



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS MORFOFISIOLÓGICOS EN
OVARIOS DE RATA *Wistar* POR UNA DIETA ALTA EN GRASA Y
SU RELACIÓN CON LA INFERTILIDAD**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

BRENDA CAROLINA LIRA GONZÁLEZ



CD. MX.

2021



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
VOCAL: DRA. ILIANA ELVIRA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ
SECRETARIO: DR. JOSE RENE ESCALONA MUGICA
1er. SUPLENTE: DRA. LIDYA SUMIKO MORIMOTO MARTÍNEZ
2° SUPLENTE: DR. EDGAR RICARDO VÁZQUEZ MARTÍNEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE EMBRIOLOGÍA Y GENÉTICA,
FACULTAD DE MEDICINA, U.N.A.M.

ASESOR DEL TEMA:

DR. JOSE RENE ESCALONA MUGICA

SUSTENTANTE (S):

BRENDA CAROLINA LIRA GONZÁLEZ

Nada en este mundo debe ser temido, sólo comprendido. Ahora es el momento de comprender más, para que podamos temer menos.

Marie Curie.

Cuando el objetivo te parezca difícil, no cambies de objetivo, busca un nuevo camino para llegar a él.

Confucio.

DEDICATORIAS

Con profundo agradecimiento, por ser mi principal soporte, guía y compañía. Han sido una pieza esencial en todo este proceso y más:

A mis padres, Ernesto Lira y Rocío González; a mi hermana, Daniela Lira; a mi mejor amiga, Fer Colín; a Jorge Isaac; a mi familia y amigos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, por brindarme formación humana y académica, así como por ser un segundo hogar.

Al equipo de investigación del Departamento de Embriología y Genética de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M.; por abrirme las puertas de su laboratorio, por el apoyo, las enseñanzas y las facilidades otorgadas.

Al Dr. Jose Rene Escalona Mugica, por su asesoramiento, su apoyo, sus consejos y sus enseñanzas.

A los integrantes del H. Jurado, por su cuidadosa revisión y gratas sugerencias del presente trabajo.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la U.N.A.M. IA205321.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
ÍNDICE DE ANEXOS.....	III
ABREVIATURAS.....	IV
GLOSARIO.....	V
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	IX
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1 Obesidad.....	1
1.1.1 Definición.....	1
1.1.2 Evaluación del grado de obesidad.....	2
1.1.3 Estudio de la obesidad en modelos murinos.....	4
1.1.4 Epidemiología.....	6
1.2 Ovario.....	10
1.2.1 Definición y morfología.....	10
1.2.2 Fisiología.....	11
1.2.3 Ciclo ovárico y ciclo estral.....	11
1.2.4 Desarrollo folicular.....	15
1.3 Control hormonal de la reproducción.....	21
1.3.1 Insulina.....	21
1.3.2 Leptina.....	22
1.3.3 Eje hipotálamo-hipófisis-ovario.....	24
1.4 Infertilidad femenina y su relación con la obesidad.....	25
1.5 Alteraciones del perfil hormonal a causa de la obesidad.....	26
1.5.1 Insulina.....	27
1.5.2 Leptina.....	28
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29

3. HIPÓTESIS.....	30
4. OBJETIVOS.....	30
4.1 Objetivo general.....	30
4.2 Objetivos particulares.....	30
5. METODOLOGÍA.....	31
5.1 Diseño experimental.....	31
5.2 Material biológico.....	32
5.3 Evaluación de las dietas altas en grasa.....	32
5.4 Dieta administrada.....	33
5.5 Ganancia de peso corporal y consumo de alimento.....	34
5.6 Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal.....	36
5.7 Prueba de sensibilidad a la insulina intraperitoneal.....	36
5.8 Análisis anatómico.....	37
5.9 Disección, resección de tejidos y colecta de sangre.....	37
5.10 Obtención de plasma.....	38
5.11 Cuantificación de lípidos en plasma.....	39
5.11.1 Cuantificación de colesterol total.....	39
5.11.2 Cuantificación de triacilgliceroles.....	40
5.12 Procesamiento histológico del ovario.....	41
5.13 Caracterización histológica del ovario.....	42
5.13.1 Conteo de estructuras ováricas.....	42
5.13.2 Análisis morfométrico del ovario.....	44
5.14 Apareamiento y determinación de la fertilidad y la fecundidad.....	44
5.15 Análisis estadístico.....	45
5.16 Paquetería informática.....	45
6. RESULTADOS.....	46
6.1 Ganancia de peso corporal y consumo de alimento.....	46

6.2 Metabolismo de los hidratos de carbono.....	50
6.3 Análisis anatómico y composición corporal.....	52
6.4 Metabolismo de lípidos.....	54
6.5 Caracterización histológica del ovario.....	55
6.6 Efecto de la dieta HFD en la fertilidad y en la fecundidad.....	58
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	60
8. CONCLUSIONES.....	68
9. PERSPECTIVAS.....	69
10. REFERENCIAS.....	70
11. ANEXOS.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
Figura 1. Porcentaje de la población adulta con obesidad en el mundo del año 1975 al 2016 (Gráfico extraído y modificado de: Ritchie-Roser, 2019. Datos: WHO, Global Health Observatory).	7
Figura 2. Porcentaje de la prevalencia de obesidad en mujeres adultas de 1975 a 2016 (Gráfico extraído de: Ritchie-Roser, 2019. Datos: WHO, Global Health Observatory).	8
Figura 3. Porcentaje de la población mayor de 20 años con sobrepeso y obesidad en 2012 y 2018 (Gráfico y datos: ENSANUT, 2018).	10
Figura 4. Ciclo ovárico y ciclo endometrial (Imagen extraída y modificada de: Mesiano-Jones, 2017).	12
Figura 5. Cambios hormonales y citológicos del epitelio vaginal durante el ciclo estral de roedores (Imagen extraída y modificada de: McLean <i>et al.</i> , 2012).	15
Figura 6. Estructuras del aparato reproductor femenino y estructuras internas del ovario.	16
Figura 7. Principales estructuras de un folículo ovárico. A. Ovocito, B. Zona pelúcida, C. Células de la granulosa, D. Células de la teca. Imagen de un corte de ovario de rata teñido con HE visto a 40X y capturada con una cámara VGA través del lente ocular.	17
Figura 8. Regulación hormonal del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario.	25
Figura 9. Reacciones químicas llevadas a cabo durante la determinación de colesterol total en plasma.	40
Figura 10. Reacciones químicas llevadas a cabo durante la determinación de triacilgliceroles en plasma.	41

CONTENIDO	PÁGINA
Figura 11. Representación de los cortes obtenidos del ovario.	42
Figura 12. Representación del conteo de folicular por ovario.	43
Figura 13. Evaluación semanal del peso corporal durante el tratamiento.	47
Figura 14. Evaluación semanal del consumo de energía durante el tratamiento.	50
Figura 15. Metabolismo de los hidratos de carbono.	51
Figura 16. Figura representativa de los animales a las 18 semanas.	52
Figura 17. Tejido adiposo.	54
Figura 18. Caracterización histológica del ovario.	56
Figura 19. Efecto de la dieta alta en grasa en el ovario.	57
Figura 20A. Determinación de la fertilidad.	58
Figura 20B. Determinación de la fecundidad.	59
Figura A1. Evaluación semanal del consumo de energía.	82
Figura A2. Peso absoluto expresado en gramos.	83
Figura A3. Concentración de glucosa en ayuno expresada en mg/ dL a las 18 semanas de tratamiento.	83
Figura A4. Curva de tolerancia a la glucosa vía intraperitoneal a las 18 semanas de tratamiento.	84
Figura A5. Curva de tolerancia a la insulina vía intraperitoneal a las 18 semanas de tratamiento.	85

ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINA
Tabla 1. Puntos de corte aplicados por la OMS para la clasificación de sobrepeso y obesidad.	3
Tabla 2A. Características presentes en las diferentes estructuras que conforman el ovario.	18
Tabla 2B. Características presentes en las diferentes estructuras que conforman el ovario (continuación).	19
Tabla 3. Características nutrimentales de las dietas formuladas.	33
Tabla 4. Composición nutrimental de las dietas administradas.	34
Tabla 5. Formulación de la dieta alta en grasa.	34
Tabla 6. Análisis anatómico de los grupos experimentales.	53
Tabla 7. Resultados de la determinación de TAG y CT a las 18 semanas de tratamiento.	55

ÍNDICE DE ANEXOS

CONTENIDO	PÁGINA
Anexo I. Dietas administradas.	82
Anexo II. Procedimiento para la elaboración de la dieta alta en grasa.	86
Anexo III. Composición química del alimento empleado para el grupo control, Laboratory Rodent Diet 5001, LabDiet.	87
Anexo IV. Reactivos y procedimiento empleado para el procesamiento histológico del ovario.	88

ABREVIATURAS

4-AA: 4-aminoantipirina	HHO: Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario
ADP: Adenosin difosfato	IL: Índice de Lee
AGI: Ácidos grasos insaturados	IMC: Índice de masa corporal
AGS: Ácidos grasos saturados	IPGTT: Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (por sus siglas en inglés)
ATP: Adenosin trifosfato	ITT: Prueba de sensibilidad a la insulina (por sus siglas en inglés)
CE: Colesterol esterasa	LH: Hormona Luteinizante
CG: Células de la granulosa	LPL: Lipoprotein lipasa
CL: Cuerpo Lúteo	PBS: Amortiguador de fosfato salino
CO: Colesterol oxidasa	PFA: Paraformaldehído
CT: Colesterol total	POD: Peroxidasa
CTR: Grupo control	Q: Quiste
DHAP: Dihidroxiacetona fosfato	SEM: Error estándar de la media, por sus siglas en inglés (standar error of the mean)
FAn: Folículo antral	SHBG: Globulina de unión a hormonas sexuales
FAttr: Folículo atrésico	SOP: Síndrome de Ovario Poliquístico
FP: Folículo primario	SPN: Semanas postnatales
FPr: Folículo primordial	TAG: Triacilgliceroles
FS: Folículo secundario	TAPP: Tejido adiposo peripancreático
FSH: Hormona folículoestimulante	TASC: Tejido adiposo subcutáneo
FT: Folículo terciario	TASG: Tejido adiposo supragonadal
G-3P: Glicerol-3-fosfato	TAV: Tejido adiposo visceral
GK: Glicerol cinasa	VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad (por sus siglas en inglés)
GLUT 4: Transportador de glucosa 4	
GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina	
GPO: Glicerofosfato oxidasa	
GT: Grasa total	
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno	
HE: Hematoxilina-Eosina	
HFD: Dieta Alta en Grasa (por sus siglas en inglés).	

GLOSARIO

- I. **Azoospermia:** Ausencia de espermatozoides en la eyaculación (Zegers *et al.*, 2017).
- II. **Celo:** Calor sexual inducido por una serie de hormonas, principalmente por la progesterona (Pfaus *et al.*, 2015).
- III. **Comorbilidad:** Implica la presencia de dos o más trastornos dentro de un solo individuo. Este término se usa comúnmente cuando los trastornos coexisten a tasas más altas de lo esperado de la tasa base de cada trastorno (Holmbeck *et al.*, 1999).
- IV. **Epidemiología:** Estudio de la distribución y los determinantes de estados o eventos (en particular de enfermedades) relacionados con la salud y la aplicación de esos estudios al control de enfermedades y otros problemas de salud (OMS, 2019/A).
- V. **Fecundidad:** En humanos, se refiere a la cantidad de hijos que puede tener una mujer en su vida fértil (Fuentes, 2010). Clínicamente se define como la capacidad de llevar a cabo un embarazo a término (Zegers *et al.*, 2017).
- VI. **Fertilidad:** Es la capacidad de establecer clínicamente un embarazo (Zegers *et al.*, 2017).
- VII. **Hirsutismo:** Padecimiento que se caracteriza por una proliferación capilar excesiva dependiente de andrógenos y con un patrón masculino, afecta a cerca del 10% de las mujeres. La mayor parte de los casos es una consecuencia del exceso de andrógenos (Ehrmann, 2016).
- VIII. **Incidencia:** Representa el número de casos nuevos de una enfermedad en un lugar determinado y durante un tiempo particular (Ward, 2013).
- IX. **Infertilidad:** Enfermedad del sistema reproductivo definida como la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales no protegidas (OMS, 2010).

- X. *Oligoovulación:*** Se define como ciclos menstruales con una duración mayor a 35 días, lo cual equivale a 10 o menos ciclos por año (Azziz, 2018).
- XI. *Oligozoospermia:*** Concentración de espermatozoides por debajo del límite inferior de referencia en la eyaculación. Al informar los resultados, se deben especificar los criterios de referencia (Zegers *et al.*, 2017).
- XII. *Polimorfismo:*** Variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población. Para que verdaderamente pueda considerarse como un polimorfismo, la variación fenotípica debe aparecer al menos en el 1% de la población (NIH, 2019).
- XIII. *Prevalencia:*** Medida de una enfermedad en una población, un lugar y un momento particular, se representa en un recuento del número de personas afectadas (Ward, 2013).
- XIV. *Vitelo:*** Sustancias nutritivas de reserva que se acumulan durante el proceso de oogénesis (Uribe, 2002).

RESUMEN

La obesidad es una de las enfermedades de mayor prevalencia^{xiii} en México y el mundo. El aumento de peso en dicho padecimiento, específicamente en tejido adiposo, incrementa el riesgo de padecer otro tipo de enfermedades, tales como: diabetes tipo II, algunos tipos de cáncer, hipertensión, síndrome metabólico, enfermedades en el sistema reproductivo, entre otros.

Haciendo referencia al tema de la reproducción, el exceso de tejido adiposo genera cambios fisiológicos y morfológicos en los ovarios, lo cual se traduce en una disminución de su capacidad reproductiva. Actualmente, existen algunos estudios llevados a cabo en animales, acerca de la relación entre la obesidad y la infertilidad^{ix} femenina; sin embargo, las dietas administradas varían en cuanto al tipo de grasa añadida y a la cantidad, mostrando efectos diferentes en los ovarios. Es por ello que en el presente trabajo se empleó una dieta alta en grasa (HFD) formulada dentro de nuestro equipo de investigación, cuyo objetivo principal fue caracterizar sus efectos en la morfofisiología de ovarios de ratas *Wistar*, así como en su capacidad reproductiva.

Para ello, se trabajó con ratas *Wistar* de 4 semanas postnatales, las cuales se dividieron en dos grupos de acuerdo a la dieta asignada: dieta control (CTR, 4.1 kcal/g) y dieta alta en grasa (HFD, 5.82 kcal/g). Las dietas se administraron durante 18 semanas; en este periodo de tiempo se llevó a cabo un registro semanal del consumo de alimento y la ganancia de peso corporal. Al término del tratamiento se evaluó el peso corporal, la talla, el índice de Lee, la glucemia en ayuno, el peso de los depósitos de tejido adiposo y de los ovarios. Asimismo, se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa intraperitoneal y de sensibilidad a la insulina, así como, un análisis bioquímico en plasma para la cuantificación de triacilgliceroles y colesterol. El tejido ovárico fue sometido a un análisis morfométrico cuantitativo para determinar cambios histológicos; específicamente, se caracterizaron los cambios en el número y proporción de los diferentes tipos de folículos, así como el número de cuerpos lúteos.

Finalmente, se observó el efecto de la dieta en la fertilidad^{VI} y en la fecundidad^V de los animales. Los resultados de este trabajo revelaron que la dieta alta en grasa ocasionó cambios en la composición corporal y alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono en el grupo HFD, además de ocasionar el desarrollo de quistes en los ovarios y una reducción en el porcentaje de concepción y el tamaño de camada. En conclusión, la obesidad inducida por la dieta HFD ocasionó cambios en la morfofisiología de los ovarios de hembras obesas, conduciendo a alteraciones en la fertilidad y fecundidad del modelo experimental, con lo cual, se comprueba la hipótesis del presente trabajo.

ABSTRACT

Obesity is one of the most prevalent diseases in Mexico and the world. Excessive weight gain caused by an increase in adipose tissue increases the predisposition to other diseases, such as type II diabetes, some types of cancer, hypertension, metabolic syndrome, and reproductive anomalies, among others.

Some research groups have reported that the excess of adipose tissue generates morphological and physiological changes in the ovaries, which lead to an impaired fertility. There are currently some animal models studies regarding the relationship between obesity and female infertility; however, the diets used vary in terms of amount and source of the fats employed, showing different effects on the ovaries. That is why in the present work, a high-fat diet (HFD) formulated by our research group was used, whose principal aim was to characterize its effects on the ovarian morphophysiology of Wistar rats, as well as on their reproductive capacity.

For this study, 4 week-old *Wistar* rats were used. The rats were divided into two groups: control diet (CTR, 4.1 kcal/g) and high fat diet (HFD, 5.82 kcal/g), the diets were administered *ad libitum* for 18 weeks. During this period, a weekly record of caloric intake and body weight gain was kept. At the end of the treatment period, body weight, length, fasting plasma glucose, adipose tissue weight and ovarian weight were recorded. Additionally, an intraperitoneal glucose tolerance test and an insulin sensitivity test were performed; as well as, assays for triacylglycerols and cholesterol levels. Ovarian tissue underwent histological analysis on paraffin sections; morphological changes and variations in follicle and corpora lutea numbers were assessed. Finally, the effect of diet on fertility and fecundity was observed. The results of this work showed that the high-fat diet caused changes in body composition and alterations in carbohydrate metabolism in the HFD group. In addition to causing the development of cysts and a reduction in the percentage of pregnancies and litter size. In conclusion, HFD induced obesity caused changes in the morphophysiology of the ovaries of obese females, leading to alterations in fertility and fecundity of the experimental model; thus, proving the hypothesis of this study.

1. ANTECEDENTES

1.1 OBESIDAD

1.1.1 Definición

La obesidad es una enfermedad multifactorial caracterizada por un balance positivo de energía que ocasiona una acumulación excesiva de grasa corporal y con ello, ganancia de peso corporal (INSP, 2018; OMS, 2019/B). Padecer obesidad está estrechamente relacionado con un mayor riesgo a desarrollar: diabetes mellitus, resistencia a la insulina, algunos tipos de cáncer, dislipoproteinemias, hipertensión, aterosclerosis, alteraciones psicosociales, síndrome metabólico, así como diversos desórdenes reproductivos (Oldknow *et al.*, 2015; Triantafyllou *et al.*, 2016).

La naturaleza de los riesgos para la salud relacionados con la obesidad, es similar en todas las poblaciones, aunque el nivel específico de riesgo asociado con un determinado nivel de sobrepeso u obesidad puede variar según la etnia, la edad, el género y las condiciones sociales (NIH, 1998/B).

Entre los factores principales sobre los que existe suficiente evidencia científica como causantes del peso excesivo destacan: una alimentación inadecuada y el sedentarismo. Sin embargo, también diversas mutaciones genéticas están asociadas, principalmente algunos desórdenes congénitos causantes de hiperfagia (Rodríguez-Correa *et al.*, 2020). Además, en otras observaciones epidemiológicas se ha encontrado que un mal estado de nutrición, no solo la desnutrición sino también la sobrenutrición, durante la vida intrauterina y postnatal temprana aumenta la susceptibilidad a las alteraciones metabólicas en la vida adulta al actuar durante un período crítico del desarrollo (Velkoska-Morris, 2011).

Entre las alteraciones moleculares asociadas a la obesidad, se incluyen una alteración en la capacidad oxidativa y un estado redox celular alterado; ocasionando una disfunción en: la señalización a la insulina, el transporte de glucosa y en la lipólisis generando, de esta manera, una afectación en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono, entre otros (Rodríguez-Correa *et al.*, 2020).

Por otro lado, algunos de los factores que protegen contra la obesidad son la práctica regular de actividad física, la ingestión de una dieta hipoenergética y la lactancia materna (INSP, 2018).

1.1.2 Evaluación del grado de obesidad

En la práctica clínica, la grasa corporal es estimada comúnmente por una fórmula que relaciona la masa corporal y la talla. La suposición subyacente es que, dentro de la población general, la mayoría de las variaciones en el peso de personas con la misma talla es debido a la masa grasa. La fórmula usada con mayor frecuencia en estudios epidemiológicos es el índice de masa corporal (IMC), la única limitante que tiene dicha medición es que no hace distinción alguna entre la masa grasa y la masa magra (Kopelman, 2018). A continuación, se presenta la ecuación correspondiente al cálculo del IMC:

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso corporal [kg]}}{(\text{Talla})^2 [\text{m}]} \quad \text{Ecuación 1}$$

La epidemiología de la obesidad resultó difícil de estudiar durante muchos años porque varios países tenían criterios específicos para clasificar los diferentes grados de sobrepeso. Sin embargo, gradualmente durante la década de 1990, el índice de masa corporal se convirtió en una medida universalmente aceptada del grado de sobrepeso; ahora se recomiendan puntos de corte idénticos (Seidell y Rissanen, 2019). En la **Tabla 1** se observan los puntos de corte aplicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el caso de los adultos (OMS, 2000).

Tabla 1. Puntos de corte aplicados por la OMS para la clasificación de sobrepeso y obesidad.

IMC	Clasificación de la OMS	Descripción popular	Riesgo asociado a la salud
<18.5	Bajo peso	Delgado	Bajo (pero incrementa el riesgo de otros problemas clínicos)
18.5-24.9	Peso normal	Delgado saludable	Promedio
25.0-29.9	Sobrepeso	Sobrepeso	Incrementado
30.0-34.9	Obesidad grado I	Obeso	Incremento moderado
35.0-39.9	Obesidad grado II	Obeso	Incremento severo
40 o más	Obesidad grado III	Obeso mórbido	Severamente incrementado

Algunas de las ventajas que presenta la evaluación del sobrepeso y la obesidad mediante el IMC es que la medición resulta fácil, económica y no invasiva; además, es aplicable en un contexto global. Es decir, es posible usarlo para comparar distintas áreas a nivel geográfico, diferentes subgrupos de una población y a lo largo del tiempo (Kopelman, 2018).

Algunas investigaciones realizadas en la última década han sugerido que, para una clasificación precisa del sobrepeso y la obesidad con respecto a los riesgos para la salud, se debe tener en cuenta la distribución de grasa abdominal. Tradicionalmente, esto ha sido asociado a un valor relativamente alto de la relación entre la circunferencia de la cintura y de la cadera (Seidell y Rissanen, 2019). En 1998, los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (Instituto Nacional del Corazón, de los Pulmones y la Sangre) adoptaron la clasificación de IMC y la combinaron con los puntos de corte de la cintura. Bajo esta clasificación, la combinación de sobrepeso y obesidad moderada, con una circunferencia de cintura grande (≥ 102 cm en hombres o ≥ 88 cm en mujeres) conlleva un riesgo adicional en la salud (NIH, 1998/B).

Existe una estrecha relación entre el IMC y la incidencia^{VIII} de varias condiciones causadas por un exceso de tejido adiposo: síndrome metabólico, osteoartritis y algunos tipos de cáncer (Kopelman, 2018). Asimismo, se asocia con complicaciones durante el embarazo, irregularidades menstruales, hirsutismo^{VII} y trastornos psicológicos como la depresión (NIH, 1998/B).

1.1.3 Estudio de la obesidad en modelos murinos

El esfuerzo global por reducir la prevalencia de la obesidad se ha traducido en la promoción de una dieta sana y en el incremento de la actividad física entre la población, aunado a la adopción de buenos hábitos para un estilo de vida saludable. A la par, la investigación científica es fundamental para comprender los múltiples factores involucrados en la epidemiología de la obesidad, así como para desarrollar e identificar nuevas estrategias genéticas, terapéuticas y de prevención (Oldknow *et al.*, 2015).

Los modelos murinos ofrecen uno de los mejores modelos animales para el estudio de muchas de las enfermedades que afectan al ser humano; tales como los desórdenes en el metabolismo de lípidos, la diabetes mellitus y la obesidad. Adicionalmente, gracias a diversas herramientas de genética y genómica, actualmente se conoce la secuencia del genoma de la rata, así como del humano; esto permite la extrapolación de los resultados, dado el parecido de secuencias entre ambos. Por otro lado, por su tamaño y su tiempo intergeneracional relativamente corto, a diferencia de otros modelos experimentales, se facilita su manipulación, la capacidad de controlar y estandarizar los factores ambientales y de realizar estudios a través de múltiples generaciones (Hedrich, 2000; Oldknow *et al.*, 2015). La simulación de los procesos metabólicos en modelos experimentales ayuda a conocer los mecanismos por los cuales surge una enfermedad y de esta manera, poder dar paso al desarrollo de tratamientos alternativos y a nuevas líneas de investigación.

Para el estudio de la obesidad en un modelo murino, es necesario realizar mediciones repetidas en los mismos individuos, debido a esto, es ideal contar con alguna metodología que proporcione ventajas como las que ofrece el IMC, ya que la cuantificación precisa y no invasiva del tejido adiposo, resulta importante. Sin embargo, el IMC es una medición que aún no ha sido validada para evaluar el grado de obesidad en animales (Thibault, 2013); Milton Lee estableció una ecuación (**Ecuación 2**) que relaciona al igual que el IMC; el peso corporal y la talla, indicando que valores superiores a 0.31 son indicadores de obesidad, este indicador es conocido como índice de Lee (IL) (Thibault, 2013).

$$IL = \frac{\sqrt[3]{\text{Peso corporal [g]}}}{\text{Talla [cm]}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Del mismo modo que en humanos, en la investigación científica se han empleado instrumentos más sofisticados para evaluar el grado de obesidad, éstos funcionan mediante la absorciometría dual de rayos X o la pletismografía por desplazamiento de aire y con ellos es posible medir la masa grasa, la masa muscular y también la masa mineral esquelética (Costa *et al.*, 2015).

Muchos investigadores establecen arbitrariamente la obesidad en su modelo mediante la comparación del porcentaje de tejido adiposo entre el grupo alimentado con una dieta alta en grasa y el grupo control (Woods *et al.*, 2013). Sin embargo, aunque el tejido adiposo es un órgano de depósito múltiple tanto en humanos como en roedores, existen diferencias anatómicas y fisiológicas que deben tenerse en cuenta (Chusyd *et al.*, 2016).

Al igual que en humanos, el consumo excesivo de comida en ratas genera un incremento del peso corporal y la adiposidad. Sin embargo, en los roedores existe cierta variabilidad en cuanto a su susceptibilidad a la obesidad inducida por una dieta alta en grasa; puesto que, no sólo depende de la composición de la dieta, sino también de aspectos biológicos como el sexo, la edad y la raza del animal, así como de variables técnicas, como la duración del periodo de alimentación

con la dieta, el acceso a la comida (libre o restringido), el momento de alimentación durante el ciclo circadiano, entre otros (Pérez-Leighton *et al.*, 2020).

Las ratas de la cepa *Zucker, Koletsky y Otsuka Long Evans Tokushima* desarrollan la obesidad fácilmente debido a que son animales con desórdenes monogénicos, ya que presentan mutaciones en el receptor de leptina; sin embargo, la obesidad en humanos es el resultado de la actividad integrada de numerosos genes, cada uno de los cuales lleva un factor de riesgo; además, que los factores del medioambiente (dieta y actividad física) tienen un papel central. Es por ello que, para el estudio de la obesidad humana es recomendable emplear animales genéticamente intactos y expuestos a entornos obesogénicos, tales como el consumo de dietas altas en grasa (Lutz-Woods, 2012).

Entre las cepas de ratas poligénicas mayormente empleadas para el estudio de la obesidad humana se encuentran: la cepa *Wistar*, la cual, presenta comorbilidades^{III} como resistencia a la insulina, hiperinsulinemia y dislipidemia (Pérez-Leighton *et al.*, 2020) y la cepa *Sprague-Dawley*, la cual se caracteriza por el desarrollo de hipertensión e hiperglucemia; sin embargo, estas características se observan en un menor tiempo de exposición a la dieta en la cepa *Wistar* (Marques *et al.*, 2015).

1.1.4 Epidemiología ^{IV}

La obesidad se ha convertido a lo largo del tiempo en un problema de salud pública a nivel mundial. Una hipótesis para explicar la rapidez con la que se ha extendido la epidemia de la obesidad en humanos en los últimos 30 a 40 años es la posibilidad de que nuestros sistemas reguladores se vean sobrepasados por la amplia disponibilidad de alimentos apetitosos de alta densidad energética (Speakman *et al.*, 2008).

En el año 2016, la Organización Mundial de la Salud estimó que el 13% de la población mundial era obesa y dichas cifras se han triplicado desde 1975 (Figura 1). De acuerdo con ese estudio, más de 1,900 millones de adultos tenían sobrepeso y obesidad (aproximadamente el 39% de la población adulta mundial) y, de estos, más de 650 millones presentaban algún grado de obesidad (OMS, 2019/B).

