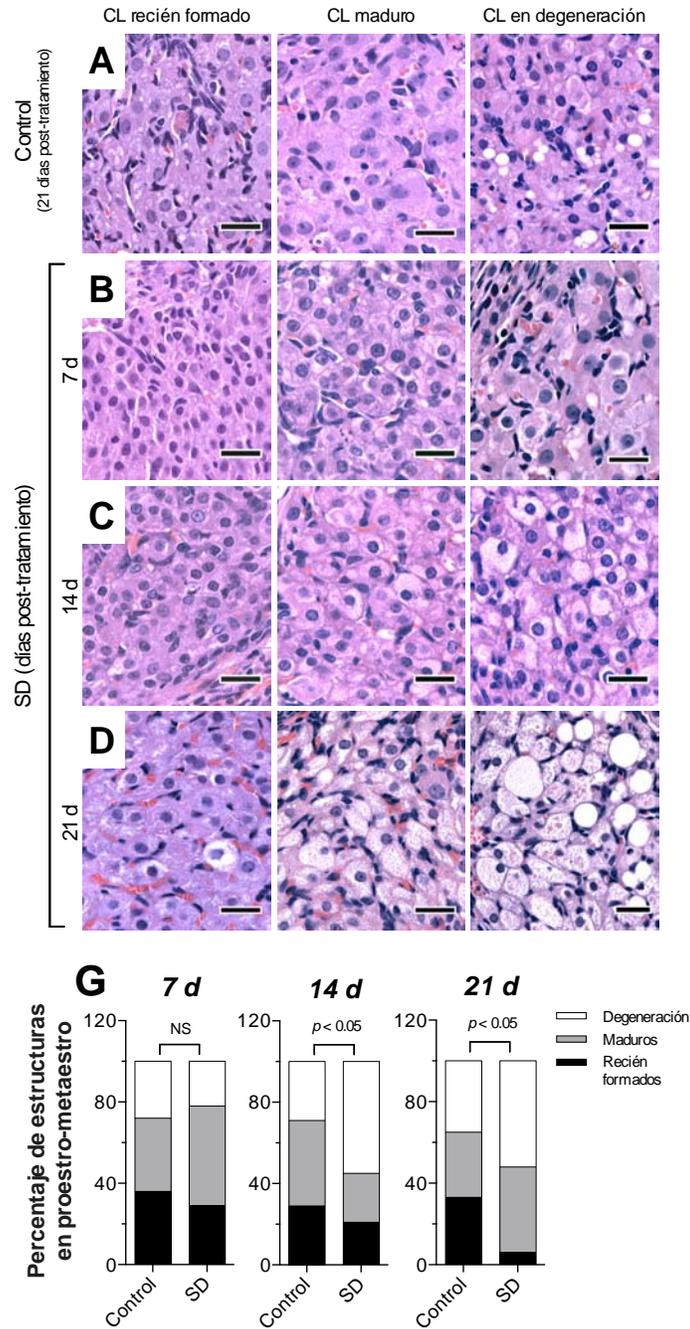


Figura 9. Microfotografías representativas de cuerpo lúteo en diferentes etapas de desarrollo teñidas con H&E en ovarios de rata del grupo Control (**A**) y con SD (**B-D**) evaluadas a diferentes tiempos y **G**) graficas de barras apiladas del porcentaje de cuerpos lúteos observados durante la etapa de transición de proestro-metaestro en ambos grupos. Nótese en A la variabilidad del tamaño de las células luteales y la producción gradual de vacuolas durante el desarrollo del cuerpo lúteo. En comparación, en el tejido diabético se muestra una alteración histológica progresiva: hipertrofia y abundantes vacuolas citoplasmáticas. NS= no significativo. Barras de escala: 25 μ m.

