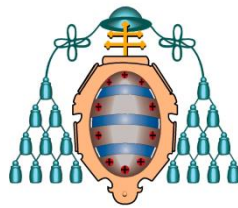


Respuesta a la hiperestimulación ovárica en un modelo murino de obesidad. Potencial terapéutico del resveratrol.

Máster en Biología y Tecnología de la Reproducción



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Director:

Celestino González González

Estefanía Cabello Thomas

10 de Junio de 2013

AGRADECIMIENTOS

A mi director, el Dr. Celestino González, por su guía, colaboración y consejo durante el desarrollo de este trabajo, además de acogirme en su equipo y abrirme la puerta al mundo de la investigación.

A mis compañeros Pablo Garrido y Javier Morán, por su ayuda constante e ilimitada en la elaboración de este trabajo, por su paciencia durante mi aprendizaje y por ser no sólo compañeros, sino verdaderos amigos. No hubiese sido capaz sin vosotros.

A la Dr. Lourdes Sánchez, Vanesa Castañón y todo el equipo de la Unidad de Reproducción asistida del HUCA, por su ayuda durante mi período de prácticas, permitirme adquirir destreza en las técnicas de reproducción asistida y esforzarse en hacer mi aprendizaje ameno en todo momento.

Al equipo del Servicio de Histopatología Molecular en modelos animales de cáncer del IUOPA, por el procesamiento de los cortes histológicos y su preparación.

A la Dr. Carmen González por su colaboración amable y desinteresada ayudándome con el análisis e interpretación de los cortes histológicos y atendiendo a mis dudas siempre que lo necesitara.

A la Dr. Carmen Díez por facilitarnos el material necesario para llevar a cabo los protocolos de vitrificación y su dedicación enseñándome el manejo de ésta técnica.

A la Dr. Marta Muñoz por su ayuda en los baches de ésta investigación.

A la Universidad de Oviedo por la financiación para el desarrollo de este trabajo dentro del marco del proyecto con título “Control del estado proinflamatorio asociado a obesidad en casos de infertilidad y en la gestación: Potencial terapéutico de polifenoles de origen vegetal y bifidobacterias.” y Referencia UNOV-12-MA-06.

A mis compañeros del Área de Fisiología, Inés, Alina, Adrián y la Dr. Paula Núñez, por prestarme su ayuda siempre que la he necesitado y los buenos momentos.

A mis compañeras y amigas del Máster, Coppelia, María y Sara por los buenos ratos vividos durante este año.

A Antonela Toni, por su apoyo en todos los malos momentos.

A mis diez chicas favoritas, porque hay gente que viene y va, pero vosotras seréis para siempre y nunca me habéis fallado.

A mis padres y mi hermano, por su apoyo incondicional y creer en mí en todo momento, incluso cuando yo misma no soy capaz de hacerlo.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO	1
1.1.1.	Ciclo del estro en el ratón.....	2
1.2.	LEPTINA: IMPLICACIÓN EN LA FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA.....	2
1.2.1.	Efectos de la deficiencia en leptina en el eje neuroendocrino reproductor....	3
1.2.2.	Control de la leptina sobre la secreción de GnRH.....	5
1.3.	OBESIDAD: IMPACTO EN LA FERTILIDAD FEMENINA	6
1.3.1.	Inflamación de bajo grado asociada a la obesidad y subfertilidad	7
1.3.2.	Disfunción ovárica asociada a la insulinoresistencia	10
1.4.	IMPORTANCIA DE LA CALIDAD OVOCITARIA	13
1.4.1.	Crecimiento folicular	13
1.4.2.	Maduración del ovocito en mamíferos	14
1.5.	POTENCIAL TERAPEÚTICO DEL RESVERATROL.....	16
1.5.1.	Resveratrol e inflamación	17
1.5.2.	Resveratrol e insulinoresistencia	17
1.5.3.	Resveratrol y fertilidad	19
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
3.1.	ANIMALES	22
3.2.	DISEÑO Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	22
3.3.	EVALUACIÓN DE LOS CICLOS ESTRALES	24
3.4.	HISTOLOGÍA DEL OVARIO Y ANÁLISIS DE FOLÍCULOS	25
3.5.	RESPUESTA A LA SUPEROVULACIÓN CON GONADOTROPINAS.....	26
3.6.	ENSAYOS HORMONALES.....	28