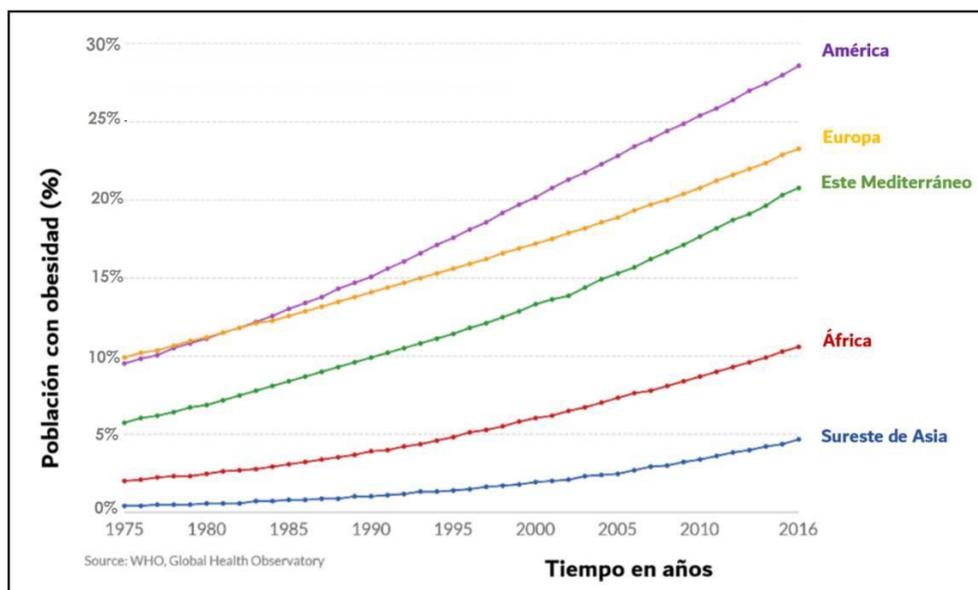


Figura 1. Porcentaje de la población adulta con obesidad en el mundo del año 1975 al 2016 (Gráfico extraído y modificado de: Ritchie-Roser, 2019. Datos: WHO, Global Health Observatory).

Por otro lado, se observó un marcado incremento en la prevalencia de obesidad en mujeres adultas de 1975 a 2016, principalmente en países como: Estados Unidos, México, Chile, Uruguay, Australia, Irán, Arabia Saudita, Egipto, Nueva Zelanda, Libia, Sudáfrica y Turquía (Ritchie-Roser, 2019) (**Figura 2**). Asimismo, al categorizar por sexos, la prevalencia de obesidad masculina incrementó del 6% al 22%, mientras que la obesidad femenina se incrementó del 13% al 32% en México (Jaacks *et al.*, 2019). De hecho, la incidencia de obesidad en mujeres, ha sido superior de forma constante en comparación con las cifras de obesidad en hombres, tanto a nivel mundial como nacional (ENSANUT, 2016; ENSANUT, 2018; Jaacks *et al.*, 2019; Ritchie-Roser, 2019).

La susceptibilidad femenina relacionada con enfermedades como la obesidad, parece estar influenciada por el cromosoma sexual, así como por las hormonas sexuales. Esto último debido a que tienen fuertes efectos en el metabolismo, almacenamiento y diferenciación del tejido adiposo, dependiendo en gran medida de los niveles de receptores de estrógeno y andrógeno hormonales (Zore *et al.*, 2018).

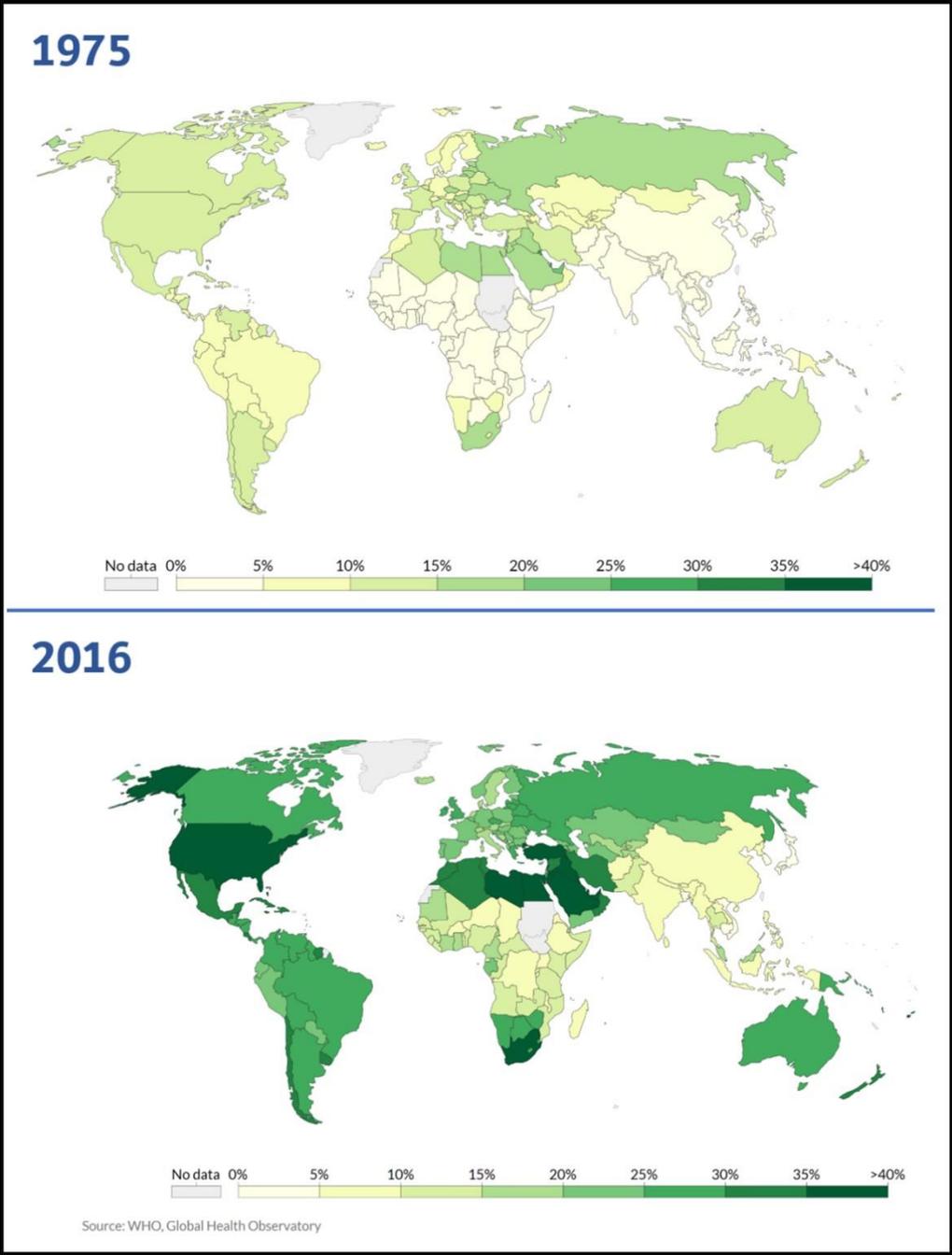


Figura 2. Porcentaje de la prevalencia de obesidad en mujeres adultas de 1975 a 2016 (Gráfico extraído de: Ritchie-Roser, 2019. Datos: WHO, Global Health Observatory).

Debido al incremento de este padecimiento en las últimas tres décadas, actualmente México es uno de los países con mayor prevalencia de obesidad en el mundo (INSP, 2018). Los datos de la última Encuesta Nacional de Salud y Nutrición mostraron que alrededor del 75.2% de la población adulta padece sobrepeso (39.1%) y obesidad (36.1%), lo que equivale aproximadamente a más de 62 millones de personas a nivel nacional, dicho porcentaje fue de 71.3% en 2012 (ENSANUT, 2018).

Asimismo, al categorizar por sexos los datos de dicha encuesta, se observa que la prevalencia de sobrepeso y obesidad es mayor en las mujeres (76.8%) que en los hombres (73.0%) (ENSANUT, 2018) (**Figura 3**).

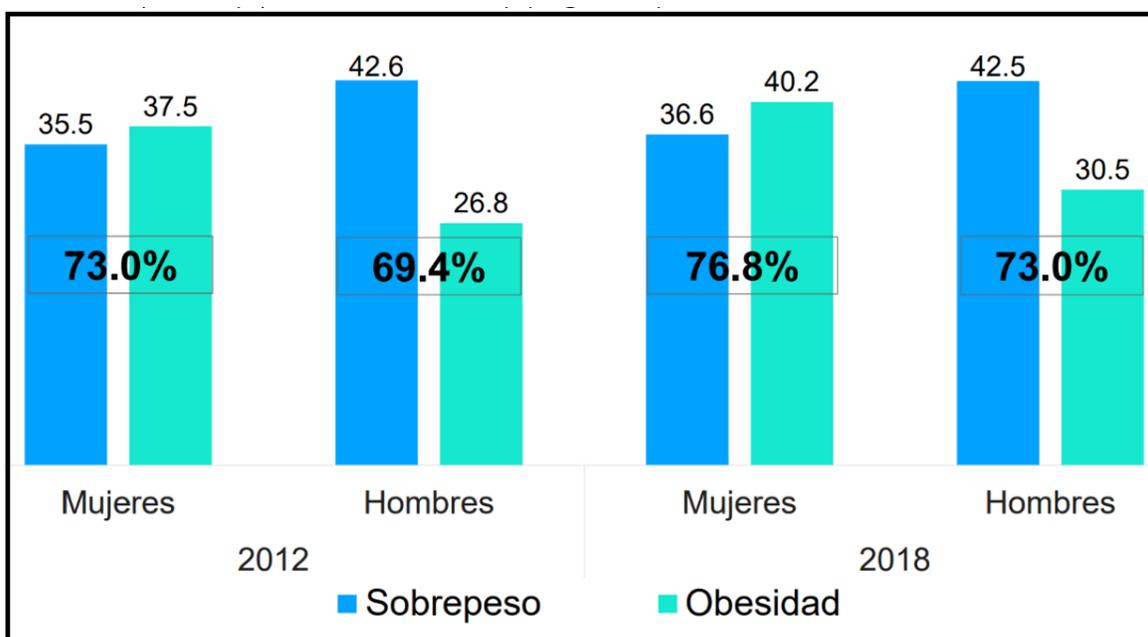


Figura 3. Porcentaje de la población mayor de 20 años con sobrepeso y obesidad en 2012 y 2018 (Gráfico y datos: ENSANUT, 2018).

La obesidad afecta significativamente la calidad de vida (se asocia con un mayor riesgo de mortalidad), la capacidad física, la fortaleza mental e impone una gran carga en términos de costos de atención médica debido a las comorbilidades asociadas a esta enfermedad. Dentro de las propuestas para una política integral frente a la Epidemia de Sobrepeso y Obesidad en México (El Poder del

Consumidor, 2018), se menciona que la Secretaría de Salud estimó que el costo total de la obesidad en el 2017 fue de 240 mil millones de pesos y seguirá aumentando hasta alcanzar los 272 mil millones en 2023, un aumento del 13% en seis años (Secretaría de Salud, 2015).

Por otro lado, en el año 2013, Rtveldze y colaboradores realizaron una simulación para proyectar tendencias futuras del IMC en la población mexicana. Se plantearon tres distintos escenarios: sin reducción del IMC, con una reducción del 1% y otra del 5% del IMC. Entre sus observaciones encontraron que habría una disminución del 9% en la población femenina de peso normal del año 2010 al año 2050, además de que habría una mayor cantidad de individuos con obesidad que con un peso normal. Como consecuencia, el costo de este padecimiento a los sistemas de salud pública y a los pacientes, se incrementaría hasta 1.7 billones de dólares para el año 2050. Finalmente, se calcularon ahorros de alrededor de 85 y 192 millones de dólares si el IMC promedio de la población se redujera 1% y 5%, respectivamente (Rtveldze *et al.*, 2013).

El conocimiento sobre la magnitud, distribución y tendencia de la obesidad, así como sus causas y los factores de riesgo de la población, permite emitir recomendaciones con base en evidencia a fin de diseñar políticas para su prevención y control, por lo cual es necesario comenzar a tomar medidas con el fin de reducir la incidencia de la obesidad en México y el mundo.

1.2 OVARIO

1.2.1 Definición y morfología

El ovario es la gónada femenina, se encuentra ubicada de forma bilateral; en humanos tiene forma similar a una almendra y sus dimensiones aproximadas son de 3.5 cm de alto, 2 cm de ancho y 1 cm de espesor. Estos presentan una consistencia dura y color blanquecino (Tapia, 2008). Los ovarios se encuentran situados en la cavidad pelviana, en una depresión denominada fosa ovárica,

conectados a las tubas uterinas por medio de las fimbrias, mismas que conectan con el útero (Mesiano-Jones, 2017).

1.2.2 Fisiología

Los ovarios cumplen con una doble función: la producción de gametos (óvulos) y como una glándula endócrina, la cual sintetiza y secreta hormonas proteicas (inhibina, activina, folistatina, etc.) y esteroides (andrógenos, estrógenos y progestágenos) (Barret *et al.*, 2012). Debido a ésta última función, los ovarios presentan cambios significativos a nivel estructural y funcional durante las diferentes etapas del ciclo menstrual (Inik *et al.*, 2019).

En el control de la función reproductiva, tanto la función secretora como la gametógena, dependen de la secreción de gonadotropinas: la hormona folículoestimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Por otro lado, mediante sistemas de retroalimentación, las hormonas producidas en el ovario, específicamente de los estrógenos y de la inhibina B, regulan la secreción de gonadotropinas. En mujeres pospúberes, es necesario que la secreción de gonadotropinas se lleve a cabo de un modo ordenado y secuencial para conseguir la menstruación, el embarazo y la lactancia (Barret *et al.*, 2012).

Por otro lado, el ciclo ovárico humano implica cambios rítmicos en los ovarios, en el ciclo menstrual y en el endometrio. Aunque generalmente estos ciclos son regulares durante los años reproductivos de una mujer, su duración puede ser sumamente variable, debido a alteraciones en la función neuroendocrina. Los fundamentos evolutivos para esta sensibilidad ambiental sugieren que la reproducción es más eficiente cuando existen recursos para mantener una gestación y criar al recién nacido (Mesiano-Jones, 2017).

1.2.3 Ciclo ovárico y ciclo estral

El ciclo ovárico consta de cuatro acontecimientos cruciales: 1) foliculogénesis; 2) ovulación; 3) formación del cuerpo lúteo (CL), y 4) regresión del cuerpo lúteo.

Asimismo, consta de dos fases: la fase folicular y la fase lútea. La fase folicular tiene una duración promedio de doce a catorce días, ésta comienza poco tiempo después de que degenera el cuerpo lúteo y finaliza con la ovulación. Por otro lado, la fase lútea dura en promedio doce a catorce días, comienza en el momento de la ovulación y finaliza con la degeneración del cuerpo lúteo (Mesiano-Jones, 2017). El ciclo ovárico está relacionado con el ciclo endometrial, el cual consta de tres fases importantes: la menstruación, la fase proliferativa y la fase secretora (**Figura 4**).

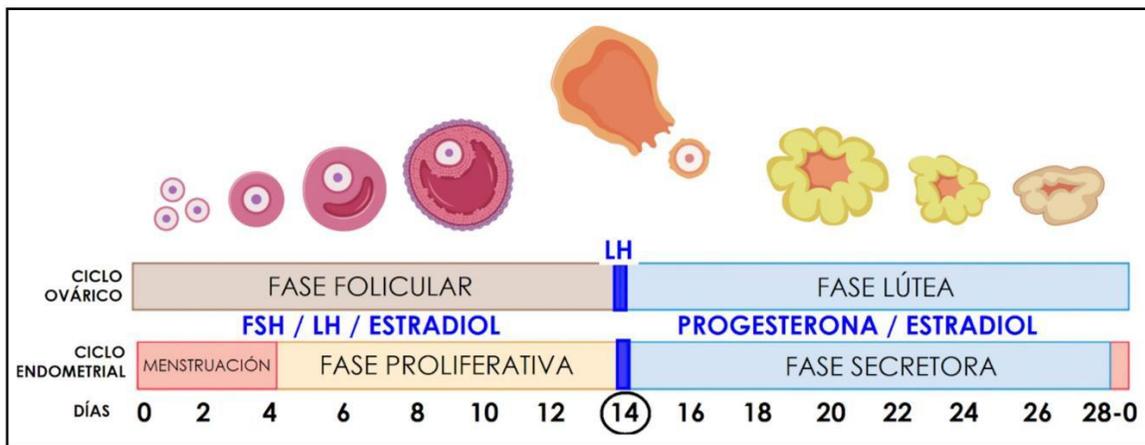


Figura 4. Ciclo ovárico y ciclo endometrial (Imagen extraída y modificada de: Mesiano-Jones, 2017).

Por otro lado, la actividad reproductora en animales suele presentar un modelo cíclico impuesto por diversos factores tanto internos (ritmos endógenos, cantidad de vitelo^{XIV} a depositar en los ovocitos, estado nutricional del animal, etc.), como externos (temperatura, disponibilidad de alimentos, el olor del sexo opuesto, etc.). Dichos factores en conjunto, crean un ambiente favorable para el éxito reproductivo en los animales, actuando como estímulos exteroceptivos que estimulan cierta transmisión nerviosa dirigida al hipotálamo, el cual controla endocrinamente a la hipófisis y esta, a su vez, conducirá a la producción de FSH y LH para generar los cambios necesarios en el aparato reproductor femenino (Mendiola *et al.*, 1993).

En el modelo cíclico reproductivo en animales es común que esté determinado por una fase conocida como *estro* o *calor*, en la cual la hembra permitirá la copulación. Este ciclo se conoce como ciclo estral y se define como el tiempo que transcurre entre un periodo de celoⁿ y el comienzo del siguiente (Mendiola *et al.*, 1993). En los roedores, la duración del ciclo es de cuatro a cinco días, que es consecuencia de una fase lútea breve, característica en estos mamíferos (Stein, 1994).

El ciclo estral se divide en cuatro fases, mismas que es posible identificar por la composición celular del epitelio vaginal, controlada por la circulación plasmática de estrógeno mediante la realización de frotis vaginales (**Figura 5**). Dichas fases son las siguientes:

Proestro. Se observan células epiteliales nucleadas debido a un aumento del proceso de mitosis en la mucosa vaginal (Mendiola *et al.*, 1993). Tiene una duración aproximada de doce horas. Se tiene la concentración pulsátil más elevada de LH en todo el ciclo, al igual que de estradiol y de FSH (McLean *et al.*, 2012; Lohmiller *et al.*, 2020). Esta última hormona estimula el desarrollo de varios folículos ováricos, puesto que los roedores son animales poliéstricos (Mendiola *et al.*, 1993). Hay una aceptación por parte del macho al final de esta fase.

Estro. La citología predominante es de células escamosas y su duración aproximada es de doce horas (Lohmiller *et al.*, 2020). Durante la fase tardía del proestro y el inicio del estro, se lleva a cabo la ovulación (Juárez-Miranda, 2016). La concentración de la LH decae a un nivel muy cercano a cero, por el contrario, la FSH tiene un segundo pulso debido a una disminución en los niveles de inhibina después de la ovulación (Lohmiller, 2020). En esta etapa el animal se encuentra en celo y hay aceptación del macho.

Metaestro. Se caracteriza por presentar un patrón de secreción basal de LH y FSH desde la hipófisis, ambos promueven la maduración de folículos ováricos (Juárez-Miranda, 2016). En el ovario comienza la formación del cuerpo lúteo y con

ello, un incremento de la concentración plasmática de progesterona (Mendiola *et al.*, 1993). La mucosa vaginal entra en regresión y es invadida por leucocitos, además de presentar células queratinizadas. La duración aproximada es de veintiún horas (Lohmiller *et al.*, 2020).

Diestro. Si no ha habido fecundación, se produce la regresión del cuerpo lúteo. A su vez, algunos folículos se diferencian a causa de la secreción de estrógenos (17- β estradiol); su concentración va aumentando gradualmente en el plasma hacia el final de esta fase y el inicio del ciclo en la fase de proestro (Mendiola *et al.*, 1993; Juárez-Miranda, 2016; Lohmiller *et al.*, 2020). En la citología vaginal predominan los leucocitos y hay presencia de células epiteliales nucleadas en menor cantidad. La duración aproximada es de cincuenta y siete horas (Lohmiller *et al.*, 2020).

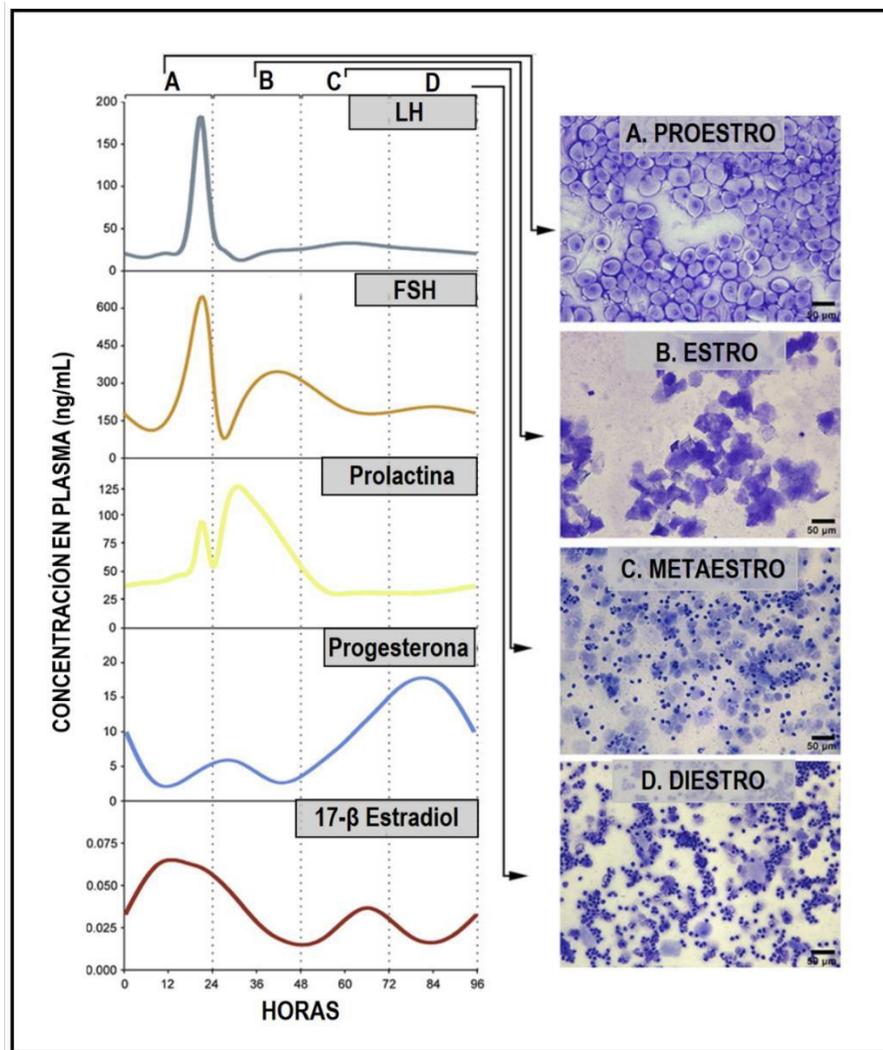


Figura 5. Cambios hormonales y citológicos del epitelio vaginal durante el ciclo estral de roedores (Imagen extraída y modificada de: McLean *et al.*, 2012).

1.2.4 Desarrollo folicular

En 1672, Regnier de Graaf describió por primera vez la diferenciación de folículos ováricos a cuerpos lúteos. Expresó que la edad y el coito causan grandes cambios en los folículos; en animales jóvenes son muy pequeños y más grandes en los desarrollados. Luego del coito, los folículos se modifican para asemejarse a los cuerpos lúteos, presentándose uno o más de acuerdo a si el animal va a producir uno o más embriones (Stein, 1994).

El folículo ovárico es la unidad fundamental del ovario. Se encuentran distribuidos en todo el ovario, principalmente en la región subcortical. Contiene células somáticas y al ovocito, el cual eventualmente puede ser ovulado, fecundado y tras la implantación puede formar un embrión. También proporciona las hormonas esteroideas y proteicas necesarias para el mantenimiento del ciclo ovárico, las características sexuales secundarias y para la preparación del endometrio para la implantación.

Asimismo, después de la ovulación, la estructura folicular que permanece en el ovario es el cuerpo lúteo (CL) (**Figura 6**), el cual involuciona en los ciclos no concepcionales (Vantman-Vega, 2010) y proporciona hormonas esenciales para el establecimiento y mantenimiento del embarazo (Findlay *et al.*, 2009). En la etapa post-puberal, solo unos pocos de estos folículos logran ovular (liberar al ovocito), mientras que la mayoría restante degenera y se transforma en folículos atrésicos.

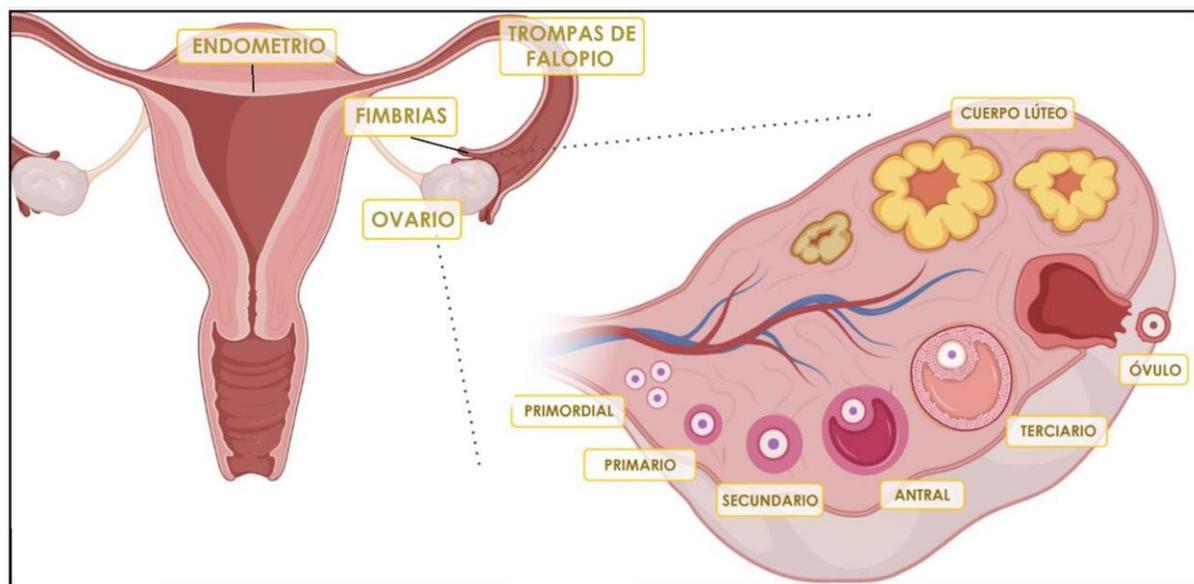


Figura 6. Estructuras del aparato reproductor femenino y estructuras internas del ovario.

La fase folicular del ciclo ovárico comienza con el inicio de la menstruación y dura en promedio 14 días. Durante esta fase, la FSH y la LH estimulan el desarrollo de

un conjunto de folículos, los cuales producen estradiol (Mesiano-Jones, 2017). En la **Figura 7** se presentan las estructuras principales que componen a un folículo.