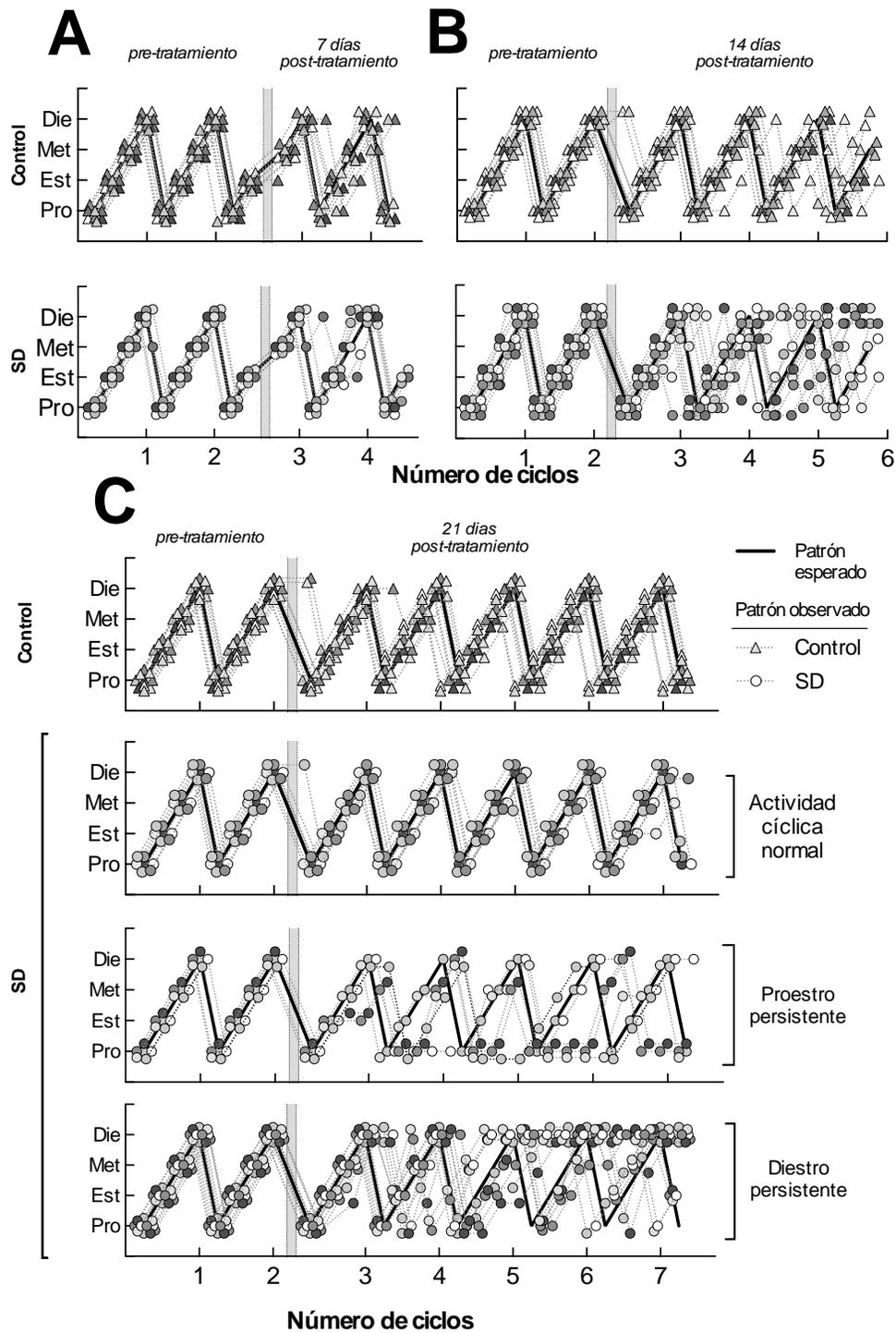


Figura 10. Patrones del ciclo estral esperados y observados durante las etapas de pre- y post-tratamiento en ratas Control y con SD evaluadas a los **A)** 7, **B)** 14, y **C)** 21 días post-tratamiento. Cada símbolo representa un animal por grupo. La progresión esperada durante el ciclo estral es: Pro-Est-Met-Die. Pro = Proestro, Est = Estro, Met = Metaestro, y Die = Diestro. Nótese que el patrón esperado es semejante al observado para ambos grupos durante el período pre-tratamiento.