3.7. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA ACCIÓN DE LA INSULINA.....	28
3.8. WESTERN-BLOT.....	28
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1. PESO CORPORAL E INGESTA ALIMENTARIA.....	31
4.2. GLUCEMIA, INSULINEMIA E ÍNDICE HOMA-IR.....	34
4.3. NIVELES DE TNF- α	36
4.4. PESO DEL APARATO REPRODUCTOR.....	37
4.5. NÚMERO Y CALIDAD DE LOS OVOCITOS RECOGIDOS.....	38
4.6. ESTIMACIÓN DE LA FOLICULOGÉNESIS.....	40
5. DISCUSIÓN.....	43
6. CONCLUSIONES.....	52
BIBLIOGRAFÍA.....	53

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO

El hipotálamo, la adenohipófisis y el ovario constituyen el eje neuroendocrino reproductor. En el núcleo arcuato del hipotálamo se sintetiza y secreta de forma pulsátil la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que, a través del sistema porta hipofisario, alcanza a la adenohipófisis, donde promueve la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH), las cuales se vierten a la circulación y llevan a cabo sus acciones sobre el ovario [1].

Durante la fase folicular la FSH estimula la proliferación de células de la granulosa, así como la biosíntesis de estrógenos, e induce la expresión de receptores de LH la cual estimula la secreción de andrógenos. Los estrógenos ejercen un mecanismo de retroalimentación positivo sobre hipotálamo e hipófisis, aumentando la liberación de GnRH, FSH y LH hasta que se produce el pico preovulatorio de LH. La LH desencadena la ovulación de los ovocitos maduros, la luteinización de células de la teca y de la granulosa y la formación del cuerpo lúteo [2].

En la fase luteínica, los estrógenos causan inhibición de la secreción, tanto de GnRH a nivel hipotalámico como de FSH y LH a nivel hipofisario, completándose así un circuito de retroalimentación hipotálamo-hipofisario-ovárico. Este efecto inhibitorio de los estrógenos se ve potenciado por la progesterona sintetizada por el cuerpo lúteo.

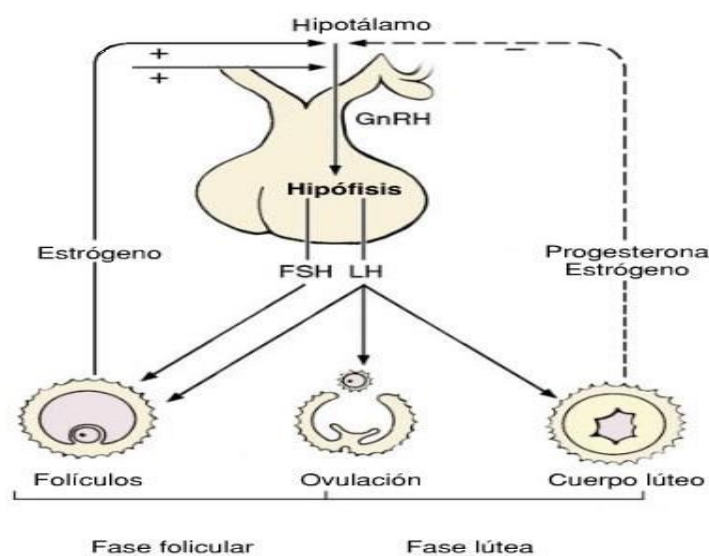


Figura 1.Regulación del eje Hipotalámico-Hipofisario-Ovárico

1.1.1. Ciclo del estro en el ratón

El ciclo del estro en el ratón dura de 4 a 5 días y está dividido en cuatro fases: diestro, proestro, estro, metaestro. El diestro dura 65 horas aproximadamente y se corresponde con la fase folicular temprana, donde FSH, LH y estrógenos presentan niveles bajos y se van elevando progresivamente. El proestro con una duración aproximada de 12 horas, corresponde a la fase folicular tardía donde tiene lugar el pico de estradiol que desencadena el pico de LH y FSH. El estro dura 12 horas y es cuando tiene lugar la ovulación. El metaestro dura unas 21 horas y se corresponde a la fase luteínica. Se considera que el proestro es la etapa del ciclo estral óptima para la inducción a la superovulación [3].