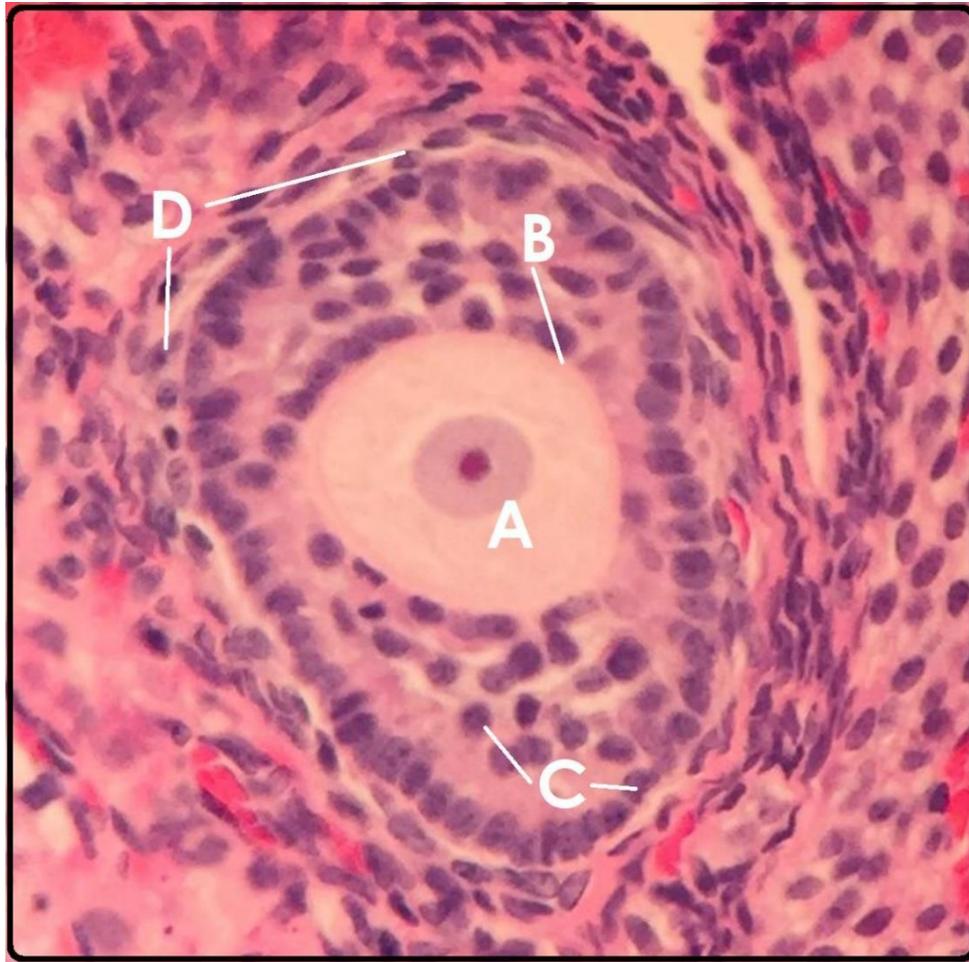


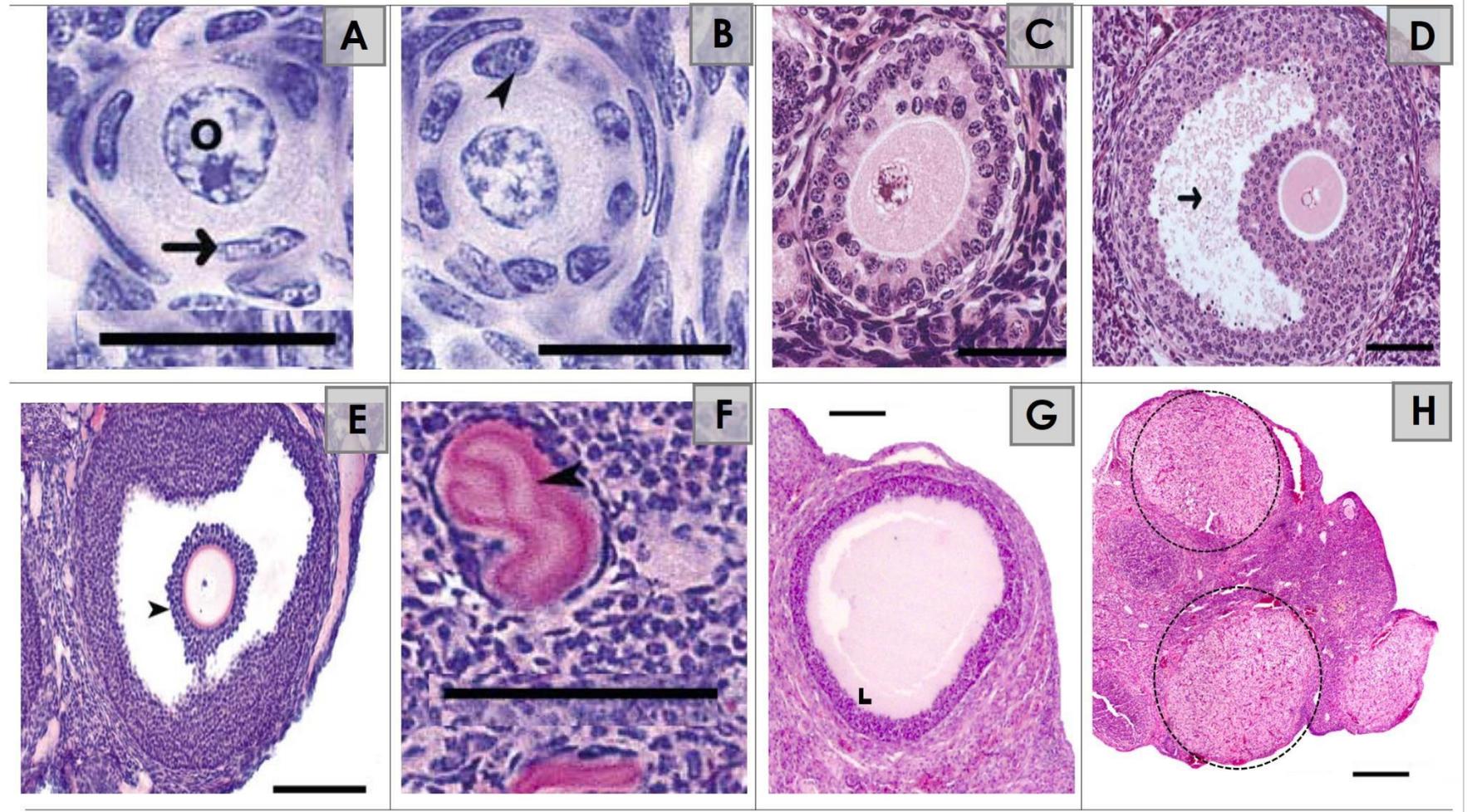
Figura 7. Principales estructuras de un folículo ovárico. A. Ovocito, B. Zona pelúcida, C. Células de la granulosa, D. Células de la teca. Imagen de un corte de ovario de rata teñido con HE visto a 40X y capturada con una cámara VGA través del lente ocular.

De acuerdo al grado de desarrollo existen diferentes tipos de folículos dentro del ovario: primordial, primario, secundario, antral y terciario o de Graaf. En la **Tabla 2A** y en su continuación (**Tabla 2B**) se presentan las características específicas para cada tipo de folículo (Modificado de: Myers *et al.*, 2004).

Tabla 2A. Características presentes en las diferentes estructuras que conforman el ovario.

A	FOLÍCULO PRIMORDIAL (Pr)	B	FOLÍCULO PRIMARIO (P)
	Presenta un ovocito (O) rodeado por una capa parcial o completa de células de la granulosa escamosas (aplanadas-flecha). Escala: 20 μm .		Poseen un ovocito rodeado de una sola capa de células de la granulosa cuboides (punta de flecha). Escala: 20 μm .
C	FOLÍCULO SECUNDARIO (S)	D	FOLÍCULO ANTRAL (An)
	Ovocito rodeado por más de una capa de células de la granulosa cuboides sin un antro visible. Escala: 50 μm .		Posee un espacio antral claramente definido (flecha). Escala: 100 μm .
E	FOLÍCULO TERCIARIO (T)	F	FOLÍCULO ATRÉSICO (Atr)
	Son los folículos de mayor tamaño y poseen un gran cúmulo de capas de células de la granulosa (punta de flecha), se encuentran principalmente en la corteza del ovario. Escala: 200 μm .		Las células de la granulosa sufren apoptosis y la zona pelúcida se encuentra dañada (punta de flecha), esto representa la etapa final de estos folículos. Escala: 100 μm .
G	QUISTE (Q)	H	CUERPO LÚTEO (CL)
	Estructuras circulares llenas de fluido ovárico y rodeadas por una capa de células de la más delgadas y usualmente con forma irregular (punta de flecha). Escala: 200 μm . (Imagen tomada en microscopio óptico Primo Star ZEISS® en el objetivo 4X).		De forma circular y con una tonalidad ligeramente menor que el entorno. Generalmente se encuentran en la superficie del ovario (círculo punteado). Escala: 200 μm . (Imagen tomada en microscopio óptico Primo Star ZEISS® en el objetivo 4X).

Tabla 2B. Características presentes en los diferentes tipos de folículos ováricos (continuación).



El potencial reproductivo de cada mujer depende del número y tipo de folículos ováricos presentes. La disminución en el número de folículos primordiales es un signo del agotamiento de la reserva ovárica, así como la incapacidad de observar los folículos terciarios, ya que estos contienen al ovocito en desarrollo. Esto puede indicar infertilidad (Inik *et al.*, 2019). El folículo primordial en el ovario de los primates puede considerarse la forma de almacenamiento del gameto femenino. Se han utilizado estimaciones del número de estos folículos en los ovarios en diversas etapas de madurez reproductiva como medida de la reserva reproductiva. Además, se ha observado una disminución continua de este tipo de folículos, desde el período fetal hasta el momento de la menopausia en varias especies de primates (Miller *et al.*, 1997).

Pearl y Schoppe plantearon en 1921 que, en la especie humana, así como en la mayoría de las hembras de mamíferos, la formación de los gametos femeninos comienza en la etapa embrionaria-fetal, quedando determinado en esta etapa el número definitivo de células germinales de la mujer. Posteriormente, en 2004 inició el cambio de esta idea, pues se identificaron células madre de la línea germinal mitóticamente activas durante la vida postnatal en el ovario murino (Johnson *et al.*, 2004). Estudios posteriores en 2012, mostraron el equivalente de estas células en el ovario humano, esto por medio de un protocolo de clasificación de células activadas por fluorescencia (Fluorescence-Activated Cell Sorting FACS); el cual permitió su purificación y caracterización (Telfer-Albertini, 2012).

A lo largo de los últimos años, se han utilizado diferentes métodos de aislamiento y caracterización y existen diferentes terminologías para describir estas células, lo que genera cierta confusión. Si bien existe controversia sobre el significado biológico de estas células, se debe reconocer que su identificación y aislamiento representan un avance significativo con el potencial de cambiar los tratamientos de infertilidad, e incluso, posiblemente en un futuro, las consecuencias no reproductivas de la pérdida de la función ovárica (Telfer-Anderson, 2019).

1.3 CONTROL HORMONAL DE LA REPRODUCCIÓN

1.3.1 Insulina

La insulina es una proteína secretada por el páncreas, la cual participa en el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas. La producción deficiente de insulina y/o la disminución en la respuesta de los tejidos y órganos periféricos a su acción constituyen a las principales bases de la diabetes mellitus (Ros-Medina, 2011).

La señalización normal de la insulina se constituye, principalmente en tres niveles diferentes: el primer nivel se produce a través de la activación de un receptor específico para insulina, el cual pertenece a una subfamilia de receptores de cinasas de tirosina (Ogawa *et al.*, 1998). El receptor de insulina activado, directamente fosforila en múltiples residuos tirosina el substrato del receptor de insulina (IRS) (Ogawa *et al.*, 1998); siendo considerados IRS-1 y 2, los más importantes en el transporte de glucosa.

El siguiente nivel involucra la cinasa de fosfoinositol-3 (PI3K); la cual es un elemento clave en la señalización de insulina, ya que regula el transporte de glucosa, el efecto antilipolítico, la síntesis de ácidos grasos y la síntesis de glucógeno (Ros-Medina, 2011). Una de las respuestas a la señalización por la insulina es facilitar el transporte de glucosa por medio del transportador de glucosa 4 (Glut-4); el cual se expresa fundamentalmente en tejido muscular y tejido adiposo y su regulación es dependiente de insulina (Barrios, 2015). De esta forma, si el nivel de glucosa en sangre aumenta, se estimula la secreción de insulina por parte de las células β del páncreas. El estímulo insulínico sobre estos tejidos conduce al reclutamiento de las vesículas intracelulares portadoras de Glut-4 hacia la membrana plasmática, donde dicho transportador se fusiona para mediar la entrada de glucosa (Barrios, 2015). La alteración de estas moléculas puede desencadenar resistencia a la insulina (Maier *et al.*, 2000; Ros-Medina, 2011).

Si bien, la principal función de la insulina es mantener la homeostasis de la glucosa periférica, a través de la estimulación de la absorción, la oxidación, el almacenamiento y la síntesis de glucosa (Donato, 2012); también existe evidencia de que la insulina juega un papel importante en la regulación de la reproducción. Se ha visto que las acciones periféricas y centrales de la insulina son permisivas, más que necesarias, para la secreción pulsátil normal de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y a su vez, de la LH (Sliwowska *et al.*, 2014). Las mujeres que padecen SOP, a menudo desarrollan resistencia a la insulina; se ha observado que esta resistencia actúa en sinergia con la LH, estimulando la producción de andrógenos (Azziz, 2018).

Además, existe evidencia epidemiológica y experimental para sugerir que la insulina juega un papel en la programación fetal de los ejes metabólico y reproductivo (Bakker *et al.*, 2001; Matthews, 2002; Sliwowska *et al.*, 2014).

1.3.2 Leptina

La leptina es una proteína de señalización celular producida principalmente por el tejido adiposo, por lo que es denominada una adipocina (Broughton-Moley, 2017). Desempeña un papel importante en la regulación de la saciedad y del balance energético por medio de vías adipo-hipotálamo-hipofisarias; además, interviene en el desencadenamiento de la pubertad y la reproducción (Henríquez *et al.*, 2006).

En investigaciones previas con modelos murinos, se ha observado que las alteraciones genéticas que previenen la producción de la leptina o la respuesta a ésta producen obesidad severa en el ratón con disminución en el gasto energético, hiperfagia, así como infertilidad y un retraso en la pubertad (Caro *et al.*, 1996).

La evidencia científica reportada ha mostrado que existe una relación directa entre las concentraciones plasmáticas de leptina y el IMC (Considine *et al.*, 1996). Sin embargo, puede observarse una considerable variabilidad en las concentraciones de leptina en las personas con el mismo IMC, lo que sugiere que la producción de

leptina también está regulada por otros factores diferentes de la propia masa de tejido adiposo (Henríquez *et al.*, 2006).

En los mamíferos, la fertilidad está estrechamente ligada a la existencia de unos niveles mínimos de reservas adiposas. Este fenómeno se ha interpretado asumiendo la existencia de una señal permisiva producida por el tejido adiposo, la cual informaría al hipotálamo de que las reservas energéticas son suficientes para garantizar el inicio de la pubertad, la gestación y la lactancia; así como el mantenimiento del ritmo pulsátil de la LH en la vida reproductiva (Arce *et al.*, 2006; Triantafyllou *et al.*, 2016). Durante la última década se han acumulado datos experimentales que demuestran que ésta señal permisiva sería la leptina. Se han identificado receptores de leptina a nivel hipotalámico y en la hipófisis, así como en tejidos reproductivos periféricos, como el ovario y útero (Arce *et al.*, 2006).

Asimismo, se ha encontrado que la leptina es sintetizada en la placenta en concentraciones compatibles con las de la célula adiposa (Henríquez *et al.*, 2006). En el ovario, se ha observado la presencia de leptina en el cuerpo lúteo, en folículos atrésicos y en folículos en distintas etapas de desarrollo, presentando una concentración variable en diferentes sitios del folículo. Asimismo, se ha planteado la posibilidad de que la leptina localizada de forma cortical en los folículos maduros, presente una posible interacción entre las células de la granulosa y el oocito, lo cual no se presenta en los folículos atrésicos (Löffler *et al.*, 2001).

Además de la grasa, existen otros factores que pueden influir en los niveles de leptina tanto en animales experimentales como en el hombre. Los factores que estimulan su secreción incluyen la insulina y glucocorticoides; los factores que la inhiben incluyen agonistas adrenérgicos y, posiblemente, otros factores lipolíticos (Henríquez *et al.*, 2006).

1.3.3 Eje hipotálamo-hipófisis-ovario

El control de la función reproductiva requiere de una regulación precisa, cuantitativa y temporal del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (HHO). Esta regulación comienza en las neuronas del hipotálamo; las cuales, sintetizan, almacenan y secretan la GnRH, que es transportada hasta la hipófisis anterior, en donde las células diana de la GnRH (los gonadotropos), sintetizan y liberan la FSH y la LH (Mesiano-Jones, 2017).

Al llegar al ovario, la LH se une a receptores en las células de la teca para aumentar la síntesis de progesterona y andrógenos. Los andrógenos entran en las células de la granulosa (CG), las cuales por medio de la enzima P450 aromatasa convierten a los andrógenos en estrógenos. Por otro lado, la FSH se une a receptores en las CG para incrementar la producción de enzimas esteroideogénicas y de activinas e inhibinas; éstas dos últimas hormonas actúan en la hipófisis anterior activando o inhibiendo respectivamente, la producción de FSH (Mesiano-Jones, 2017).

Es así como, durante la etapa fértil de la mujer, el ovario en respuesta a la secreción cíclica y pulsátil de las gonadotropinas (LH y FSH), madura y libera de manera periódica ovocitos aptos para ser fecundados (función gametógena). Además, secreta esteroides sexuales (estrógenos y progestágenos), péptidos (inhibinas y activinas) y factores de crecimiento (Vantman-Vega, 2010). En conjunto, estos esteroides y péptidos ováricos ejercen una retroalimentación negativa y positiva sobre el hipotálamo y la hipófisis anterior (Mesiano-Jones, 2017). La regulación hormonal en el eje HHO se resume en la **Figura 8**.

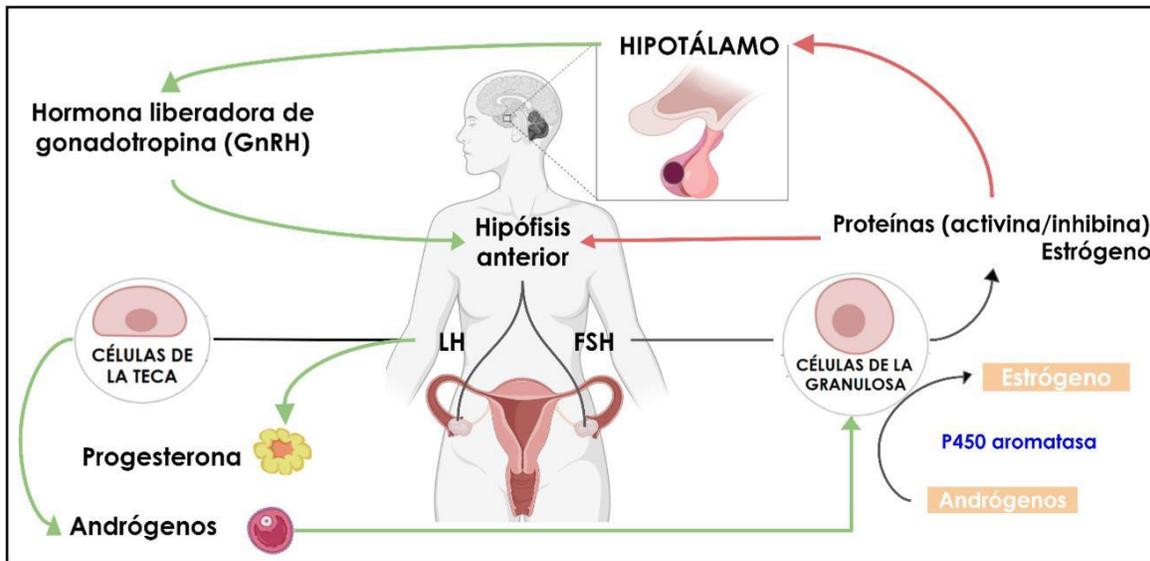


Figura 8. Regulación hormonal del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario.

1.4 INFERTILIDAD FEMENINA Y SU RELACIÓN CON LA OBESIDAD

La Organización Mundial de la Salud ha definido la infertilidad como una enfermedad del sistema reproductivo que se caracteriza por la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales no protegidas (OMS, 2010). Asimismo, en la Guía de Práctica Clínica para el diagnóstico de la pareja infértil y tratamiento con técnicas de baja intensidad de la Secretaría de Salud (#Catálogo IMSS-621-13), se considera la infertilidad como la incapacidad de concebir un embarazo después de 12 meses de prácticas sexuales sin protección a una edad < 35 años y 6 meses a una edad de \geq 35 años (SSA, 2013).

Definir la causa de infertilidad resulta complejo, es por ello que para el estudio de la infertilidad en la pareja, es posible dividir las causas en los siguientes factores: uterinos, túbulo-peritoneales, cervicales, masculino y endocrino-metabólicos (ovulatorios) (Masoli, 2010); es en éste último factor en el que centraremos este trabajo. Los defectos ovulatorios se pueden identificar en alrededor del 15% de las parejas infértiles y es causa del 40% de la infertilidad femenina (Masoli, 2010). Las proyecciones de la población de México 2005 a 2050 revelan un importante

incremento en la población que potencialmente requerirá de atención a los problemas causados por la infertilidad (Mora, 2019).

Aproximadamente del 5 al 10% de las mujeres infértiles pueden tener anomalías genéticas subyacentes; como anomalías cromosómicas, polimorfismos^{xii} y mutaciones únicas o múltiples. Una parte importante de los casos de infertilidad puede explicarse por la exposición a factores ambientales causantes de trastornos endocrinos (Tarín, 2015; Hanson *et al.*, 2016). Sin embargo, estudios previos han demostrado que existe una asociación entre la fertilidad y la obesidad. Como parte de un estudio de control de casos, se observó que a partir de los 18 años, cuanto mayor sea el IMC, incluso por niveles inferiores a los considerados obesos, mayor es el riesgo de desarrollar infertilidad ovulatoria (NIH, 1998/A). Además, se ha encontrado que la obesidad aumenta la probabilidad del desarrollo de trastornos reproductivos al aumentar el riesgo de infertilidad, de cáncer de mama y de endometrio (Cardozo *et al.*, 2012).

Por otro lado, en estudios previos se ha observado que la nutrición materna durante el periodo periconcepcional puede afectar la calidad de los ovocitos, así como el desarrollo embrionario (Machtinger *et al.*, 2012) y la salud de la descendencia (Connor *et al.*, 2012). Así mismo, se ha reportado que el exceso de ácidos grasos libres puede tener un efecto tóxico en los tejidos de los órganos reproductivos, provocando daño celular y un estado inflamatorio crónico de bajo grado (Broughton-Moley, 2017).

1.5 ALTERACIONES DEL PERFIL HORMONAL A CAUSA DE LA OBESIDAD

Resulta complicado describir el mecanismo de cómo la obesidad afecta el sistema reproductivo porque su funcionamiento es complejo y multifactorial, además de que en la obesidad hay una alteración hormonal importante (Özcan-Dilbaz, 2015; Kini *et al.*, 2020). Sin embargo, se sabe que el efecto negativo que ocasiona, se

observa principalmente en la secreción y el metabolismo de las hormonas sexuales. Estas alteraciones resultan en cambios en la biodisponibilidad de estrógenos y andrógenos, principalmente debido a la alteración funcional del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Kini *et al.*, 2020).

En la obesidad femenina, la LH, la androstenediona, la insulina, los triacilgliceroles y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) aumentan, y los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) disminuyen (Özcan-Dilbaz, 2015). Estas alteraciones bioquímicas, se manifiestan como: trastornos menstruales, disfunción ovulatoria, anovulación, síndrome de ovario poliquístico (SOP), entre otros (Özcan-Dilbaz, 2015). Se ha observado que pacientes con SOP presentan un riesgo aumentado de aborto espontáneo y una tasa de concepción reducida (NIH, 1998/B).

1.5.1 Insulina

El exceso de tejido adiposo en la obesidad es uno de los factores principales que comienzan a causar alteraciones en el resto del cuerpo; además, la distribución de la grasa es por sí misma un determinante de la sensibilidad a la insulina (Kahn *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2011). Los individuos delgados con una distribución de la grasa periférica, es decir, que se encuentra distribuida en distintos depósitos de grasa en todo el cuerpo, tienen mayor sensibilidad a la insulina que individuos delgados con una distribución de grasa central. La grasa intrabdominal y subcutánea son diferentes en su función endócrina y metabólica. La grasa intraabdominal es más lipolítica que la subcutánea y es menos sensible al efecto antilipolítico de la insulina (Montague-O´Rahilly, 2000; Álvarez *et al.*, 2011).

Las mujeres obesas a menudo tienen niveles circulantes de insulina más altos que mujeres de un peso normal (asociado a resistencia a la insulina); lo cual es un estímulo para aumentar la producción de andrógenos ováricos (Rachon-Teede, 2010; Broughton-Moley, 2017). Al aumentar la adiposidad, incrementa la

aromatización periférica de los andrógenos a los estrógenos, con una disminución concurrente en la síntesis hepática de la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) (Talmor-Dunphy, 2015). Estos cambios generan una retroalimentación negativa sobre el eje HHO y afectan la producción de gonadotropinas (Jungheim-Moley, 2010; Broughton-Moley, 2017). En conjunto, éstos desórdenes dan como resultado un aumento en los niveles de estradiol y testosterona libres.

También se ha observado que el ambiente folicular ovárico se modifica en mujeres obesas (Valckx *et al.*, 2012); los niveles elevados de triacilgliceroles, glucosa e insulina en el líquido folicular generan cambios en el microambiente del ovocito, lo cual puede tener consecuencias adversas para la reproducción (Robker *et al.*, 2009).

1.5.2 Leptina

Conforme la masa de tejido graso corporal aumenta en la obesidad, se produce cierto grado de hipoxia dentro del adipocito; lo cual genera una respuesta inflamatoria que induce la liberación de adipocitocinas, tales como: leptina y resistina, las cuales influyen en los procesos reproductivos (Álvarez *et al.*, 2011). Se ha observado que mujeres con altas concentraciones séricas de leptina, así como con una relación leptina/IMC elevada; tienen tasas más bajas de embarazos mediante técnicas de reproducción asistida (Broughton-Moley, 2017).

También se ha encontrado una relación con el SOP y la leptina. Las concentraciones plasmáticas elevadas de esta adipocina ocasionan anomalías en el control para la producción de FSH y en la síntesis de hormonas esteroideas por las células de la granulosa; además de interferir en la señalización adecuada de secreción de LH (Löffler *et al.*, 2001).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La obesidad es una enfermedad que ha ido en aumento y que afecta a gran parte de la población mexicana. En la actualidad, México tiene una prevalencia de obesidad y sobrepeso del 75%, lo que representa aproximadamente a 62 millones de mexicanos mayores a 20 años (ENSANUT, 2018). Además, la prevalencia de obesidad en mujeres en edad reproductiva es del 32.7%, lo que ha llevado a México a ocupar uno de los primeros tres puestos en América Latina con mayor prevalencia de obesidad femenina (INSP, 2018).

Por otro lado, la obesidad se caracteriza por el desarrollo de un desequilibrio endocrino y metabólico (Álvarez *et al.*, 2011), encontrándose que el 40% de los casos de infertilidad femenina es a causa de afectaciones a nivel endócrino (problemas ovulatorios) (Masoli, 2010). Por lo tanto, resulta importante el estudio de los cambios morfológicos en los ovarios, así como el de las alteraciones hormonales en la obesidad. Para tal fin, se empleará un modelo murino de obesidad inducida por una dieta alta en grasa. Este modelo permitirá evaluar si dichos cambios gonadales representan un problema en la fertilidad y en la fecundidad del modelo experimental.