7. DISCUSIÓN

La integración de la evidencia clínica sugiere que parte de la disfunción ovárica que se presenta en las mujeres diabéticas podría estar asociada con fallas en la foliculogénesis (13, 14). Sin embargo, debido a las limitaciones impuestas por los estudios clínicos y la falta de resultados concluyentes por parte de los estudios con modelos experimentales, se desconoce el efecto que provoca la hiperglucemia sobre el patrón de crecimiento folicular y su posible asociación con alteraciones en la fisiología del ovario. En este estudio demostramos que en respuesta al SD inducido mediante STZ en ratas se presentó una interrupción gradual de la foliculogénesis. Dicha alteración se caracterizó por un aumento progresivo de la frecuencia de los folículos preantrales, los cuales detuvieron su crecimiento y la correspondiente transición hacia folículos preovulatorios. Adicionalmente, encontramos que el SD redujo el número de folículos sanos e incrementó la incidencia de atresia folicular. En respuesta a dichos cambios observamos una baja frecuencia de CL recién formados, una menor concentración de esteroides y la consecuente pérdida de la ciclicidad ovárica.

En conjunto nuestros resultados demostraron que el SD provocó un efecto negativo sobre el patrón fisiológico de crecimiento y desarrollo folicular, el cual se asoció con fallas en la fisiología del ovario. De ésta forma nuestros resultados aportan un sustrato para explicar parte de la disfunción ovárica que afecta a la mujer diabética, la cual ha sido sujeto de estudio por parte de diferentes grupos de investigación (19-21, 24, 42). Cabe resaltar que hasta la fecha no se había realizado un estudio sistemático con un modelo experimental a partir del cual se obtuvieran resultados que integraran los cambios en la foliculogénesis con signos de disfunción ovárica

El tratamiento con STZ indujo un estado diabético que incrementó paulatinamente la atresia folicular en las hembras tratadas. En particular, éste resultado podría estar asociada a la disminución de insulina que genera la destrucción de las células β pancreáticas por efecto de la STZ (27). Debido a que en condiciones fisiológicas la insulina actúa como co-gonadotropina en el ovario (42) y evita la atresia folicular (53, 54), es posible que la insuficiencia insulínica asociada al SD induzca la aparición de signos de atresia, los cuales se incrementaron de forma gradual hasta afectar al 50% de la población folicular en los animales evaluados 21 días post-tratamiento. En este sentido, el incremento de la atresia folicular resulta de suma importancia pues genera efectos adversos en la tasa ovulatoria (31, 32, 55-57), lo cual podría estar relacionado con las anovulaciones observadas en modelos murinos y mujeres diabéticas (19, 21, 29, 30, 42). Sin embargo, esta afección también sugiere una asociación con la interrupción progresiva de la foliculogénesis que genera el SD, la cual se caracteriza por la reducción de folículos preovulatorios encargados de la ovulación. En respuesta a la disminución de dichos

folículos, observamos el incremento de folículos primordiales, de forma similar a lo reportado en mujeres diabéticas (19).

La interrupción de la foliculogénesis representa parte de las alteraciones que subyacen a la disfunción ovárica, pues genera la reducción de CL recién formados, la disminución de hormonas esteroides y la desregulación de la actividad cíclica ovárica. La baja frecuencia de CL recién formados que observamos puede ser asociada con la carencia de folículos preovulatorios que permitan su formación. Sin embargo, en las estructuras luteales también observamos hipertrofia en las células luteales, incremento de la vacuolación y la formación prematura de tejido conectivo (49). En conjunto estos signos histopatológicos son considerados como el reflejo de una alteración en la función del CL (58-60). Uno de los resultados de la falla funcional del CL puede ser determinado a través de su capacidad esteroidogénica. Es por ello que en concomitancia con la afección de las características histológicas del CL, así como en la disminución de la frecuencia de estructuras luteales recién formada observamos una disminución gradual de la concentración de progesterona, la cual resultó similar a estudios previos (28, 35, 61). Este resultado es de peculiar importancia, pues se ha asociado con el bajo índice de implantación y de gestación reportada en modelos murinos y mujeres diabéticas (35, 61-63).

Aunada a la disminución de progesterona, observamos que la cantidad de estradiol a partir de la segunda semana de tratamiento también se reduce. Lo anterior podría ser asociado al incremento de atresia, a la disminución de estructuras foliculares que realicen la esteroidogénesis o bien, a la desregulación hormonal provocada por la interrupción de la interacción entre insulina y las células de la teca y de la granulosa que surge por la condición diabética y que impide la regulación en la secreción de hormonas esteroides (13, 42).