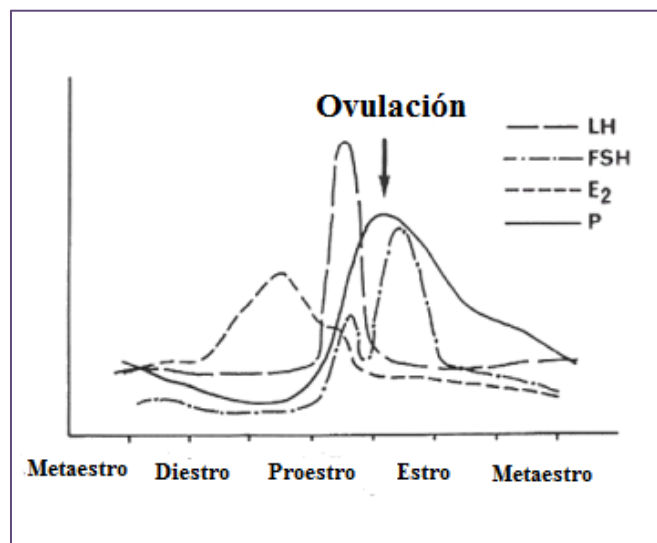


Figura 2. Cambios hormonales en el ciclo del estro del ratón.

1.2. LEPTINA: IMPLICACIÓN EN LA FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA

La leptina fue descubierta por primera vez en 1994, es una hormona proteica sintetizada y secretada principalmente por el tejido adiposo blanco [4] aunque también se produce en variedad de tejidos, incluyendo la placenta, ovarios, epitelio mamario, la médula ósea y tejidos linfoides [5]. Está codificada por el gen *Lep* / *LEP* (anteriormente denominado gen *ob*, de obeso) y circula en el plasma en forma libre o unida a su receptor soluble. Los receptores de leptina, codificados por los genes *Lepr* / *LEPR* se encuentran en seis isoformas [6, 7] expresadas en numerosos tejidos endocrinos y neuroendocrinos involucrados en el control de la fisiología reproductiva, como son el hipotálamo, hipófisis anterior, ovario (células de la teca y de la granulosa), útero, testículos, etc. [8].

En condiciones fisiológicas, los niveles circulantes de leptina se correlacionan con la cantidad de tejido adiposo almacenado [9] y las fluctuaciones en estos niveles de leptina son una señal metabólica clave para las adaptaciones neuroendocrinas que ocurren en función del balance energético [10, 11]. Una disminución en los niveles de esta hormona indica un balance negativo e induce respuestas compensatorias para restaurar la reserva energética. Aumentar el apetito y por lo tanto la ingesta, disminuir la termogénesis y la actividad locomotora, inhibir el eje tiroideo y activar el eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal son ejemplos de esas respuestas adaptativas [12]. Además, probablemente debido a los altos costes energéticos de los procesos reproductivos tales como el embarazo y la lactancia, en estados donde el balance energético es negativo se inhibe rápidamente la función reproductora, lo que supone una adaptación neuroendocrina mediada entre otros por la leptina, que actuaría como señal integradora entre el grado de insuficiencia energética y la función reproductora [13].

La leptina es la señal más temprana de comienzo de la pubertad, contribuyendo en la activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada, sin embargo, aunque sea un factor necesario no es suficiente para el inicio de esta [14].

1.2.1. Efectos de la deficiencia en leptina en el eje neuroendocrino reproductor

La mutación genética que causa deficiencia en la síntesis de leptina fue identificada por primera vez en ratones C57BL/6 (los cuales fueron llamados ob/ob) en los Laboratorios Jackson [15]. La mutación fue posteriormente descrita como autosómica recesiva, los individuos homocigotos son fenotípicamente obesos, debido a la hiperfagia y una escasa actividad física, y presentan múltiples anomalías metabólicas como hiperglucemia, hiperlipidemia e hiperinsulinemia [4, 16, 17], por lo que han sido ampliamente utilizados como modelos animales de obesidad y diabetes mellitus tipo II. Además presentan anormalidades neuroendocrinas en cuanto a su función reproductora, de manera que los ratones ob/ob de ambos sexos son infértiles, no alcanzan la madurez sexual y permanecen toda su vida en un estadio prepuberal. Todas estas características son una consecuencia directa del déficit en la producción de leptina, por lo que la administración de esta hormona restaura el normopeso, la función metabólica y la fertilidad [18-20].

Los órganos reproductores de los ratones ob/ob muestran una serie de anormalidades morfológicas y bioquímicas. En las hembras el útero es inmaduro y los pesos uterinos son significativamente inferiores que en ratones libres de la mutación [21]. En el ovario tienen un número reducido de folículos maduros, no se detectan cuerpos lúteos [18] y presentan un deterioro de la foliculogénesis con niveles elevados de apoptosis en las células de la granulosa [21], presentando anovulación y sin ciclos del estro.