3. HIPÓTESIS

La obesidad generada por una dieta alta en grasa conducirá a cambios en la morfofisiología de ovarios de ratas Wistar, ocasionando un efecto negativo en la fertilidad y fecundidad.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

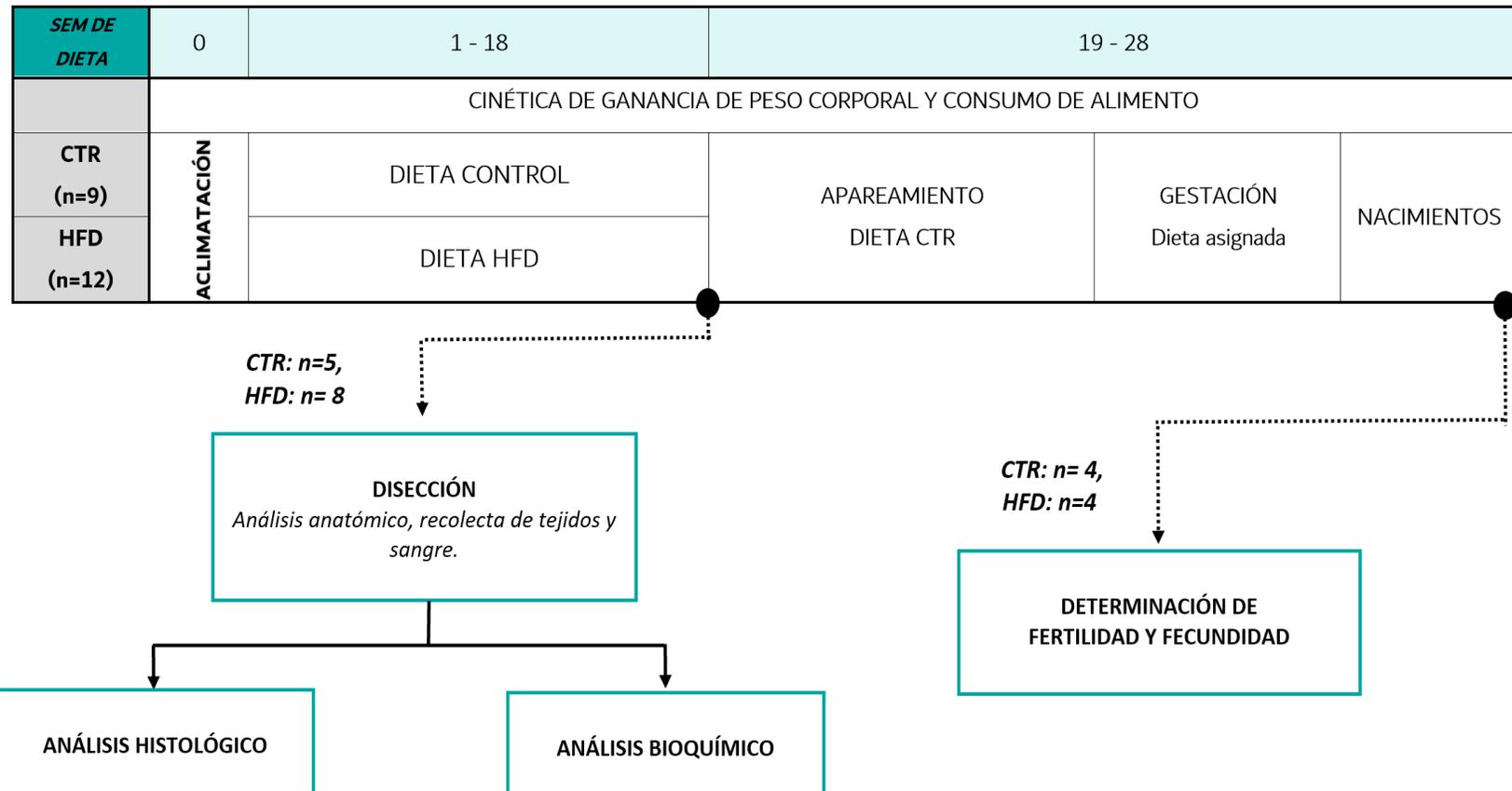
Determinar el efecto que tiene la obesidad inducida por una dieta alta en grasa en la morfofisiología de los ovarios de un modelo murino.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Generar y caracterizar un modelo de obesidad inducida por una dieta alta en grasa en ratas Wistar.
- Caracterizar los cambios histológicos que experimentan los ovarios de un animal obeso mediante la medición de su área, así como mediante el conteo de folículos en cada etapa de desarrollo y cuerpos lúteos presentes en dicho órgano.
- Comparar la fertilidad y la fecundidad en hembras obesas respecto a las hembras control.
- Determinar el efecto que tiene una dieta alta en grasa en la fertilidad de ratas Wistar.

5. METODOLOGÍA

5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL



5.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Se trabajó con 21 ratas hembras de la cepa Wistar de 4 semanas post-natales (spn) provenientes de 5 camadas diferentes, proporcionadas por el Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, siguiendo las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio dictadas por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para lograr resultados confiables y al igual que un trato ético a los animales de estudio.

El cuidado de los animales se llevó a cabo en el vivarium de especies murinas del Departamento de Embriología y Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (24°C), ventilación e iluminación (12:12 horas luz:oscuridad) y tuvieron acceso a alimento y bebida *ad libitum* durante todo el experimento.

Se colocaron de 2 a 3 animales en cajas de acrílico de 46x31x20 cm con tapas de acero galvanizado, de acuerdo a su masa corporal, cuidando de no exceder un límite máximo de 100 g de masa corporal del animal por cada 110 cm² de área dentro de la caja. El cambio de cama, cajas y bebederos se realizó tres veces a la semana, mientras que el alimento se cambió cinco veces por semana para mantenerlo fresco. Los animales se monitorearon tres veces a la semana en caso de alguna lesión o enfermedad.

5.3 EVALUACIÓN DE DIETAS ALTAS EN GRASA

En el laboratorio de Embriología y Genética de la Facultad de Medicina, U.N.A.M., se diseñaron tres dietas altas en grasa, cuya aportación de ácidos grasos saturados (AGS) fue proveniente de manteca de cerdo, mientras que la de ácidos grasos insaturados (AGI) provino de aceite de olivo. Los parámetros evaluados para la selección de la dieta empleada en el presente trabajo fueron: glucosa en ayuno, tolerancia a la glucosa, sensibilidad a la insulina y peso corporal. Estas

dietas se encuentran descritas en la **Tabla 3**. Los resultados de la caracterización del modelo de obesidad son mostrados en el **Anexo I**. La dieta empleada en el presente trabajo fue la HFD 60% (II), debido a que mostró mayor ganancia de peso y desarrollo de alteraciones metabólicas.

Tabla 3. Características nutrimentales de las dietas formuladas

	HFD 45%	HFD 60% (I)	HFD 60% (II)
Contenido energético (kcal/g)	5.11	5.78	5.82
Lípidos totales (%)	45	60	60
Relación AGS: AGI	90:10	90:10	50:50

5.4 DIETA ADMINISTRADA

Después de una semana de aclimatación dentro del vivarium, los animales se dividieron de forma aleatoria en dos grupos respecto a la dieta asignada: al grupo control (CTR, n=9) se le administró *Rodent Lab Diet*® 5001, formulada para el mantenimiento del ciclo de vida de los roedores (crecimiento, reproducción y lactancia), así como para la investigación científica (Rachon-Teede, 2010; Özcan- Dilbaz, 2015). La composición de la dieta se detalla en la **Tabla 4**.

Por otro lado, al grupo tratado se le asignó una dieta alta en grasa (HFD por sus siglas en inglés, n=12) la cual fue elaborada en el laboratorio del Departamento de Embriología y Genética de la Facultad de Medicina, UNAM. La composición de la dieta se detalla en la **Tabla 4**.

Para la preparación de la HFD, se ajustó el porcentaje total de lípidos utilizando manteca de cerdo como fuente de ácidos grasos saturados y aceite de oliva como fuente de ácidos grasos insaturados, obteniendo así 60% de la energía total provenientes de lípidos y una relación de grasa saturada:insaturada de 1:1. Asimismo, para mantener un aporte proteico de al menos un 20%, se adicionó albúmina de huevo liofilizada como fuente de aminoácidos. La preparación de la dieta HFD se detalla en el **Anexo II**.

Tabla 4. Composición nutrimental de las dietas administradas

NUTRIMENTO	DIETA CONTROL (Croqueta estándar) *		DIETA ALTA EN GRASA (HFD 60%) **	
	% P/P	% Calórico aportado	% P/P	% Calórico aportado
Hidratos de carbono	25.05	58.00	12.40	20.00
Proteína	24.10	29.00	26.93	20.00
Grasa total	5.00		37.98	
De las cuales:				
Grasa saturada	1.56	13.00	17.75	60.00
Grasa insaturada	3.12		18.70	
Total		100		100
Contenido energético (Kcal/ g)	4.10		5.82	

*Datos obtenidos del análisis por *Laboratory Rodent Diet* (ver **Anexo III**).

Datos calculados respecto a la formulación de la **Tabla 5.

Tabla 5. Formulación de la dieta alta en grasa

INGREDIENTE	NUTRIMENTO	CONCENTRACIÓN
		(g de nutrimento / 100 g de alimento)
Croqueta estándar	Hidratos de carbono	49.50
Albúmina de huevo	Proteína	15.00
Manteca de cerdo	Grasa saturada	17.75
Aceite de oliva	Grasa insaturada	19.48

5.5 GANANCIA DE PESO CORPORAL Y CONSUMO DE ALIMENTO

Para realizar la cinética de ganancia de peso, el animal fue colocado en un recipiente de plástico que limitara su movimiento, mismo que se colocaba sobre una balanza electrónica (**Biomédica 20002**) y el peso corporal fue registrado. La ganancia de peso corporal se realizó empleando la **Ecuación 3**.

$$\text{Ganancia de peso corporal} = \frac{PC_n \times 100}{PC_0} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

PC_n: Peso corporal de la semana actual (g)

PC₀: Peso corporal de la semana inicial del tratamiento (semana cero) (g)

Por otro lado, la cinética de consumo de alimento se realizó colocando una cantidad conocida de alimento (CTR: 250 g/caja, HFD: 50 g/animal) en cada caja, después de 24 horas, el alimento fue pesado en la balanza electrónica y se registró dicho valor. Para obtener el consumo individual en calorías se empleó la **Ecuación 4**.

$$\text{Consumo individual} = \left(\frac{MA_i - MA_f}{N} \right) \times (\text{AED}) \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

MA_i: Masa inicial del alimento (g)

MA_f: Masa final del alimento (g)

N: Número de animales en la caja

AED: Aporte energético de la dieta (kcal/g)

Los valores de la cinética de consumo de alimento se informaron en calorías consumidas considerando la masa del animal. Para ello se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Consumo individual normalizado} = \frac{\text{Consumo individual [kcal]}}{\text{Peso corporal [g]}} \times 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

5.6 PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA INTRAPERITONEAL

A las 18 semanas de tratamiento, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT). Para ello, se mantuvo en ayuno a los animales durante 12 horas.

Primero se determinó la glucemia en ayuno realizando una pequeña punción en el extremo de la cola del animal. A continuación, se administró una dosis de glucosa (2 g de glucosa/ kg de peso corporal) vía intraperitoneal a partir de una solución de dextrosa al 40% previamente esterilizada con un filtro de 0.22 μm . Posteriormente, se midió la concentración de glucosa en sangre a los 15, 30, 45, 60 y 120 minutos. Las mediciones de glucemia (mg/dL) se obtuvieron mediante un glucómetro marca **SD Check Gold® 01GM10**. Se reportaron los valores promedio como % de la glucemia basal.

5.7 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A LA INSULINA INTRAPERITONEAL

Esta prueba se realizó la misma semana que la prueba de IPGTT, dando un periodo de al menos 3 días entre cada prueba. Previo a la realización de la prueba, los animales permanecieron en un ayuno de 12 horas.

Se determinó la concentración de la glucosa en ayuno; posteriormente, se administró una dosis de insulina (0.2 UI de insulina/ kg de peso corporal) vía intraperitoneal a partir de una solución de insulina de una concentración de 5 UI/ mL (Humulin®, insulina humana recombinante de acción rápida). Finalmente, se midió la concentración de glucosa en sangre a los 15, 30, 45, 60 y 120 minutos. Las mediciones de glucemia (mg/dL) se obtuvieron mediante un glucómetro marca **SD Check Gold® 01GM10**. Si durante algún momento de la prueba, la glucemia de algún animal disminuía por debajo de 50 mg/dL, se retiraba inmediatamente del experimento y se le daba acceso a alimento. Se reportaron los valores promedio de cada grupo como % de la glucemia basal.

5.8 ANÁLISIS ANATÓMICO

Transcurrido el tratamiento, los animales permanecieron en 12 horas de ayuno y se pesaron en una balanza electrónica como se describió en el apartado de ganancia de peso corporal, este valor fue registrado.

Posteriormente, los animales se sedaron con una dosis de pentobarbital sódico (100 mg de pentobarbital/ kg de peso corporal) por vía intraperitoneal a partir de una solución comercial de pentobarbital sódico de una concentración de 6.3 g de pentobarbital sódico/100 mL (Pisabental®, PISA® Agropecuaria).

Después de comprobar la sedación mediante una punción sobre la cola, se procedió a obtener la talla; para ello, el animal fue colocado boca abajo sobre una cinta métrica, cuidando de mantener alineada la punta de la nariz con el inicio de la cinta métrica. Se registró el valor obtenido de la punta de la nariz hasta el ano.

Para la medición de la circunferencia abdominal, se colocó la cinta métrica perpendicular a la cintura de la rata; a la altura intermedia entre las costillas y el inicio de las patas traseras.

Finalmente, el IL se calculó empleando el peso en gramos y la talla en centímetros, tomados en el punto anterior y empleando la **Ecuación 2** presentada en el apartado de Antecedentes.

5.9 DISECCIÓN, RESECCIÓN DE TEJIDOS Y COLECTA DE SANGRE

Una vez anestesiado el animal, se rasuró el vientre con una rasuradora electrónica y se procedió al inicio de la disección realizando una incisión en el área rasurada mediante unas tijeras de disección. Enseguida, se realizó una punción en la vena cava inferior con una jeringa, con la cual se obtuvieron aproximadamente 3 mL de sangre, misma que fue colocada en tubos BD Vacutainer® con EDTA (1.5 mg por cada mL de sangre), se mezclaron suavemente y se colocaron en hielo.

Finalmente, se realizó la resección bilateral del ovario. Adicionalmente, se realizó la resección del tejido adiposo supragenadal (TASG), del tejido adiposo subcutáneo (TASC), del tejido adiposo peripancreático (TAPP) y del tejido adiposo retroperitoneal (TARP) con el fin de estimar la cantidad de tejido adiposo visceral (TAV) y la grasa total (GT). Tanto los ovarios como el tejido adiposo se pesaron en una balanza electrónica **Biomedical® YP802N**.

El cálculo del tejido adiposo visceral se obtuvo por adición de TASG, TARP y TAPP:

$$TAV = TASG [g] + TARP [g] + TAPP [g] \quad \text{Ecuación 6}$$

Mientras que, para calcular la grasa total se empleó la siguiente ecuación:

$$GT = TASG [g] + TARP [g] + TAPP [g] + TASC [g] \quad \text{Ecuación 7}$$

Finalmente, para conocer qué porcentaje conforma el tejido adiposo de cada clasificación respecto al cuerpo del animal, se empleó la **Ecuación 8**.

$$\% \text{Tejido adiposo} = \frac{\text{Masa del tejido adiposo}^*}{\text{Peso corporal}} \times 100 \quad \text{Ecuación 8}$$

*Masa de tejido adiposo respectivo (TASC, TASG, TAV, GT).

5.10 OBTENCIÓN DE PLASMA

Las muestras de sangre obtenidas en la disección se centrifugaron a 0.287 xg rpm por 8 minutos en una centrífuga (**IEC Micro max®**). El sobrenadante (plasma) fue extraído y separado en alícuotas de 200 µL que se colocaron en tubos de polipropileno para microcentrífuga de 0.2 mL (Eppendorf®). Las alícuotas de plasma se almacenaron a una temperatura de -85°C (**Blizzard de Nuair®**) hasta su procesamiento para la bioquímica sanguínea. Las muestras se descongelaron un máximo de tres veces para su análisis.

5.11 CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS EN PLASMA

La cuantificación de colesterol total (CT) y triacilgliceroles (TAG) se llevó a cabo mediante el método enzimático colorimétrico a punto final, el cual fue realizado en el Departamento de Patología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México.

5.11.1 Cuantificación de colesterol total

La cuantificación de colesterol total (CT) es posible realizarla mediante dos tipos de métodos: los químicos y los enzimáticos. Los primeros se basan en la reacción de Lieberman-Burchard y su posterior medición colorimétrica; sin embargo, su imprecisión, complejidad y frecuentes interferencias analíticas, han llevado a estos métodos a quedar obsoletos. Por otro lado, los métodos enzimáticos ofrecen un mayor grado de precisión y es por ello que son los más empleados en la actualidad (Díaz *et al.*, 1997).

Esta metodología se basa en el uso de tres enzimas: colesterol esterasa (CE), colesterol oxidasa (CO) y peroxidasa (POD). En presencia de una mezcla de fenol y 4-aminoantipirina (4-AA), se llevan a cabo tres reacciones principales (**Figura 9**): (1) la enzima CE hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol y ácidos grasos libres; (2) la enzima CO oxida todo el colesterol a colesteno y peróxido de hidrógeno y finalmente, (3) el peróxido de hidrógeno es sustrato de la enzima POD, que junto con la 4-aminoantipirina (4-AA) da lugar a la formación de una quinona roja con absorbancia máxima a 505 nm, la cual será proporcional a la concentración de colesterol en la muestra (Linear Chemicals, S. L., 2020).

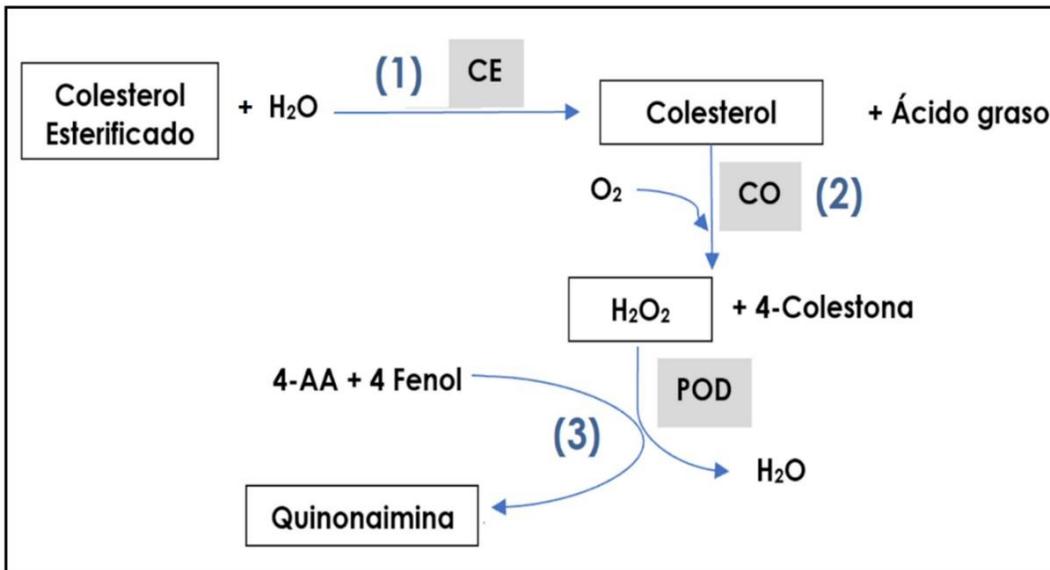


Figura 9. Reacciones químicas llevadas a cabo durante la determinación de colesterol total en plasma. CE: Coolesterol esterasa, CO: Coolesterol oxidasa, POD: Peroxidasa.

5.11.2 Cuantificación de triacilgliceroles

En la actualidad, los métodos utilizados en la cuantificación de triacilgliceroles (TAG) se basan en la cuantificación de su contenido en glicerol. Al igual que el coolesterol, podemos considerar dos tipos de métodos: los químicos y los enzimáticos. Los métodos químicos se basan en la extracción tras hidrólisis del glicerol y posterior oxidación a formaldehído, que se mide por reacción colorimétrica. Por otro lado, los métodos enzimáticos se basan en la hidrólisis de los TAG por acción de lipasas y determinación enzimática del glicerol liberado (Díaz *et al.*, 1997).

El método empleado está basado en cuatro reacciones enzimáticas (**Figura 10**): (1) la hidrólisis de los TAG séricos a glicerol y ácidos grasos libres por acción de la lipoproteína lipasa (LPL); (2) el glicerol es fosforilado por el adenosin trifosfato (ATP) en presencia de glicerol cinasa (GK) para formar glicerol-3-fosfato (G-3P) y adenosin difosfato (ADP); (3) el G-3P es oxidado por la glicerofosfato oxidasa (GPO) en dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y (4) en presencia de peroxidasa (POD), el fenol y la 4-AA se condensan por acción del

peróxido de hidrógeno formándose un cromógeno rojo, el cual es proporcional a la concentración de TAG en la muestra (Linear Chemicals, S. L., 2020).

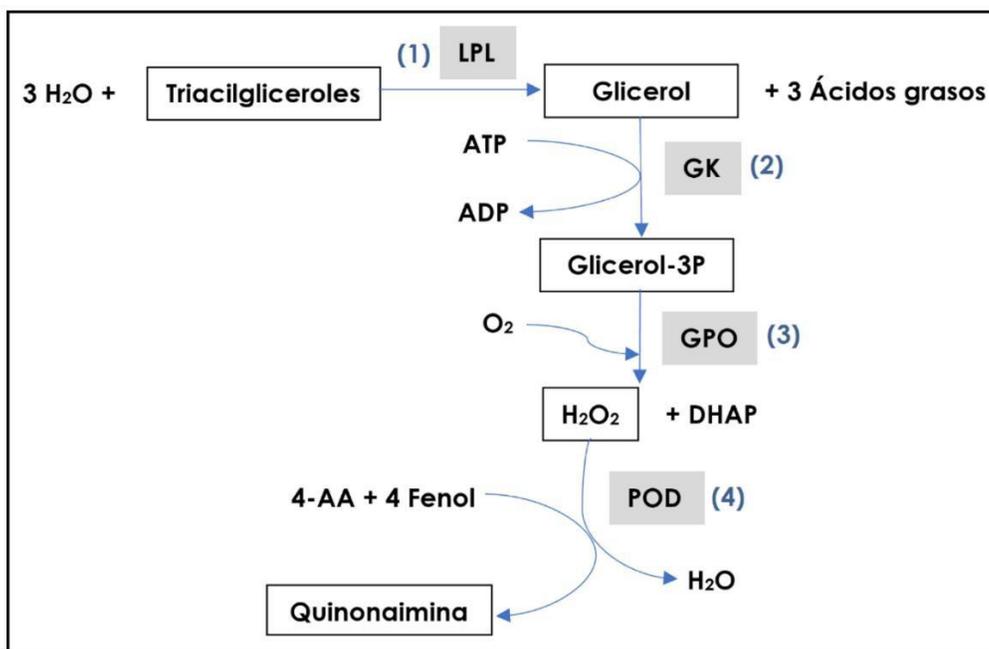


Figura 10. Reacciones químicas llevadas a cabo durante la determinación de triacilgliceroles en plasma. LPL: Lipoproteína lipasa, GK: Glicerol cinasa, GPO: Glicerofosfatasa oxidasa, POD: Peroxidasa.

5.12 PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DEL OVARIO

Después de registrar el peso del tejido ovárico, se colocó en una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en amortiguador de fosfato salino (PBS) a pH 7.4 durante 24 horas a 4°C y con agitación constante en un agitador orbital marca **Orbital Shaker® TS-1000** para su fijación. Posteriormente, se colocaron y se almacenaron en PBS a 4°C hasta su procesamiento en parafina.

El tejido fijado fue colocado en cassettes de inclusión Simport® y se sometió a un proceso de deshidratación mediante exposiciones sucesivas a soluciones alcohólicas de concentración creciente, xilol y por último, infiltración en parafina líquida (**Anexo IV A y B**). Posteriormente, los tejidos se incluyeron en bloques de parafina en una consola de inclusión marca **Tissue-Tek® II** a 56 °C.

Después, se obtuvieron cortes seriados de 4 μm de grosor con 200 μm de separación hasta concluir con el tejido; obteniendo así, varios niveles de tejido en cada ovario. De esta manera, se obtuvieron muestras representativas de todo el órgano. Lo anterior se realizó en un microtomo marca **Reichert-Jung® 1130/Biocut** como se observa en la **Figura 11**. Los cortes se colocaron de forma consecutiva en portaobjetos como se detalla en la figura siguiente:

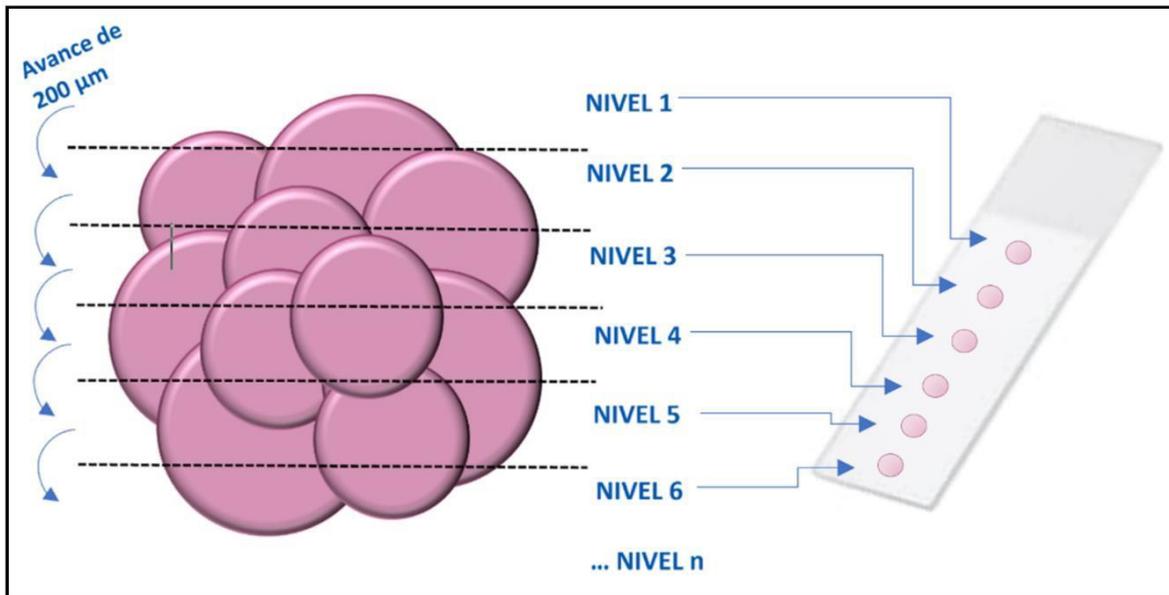


Figura 11. Representación de los cortes obtenidos del ovario.

Una serie de portaobjetos con todos los niveles del ovario fue teñida con la técnica de Hematoxilina-Eosina (HE), la cual se aborda a detalle en el **Anexo IV-C**.

5.13 CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL OVARIO

5.13.1 Conteo de estructuras ováricas

Después de la tinción con HE, los cortes histológicos se observaron en un microscopio óptico (**Primo Star ZEISS®**) en el objetivo 40X y se comenzó el conteo de folículos en cada clasificación, quistes y cuerpos lúteos en campos visuales seriados como se observa a continuación:

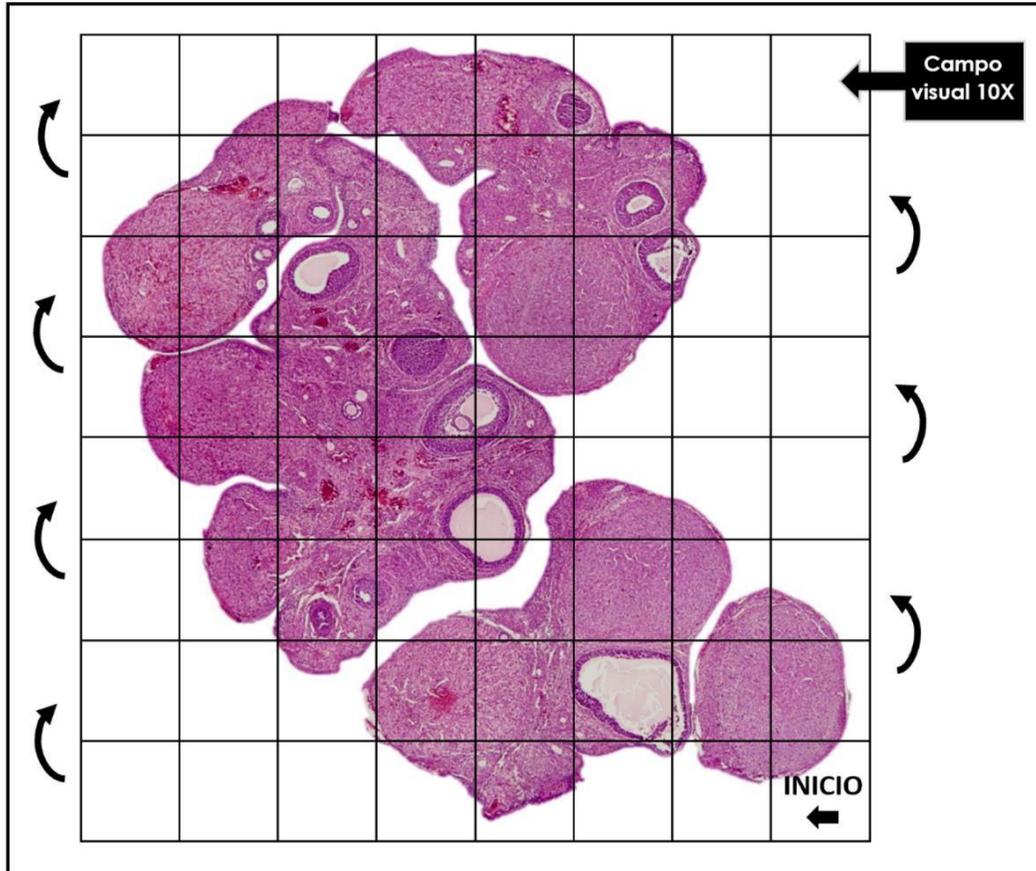


Figura 12. Representación del conteo de folicular del ovario.