Por último observamos la disrupción de la actividad cíclica ovárica, la cual consideramos un reflejo de la alteración en la foliculogénesis que conlleva a la disminución de hormonas esteroides que en condiciones fisiológicas regulan la ciclicidad (15). La alteración de la actividad cíclica se caracterizó por la presencia de diestro y proestro persistente. El diestro persistente observado en este trabajo es semejante al reportado previamente en otros estudios (50, 64), el cual indica un déficit reproductivo. Mientras que la presencia de proestro persistente presentado en menor proporción podría ser el reflejo de la carencia de cuerpos lúteos o bien de los quistes que genera la condición diabética. Finalmente observamos que en menor proporción, parte de las hembras diabéticas no presentaron alteración en los patrones de ciclicidad. Lo anterior resulta de suma importancia pues podría ser asociado a un menor daño reproductivo o bien a la variabilidad de la severidad hiperglucémica. Sin embargo, pese a que en este estudio dichas asociaciones no se buscaron, sería interesante su observación en futuros trabajos.

Nuestro modelo de SD inducido con STZ mostró una eficiencia similar a la descrita previamente (27, 29). El SD se caracterizó por un estado de hiperglucemia crónica que generó polidipsia y polifagia. Dichos signos clínicos son importantes, pues permitieron confirmar el establecimiento del SD. Además, hasta el momento no habían sido evaluados de forma consistente. Además de estos signos clínicos, observamos la pérdida de peso corporal, la cual podría generar parte de las alteraciones reproductivas, debido a que la disminución de tejido adiposo altera la señalización neuroendocrina del eje reproductor femenino y particularmente la actividad fisiológica del ovario (13). En este sentido resulta interesante pensar en el efecto que podría tener la hiperglucemia crónica durante un mayor tiempo de evaluación en la pérdida de peso corporal y su relación con la disfunción ovárica.

8. CONCLUSIONES

En el presente trabajo encontramos evidencia que sugiere una posible asociación entre la interrupción progresiva de la foliculogénesis y la disfunción ovárica provocadas por la condición diabética. La disfunción ovárica diabética se caracterizó por la carencia de CL recién formados, la reducción de hormonas esteroides y la alteración de la actividad cíclica ovárica. Dichas fallas podrían ser consecuencia, al menos en parte, de la alteración generada en la foliculogénesis, debido a la carencia de estructuras que realicen la esteroidogénesis y regulen la actividad cíclica ovárica. En general nuestro trabajo ofrece un sustrato para evaluar experimentalmente parte de la disfunción ovárica que afecta a la mujer diabética y que en general compromete su reproducción.

9. LITERATURA CONSULTADA

1. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*. 2011 Jul 2;378(9785):31-40. PubMed PMID: 21705069.
2. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiological reviews*. 2013 Jan;93(1):137-88. PubMed PMID: 23303908.
3. Rocca F, Plá JA. *Diabete mellitus: bases fisiológicas y fisiopatológicas para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la diabetes.*: Departamento de Publicaciones del Sindicato Médico del Uruguay; 1963.

4. Mathis D, Vence L, Benoist C. beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):792-8. PubMed PMID: 11742411.
5. Maiorino MI, Bellastella G, Esposito K. Diabetes and sexual dysfunction: current perspectives. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*. 2014;7:95-105. PubMed PMID: 24623985. Pubmed Central PMCID: 3949699.
6. Ziaei-Rad M, Vahdaninia M, Montazeri A. Sexual dysfunctions in patients with diabetes: a study from Iran. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010;8:50. PubMed PMID: 20482781. Pubmed Central PMCID: 2887879.
7. Salonia A, Lanzi R, Scavini M, Pontillo M, Gatti E, Petrella G, et al. Sexual function and endocrine profile in fertile women with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2006 Feb;29(2):312-6. PubMed PMID: 16443879.
8. Miocic J, Car N, Metelko Z. Sexual dysfunction in women with diabetes mellitus. *Diabetetologija Croatica*. 2008;37(2):35-40.
9. Maneesh M, Jayalakshmi H, Singh TA, Chakrabarti A. Impaired hypothalamic-pituitary-gonadal axis function in men with diabetes mellitus. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*. 2006 Mar;21(1):165-8. PubMed PMID: 23105591. Pubmed Central PMCID: 3453761.
10. Jovanovic L, Harrison RW, 3rd. Advances in diabetes for the millennium: diabetes in minorities. *MedGenMed : Medscape general medicine*. 2004;6(3 Suppl):2. PubMed PMID: 15647707. Pubmed Central PMCID: 1474825.
11. Homko CJ, Trout K. Women and diabetes. *The Nursing clinics of North America*. 2006 Dec;41(4):549-65. PubMed PMID: 17059974.
12. Dorman JS, Steenkiste AR, Foley TP, Strotmeyer ES, Burke JP, Kuller LH, et al. Menopause in type 1 diabetic women: is it premature? *Diabetes*. 2001 Aug;50(8):1857-62. PubMed PMID: 11473049.
13. Codner E, Merino PM, Tena-Sempere M. Female reproduction and type 1 diabetes: from mechanisms to clinical findings. *Human reproduction update*. 2012 Sep-Oct;18(5):568-85. PubMed PMID: 22709979.
14. Codner E, Cassorla F. Puberty and ovarian function in girls with type 1 diabetes mellitus. *Horm Res*. 2009 Jan;71(1):12-21. PubMed PMID: 19039232.
15. Arrais RF, Dib SA. The hypothalamus-pituitary-ovary axis and type 1 diabetes mellitus: a mini review. *Hum Reprod*. 2006 Feb;21(2):327-37. PubMed PMID: 16239312.
16. Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod*. 1994 Feb;50(2):225-32. PubMed PMID: 8142540. Epub 1994/02/01. eng.

17. Findlay JK, Kerr JB, Britt K, Liew SH, Simpson ER, Rosairo D, et al. Ovarian physiology: follicle development, oocyte and hormone relationships. *Animal Reproduction*. 2009;6(1):16-9.
18. Enzlin P, Mathieu C, Van den Bruel A, Bosteels J, Vanderschueren D, Demyttenaere K. Sexual dysfunction in women with type 1 diabetes: a controlled study. *Diabetes Care*. 2002 Apr;25(4):672-7. PubMed PMID: 11919123.
19. Codner E, Eyzaguirre FC, Iniguez G, Lopez P, Perez-Bravo F, Torrealba IM, et al. Ovulation rate in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Fertil Steril*. 2011 Jan;95(1):197-202, e1. PubMed PMID: 21122841.
20. Zarzycki W, Zieniewicz M. Reproductive disturbances in type 1 diabetic women *Neuro Endocrinol Lett*. 2005 2005;6(26):733-8.
21. Shabsigh R, Shah M, Sand M. Erectile dysfunction and men's health: developing a comorbidity risk calculator. *J Sex Med*. 2008 May;5(5):1237-43. PubMed PMID: 18439154.
22. Hassan MI, Kassim SK, Saeda L, Laban M, Khalifa A. Ovarian cancer-induced immunosuppression: relationship to tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) release from ovarian tissue. *Anticancer Res*. 1999 Nov-Dec;19(6C):5657-62. PubMed PMID: 10697636.
23. Shabsigh R, Kaufman JM, Steidle C, Padma-Nathan H. Randomized study of testosterone gel as adjunctive therapy to sildenafil in hypogonadal men with erectile dysfunction who do not respond to sildenafil alone. *J Urol*. 2008 May;179(5 Suppl):S97-S102. PubMed PMID: 18405769.
24. Shabsigh R, Arver S, Channer KS, Eardley I, Fabbri A, Gooren L, et al. The triad of erectile dysfunction, hypogonadism and the metabolic syndrome. *Int J Clin Pract*. 2008 May;62(5):791-8. PubMed PMID: 18266714. Pubmed Central PMCID: 2327081.
25. Strotmeyer ES, Steenkiste AR, Foley TP, Jr., Berga SL, Dorman JS. Menstrual cycle differences between women with type 1 diabetes and women without diabetes. *Diabetes Care*. 2003 Apr;26(4):1016-21. PubMed PMID: 12663566.
26. Jawerbaum A, White V. Animal models in diabetes and pregnancy. *Endocr Rev*. 2010 Oct;31(5):680-701. PubMed PMID: 20534704.
27. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001;50(6):537-46. PubMed PMID: 11829314. Epub 2002/02/07. eng.
28. Chabrolle C, Jeanpierre E, Tosca L, Rame C, Dupont J. Effects of high levels of glucose on the steroidogenesis and the expression of adiponectin receptors in rat ovarian cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 2008;6:11. PubMed PMID: 18353182. Pubmed Central PMCID: 2277425. Epub 2008/03/21. eng.
29. Vomachka MS, Johnson DC. Ovulation, ovarian 17 alpha-hydroxylase activity, and serum concentrations of luteinizing hormone, estradiol, and progesterone in immature rats with diabetes

mellitus induced by streptozotocin (41500). *Proc Soc Exp Biol Med.* 1982 Nov;171(2):207-13. PubMed PMID: 6217463. Epub 1982/11/01. eng.