Únicamente se contaron aquellos folículos con un ovocito visible, esto para evitar una sobreestimación en los valores. Los folículos se clasificaron tomando como criterio lo publicado por Myers y colaboradores en 2004 detallado en la introducción, lo cual se resume a continuación:

- Folículo primordial (FPr): capa parcial o total de células de la granulosa (CG) escamosas aplanadas.
- Folículo primario (FP): una sola capa de CG cuboides.
- Folículo secundario (FS): más de una capa de CG cuboides rodeando al ovocito, sin un desarrollo de antro.
- Folículo antral (FAn): presenta múltiples capas de células de la granulosa con un antro claramente definido.

- Folículo terciario (FT): de gran tamaño, con varias capas de CG y la mayor parte del ovocito se encuentra embebido en el antro. Generalmente se encuentran en la superficie del ovario.
- Folículo atrésico (FAtr): CG dañadas, no se aprecian con forma definida en conjunto.
- Cuerpo lúteo (CL): de forma circular y con células productoras de hormonas esteroides. Generalmente se encuentran en la superficie del ovario.
- Quiste (Q): estructuras circulares llenas de fluido ovárico y rodeadas por una capa de células de la granulosa y células de la teca más delgadas y usualmente con forma irregular.

5.13.2 Análisis morfométrico del ovario

Finalmente, se determinó el área del ovario mediante micrografías digitales con el objetivo 4X en formato TIF (**Axiocam ERC 5s ZEISS®**). Utilizando estas imágenes, se realizó la medición del área del ovario con la finalidad de expresar el número de folículos de cada categoría por unidad de área (10 mm²).

5.14 APAREAMIENTO Y DETERMINACIÓN DE LA FERTILIDAD Y LA FECUNDIDAD

Al comienzo de la semana 19 de dieta, se colocó a un macho no experimental de edad adulta por cada dos hembras del mismo grupo experimental en cada caja, con el fin de llevar a cabo el apareamiento durante una semana. Las ratas macho fueron proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Al finalizar el periodo de apareamiento, cada hembra fue colocada en una caja y tuvieron acceso al agua y a su dieta respectiva *ad libitum* durante toda la gestación realizando, además, la cinética de ganancia de peso corporal y la cinética de consumo de alimento.

Durante el primer periodo de apareamiento, únicamente se lograron dos embarazos; uno del grupo CTR y otro del grupo HFD. Esto a causa de anomalías en los machos proporcionados por el bioterio, pues al realizarse una disección y espermatobioscopía, se encontró hipogonadismo en los animales, así como oligozoospermia^{xi} y azoospermia^l, es por ello que se decidió repetir el periodo de cruza con un lote nuevo de machos proporcionados por el bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Los apareamientos se llevaron a cabo durante la semana 19 y la semana 24 de dieta.

Durante los nacimientos se registró el tamaño de camada (número de crías), la cantidad de crías de cada sexo y el peso corporal, el cual se obtuvo empleando una balanza electrónica (**Biomédica 2002**). El sexado de crías se determinó mediante la medición de la distancia ano-genital con un vernier.

Finalmente, se determinó la fertilidad obteniendo el porcentaje de hembras preñadas, mientras que el tamaño de la camada reflejaría la fecundidad en cada grupo experimental.

5.15 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como la media de cada grupo \pm el error estándar de la media (SEM). Se realizó la prueba de *t* de Student y se determinó diferencia significativa con una $p \leq 0.05$. Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism® versión 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

5.16 PAQUETERÍA INFORMÁTICA

- Las imágenes no citadas en este trabajo se realizaron en la página web de BioRender© (BioRender, 2020).
- El procesamiento de imágenes para la medición del área del ovario se realizó mediante el programa de procesamiento de imágenes FIJI (Fiji Is Just ImageJ, National Institute of Health).
- Los gráficos se realizaron con el software GraphPad Prism® versión 6.0 (GraphPad Software, Inc.).

6. RESULTADOS

6.1 GANANCIA DE PESO CORPORAL Y CONSUMO DE ALIMENTO

Se llevó a cabo un registro semanal individual de la ganancia de peso corporal y del consumo de alimento en cada grupo experimental. Transcurridas las 18 semanas de tratamiento, los resultados de ganancia de peso corporal se plasmaron en un gráfico con las semanas de dieta en el eje de las abscisas y la ganancia de peso correspondiente en el eje de las ordenadas (**Figura 13**). Por otro lado, los resultados de consumo de energía se expresaron en calorías por gramo de peso corporal y se presentan en la **Figura 14**.

a) Ganancia de peso corporal

En la **Figura 13A** se observa que al inicio de la dieta ambos grupos comienzan con un peso corporal similar (CTR= [117.6 ± 3.5] g; HFD= [115 ± 3.9] g). Posteriormente, se observa un aumento significativo en el peso corporal del grupo CTR respecto al grupo HFD; tras dos semanas de haber iniciado el experimento.

Durante el tratamiento experimental, ambos grupos mantuvieron un peso similar; sin embargo, el peso corporal del grupo HFD comenzó a aumentar a partir de la semana 7 y se mantuvo por arriba del grupo CTR durante el resto del tratamiento, mostrando diferencia significativa en la semana 18 de dieta (CTR= [263 ± 13.2] g; HFD= [305.6 ± 16.1] g).

Al igual que en la **Figura 13A**, se observa que el grupo HFD comenzó a adquirir un mayor porcentaje de ganancia de peso corporal en comparación con el grupo CTR a partir de la semana 7; presentando una diferencia significativa en las semanas 10 a la 14, 17 y 18 (**Figura 13B**).

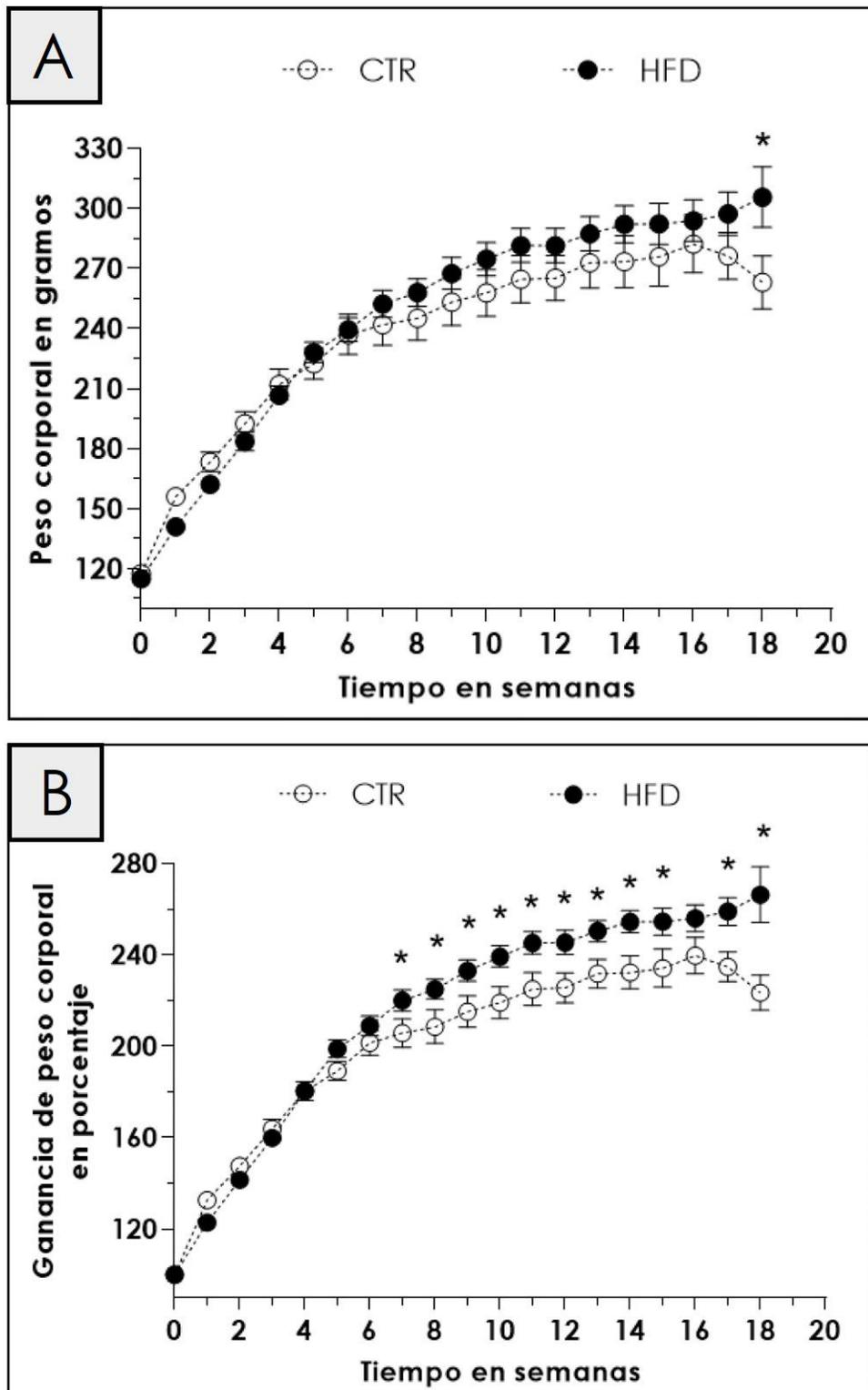


Figura 13. Evaluación semanal del peso corporal durante el tratamiento. Se presentan los datos de: la cinética de peso corporal absoluto (**A**) y la cinética de ganancia de peso corporal porcentual (**B**) del grupo control (CTR, n=9) y el

grupo tratado (HFD, n=12). El peso corporal se reporta en porcentaje respecto al peso al inicio del tratamiento (semana 0). Los puntos representan la media \pm SEM. (*) Denota diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

a) Consumo de alimento

En la **Figura 14** se presenta el consumo energético durante las 18 semanas de tratamiento, en la cual no se observa una tendencia clara, puesto que el consumo energético entre grupos fue variable.

De acuerdo con la **Figura 13A y B**, a partir de la semana 7 se presentó un incremento en la ganancia de peso corporal del grupo HFD respecto al grupo CTR; mientras que en la **Figura 14A** se observa que hubo un mayor consumo energético individual en el grupo HFD de la semana 5 hasta la semana 8, mostrando diferencia significativa en la semana 7 (CTR= $[67.0 \pm 2.8]$ kcal; HFD= $[73.14 \pm 1.7]$ kcal) y en la semana 8 (CTR= $[59.3 \pm 3.8]$ kcal; HFD= $[78.9 \pm 5.47]$ kcal).

Por otro lado, en la **Figura 14B** se observa que de la semana 6 a la semana 8 se presentó una relación de consumo energético/ peso corporal similar entre ambos grupos.

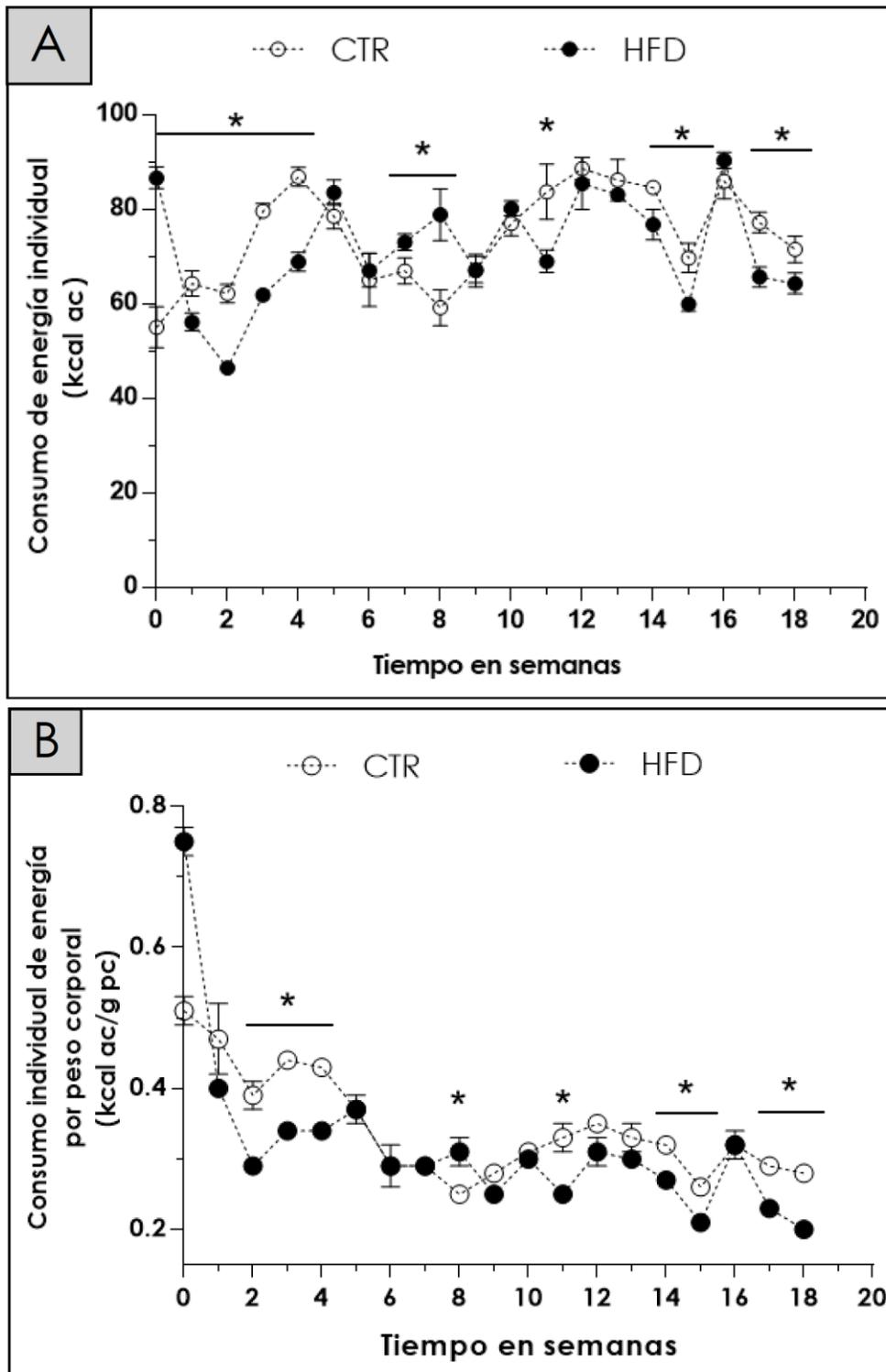


Figura 14. Evaluación semanal del consumo de energía durante el tratamiento. Se presentan los datos de la cinética de consumo individual de energía en 24 horas expresado en calorías de alimento consumido (kcal ac) (A) y la cinética de consumo de energía individual por peso corporal en 24 horas

expresado en calorías de alimento consumido por gramo de peso corporal (g pc) (**B**) del grupo CTR (n=9) y del grupo HFD (n=12). Los puntos denotan la media \pm SEM. (*) Denota diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

6.2 METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO

El metabolismo de los hidratos de carbono se evaluó mediante la determinación de la concentración de glucosa en ayuno y las pruebas intraperitoneales de tolerancia a la glucosa (IPGTT) y sensibilidad a la insulina (ITT). Respecto a la glucosa en ayuno, el grupo HFD presentó una mayor concentración ($[101.6 \pm 1.9]$ mg/dL), mostrando diferencia significativa respecto al grupo CTR ($[85.4 \pm 2.7]$ mg/dL) (**Figura 15A**).

En el caso de la prueba de tolerancia a la glucosa, se observó que en ambos casos la respuesta a la dosis de glucosa administrada al inicio de la prueba ocurrió a los 15 y 30 minutos, y su disminución se presentó a partir del minuto 60 y hasta concluir la prueba. Sin embargo, el grupo HFD mostró un incremento significativo en la concentración de glucosa, este valor fue aproximadamente del triple respecto a su concentración inicial en el minuto 15 (**Figura 15B**). Esto sugiere un metabolismo alterado de los hidratos de carbono en el grupo HFD.

Aunado a lo anterior, en ambos casos se observó una respuesta inmediata a la dosis inicial de insulina en la ITT; ya que su efecto sobre la concentración de glucosa comenzó al minuto 15 (**Figura 15C**). Se observó que a partir del minuto 60, la concentración de glucosa en sangre aumentó en ambos casos, aunque este incremento resultó ser estadísticamente mayor en el grupo HFD; además de mostrar un periodo de respuesta de la insulina exógena más reducido en el grupo HFD respecto al grupo CTR (**Figura 15C**).

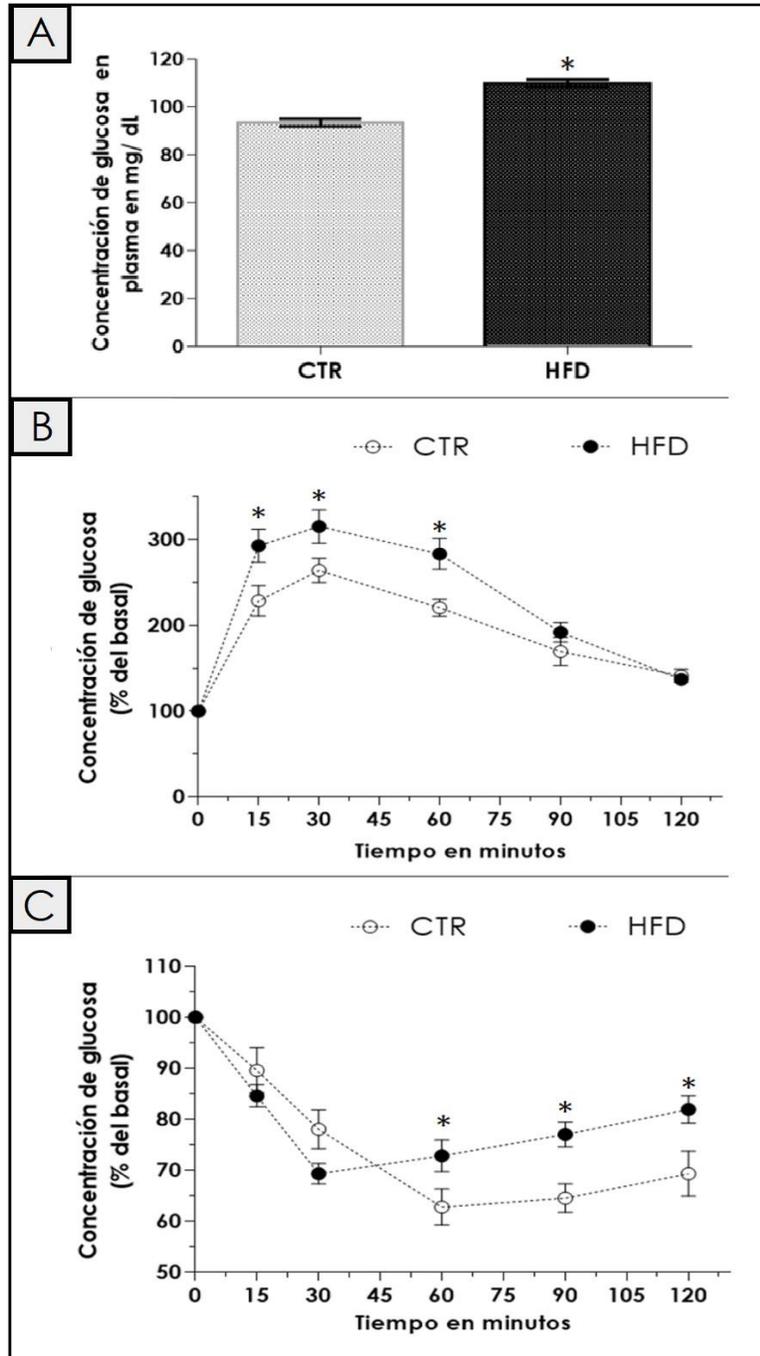


Figura 15. Metabolismo de los hidratos de carbono. Se presentan los resultados de la concentración de glucosa en ayuno (A), la curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (B) y la curva de sensibilidad a la insulina intraperitoneal (C) a las 18 semanas de tratamiento. (A) y (B) CTR (n=9), HFD (n=12); (C) CTR (n=8), HFD (n=12). Los puntos representan la media del porcentaje del basal \pm EE. (*) Denota diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

6.3 ANÁLISIS ANATÓMICO Y COMPOSICIÓN CORPORAL

A continuación, se presentan los resultados correspondientes al análisis anatómico y a la composición corporal de los animales.

a) Análisis anatómico

En la **Figura 16** se aprecia que el animal del grupo HFD presentó mayores dimensiones corporales, específicamente en el área abdominal comparado con el grupo CTR.

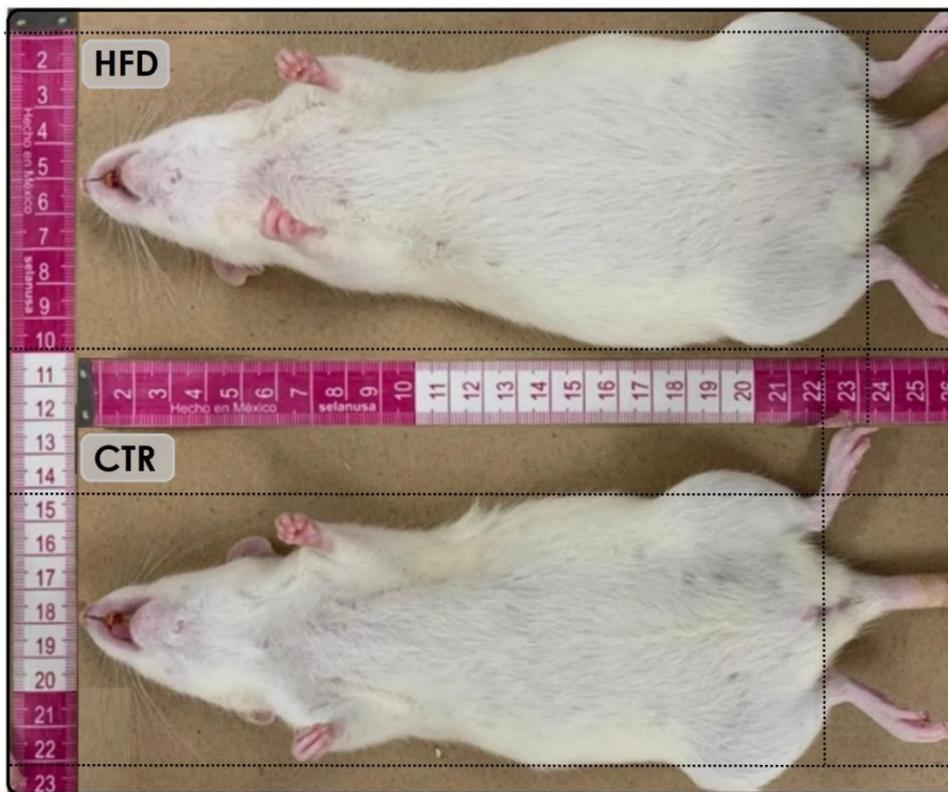


Figura 16. Figura representativa de los animales a las 18 semanas. Se presenta a un animal del grupo CTR (abajo) y del grupo HFD (arriba). Imagen capturada con una cámara digital en el punto final del tratamiento, los animales se encontraban bajo anestesia.

Lo observado en la Figura 16 también se refleja en la Tabla 6, en la que se presenta el análisis anatómico de los grupos experimentales. Se observa que el peso corporal del grupo HFD fue 1.16 veces mayor (305.63 ± 15.03 g) comparado con el grupo CTR (263.00 ± 13.20 g); sin embargo, no hubo diferencias significativas en la

talla, perímetro abdominal, ni en el índice de Lee.

Tabla 6. Análisis anatómico de los grupos experimentales.

	Talla (cm)	Perímetro abdominal (cm)	Índice de Lee	Peso corporal (g)*
CTR (n=5)	21.64 ± 0.33	16.84 ± 0.58	0.29 ± 0.00	263.00 ± 13.20
HFD (n=8)	22.34 ± 0.31	18.01 ± 0.52	0.30 ± 0.01	305.63 ± 15.03

Se presenta media ± SEM. (*) Denota diferencia estadísticamente significativa (p<0.05).

b) Composición corporal

El grupo HFD, además de tener un mayor peso corporal al final del tratamiento, también presentó una mayor cantidad de depósitos de tejido adiposo. El TAV del grupo HFD fue 2.42 veces más pesado que el del grupo CTR (CTR= [5.45 ± 1.02] g; HFD= [13.21 ± 1.84] g) (**Figura 17A**) y representó un mayor porcentaje de la masa total del animal (**Figura 17B y 17C**); además, se observó más del triple de TAV respecto a TSC.

Esta tendencia también se observó en el TASC, el cual fue 1.94 veces superior en el grupo HFD ([3.42 ± 0.48] g) en comparación con el grupo CTR ([1.76 ± 0.28] g). Asimismo, el TASG resultó ser 2.34 veces más pesado en el grupo HFD ([5.01 ± 0.72] g) que en el grupo CTR ([2.14 ± 0.60] g) (**Figura 17A**). Lo anterior resultó en un mayor porcentaje de TASC y TASG respecto a la masa total del animal (**Figura 17B**). Además, el grupo CTR presentó un valor de grasa total de [7.21 ± 1.28] g, mientras que la grasa total en el grupo HFD fue de [16.63 ± 2.24] g, 2.30 veces superior. La diferencia entre grupos en los valores de su composición corporal mostró ser estadísticamente significativa.

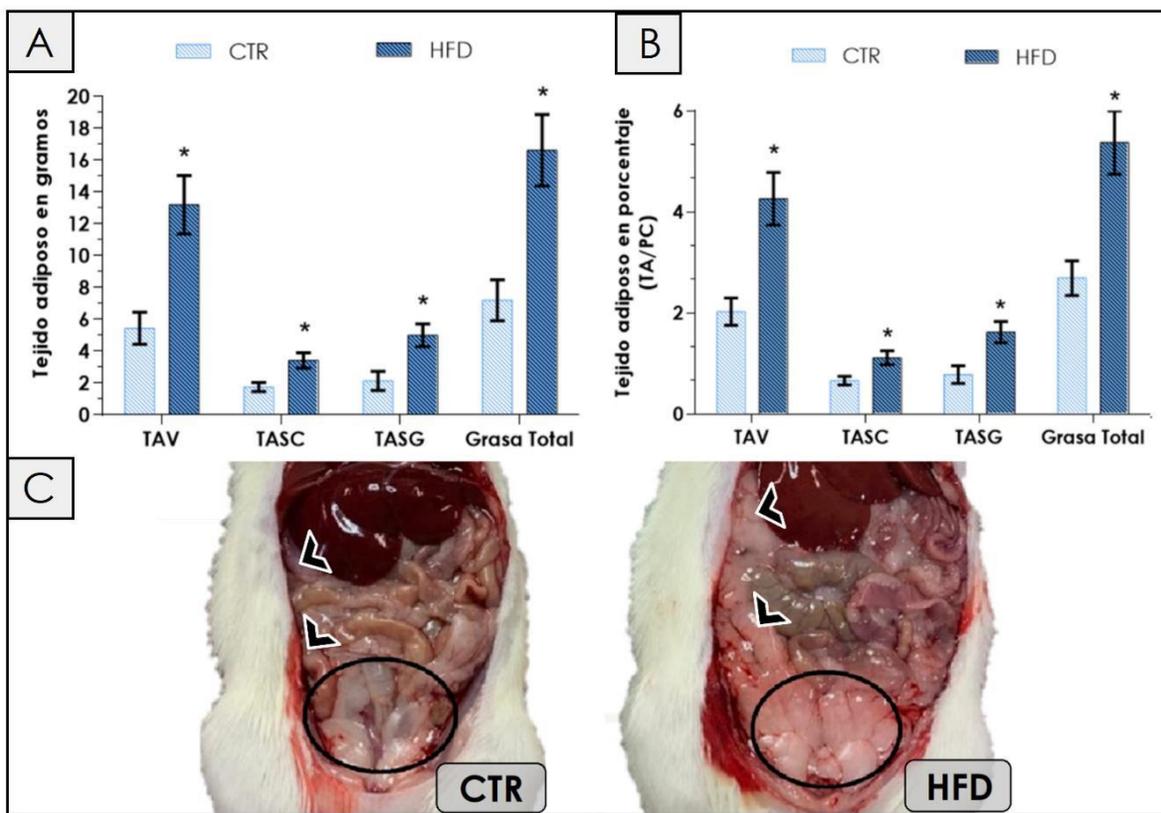


Figura 17. Tejido adiposo. Se presentan los resultados de tejido adiposo expresados en gramos (A), en porcentaje respecto al peso corporal (B) y una imagen representativa del tejido adiposo visceral de un animal del grupo CTR y uno del grupo HFD a las 18 semanas de tratamiento. Se encuentra señalado con puntas de flecha el TAV y en un óvalo el TASG (C). La imagen fue tomada con una cámara digital. Las barras denotan la media \pm SEM. (*) Denota diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

6.4 METABOLISMO DE LÍPIDOS

Los resultados de la concentración de TAG y CT en plasma mostraron una tendencia a disminuir en el grupo HFD en comparación con el grupo CTR, sin tener diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Lo anterior se presenta en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Resultados de la determinación de TAG y CT a las 18 semanas de tratamiento.

	Triacilgliceroles (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)
CTR (n=5)	38.94 ± 6.00	59.77 ± 2.79
HFD (n=7)	24.78 ± 6.43	52.36 ± 2.02

6.5 CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL OVARIO

Con la finalidad de observar el efecto de la dieta administrada en el ovario, se realizó la caracterización histológica del mismo, mediante el conteo de las siguientes estructuras: folículos, quistes y cuerpos lúteos.

Los resultados se presentan en la **Figura 18** y están expresados como número de estructuras por cada 10 mm² de tejido ovárico. En ella se observa que la cantidad de folículos primordiales, secundarios, antrales, terciarios, atrésicos, así como de cuerpos lúteos, no presentan una diferencia estadísticamente significativa. Por otro lado, el grupo HFD presentó una mayor cantidad de quistes; presentando diferencia estadística con respecto al grupo CTR.

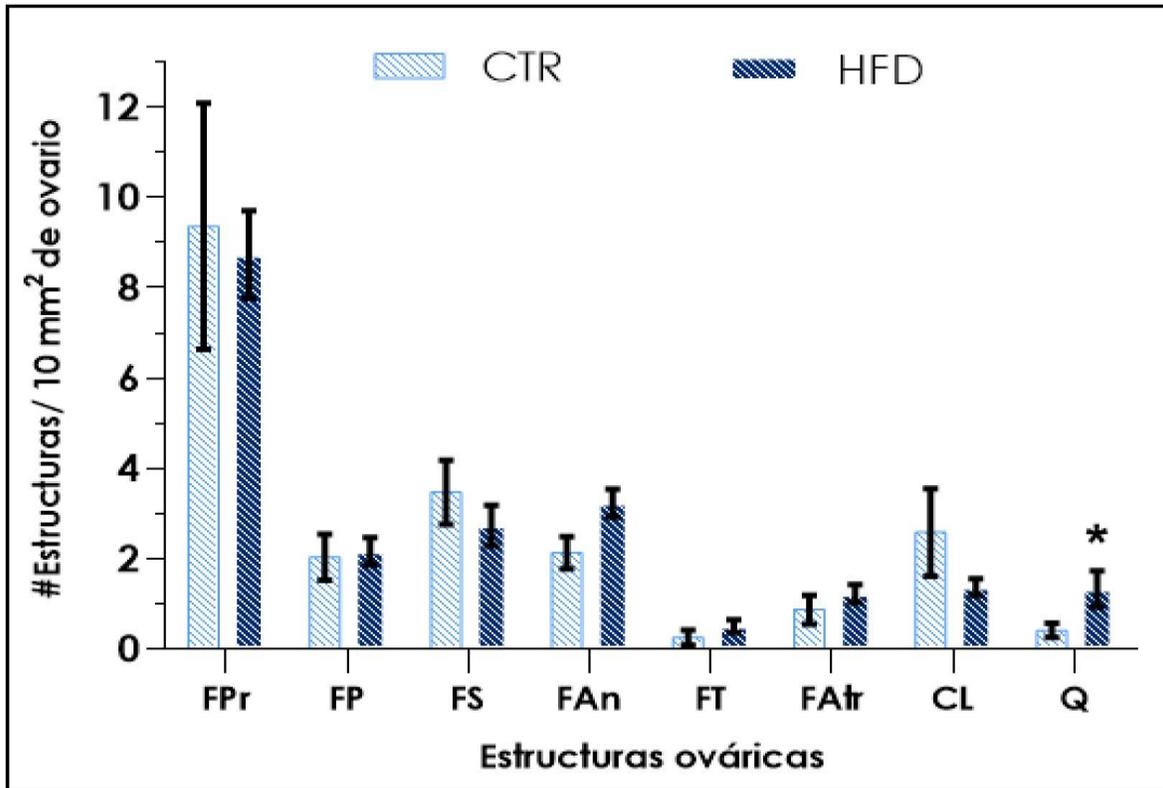


Figura 18. Caracterización histológica del ovario. Se presentan los resultados del conteo de folículos, quistes (Q) y cuerpos lúteos (CL) por una unidad de área de 10 mm² de tejido ovárico. Los folículos ováricos se clasificaron de la siguiente forma: Primordial (Pr), Primario (P), Secundario (S), Antral (An), Terciario (T) y Atrésico (A). Las barras denotan la media ± SEM. (*) Denota diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Los quistes fueron las estructuras que se presentaron con mayor frecuencia en los ovarios del grupo HFD, además de observar infiltraciones de tejido adiposo (Figura 19).

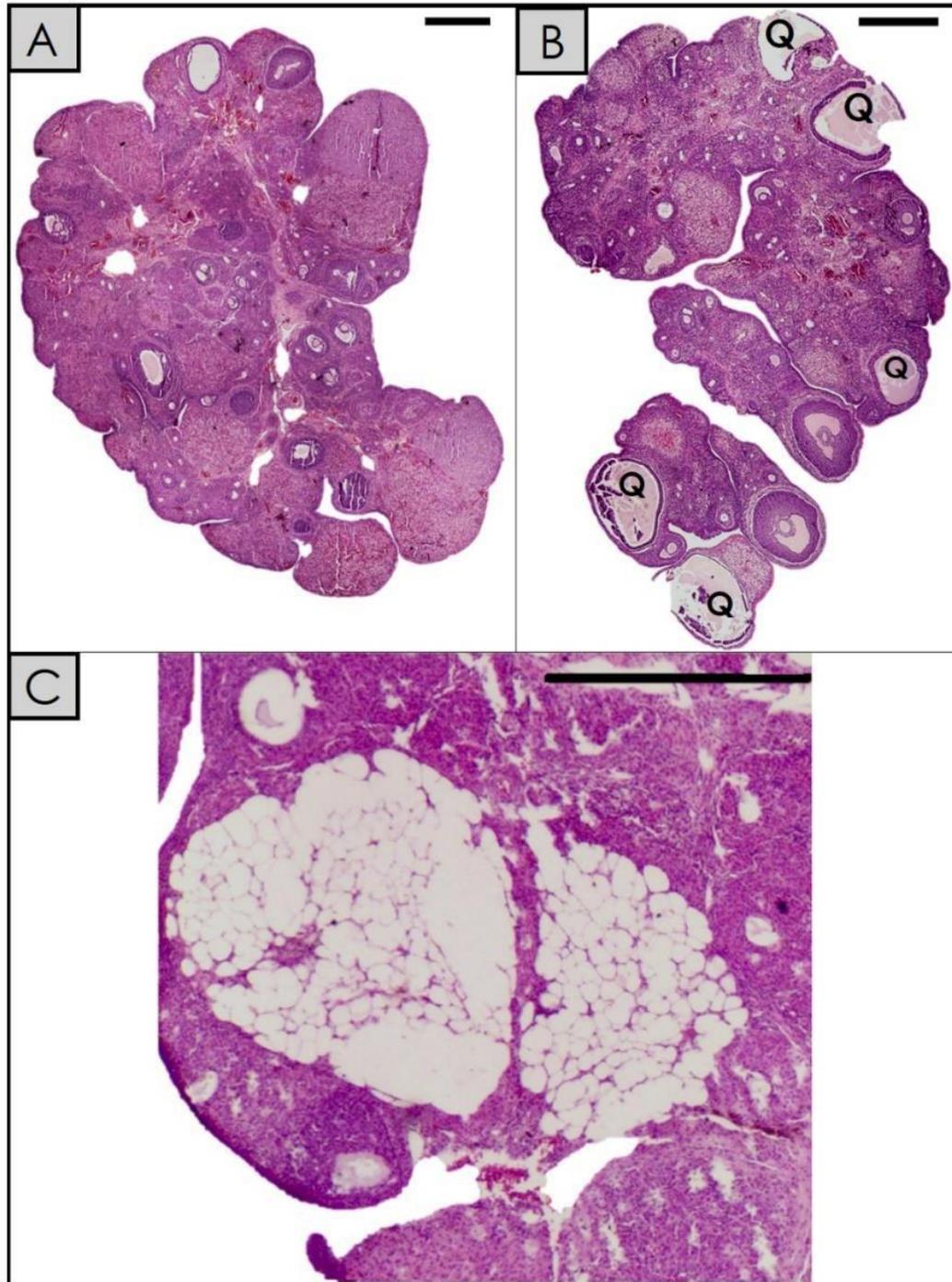


Figura 19. Efecto de la dieta alta en grasa en el ovario. Se presentan imágenes representativas del grupo CTR (A) y del grupo HFD (B) a las 18 semanas de tratamiento. Además, se observa una infiltración de tejido adiposo (C) y la presencia de quistes (Q). La barra denota una escala de 500 μ m.

6.6 EFECTO DE LA DIETA HFD EN LA FERTILIDAD Y EN LA FECUNDIDAD

Después de la disección y resección de los ovarios para la caracterización histológica, el resto de los animales tuvo un periodo de apareamiento para la determinación de fertilidad y fecundidad, los resultados de dichas determinaciones fueron los siguientes.

Los resultados de la determinación de fertilidad mostraron que el 100% de las hembras del grupo CTR lograron concebir un embarazo, a diferencia de las hembras HFD que tuvieron un 75% de fertilidad (**Figura 20A**). Asimismo, en la **Figura 20B** se observa que el tamaño de la camada en el grupo CTR resultó en un número de crías entre 8 y 10, mientras que las hembras HFD alcanzaron un tamaño de camada máximo de 7 crías, lo que se traduce en un menor grado de fecundidad.

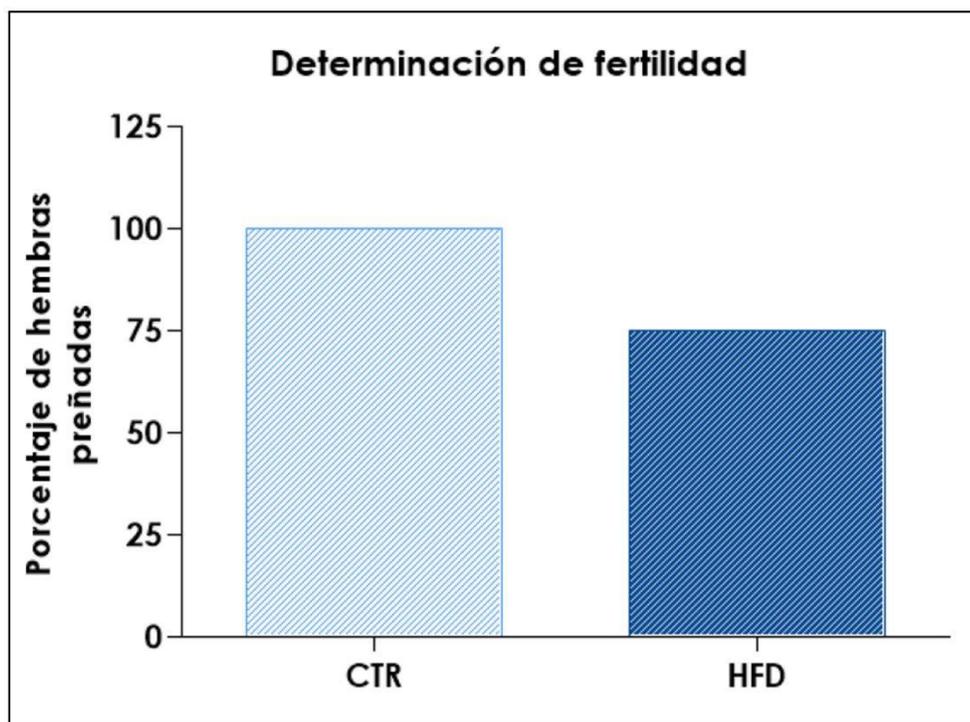


Figura 20A. Determinación de la fertilidad. Se presentan los resultados del porcentaje de hembras preñadas CTR (n=4) y del grupo HFD (n=4).

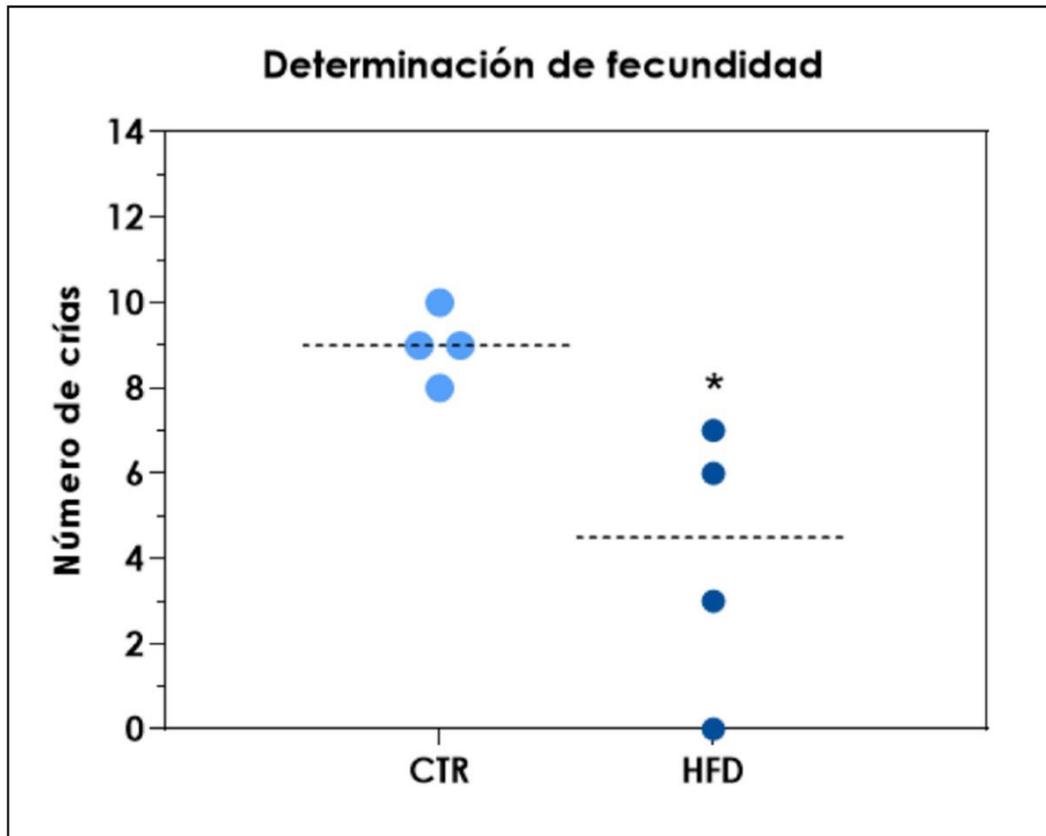


Figura 20B. Determinación de la fecundidad. Se presentan los resultados del tamaño de camada del grupo CTR (n=4) y del grupo HFD (n=4). (*) Denota diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Del año 2012 al 2018, la obesidad en mujeres en México ha aumentado cerca de un 2.7%, representando un 76.8% de las mujeres adultas (ENSANUT, 2018); afectando la calidad de vida de la población en distintos ámbitos. La nula mejoría de esta situación, ha provocado que México se posicione como uno de los primeros países a nivel mundial con una mayor prevalencia de obesidad y de sus comorbilidades asociadas. En el presente trabajo, se aborda cómo ésta problemática puede incidir en la fertilidad y en la fecundidad. Para ello, se empleó un modelo murino (ratas *Wistar*) de obesidad inducida por dieta.

Uno de los primeros objetivos de este trabajo fue el de generar un modelo experimental de obesidad. Para ello, partiendo del hecho de que la obesidad se caracteriza por un aumento en los depósitos de grasa como consecuencia de un balance positivo de energía; se elaboró una dieta con un contenido lipídico del 60%, lo que se clasifica como una dieta alta en grasa, puesto que, en roedores, el valor normal de este grupo de nutrimentos oscila entre el 4 y el 15% de grasa en peso de alimento (Mickelson *et al.*, 2020). Esta dieta se administró a 12 ratas *Wistar* de 4 SPN de edad (grupo HFD) durante 18 semanas. Los resultados se compararon en todo momento con el grupo CTR que estuvo conformado por 9 ratas *Wistar* de 4 SPN de edad, alimentadas con una dieta balanceada y normocalórica (5001 LabRodent Diet).

Se sabe que, para el desarrollo de la obesidad, el tipo de grasa juega un papel importante. Algunos estudios han reportado que no todas las grasas son obesogénicas y el perfil de ácidos grasos, es una variable importante para el desarrollo de la obesidad (Moussavi *et al.*, 2008; Hariri-Thibault, 2010). La tasa de oxidación de los ácidos grasos saturados disminuye conforme aumenta el número de carbonos en su estructura, teniendo la tasa de oxidación más alta (72%) el ácido láurico (12 carbonos) y la más baja (28%) el ácido esteárico (18 carbonos) (Moussavi *et al.*, 2008; Hariri-Thibault, 2010). Por otro lado, los ácidos grasos poli-

insaturados, especialmente los omega-6 y omega-3 tienen tasas de oxidación más altas que los SFA de cadena larga (Moussavi *et al.*, 2008).

Es por ello que, el aporte energético de la grasa provino principalmente de ácidos grasos saturados, provenientes de una fuente animal (manteca de cerdo) y de ácidos grasos insaturados, provenientes de una fuente vegetal (aceite de oliva). Dichas fuentes de lípidos tienen una composición en orden ascendente de ácidos: oléico (18:1), palmítico (16:0), linoléico (18:2) y esteárico (18:0) (Yanty *et al.*, 2011; Rohman *et al.*, 2012), en el caso de la manteca de cerdo, mientras que la composición del aceite de oliva en orden ascendente es la siguiente: oléico (18:1), palmítico (16:0) y linoléico (18:2) (Gurdeniz *et al.*, 2010).

Al cabo del tiempo de tratamiento, se observó una mayor eficiencia de conversión de energía consumida en peso corporal en el grupo HFD. A partir de la semana 10 de tratamiento hubo diferencia significativa en el peso corporal y esta tendencia permaneció de forma mayoritaria el resto del tratamiento, generando una ganancia de peso corporal mayor en un 16%, en comparación con el grupo CTR. También se observó que una parte significativa de la diferencia en el peso corporal resultó ser por una composición mayor de panículos de tejido adiposo visceral, subcutáneo y supragenital en el grupo HFD, resultando en un porcentaje de grasa total 1.99 veces superior que en el grupo CTR.

Se sabe que el exceso de grasa en la dieta no aumenta la oxidación completa de la grasa para la obtención de energía, además de que el exceso de calorías en forma de grasa se almacena fácilmente como TAG en el TA con una eficiencia superior al 96%, ya que este nutrimento requiere menos energía (2-3%) para ser absorbido y digerido (Campfield *et al.*, 2003; Adorni *et al.*, 2017). Lo anterior se ha manifestado en varios experimentos con modelos murinos que consumen una dieta HFD, mostrando una diferencia significativa entre el grupo HFD con respecto al grupo CTR en al menos un 93% de los experimentos y parece ser proporcional al tiempo de administración,

observando cambios más aparentes después de las 10 semanas; así como a la edad del animal (Zore *et al.*, 2018; Rodríguez-Correa *et al.*, 2020).

Cabe resaltar que varias publicaciones han reportado el uso de dietas altas en grasa producidas de forma industrial; tal es el caso del modelo murino de obesidad empleado por Wu y colaboradores, en el cual se observó en el grupo HFD, un incremento dos veces superior en el IMC respecto al grupo CTR, empleando una dieta de Research Diets, Inc. (Wu *et al.*, 2016). El modelo empleado por Hohos y colaboradores también se basó en la alimentación de los animales con una dieta de Research Diets, Inc.; en donde se encontró que el aumento de peso corporal en el grupo HFD respecto al grupo CTR fue del 30%, mientras que el porcentaje de grasa corporal fue un 27% superior; ambos mostrando diferencia estadística (Hohos *et al.*, 2018).

Por otro lado, en el presente trabajo se empleó una dieta formulada y elaborada por el grupo de investigación del Departamento de Embriología y Genética de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M.. Estos resultados indican que la dieta empleada es capaz de inducir la obesidad, la cual es comparable con las de origen industrial. Esto es de gran importancia, ya que la relación costo-beneficio de esta dieta es significativamente mayor, además de su accesibilidad, ya que no requiere ser importada y de su flexibilidad, puesto que es posible de manera relativamente fácil la modificación de su formulación para investigaciones posteriores. Por ejemplo, se pueden modificar los porcentajes de cada uno de los macronutrientes así como el origen de los mismos. Adicionalmente, la aportación energética total por gramo de alimento consumido en la dieta del presente trabajo (HFD) es de 5.82 kcal/g, la cual es mayor en comparación con la dieta alta en grasa de Research Diets, Inc. (HFD_{RD}), la cual es de 5.21 kcal/g (Research Diets, Inc., 2021).

Por otro lado, la fuente de grasas saturadas en la dieta HFD_{RD} provienen de la manteca de cerdo, mientras que las grasas insaturadas son aportadas por el aceite de soya y tienen una relación saturadas:insaturadas de 90:10 (Research Diets, Inc., 2021), caso contrario a la dieta HFD, cuya relación es de 50:50. Lo anterior,

representa una desventaja comparada con la dieta que se empleó, pues, a pesar de que en el aceite de soya predomina el ácido linoléico (Dijkstra, 2016), la proporción de grasa saturada es superior y tiene una mayor influencia en el aumento de tejido adiposo. Otra desventaja de la dieta HFD es que los hidratos de carbono aportados por la croqueta estándar, provienen de distintos tipos de cereales, en los cuales es posible la presencia de contaminantes como: micotoxinas, metales pesados, fitoestrógenos y pesticidas, los cuales pueden influir en el desarrollo de enfermedades en el animal (Pellizzon-Ricci, 2018), a diferencia de los hidratos de carbono en la dieta HFD_{RD}, que son la maltodextrina y la sacarosa, considerados químicamente puros.

En lo que concierne al consumo de alimento, en general se observó que el consumo de energía entre grupos fue variable cada semana. Un consumo energético variable entre grupos se debe en gran medida a la composición de la dieta, ya que una dieta alta en grasa suele ser más saciante que aquella rica en otros componentes, como lo observado en el grupo HFD (Lawton et al., 2000; French-Robinson, 2003). Durante pocas semanas se observó un consumo energético superior en el grupo HFD, en algunas se observó un consumo calórico similar entre grupos e incluso, en gran parte del experimento, se observó un mayor consumo de calorías por parte del grupo CTR; sin embargo, se debe considerar que la composición de las dietas es distinta, favoreciendo un mayor consumo de lípidos por parte del grupo HFD, demostrando así que la ganancia de peso corporal no fue debido al consumo energético, sino a la composición de macronutrientes.

Por otro lado, el metabolismo de los hidratos de carbono en el grupo HFD mostró estar alterado. Se observó diferencia significativa en la concentración de glucosa en ayuno y un incremento tres veces superior como respuesta a la dosis exógena de la misma, en la prueba de tolerancia a la glucosa. Además, en este mismo grupo, en la prueba de sensibilidad a la insulina se observó una respuesta menor a la administración de insulina exógena. Estos resultados

sugieren una resistencia a la acción de insulina y, por lo tanto, un aumento en su producción para el aprovechamiento y metabolismo de la glucosa.

Los resultados obtenidos en la prueba de sensibilidad a la insulina son compatibles con los reportados en la bibliografía, ya que diversos estudios han mostrado que las dietas altas en grasa parecen ser las más efectivas en la alteración de la glucosa en ayuno, pues este fenotipo se ha manifestado en muchos experimentos previos (Sour *et al.*, 2015; Hong *et al.*, 2017; Ramalho *et al.*, 2017; Rodríguez- Correa *et al.*, 2020).

Por otro lado, en ambos grupos, la curva de sensibilidad a la insulina mostró un incremento en la concentración de glucosa a partir de los 30 minutos, aunque de forma más pronunciada en el grupo HFD. Es posible explicarlo partiendo del hecho de que la insulina es una hormona de carácter anabólico, cuya función principal es la de proveer el aporte necesario de glucosa a las células; impartiendo con ello la activación de la glucólisis y la inhibición de la gluconeogénesis y de la glucogénesis (Martínez-Suárez, 2010). Esto apoya la noción de una disminución de la sensibilidad a insulina en el grupo HFD.

En 2006, Buettner y colaboradores mostraron que un consumo excesivo de aceite de oliva y/o manteca de cerdo conduce a la obesidad y a la resistencia a la insulina en ratas, favoreciendo una mayor transcripción de genes relacionados con la lipogénesis y la glucólisis, como la translocasa CD36 (Buettner *et al.*, 2006). Por otro lado, Moussavi y colaboradores sugirieron que los ácidos grasos poliinsaturados suprimen la expresión de genes lipogénicos, como el gen SREBPs y son mejores activadores del receptor PPAR γ , ambos asociados con la diferenciación de los adipocitos y la regulación metabólica del tejido adiposo, mientras que los ácidos grasos saturados y monoinsaturados no lo hacen (Moussavi *et al.*, 2008). Lo anterior, podría explicar el aumento observado de grasa corporal, así como una disminución en la sensibilidad a la insulina en nuestro modelo experimental en el que la manteca de cerdo y el aceite de oliva, constituyeron las principales fuentes de energía en nuestra dieta.

En cuanto al metabolismo de los lípidos, se encontró una menor concentración de TAG y CT en el grupo HFD, sin mostrar diferencia significativa. Existe amplia evidencia científica sobre la prevención de aterosclerosis y del efecto cardioprotector que proporciona el consumo a largo plazo de aceite de oliva; debido a su composición química, este aceite vegetal influye en la disminución de lipoproteínas LDL, colesterol total y triacilgliceroles, así como en el aumento de lipoproteínas HDL, las cuales transportan el colesterol hasta el hígado para su metabolización y posterior eliminación, sin infiltrarse en las paredes arteriales como en el caso de las lipoproteínas LDL (Sánchez Villegas-Sánchez Tainta, 2018). Un consumo en exceso a mediano plazo de aceite de oliva como en el caso del grupo HFD permitió que se beneficiasen de los efectos antes mencionados, tal como se observó en su perfil lipídico; sin embargo, también propició el almacenamiento de TA como se observó en otros modelos de investigación (Bazzano *et al.*, 2015; Sour *et al.*, 2015; Ramalho *et al.*, 2017; Patel-Shah *et al.*, 2018).

Además, se sabe que el tejido adiposo en exceso ocasiona un desequilibrio metabólico, el cual es caracterizado por la hipertrofia del adipocito, seguido de la reducción en la capacidad de almacenamiento de los TAG y el aumento en la producción de adipocinas pro-inflamatorias, estrés oxidativo y liberación de ácidos grasos por lipólisis, los cuales causan efectos nocivos sistémicos (De Ferranti-Mozaffarian, 2009; Adorni *et al.*, 2017; Metafome-Seiça, 2017). Lo anterior es compatible con lo observado en el grupo HFD, en el que se presentó acumulación de tejido adiposo a lo largo del experimento, incluso ocasionando infiltraciones en el propio ovario.

Por otro lado, con base en los resultados previamente analizados, nuestro modelo murino de obesidad presentó hiperglucemia, resistencia a la insulina y un aumento del tejido adiposo visceral, lo que sugiere un probable incremento en los niveles de leptina e insulina. Estas alteraciones podrían causar afectaciones en la producción de gonadotropinas y hormonas esteroideas. Como fue mencionado en los antecedentes, en la obesidad femenina las alteraciones bioquímicas generadas por el aumento de LH e insulina se manifiestan como: trastornos menstruales,

disfunción ovulatoria, anovulación, SOP y alteraciones en el eje HHO entre otros (Özcan-Dilbaz, 2015; Kini *et al.*, 2020).