30. Colton SA, Pieper GM, Downs SM. Altered meiotic regulation in oocytes from diabetic mice. *Biol Reprod.* 2002 Jul;67(1):220-31. PubMed PMID: 12080021. Epub 2002/06/25. eng.

31. Kim K, Kim CH, Moley KH, Cheon YP. Disordered meiotic regulation of oocytes by duration of diabetes mellitus in BBdp rat. *Reprod Sci.* 2007 Jul;14(5):467-74. PubMed PMID: 17913966. Epub 2007/10/05. eng.

32. Sinden JA, Longwell BB. Effect of alloxan diabetes on fertility and gestation in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1949 Apr;70(4):607-10. PubMed PMID: 18149445. Epub 1949/04/01. eng.

33. Bultrini A, Carosa E, Colpi EM, Poccia G, Iannarelli R, Lembo D, et al. Possible correlation between type 1 diabetes mellitus and female sexual dysfunction: case report and literature review. *J Sex Med.* 2004 Nov;1(3):337-40. PubMed PMID: 16422965.

34. Bogovich K, Clemons J, Poretsky L. Insulin has a biphasic effect on the ability of human chorionic gonadotropin to induce ovarian cysts in the rat. *Metabolism.* 1999 Aug;48(8):995-1002. PubMed PMID: 10459564.

35. Garris DR. Effects of diabetes on uterine condition, decidualization, vascularization, and corpus luteum function in the pseudopregnant rat. *Endocrinology.* 1988 Feb;122(2):665-72. PubMed PMID: 3276500. Epub 1988/02/01. eng.

36. Huth JR, Norton SE, Lockridge O, Shikone T, Hsueh AJ, Ruddon RW. Bacterial expression and in vitro folding of the beta-subunit of human chorionic gonadotropin (hCG beta) and functional assembly of recombinant hCG beta with hCG alpha. *Endocrinology.* 1994 Sep;135(3):911-8. PubMed PMID: 8070386.

37. Ziaei-Rad M, Vaamonde CA, Montazeri A. Sexual dysfunctions in patients with diabetes: a study from Iran *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2010;8:50.

38. Bitzer J, Alder J. Diabetes and female sexual health. *Women's health.* 2009 Nov;5(6):629-36. PubMed PMID: 19863466.

39. Enzlin P, Mathieu C, Demyttenaere K. Diabetes and female sexual functioning: a state-of-the-art. *Diabetes Spectrum* 2003;16:256-9.

40. Fraietta R, Zylberstejn DS, Esteves SC. Hypogonadotropic hypogonadism revisited. *Clinics.* 2013;68 Suppl 1:81-8. PubMed PMID: 23503957. Pubmed Central PMCID: 3583156.

41. Rabijewski M, Papierska L, Zgliczynski W, Piatkiewicz P. The incidence of hypogonadotropic hypogonadism in type 2 diabetic men in Polish population. *BioMed research international.* 2013;2013:767496. PubMed PMID: 24222915. Pubmed Central PMCID: 3810490.

42. Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Giudice LC. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev.* 1999 Aug;20(4):535-82. PubMed PMID: 10453357.
43. Chun SY, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafirri A, Hsueh AJ. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology.* 1994 Nov;135(5):1845-53. PubMed PMID: 7525255.
44. Hsueh AJ, Billig H, Tsafirri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev.* 1994 Dec;15(6):707-24. PubMed PMID: 7705278.
45. Gougeon A. Ovarian follicular growth in humans: ovarian ageing and population of growing follicles. *Maturitas.* 1998 Oct 12;30(2):137-42. PubMed PMID: 9871908.
46. Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci.* 2003 Oct 15;78(3-4):135-63. PubMed PMID: 12818642. Epub 2003/06/24. eng.
47. Schweiger B, Klingensmith GJ, Snell-Bergeon JK. Menarchal timing in type 1 diabetes through the last 4 decades. *Diabetes Care.* 2010 Dec;33(12):2521-3. PubMed PMID: 20843975. Pubmed Central PMCID: 2992181.
48. Schweiger BM, Snell-Bergeon JK, Roman R, McFann K, Klingensmith GJ. Menarche delay and menstrual irregularities persist in adolescents with type 1 diabetes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011;9:61. PubMed PMID: 21548955. Pubmed Central PMCID: 3100251.
49. Westwood FR. The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. *Toxicologic Pathology.* 2008 April 1, 2008;36(3):375-84.
50. Mirsky ML, Sivaraman L, Houle C, Potter DM, Chapin RE, Cappon GD. Histologic and cytologic detection of endocrine and reproductive tract effects of exemestane in female rats treated for up to twenty-eight days. *Toxicol Pathol.* 2011 Jun;39(4):589-605. PubMed PMID: 21540174.
51. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology.* 2002;62:609-14.
52. Hirshfield AN, Midgley AR, Jr. Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biol Reprod.* 1978 Oct;19(3):597-605. PubMed PMID: 363183. Epub 1978/10/01. eng.
53. Quirk SM, Cowan RG, Harman RM, Hu CL, Porter DA. Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Sci.* 2004;82 E-Suppl:E40-52. PubMed PMID: 15471814.
54. Kaipia A, Hsueh AJ. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol.* 1997;59:349-63. PubMed PMID: 9074768.

55. Cheng PP, Xia JJ, Wang HL, Chen JB, Wang FY, Zhang Y, et al. Islet transplantation reverses the effects of maternal diabetes on mouse oocytes. *Reproduction*. 2011 Apr;141(4):417-24. PubMed PMID: 21273367.
56. Navarro VM, Sanchez-Garrido MA, Castellano JM, Roa J, Garcia-Galiano D, Pineda R, et al. Persistent impairment of hypothalamic KiSS-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation. *Endocrinology*. 2009 May;150(5):2359-67. PubMed PMID: 19106226.
57. Blades RA, Bryant KR, Whitehead SA. Feedback effects of steroids and gonadotrophin control in adult rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1985 Jun;28(6):348-54. PubMed PMID: 3899819.
58. Taketa Y, Inoue K, Takahashi M, Yamate J, Yoshida M. Differential morphological effects in rat corpora lutea among ethylene glycol monomethyl ether, atrazine, and bromocriptine. *Toxicol Pathol*. 2013 Jul;41(5):736-43. PubMed PMID: 23076038.
59. Taketa Y, Inomata A, Hosokawa S, Sonoda J, Hayakawa K, Nakano K, et al. Histopathological characteristics of luteal hypertrophy induced by ethylene glycol monomethyl ether with a comparison to normal luteal morphology in rats. *Toxicol Pathol*. 2011 Feb;39(2):372-80. PubMed PMID: 21422263.
60. Yoshida M, Sanbuissyo A, Hisada S, Takahashi M, Ohno Y, Nishikawa A. Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. *J Toxicol Sci*. 2009;34 Suppl 1:SP189-97. PubMed PMID: 19265285.
61. Garris DR, Whitehead DS, Morgan CR. Effects of alloxan-induced diabetes on corpus luteum function in the pseudopregnant rat. *Diabetes*. 1984 Jul;33(7):611-5. PubMed PMID: 6376216. Epub 1984/07/01. eng.
62. Becerra JE, Khoury MJ, Cordero JF, Erickson JD. Diabetes mellitus during pregnancy and the risks for specific birth defects: a population-based case-control study. *Pediatrics*. 1990 Jan;85(1):1-9. PubMed PMID: 2404255.
63. Codner E, Soto N, Merino PM. Contraception, and pregnancy in adolescents with type 1 diabetes: a review. *Pediatr Diabetes*. 2012 Feb;13(1):108-23. PubMed PMID: 21995767.
64. Castellano JM, Navarro VM, Roa J, Pineda R, Sanchez-Garrido MA, Garcia-Galiano D, et al. Alterations in hypothalamic KiSS-1 system in experimental diabetes: early changes and functional consequences. *Endocrinology*. 2009 Feb;150(2):784-94. PubMed PMID: 18845637.