Los resultados del análisis morfométrico cuantitativo del ovario, el cual se realizó clasificando a los folículos con base en su etapa de desarrollo, no mostraron diferencias significativas en el número de folículos normalizados a un área de 10 mm² de ovario. En relación a esto, la exposición de los modelos murinos a dietas hipercalóricas e hiperlipídicas han mostrado no guardar una relación entre el tiempo de exposición a la dieta, pues como lo observado por Bazzano y colaboradores en 2016, al emplear una dieta de cafetería a corto plazo, nuestros resultados fueron equiparables a los suyos. Cabe resaltar que existe la posibilidad que un tratamiento a largo plazo tenga un efecto negativo sobre la reserva folicular.

Por otro lado, las alteraciones a causa de la obesidad se manifestaron con el desarrollo de quistes en el grupo HFD, presentando diferencia estadística en los resultados. Asimismo, se observó una tendencia a incrementar el número de folículos atrésicos, así como, una disminución en la cantidad de CL en el grupo HFD. Lo anterior, aunado a los resultados de fertilidad y fecundidad, podría reflejar oligoovulación^x por parte de las hembras HFD. De acuerdo con lo publicado por Azziz en 2018, entre los tres signos atribuidos a la diagnosis del SOP (hiperandrogenismo, oligoovulación y morfología de ovario poliquístico), nuestro modelo experimental presentó dos de ellos: oligoovulación y desarrollo de quistes. Lo que sugiere el desarrollo de este padecimiento en las hembras HFD. Esto es reforzado por el hecho de que el grupo HFD presentó una menor sensibilidad a la insulina exógena, lo que podría ser similar a la resistencia a la insulina como una comorbilidad que se observa hasta en un 60% de las mujeres con SOP (Azziz, 2018). En humanos se ha reportado que pacientes con SOP presentan un riesgo aumentado de aborto espontáneo y una tasa de concepción reducida (NIH, 1998/A). Esto es compatible con los resultados de fertilidad y fecundidad, al observar que el 75% de las hembras HFD concibió un embarazo; de las hembras preñadas hubo una gran variación en el tamaño de camada, a diferencia del grupo CTR, en donde hubo una menor variabilidad en el tamaño de camada y todas las

hembras tuvieron crías. Skaznik-Wikiel y colaboradores en 2016, presentaron resultados equiparables a nuestro modelo, pues se observó que el 70% de las hembras HFD no tuvieron un embarazo y el tamaño de camada en hembras HFD fue variable; ambos resultados mostraron diferencia significativa (Skaznik-Wikiel *et al.*, 2016).

Algunas investigaciones previas con modelos murinos de obesidad inducida por dieta han mostrado que la obesidad afecta el ciclo estral, manteniendo periodos de tiempo más prolongados en etapas donde las gonadotropinas se encuentran en los niveles más bajos (metaestro y diestro), afectando tanto a la fertilidad como a la fecundidad del animal (Bazzano *et al.*, 2015). Además, la obesidad parece influir en el equilibrio entre el proceso de proliferación y el de apoptosis de estructuras foliculares como las CG, las cuales se encargan de la producción de esteroides sexuales y factores de crecimiento implicados en el correcto desarrollo del ovocito (Wu *et al.*, 2015).

Se sabe que una dieta alta en grasa altera la calidad de los ovocitos, una posible explicación es debido al aumento de los niveles de TAG, glucosa e insulina en el líquido folicular (Robker *et al.*, 2009) contribuyendo a una disminución en el grado de ovulación. Estos parámetros no se evaluaron en el ovocito, pero sí en el plasma. En el caso de los niveles de glucosa y de insulina se presentó un aumento significativo en el grupo HFD, lo que sugiere una posible alteración en la calidad de los ovocitos de estas hembras, lo cual representa una posible explicación respecto a lo presentado en el tamaño de camada.

Finalmente, los roedores son animales capaces de liberar más de un óvulo para su posterior fecundación, por lo que sus camadas generalmente son mayores a cinco crías. Los resultados del análisis morfométrico del ovario, mostraron que el desarrollo folicular en las hembras HFD se llevaba a cabo de forma normal, pues no presentaron diferencia estadística respecto al grupo CTR; sin embargo, los resultados de fecundidad sí los presentaron, lo que podría sugerir una disminución en la tasa de ovulación, más que un menor desarrollo folicular.

8. CONCLUSIONES

- La dieta alta en grasa formulada en el Laboratorio de Embriología y Genética fue capaz de inducir la obesidad en ratas *Wistar* en un periodo de 18 semanas de administración, implicando un impacto positivo en la relación costo-beneficio del modelo.
- Las alteraciones metabólicas de la dieta alta en grasa fueron: hiperglucemia en ayuno, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa y aumento en el tejido adiposo visceral.
- La dieta administrada no ocasionó cambios significativos en el número de folículos, pero sí en el desarrollo de quistes y en la fecundidad del modelo.
- El desarrollo de quistes y los resultados obtenidos de fertilidad y fecundidad demostraron disfunción ovulatoria a causa de la obesidad.

9. PERSPECTIVAS

- Evaluar y correlacionar los resultados del metabolismo de lípidos con cambios histológicos en el hígado (posible desarrollo de hígado graso no alcohólico).
- Cuantificar los niveles plasmáticos de gonadotropinas, hormonas sexuales, leptina e insulina en plasma.
- Evaluar alteraciones en el ciclo estral de las hembras del grupo HFD.
- Evaluar el grado de apoptosis en las células somáticas del ovario, así como en ovocitos en hembras HFD y compararlo con el grupo CTR.
- Caracterizar el efecto de la obesidad en la descendencia (generación F1 y F2) en el metabolismo de hidratos de carbono y de lípidos.
- Caracterizar el efecto de la obesidad en la descendencia (generación F1 y F2) en los cambios histológicos en los ovarios y si estos tienen repercusiones en la fertilidad y fecundidad de los animales.

10. REFERENCIAS

- Adorni, C., Corrêa, C., Vileigas, D., de Campos, D., Padovani, C., Minatel, I., Cicogna, A. (2017). The influence of obesity by a diet high in saturated fats and carbohydrates balance in the manifestation of systemic complications and comorbidities. *Nutrire*, 42 (16): 1-6.
- Álvarez, P., Sangiao, S., Brandón, I., Cordido, F. (2011). Función endócrina en la obesidad. *Endocrinología y nutrición*, 58 (8): 422-432.
- Arce, V., Catalina, P., Mallo, F. 2006. Eje hipotálamo-hipofisio-ovario. **En:** Casabiell, X. Endocrinología. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela. Universidad de Vigo, capítulo 12.
- Azziz, R. (2018). Polycystic Ovary Syndrome. *Obstetrics & Gynecology*, 132 (2): 321-336.
- Bakker, J., van Bel, F., Heijnen, C. (2001). Neonatal glucocorticoids and the developing brain: short-term treatment with life-long consequences? *Trends in Neuroscience*, 24: 649-653.
- Barret, K., Boitano, S., Barman, S., Brooks, H., 2012. Desarrollo y función del aparato reproductor femenino. **En:** GANONG. Fisiología Médica. McGraw Hill, vigesimocuarta edición. Ciudad de México. 391-418. ISBN: 978-0-07-160567-0.
- Barrios, M. (2015). Influencia de las gonadotropinas y la insulina en la incorporación de glucosa por el complejo ovocito-cumulus porcino durante la maduración in vitro. Tesis de cátedra de Química Biológica. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias.
- Bazzano, M., Torelli, C., Pustovrh, M., Paz, D., Elia, E. (2015). Obesity induced by cafeteria diet disrupts fertility in the rat by affecting multiple ovarian targets. *Reproductive BioMedicine*, 31: 665-667.
- Biorender, 2020. BioRender. [En línea]. Disponible en: <https://biorender.com/> [Último acceso el: 22 de marzo de 2020].
- Broughton, D., Moley, K. (2017). Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact. *Fertility and Sterility*, 107 (4): 840-847.
- Buettner, R., Parhofer, K., Woenckhaus, M., Wrede, C., Kunz-Schughart, L., Schölmerich, J., Bolheimer, L. (2006). Defining high-fat diet rat models:

metabolic and molecular effects of different fat types. *Journal of Molecular Endocrinology*, 36: 485-501.

- Campfield, L. A., Smith, F., Jeanrenaud, B., 2003. Central Integration of Peripheral Signals in the Regulation of Food Intake and Energy Balance: Role of Leptin and Insulin. **En:** Bray, G., Bouchard, C. Handbook of Obesity. Etiology and Pathophysiology. New York: Segunda edición, 461-479.
- Cardozo, E., Neff, L., Brocks, M., Ekpo, G., Dune, T., Barnes, R., Marsh E. (2012). Infertility patients' knowledge of the effects of obesity on reproductive health outcomes. *American Journal Obstetrics and Gynecology*, 207 (6): 509.e1-509e10.
- Caro, J., Sinha, M., Kolaczynski, J., Zhary P., Considine R. (1996). Leptin the tale of an obesity gene. *Diabetes*, 45 (11):1455-1462.
- Chusyd, D., Wang, D., Huffman, D., Nagy, T. (2016). Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. *Frontiers in Nutrition*, 3 (10): 1-12.
- Connor, K., Vickers, M., Beltrand, J., Meaney, M., Sloboda, D. (2012). Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. *Journal Physiology*, 590 (9): 2167–2180.
- Considine, R., Sinha M., Heiman M., Kriauciunas A., Stephens T., Nyce M. (1996). Serum immunoreactive leptin concentrations in normal weight and obese humans. *The New England Journal of Medicine*, 334 (5): 292-295.
- Costa, O., Alonso-Aubin, D., Patrocinio de Oliveira, C., Candia-Luján, R., de Paz, J. (2015). Métodos de evaluación de la composición corporal: una revisión actualizada de descripción, aplicación, ventajas y desventajas. *Archivo Médico del Deporte* 36 (6): 387-394.
- De Ferranti, S., Mozaffarian, D. (2009). La tormenta perfecta: obesidad, disfunción del adipocito y consecuencias metabólicas. *Clinical Chemistry* 54: 945-955.
- Díaz, J. Fernández, M., Paredes, F. 1997. Metabolismo de lípidos. **En:** Díaz, J. Fernández, M., Paredes, F. Aspectos Básicos de Bioquímica Clínica. Madrid: Díaz de Santos, Capítulo 4.

- Dijkstra, A. J. 2016. Soybean Oil. *Encyclopedia of Food and Health*: 58-63.
- Donato, J. (2012). The Central Nervous System as a Promising Target to Treat Diabetes Mellitus. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 12(19): 2070-2081.
- Ehrmann, D. 2016. Hirsutismo **En**: D. Kasper, A. Fauci, S Hauser, D. Longo, J. Jameson, J. Loscalzo. Eds. Harrison. Principios de Medicina Interna. Vigésima edición. Ciudad de México: Mc Graw Hill, Capítulo 387.
- El Poder del Consumidor, 2018. Propuesta para una política integral frente a la Epidemia de sobrepeso y obesidad en México. [En línea]. Disponible en: <https://elpoderdelconsumidor.org/wp-content/uploads/2018/04/propuesta-politica-publica-candidatos-2018-24.pdf> [Último acceso el: 03 de febrero de 2020].
- ENSANUT, 2016. Cifras de sobrepeso y obesidad en México. [En línea]. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/209093/ENSANUT.pdf> [Último acceso el 09 de septiembre de 2019].
- ENSANUT, 2018. Cifras de sobrepeso y obesidad en México. [En línea]. Disponible en: https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_pr_esentacion_resultados.pdf [Último acceso el 04 de abril de 2019].
- Findlay, J., Kerr, J., Britt, K., Liew, S., Simpson, E., Rosairo, D., Drummond, A. (2009). Ovarian physiology: follicle development, oocyte and hormone relationships. *Animal Reproduction*, 6 (1): 16-19.
- French, S., Robinson, T. (2003). Fats and food intake. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 6 (6): 629-634.
- Fuentes, A. (2010). Fecundidad y fertilidad: aspectos generales. *Revista Médica*, 21 (3): 337-346.
- Gurdeniz, G., Ozen, B., Tokatli, F. (2010). Comparison of fatty acid profiles and mid-infrared spectral data for classification of olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112 (2): 218-226.
- Hanson, B., Johnstone, E., Dorais, J., Silver, B., Peterson, M., Hotaling, J. (2016). Female infertility, infertility-associated diagnoses, and comorbidities: a review. *Journal Assisted Reproduction and Genetics*, 34 (2):167-177.

- Hariri, N., Thibault, L. (2010). High-fat diet-induced obesity in animals models. *Nutrition Research Reviews*, 23 (2):270-299.
- Hedrich, H., 2000. History, Strains and Models. **En:** Krinke, G. J. The Handbook Of Experimental Animals. The Laboratory Rat. Primera edición. Stein: AP, 3-16. ISBN: 9780080533469.
- Henríquez, A., Tejerizo, A., González, S., Belloso, M., De Marino, M., Villalba, A., Hernández, L., Ruíz, M., Lanchares, J., Tejerizo, L. (2006). Leptina, embarazo y reproducción. *Clínica e Investigación En Ginecología y Obstetricia*, 33 (5):180-93.
- Hohos, N., Cho, K., Swindle, D., Skaznik-Wikiel, M. (2018). High-fat diet exposure, regardless of induction of obesity, is associated with altered expression of genes critical to normal ovulatory function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 470: 199-207.
- Holmbeck, G., Jandasek, B., Sparks, C., Zukerman, J., Zurenda, L. (1999). Theoretical Foundations of Developmental-Behavioral Pediatrics. **En:** Wolraich, M., Drotar, D., Dworkin, P., Perrin, E. Developmental Behavioral Pediatrics. Evidence and practice, Philadelphia: Mosby Elsevier, 13-45. ISBN: 978-0-323-04025-9.
- Inik, O., Ceyhan, A., Balcioglu, E., Ülker, E. (2019). A new method for automatic counting of ovarian follicles on whole slide histological images based on convolutional neural network. *Computers in Biology and Medicine*, 112:1-12.
- INSP (Instituto Nacional de Salud Pública). 2018. Epidemiología de la obesidad y sus principales comorbilidades en México. **En:** Rivera, J., Colchero, A., Fuentes, M., González, T., Aguilar, C., Hernández, G., Barquera, S. La obesidad en México. Estado de la política pública y recomendaciones para su prevención y control. Morelos: Instituto Nacional de Salud Pública, Capítulo 1. ISBN: 978-607-511-179-7.
- Jaacks, L., Vandevijvere, S., Pan, A., McGowan, C., Wallace, C., Imamura, F., Mozaffarian, D., Swinburn, B., Ezzati, M. (2019). The obesity transition: stages of the global epidemic. *Diabetes endocrinology*, 7:40-231.

- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J., Tilly, J. (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, 428: 50-145.
- Jungheim, E., Moley, K. (2010). Current knowledge of obesity's effects in the pre and periconceptional periods and avenues for future research. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 203 (6): 40-319.
- Kahn, S., Hull, R., Ultzschneider, K. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 49: 883-8.
- Kini, S., Ramalingam, M., Mahmood, T. 2020. Obesity and female infertility. **En:** Obesity and Gynecology. Reino Unido: Capítulo 9.
- Kopelman, P. 2018. Definition, prevalence and historical perspectives of obesity. **En:** Hankey, C, Whelan, K. Primera edición. Advanced Nutrition and Dietetics in Obesity. Oxford: Wiley Blackwell, capítulo 1.1. ISBN: 9780470670767(PB).
- Lawton, C., Delargy, H., Brockman, J., Smith, F., Blundell, J. (2000). The degree of saturation of fatty acids influences post-ingestive satiety. *British Journal of Nutrition*, 83: 473-482.
- Linear Chemicals, S. L., 2020. Colesterol MR. [En línea]. Disponible en: https://www.linear.es/ficheros/archivos/29_1118005C.pdf [Último acceso el 02 de julio de 2020].
- Linear Chemicals, S. L., 2020. Triglicéridos MR. [En línea]. Disponible en: https://www.linear.es/ficheros/archivos/74_1155005C.pdf [Último acceso el 02 de julio de 2020].
- Löffler, S., Aust, G., Köhler, U., Spanel-Borowski, K. (2001). Evidence of leptin expression in normal and polycystic human ovaries. *Molecular Human Reproduction*, 7 (12): 1143-1149.
- Lohmiller, J., Swing, S., Hanson, M., 2020. Reproduction and Breeding. **En:** Suchow, M., Hankenson, F., Wilson, R., Foley, P. The Laboratory Rat. Nueva York: AP, tercera edición, 157-179. ISBN: 9780128143391.
- Lutz, T., Woods, S. 2012. Overview of Animal Models of Obesity. *Current Protocols in Pharmacology*, 58 (1): 5.61.1-5.61.18.

- Machtinger, R., Combelles, C., Missmer, S., Correia, K., Fox, J., Racowsky, C. (2012). The association between severe obesity and characteristics of failed fertilized oocytes. *Human Reproduction* 27 (11): 3198– 3207.
- Maier, V., Melvin, D., Lister, C., Chapman, H., Gould, G., Murphym G. (2000). V- and t-SNARE protein expression in models of insulin resistance: normalization of glycemia by rosiglitazone treatments corrects overexpression of cellubrevin, vesicle-associated membrane protein-2, and syntaxin 4 in skeletal muscle of Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes*, 49: 618-25.
- Marques, C., Meirekes, M., Norberto, S., Leite, J., Freitas, J., Pestana, D., Faria, A., Calhau, C. (2015). High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague Dawley Rat. *Adipocyte*, 5 (1): 11-21.
- Martínez, O., Suárez, M., 2010. Metabolismo de los hidratos de carbono. **En:** Gil, A., Sánchez, F. Tratado de Nutrición. Tomo I. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. Madrid: Médica Panamericana, segunda edición, 205-232.
- Masoli, D. (2010). Diagnóstico de la infertilidad: estudio de la pareja infértil. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 21 (3):363-367.
- Matthews, S. (2002). Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 13 (9): 373-80.
- McLean, A., Valenzuela, N., Fai, S., Bennett, S., 2012. Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. Video Article. [En línea]. Disponible en: <https://www.jove.com/video/4389> [Último acceso el: 02 de mayo de 2020].
- Mendiola P., Penalva, A., Pérez, F., 1993. Ciclo estral de la rata. **En:** De Costa, J., Madrid, J., Zamora, S. Manual de clases prácticas de fisiología animal. Madrid: Universidad de Murcia, 147, 148.
- Mesiano, S., Jones, E. 2017. Sistema Reproductor Femenino. **En:** W. Boron, E., Boulpaep. Fisiología Médica. Barcelona: Elsevier, 1108-1128.
- Metafome, P., Seiça, R. 2017. Function and Dysfunction of Adipose Tissue. **En:** Letra, L., Seiça, R. Obesity and Brain Function. Coimbra: Springer, 3-31.

- Mickelson, B., Herfel, T., Booth, J., Wilson, R., 2020. Nutrition. **En:** Suchow, M., Hankenson, F., Wilson, R., Foley, P. Tercera edición. The Laboratory Rat. Nueva York: AP, tercera edición 243-347. ISBN: 9780128143391.
- Miller, P., Charleston, J., Battaglia, D., Klein, N., Soules, M. (1997). An Accurate, Simple Method for Unbiased Determination of Primordial Follicle Number in the Primate Ovary. *Biology of Reproduction* (56): 909-915.
- Montague, C., O’Rahilly, S. (2000). The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes*, 49: 883-888.
- Mora, E. 2019. Prevalencia de la dislipidemia y su asociación con el estado nutricional de las pacientes con diagnóstico de infertilidad atendidas en el Servicio de Biología de la Reproducción Humana. Tesis de especialidad en ginecología y obstetricia. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
- Moussavi, N., Gavino, V., Receveur, O. (2008). Could the Quality of Dietary Fat, and Not Just Its Quantity, Be Related to Risk of Obesity? *Obesity*, 16 (1): 7-15.
- Myers, M., Britt, K., Wreford, N., Ebling, F., Kerr, J. (2004). Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction and Fertility*, 127: 569-580.
- NIH (National Institute of Health). 1998/A. Introduction. **En:** NIH. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. The Evidence Report. Estados Unidos: NIH, XI-XXX.
- NIH (National Institute of Health). 1998/B. Overweight and obesity: background. **En:** NIH. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. The Evidence Report. Estados Unidos: NIH, Capítulo 2.
- NIH (National Institute of Health). 2019. Polymorphism. [En línea]. Disponible en: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymorphism> [Último acceso el: 05 de octubre de 2019].
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, 1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. [En línea]. Disponible en: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/bioterio.NOM-062.pdf> [Último acceso el: 16 de febrero de 2020].

- Ogawa, W., Matozaki, T., Kasuga, M. (1998). Role of binding proteins to IRS-1 in insulin signaling. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 182: 13-22.
- Oldknow, K., Macrae, V., Farquharson, C., Bünger, L. (2015). Evaluating invasive and non-invasive methods to determine fat content in the laboratory mouse. *Open Life Sciences*, 10 (1): 81-88.
- OMS (Organización Mundial de la Salud), 2000. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. [En línea]. Disponible en: https://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_894/en/ [Último acceso el: 21 de octubre de 2019].
- OMS (Organización Mundial de la Salud), 2010. Definición de infertilidad. [En línea]. Disponible en: https://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/art_terminology_es.pdf?ua=1 [Último acceso el: 20 de octubre de 2019].
- OMS (Organización Mundial de la Salud), 2019/A. Definición de epidemiología. [En línea]. Disponible en: <https://www.who.int/topics/epidemiology/es/> [Último acceso el: 20 de octubre de 2019].
- OMS (Organización Mundial de la Salud), 2019/B. Obesidad y sobrepeso. [En línea]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> [Último acceso el: 07 de septiembre de 2019].
- Özcan, Z., Dilbaz B. (2015). Impact of obesity on infertility in women. *Journal of the Turkish-German Gynecological Association*, 16: 111-117.
- Patel, R., Shah, G. (2018). High-fat diet exposure from pre-pubertal age induces polycystic ovary syndrome (PCOS) in rats. *Society for Reproduction and Fertility*, 155: 139-149.
- Pearl, R., Schoppe, W. (1921). Studies on the physiology of reproduction in the domestic fowl. *Journal of Experimental Zoology*, 34: 18-101.
- Pellizzon, M., Ricci, M. (2018). Effects of Rodent Diet Choice and Fiber Type on Data Interpretation of Gut Microbiome and Metabolic Disease Research. *Current Protocols in Toxicology*, 77 (1): 1-14.
- Pérez-Leighton, C., Lockridge, A., Teske, J., Alejandro, E., Klotz, C. 2020. Rat Models of Obesity, Metabolic Syndrome, and Diabetes. **En:** Suchow, M.,

Hankenson, F., Wilson, R., Foley, P. The Laboratory Rat. Nueva York: AP, tercera edición, 157-179. ISBN: 9780128143391.

- Pfaus, J., Jones, S., Flanagan-Cato, L., Blaustein, J., 2015. Female Sexual Behavior. **En:** Plant, T., Zeleznik, A., Albertini, D., Goodman, R., Herbison, A., McCarthy, M., Muglia, L., Richards, J. Knobil and Neill's. Physiology of Reproduction. Volume I. Estados Unidos: AP, cuarta edición, 2287-2370.
- Rachon, D., Teede, H. (2010). Ovarian function and obesity-interrelationship, impact on women's reproductive lifespan and treatment options. *Molecular and cellular Endocrinology*, 316: 172-179.
- Ramalho, L., da Jornada, M., Antunes, L., Hidalgo, M. (2017). Metabolic disturbances due to a high-fat diet in a non-insulin-resistant animal model. *Nutrition & Diabetes*, 7: 1-5.
- Research Diets, Inc., 2021. D12492: Rodent Diet with 60% kcal Fat. [En línea]. Disponible en: <https://researchdiets.com/formulas/d12492> [Último acceso el 24 de marzo de 2021].
- Ritchie, H., Roser, M., 2019. Obesidad. [En línea]. Disponible en: <https://ourworldindata.org/obesity> [Último acceso el 10 de octubre de 2019].
- Robker, R., Akison, L., Bennett, B., Thrupp, P., Chura, L., Russell, D., Lane, M., Norman, R. (2009) Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared with moderate-weight women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94 (5):1533 – 1540.
- Rodríguez-Correa, E., González, I., Clavel, P., Contreras, Y., Carvajal, K. (2020). Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? *Nutrition & Diabetes*, 10 (24): 1-15.
- Rohman, A., Kuwat, T., Retno, S., Sismindari, S., Yuny, E., Tridjoko, W. (2012). Fourier Transform Infrared Spectroscopy applied for rapid analysis of lard in palm oil. *International Food Research Journal*, 19 (3): 1161-1165.
- Ros, M., Medina, G. (2011). Obesidad, adipogénesis y resistencia a la insulina. *Endocrinología y Nutrición*, 58 (7): 360-369.
- Rtveldze, K., Marsh, T., Barquera, S., Sánchez, L., Levy, D., Melendez, G., Webber, L., Kilpi, F., McPherson, K., Brown, M. (2013). Obesity prevalence in

Mexico: impacto on health and economic burden. *Public Health Nutrition*, 17 (01): 1-7.

- Secretaría de Salud (SSA), 2013. Diagnóstico de la pareja infértil y tratamiento con técnicas de baja complejidad. (Guía de Práctica Clínica). [En línea] Disponible en: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/IMSS_621_13_DXPAREJAINFERTIL/621GRR.pdf Último acceso el 04 de abril de 2020.
- Secretaría de Salud (SSA), 2015. Impacto Económico del Sobrepeso y la Obesidad en México 1999-2023. Nota Técnica. [En línea] Disponible en: http://oment.salud.gob.mx/wp-content/uploads/2016/09/impacto_financiero_OyS_060815_oment.pdf [Último acceso el 03 de febrero de 2020].
- Seidell, J. y Rissanen, A., 2019. Prevalence of Obesity in Adults: The Global Epidemic. **En:** Bray, G., Bouchard, C. Handbook of Obesity. Etiology and Pathophysiology. Segunda edición. Nueva York: Marcel Dekker. 93-107.
- Siekierska-Hellmann, M., Sworzczak, K., Babinska, A., Wojtylak, S. (2006). Ovarian thecoma with androgenic manifestations in a postmenopausal woman. *Gynecological Endocrinology*, 22 (7): 405-408.
- Skaznik-Wikiel, M., Swindle, D., Allshouse, A., Polotsky, A., McManaman, J. (2016). High-Fat-Diet Causes Subfertility and Compromised Ovarian Function Independent of Obesity in Mice¹. *Biology of Reproduction*, 94 (5): 1-10.
- Sliwowska, J., Fergani, C., Gawalek, M., Skowronska, B., Fichna, P., Lehman, M. (2014). Insulin: its Role in the Central Control of Reproduction. *Physiology & Behavior*, 133: 197- 206.
- Sour, S., Belarbi, M., Sari, N., Benammar, C., Baghdad, C., Visioli, F. (2015). Argan oil reduces, in rats, the high-fat diet-induced metabolic effects of obesity. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 25 (4): 382-387.
- Speakman, J., Hambly, C., Mitchell, S., Król, E. (2008). Contribución de los modelos animales en el estudio de la obesidad. *The International Journal of Laboratory Animal Science and Welfare*, 42: 413-432.
- Stein, P. (1994). Acción de la insulina en la actividad esteroidogénica en células luteales. Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires.

- Talmor, A., Dunphy, B. (2015). Female Obesity and Infertility. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 29: 498-506.
- Tapia, F. Citología del ovario. **En:** Citología del tracto genital femenino y de la glándula mamaria. (2008). Segunda edición. Madrid: Vértice, 222, 223.
- Tarín, J. (2015). Infertility etiologies are genetically and clinically linked with other diseases in single meta-diseases. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13 (31): 1-11.
- Telfer, E., Albertini, D. (2012). The quest of human ovarian stem cells. *Nature Medicine*, 18 (3): 353-354.
- Telfer, E., Anderson, R. (2019). The existence and potential of germline stem cells in the adult mammalian ovary. *Climacteric*, 22 (1): 22-26.
- Thibault, L. Animal Models of Dietary-Induced Obesity. **En:** Conn, P. Animal Models for the Study of Human Disease. (2013). Oregon: Academic Press, capítulo 13.
- Triantafyllou, G., Paschou, S., Mantzoros, C. (2016). Leptin and Hormones: Energy Homeostasis. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 45 (3): 633-645.
- Uribe, M. Aparato reproductor femenino. **En:** Estrada, E., Uribe, M. Atlas de Histología de Vertebrados. (2002). Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México, Capítulo 10.
- Valckx, S., De Pauw, I., De Neubourg, D., Inion, I., Berth, M., Franssen, E., Bols, P., Leroy, J. (2012). BMI-related metabolic composition of the follicular fluid of women undergoing assisted reproductive treatment and the consequences for oocyte and embryo quality. *Human Reproduction*, 27 (12): 3531–3539.
- Vantman, D., Vega, M. (2010). Fisiología reproductiva y cambios evolutivos con la edad de la mujer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 21 (3): 348-362.
- Velkoska, E., Morris, M. (2011). Mechanisms behind early life nutrition and adult disease outcome. *World Journal of Diabetes*, 2 (8): 127-132.
- Ward, M. (2013). Estimating disease prevalence and incidence using administrative data: some assembly required. *Journal of Rheumatology*, 40 (8): 1241-1243.

- Woods, S., Seeley, R., Rushing, P. (2013). A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *Nutrient Metabolism*, 133: 1081-1087.
- Wu, Y., Zhang, Z., Liao, X., Qi, L., Liu, Y., Wang, Z. (2016). Effect of high-fat diet- induced obesity on the Akt/FoxO/Smad signaling pathway and the follicular development of the mouse ovary. *Molecular Medicine Reports*, 14: 3894-3900.
- Wu, Y., Zhang, Z., Liao, X., Wang, Z. (2015). High fat diet triggers cell cycle arrest and excessive apoptosis of granulosa cells during the follicular development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 466: 599-605.
- Yanty, N., Marikkar, J., Che Man, Y., Long, K. (2011). Composition and Thermal Analysis of Lard Stearin and Lard Olein. *Journal and Oleo Science*, 60 (7): 333-338.
- Zegers, F., Adamson, G., Dyer, S., Racowsky, C., De Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I., Simpson, J., Van der Poel, S. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care. *Fertility and Sterility*, 108 (3): 0015-0282.
- Zore, T., Palafox, M., Reue, K. (2018). Sex differences in obesity, lipid metabolism, and inflammation- A role for the sex chromosomes? *Molecular Metabolism*, 15:35- 44.

11. ANEXOS

Anexo I. Dietas administradas.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para las dietas formuladas en el laboratorio de Embriología y Genética de la Facultad de Medicina, U.N.A.M..

Para el análisis estadístico, se realizó una prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA, Kruskal-Wallis), considerando un valor de $P \leq 0.05$ como significativo. Posteriormente, se realizó la prueba de Mann-Whitney para comparar las diferencias entre medias, considerando diferencia estadística un valor de $P \leq 1.5$. Los resultados se expresan como la media de cada grupo \pm el SEM.

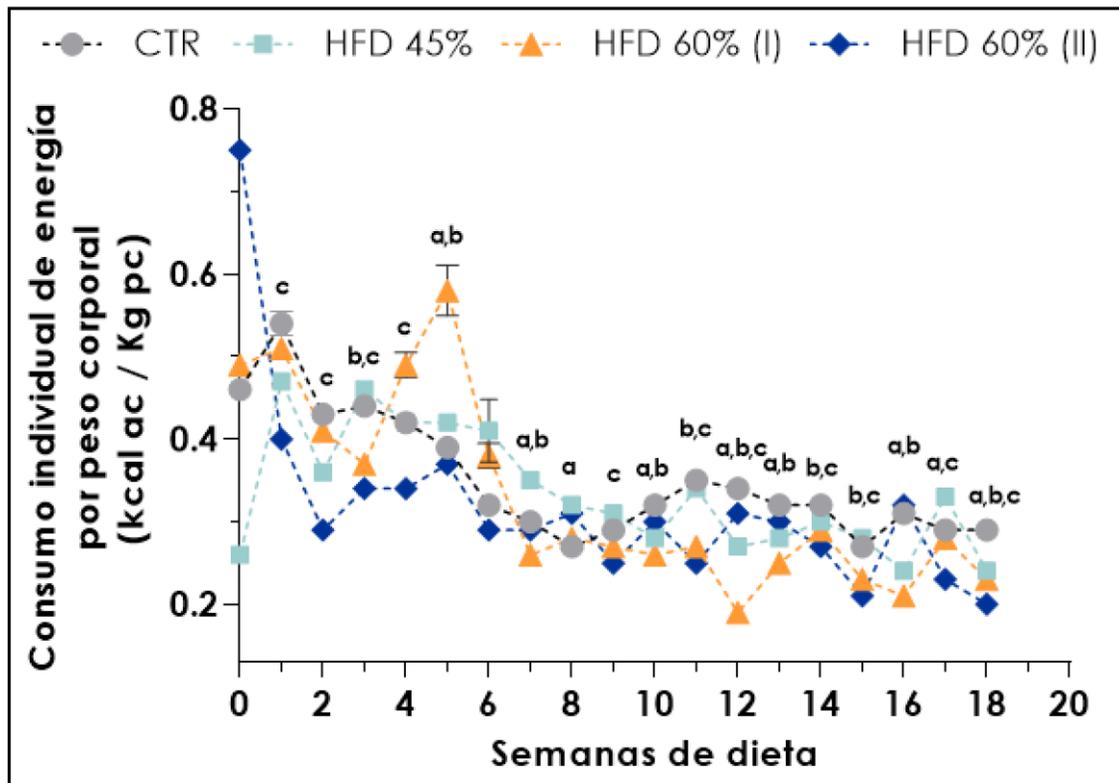


Figura A1. Evaluación semanal del consumo de energía. Se presentan los datos de la cinética de consumo individual de energía en 24 horas expresado en calorías de alimento consumido (kcal ac). Las letras denotan diferencia significativa entre las medias respecto al grupo CTR, donde: (a) CTR vs HFD 45%, (b) CTR vs HFD 60% (I), (c) CTR vs HFD 60% (II).

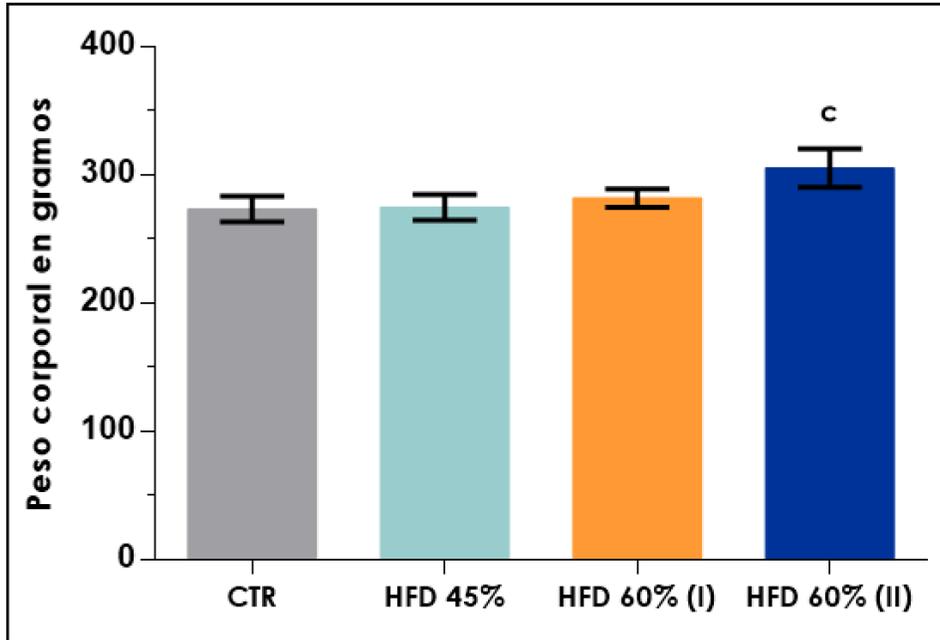


Figura A2. Peso absoluto expresado en gramos. La letra denota diferencia significativa entre las medias del grupo HFD 60% (II) respecto al grupo CTR.

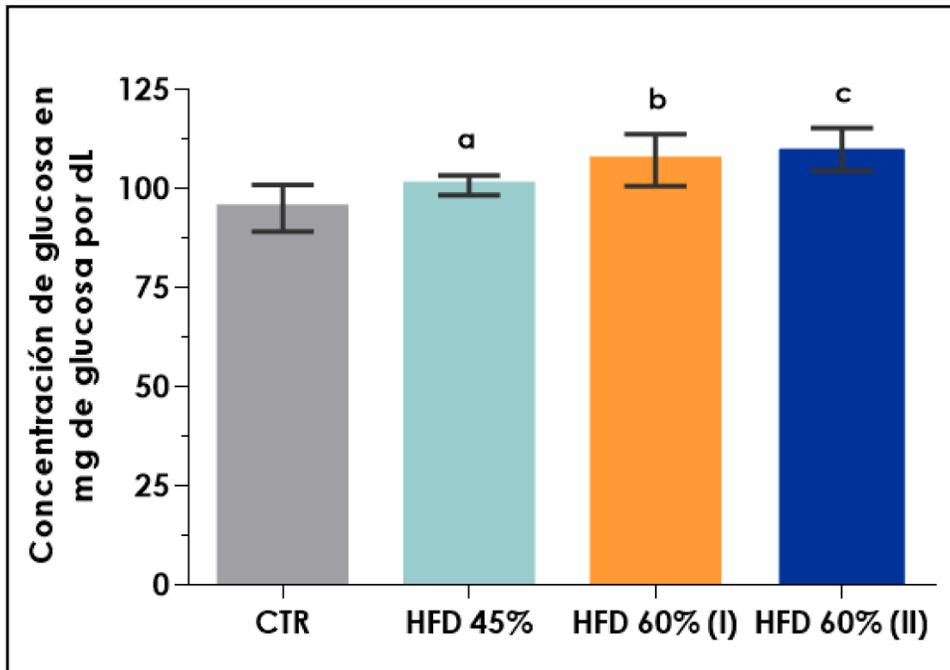


Figura A3. Concentración de glucosa en ayuno expresada en mg/ dL a las 18 semanas de tratamiento. Las letras denotan diferencia significativa entre las

medias respecto al grupo CTR, donde: (a) CTR vs HFD 45%, $P=0.01$; (b) CTR vs HFD 60% (I), $P=0.0002$ y (c) CTR vs HFD 60% (II), $P<0.0001$.

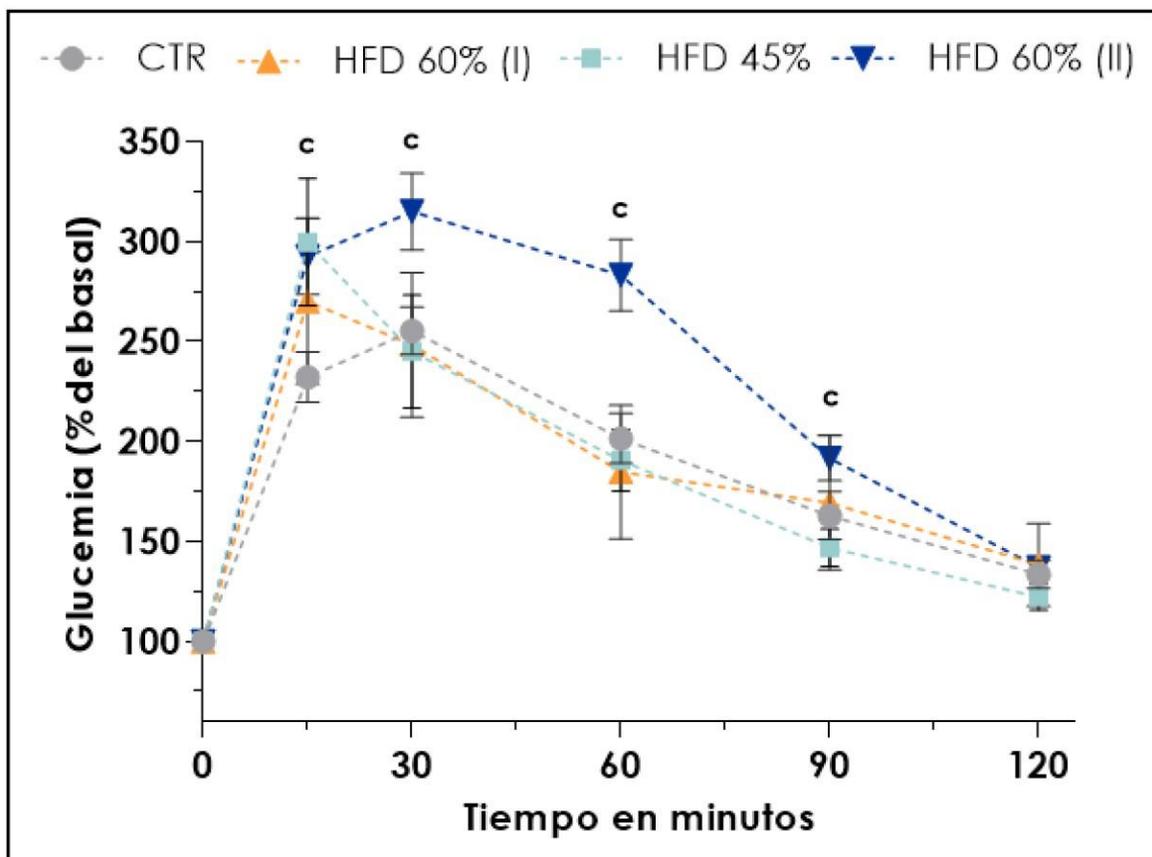


Figura A4. Curva de tolerancia a la glucosa vía intraperitoneal a las 18 semanas de tratamiento. Las letras denotan diferencia significativa entre las medias respecto al grupo CTR, donde: (a) CTR vs HFD 45%, (b) CTR vs HFD 60% (I), (c) CTR vs HFD 60% (II).

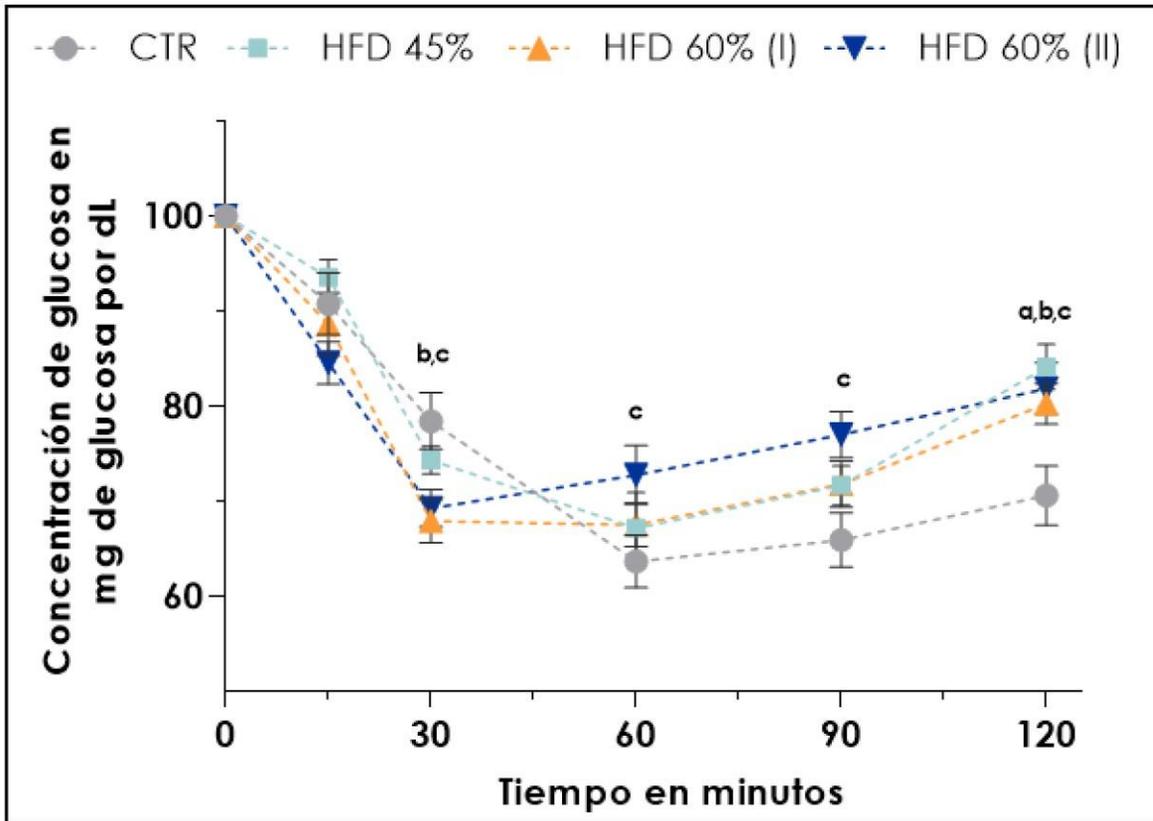


Figura A5. Curva de tolerancia a la insulina vía intraperitoneal a las 18 semanas de tratamiento. Las letras denotan diferencia significativa entre las medias respecto al grupo CTR, donde: (a) CTR vs HFD 45%, (b) CTR vs HFD 60% (I), (c) CTR vs HFD 60% (II).

Anexo II. Procedimiento para la elaboración de la dieta alta en grasa.

Los componentes empleados para la elaboración de la dieta se enlistan a continuación:

- Albúmina de huevo liofilizada (Inova®)
- Manteca de cerdo (J. C. Fortes®, presentación de 500 g)
- Aceite de oliva extra virgen (Borges®, presentación de 250 mL)
- Croqueta estándar para roedor (chow) 5001 (Lab Diet®) previamente molida y tamizada

La dieta fue elaborada de la siguiente forma:

1. El chow se trituró en un pulverizador de alimentos de la marca **NutriBullet® 600w** y se tamizó en un colador de acero inoxidable convencional.
2. Todos los componentes enlistados al inicio se pesaron de acuerdo a la cantidad total de alimento requerida y a la formulación de la **Tabla 4** en una balanza electrónica marca **Biomedical® YP802N** (capacidad máxima: 800 g y sensibilidad: 0.01 g).
3. En un bowl de acero inoxidable se colocó el chow previamente molido, tamizado y pesado y se homogenizó con la albúmina de huevo.
4. Posteriormente, se añadió el aceite de oliva al bowl y se mezcló con el chow y la albúmina.
5. Después, se adicionó la manteca y se mezcló hasta obtener una pasta de color y consistencia uniforme.
6. Finalmente, la dieta se almacenó en recipientes de plástico a 4 °C hasta su uso.

Cabe mencionar que se elaboraba el alimento suficiente para una semana, con el fin de evitar un almacenamiento prolongado y posteriores afectaciones organolépticas, microbiológicas y nutrimentales en el alimento.

Anexo III. Composición química del alimento empleado para el grupo control, Laboratory Rodent Diet 5001, LabDiet.

Laboratory Rodent Diet		5001*	
DESCRIPTION			
Laboratory Rodent Diet is recommended for rats, mice, hamsters and gerbils. This diet is a complete life cycle diet formulated using managed formulation, delivering Constant Nutrition®. This is paired with the selection of highest quality ingredients to assure minimal inherent biological variation in long-term studies. It is formulated for life-cycle nutrition; however, it is not designed for maximizing production in mouse breeding colonies. This product has been the standard of biomedical research for over 70 years.			
Features and Benefits			
<ul style="list-style-type: none"> • Managed Formulation delivers Constant Nutrition® • High quality animal protein added to create a superior balance of amino acids for optimum performance • Formulated for multiple species for single product inventory • The rodent diet standard for biomedical research 			
Product Forms Available			
• Oval pellet, 3/8" x 5/8" x 1"	Catalog #	0001319	
• Meal (ground pellets)	Catalog #	0001320	
Other Versions Available			
• 5L0D PicoLab® Laboratory Rodent Diet	Catalog #	0067137	
GUARANTEED ANALYSIS			
Crude protein not less than		23.00%	
Crude fat not less than		4.50%	
Crude fiber not more than		6.00%	
Moisture not more than		12.00%	
Ash not more than		8.00%	
INGREDIENTS			
Ground Corn, Dehulled Soybean Meal, Dried Plain Beet Pulp, Fish Meal, Ground Oats, Dehydrated Alfalfa Meal, Brewers Dried Yeast, Cane Molasses, Wheat Germ, Dried Whey, Porcine Animal Fat Preserved with BHA and Citric Acid, Porcine Meat and Bone Meal, Wheat Middlings, Salt, Calcium Carbonate, DL-Methionine, Choline Chloride, Vitamin D3 Supplement, Folic Acid, Vitamin A Acetate, Menadione Dimethylpyrimidinol Bisulfite (source of Vitamin K), Pyridoxine Hydrochloride, Biotin, Thiamine Mononitrate, Nicotinic Acid, Calcium Pantothenate, Vitamin E Supplement, Vitamin B-12 Supplement, Riboflavin Supplement, Ferrous Sulfate, Manganese Oxide, Zinc Oxide, Ferrous Carbonate, Copper Sulfate, Zinc Sulfate, Calcium Iodate, Cobalt Carbonate, Sodium Selenite.			
FEEDING DIRECTIONS			
Feed ad libitum to rodents. Plenty of fresh, clean water should be available to the animals at all times.			
Rats: All rats will eat varying amounts of feed depending on their genetic origin. Larger strains will eat up to 30 grams per day. Smaller strains will eat up to 15 grams per day. Feeders in rat cages should be designed to hold two to three days supply of feed at one time.			
Mice: Adult mice will eat up to 5 grams of pelleted ration daily. Some of the larger strains may eat as much as 8 grams per day per animal. Feed should be available on a free choice basis in wire feeders above the floor of the cage.			
Hamsters: Adults will eat up to 14 grams per day.			
For information regarding shelf life please visit www.labdiet.com .			
CHEMICAL COMPOSITION¹			
Nutrients²			
Protein, %	24.1	Iron, ppm	240
Arginine, %	1.52	Zinc, ppm	76
Cystine, %	0.38	Manganese, ppm	70
Glycine, %	1.24	Copper, ppm	13
Histidine, %	0.60	Cobalt, ppm	0.91
Isoleucine, %	1.03	Iodine, ppm	0.99
Leucine, %	1.82	Chromium (added), ppm	0.01
Lysine, %	1.44	Selenium, ppm	0.41
Methionine, %	0.60		
Phenylalanine, %	1.07	Vitamins	
Tyrosine, %	0.74	Carotene, ppm	2.3
Threonine, %	0.94	Vitamin K, ppm	1.3
Tryptophan, %	0.27	Thiamin, ppm	16
Valine, %	1.12	Riboflavin, ppm	4.7
Serine, %	1.14	Niacin, ppm	130
Aspartic Acid, %	2.73	Pantothenic Acid, ppm	24
Glutamic Acid, %	4.64	Choline Chloride, ppm	2250
Alanine, %	1.42	Folic Acid, ppm	7.1
Proline, %	1.44	Pyridoxine, ppm	6.1
Taurine, %	0.03	Biotin, ppm	0.30
Fat (ether extract), %	5.0	B ₁₂ , mcg/kg	51
Fat (acid hydrolysis), %	6.4	Vitamin A, IU/gm	18
Cholesterol, ppm	201	Vitamin D ₃ (added), IU/gm	4.6
Linoleic Acid, %	1.17	Vitamin E, IU/kg	42
Linolenic Acid, %	0.12	Ascorbic Acid, mg/gm	0.0
Arachidonic Acid, %	0.02		
Omega-3 Fatty Acids, %	0.34	Calories provided by:	
Total Saturated Fatty Acids, %	1.41	Protein, %	28.672
Total Monounsaturated Fatty Acids, %	1.50	Fat (ether extract), %	13.384
Fiber (Crude), %	5.2	Carbohydrates, %	57.944
Neutral Detergent Fiber ³ , %	16.7	*Product Code	
Acid Detergent Fiber ⁴ , %	6.6	1. Formulation based on calculated values from the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies and some nutrient loss will occur due to manufacturing processes, analysis will differ accordingly.	
Nitrogen-Free Extract (by difference), %	48.7	2. Nutrients expressed as percent of ration except where otherwise indicated. Moisture content is assumed to be 10.0% for the purpose of calculations.	
Starch, %	21.9	3. NDF = approximately cellulose, hemicellulose and lignin.	
Sucrose, %	3.15	4. ADF = approximately cellulose and lignin.	
Total Digestible Nutrients, %	73.7	5. Physiological Fuel Value (kcal/gm) = Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrate (use Nitrogen Free Extract) x 4,9,4 kcal/gm respectively.	
Gross Energy, kcal/gm	4.09	NOTE: When assayed, actual levels may vary from calculated values.	
Physiological Fuel Value⁵, kcal/gm	3.36		
Metabolizable Energy, kcal/gm	2.89		
Minerals			
Ash, %	6.9		
Calcium, %	0.95		
Phosphorus, %	0.68		
Phosphorus (non-phytate), %	0.42		
Potassium, %	1.21		
Magnesium, %	0.21		
Sulfur, %	0.33		
Sodium, %	0.39		
Chloride, %	0.64		
Fluorine, ppm	15		

10/15/17 RHI-W 10

LabDiet
www.labdiet.com

Anexo IV. Reactivos y procedimiento empleado para el procesamiento histológico del ovario.

Reactivos

- Alcohol absoluto (Meyer®)
- Alcohol etílico al 96% (Gormaca®)
- Parafina (Bio-óptica®)
- Xilol (Gormaca®)

Después de fijar la muestra en PFA al 4% durante 24 horas, se colocaron los tejidos en PBS 1x y después en un cassette de inclusión (Histossette I M490, Simport®) para el análisis histológico descrito a continuación.

A. DESHIDRATACIÓN

La deshidratación se llevó a cabo en recipientes de plástico (soluciones alcohólicas) y en recipientes de vidrio (xilol), todos con capacidad de dos litros. Se colocaron los cassettes en dichos recipientes siguiendo un orden creciente de concentración de las soluciones alcohólicas y se mantuvieron en agitación constante en el orbital **Orbital Shaker® TS-1000** durante 45 minutos.

El orden de soluciones empleado fue el siguiente:

- Solución alcohólica al 50%
- Solución alcohólica al 60%
- Solución alcohólica al 70%
- Solución alcohólica al 80%
- Alcohol etílico al 96% I
- Alcohol etílico al 96% II
- Alcohol etílico absoluto I
- Alcohol etílico absoluto II
- Xilol I
- Xilol II
- Parafina I
- Parafina II

B. INCLUSIÓN

Una vez finalizado el proceso de deshidratación, las muestras se incluyeron en parafina en una consola de inclusión **Tissue-Tek® II** para la obtención de bloques. Para ello, la parafina fue expuesta a una temperatura de 54°C para derretirla y tener una mejor manipulación.

Posteriormente, se colocaron moldes de acero inoxidable para histología de 15x15x5 mm (Simport®) en una parrilla caliente propia de la consola de inclusión, al igual que los cassettes, hasta observar que la parafina que cubría al tejido se derritiera. Asimismo, se procedió a colocar el tejido sobre el molde metálico y se colocó parafina hasta cubrir el molde, después se colocó el cassette cubriendo el molde y se vertió parafina para un mayor soporte al momento de cortar. Lo anterior se realizó con todos los tejidos hasta obtener bloques de parafina sin presencia de burbujas y donde el tejido estuviera centrado, pegado lo más posible al fondo del molde.

Finalmente, se obtuvieron los cortes histológicos de 4 µm de grosor en el microtomo **Reichert-Jung® 1130/Biocut** como se describió en el apartado de Metodología.

C. TINCIÓN: Técnica de Hematoxilina-Eosina (HE)

Los cortes se tiñeron con la técnica de HE, para ello los portaobjetos se colocaron en una incubadora (**Thermo Scientific®**) a 90°C hasta observar la parafina derretida, enseguida se colocaron en un vaso de coplin y se comenzó con el proceso de desparafinación, rehidratación y tinción como se detalla a continuación:

- Xilol 1 (1) **2 min**
- Xilol 2 (1) **2 min**
- Alcohol etílico absoluto 1 (1) **2 min**
- Alcohol etílico absoluto 2 (1) **2 min**

- Alcohol etílico al 96% 1 (1) **2 min**
- Alcohol etílico al 96% 2 (1) **2 min**
- Tres lavados con agua corriente
- Hematoxilina de Gill **5 min 30 seg**
- Tres lavados con agua corriente
- Carbonato de litio al 1% **30 seg**
- Tres lavados con agua corriente
- Eosina-Floxina **1 min 30 seg**
- Alcohol etílico al 96% 1 (2) **2 min**
- Alcohol etílico al 96% 2 (2) **2 min**
- Alcohol etílico absoluto 1 (2) **2 min**
- Alcohol etílico absoluto 2 (2) **2 min**
- Xilol 1 (2) **2 min**
- Xilol 2 (2) **2 min**
- Montaje con resina sintética

Una vez teñidos los portaobjetos se observaron al microscopio (**Primo Star ZEISS®**) con cámara adaptada (**Axiocam ERC 5s ZEISS®**).