Hamm y colaboradores [21] plantearon la hipótesis de que los defectos en la foliculogénesis, y por lo tanto en la fertilidad femenina, pueden ser causados por un estado de hipogonadismo-hipogonadotrófico en los ratones ob / ob. Las gonadotropinas son los principales factores que promueven el crecimiento folicular y la inhibición de la apoptosis de células de la granulosa en los folículos ováricos [22, 23]. Los ratones hembras ob/ob presentan niveles circulantes de LH y FSH reducidos [24], aunque las neuronas gonadotropas localizadas en la hipófisis responden adecuadamente a la GnRH. El útero y los ovarios también responden a estradiol y gonadotropinas [25, 26] y pueden producir esteroides sexuales, ovocitos viables y la gametogénesis puede ser restaurada con la administración exógena de gonadotropinas [24, 27].

Estos hallazgos indican que estos ratones deficientes en leptina tienen un desarrollo y funcionamiento adecuados de gonadotropos y gónadas pero deficiente secreción de GnRH en el momento previsto del inicio de la pubertad. De acuerdo con este concepto, tanto estudios *in vitro* como *in vivo*, han determinado que los efectos de la leptina sobre la función ovárica son mediados, principalmente, por sus efectos sobre el hipotálamo estimulando la secreción de GnRH [28-30].

La leptina también tiene acción directa sobre la hipófisis estimulando la liberación de la LH y FSH [14].

Alternativamente, la existencia de receptores de leptina en el ovario, el folículo, y el ovocito [31, 32] y sus variaciones a lo largo del ciclo reproductivo [33, 34], serían compatibles con un efecto directo de la leptina a nivel del ovario [35]. Estudios *in vivo* han demostrado que la leptina puede estar involucrada en la ovulación mediante un efecto local en el ovario, a través de la inducción de citoquinas o incluso una vía hipotalámica alternativa independiente de GnRH y LH [36].

Garris sugiere que las alteraciones progresivas, inducidas por la hiperlipidemia, en la estructura de las células del ovario interrumpen la continuidad del tejido normal, provocando la degradación tisular que culmina en fallo ovárico prematuro, órgano-involución y esterilidad reproductiva, que caracteriza a estos modelos murinos de obesidad [37].

1.2.2. Control de la leptina sobre la secreción de GnRH

Recientemente, se ha demostrado que las neuronas hipotalámicas secretoras de GnRH en ratón, prácticamente no expresan el receptor de leptina LEPR [38-40]. Quennell y colaboradores [40] demostraron que la supresión de LEPR de las neuronas de GnRH no produce ningún déficit reproductivo identificable. Por lo tanto, parece razonable suponer que la estimulación mediada por leptina en la secreción de GnRH, se produce a través de interneuronas que inervan las neuronas GnRH [41].

Varias neuronas implicadas en la homeostasis de la energía están anatómicamente asociadas con las neuronas GnRH: las neuronas AgRP / NPY (sintetizan péptido relacionado con agouti y neuropéptido Y) y las neuronas POMC (Pro-opiomelanocortina), y pueden vincular los cambios en el balance energético con la función reproductora [41].

La leptina puede mediar en el eje reproductivo por medio de la regulación de kisspeptinas, productos del gen *Kiss1*, así como dinorfina y neuroquinina B. Mutaciones que causan la disfunción de los receptores de kisspeptina GPR54, resultan en hipogonadismo-hipogonadotrófico en ratones y humanos [42, 43], y se ha demostrado que diversas kisspeptinas estimulan la liberación de GnRH y aumentan los niveles plasmáticos de LH y FSH [44-47].

Existen evidencias que sugieren que el núcleo premamilar ventral (PMV) es un sitio clave en la transmisión de los efectos de la leptina sobre el eje neuroendocrino reproductor [39, 48, 49]. Las neuronas del PMV expresan neurotransmisores excitatorios (glutamato y óxido nítrico) y sinaptan directamente con neuronas kisspeptina del núcleo paraventricular, con el núcleo arcuato, y con neuronas GnRH. Cuando las neuronas del PMV son estimuladas por acción de la leptina, activan los sitios diana que inducen la liberación de GnRH y la secreción de LH de la glándula hipofisaria (*Figura 3*) [48, 49].

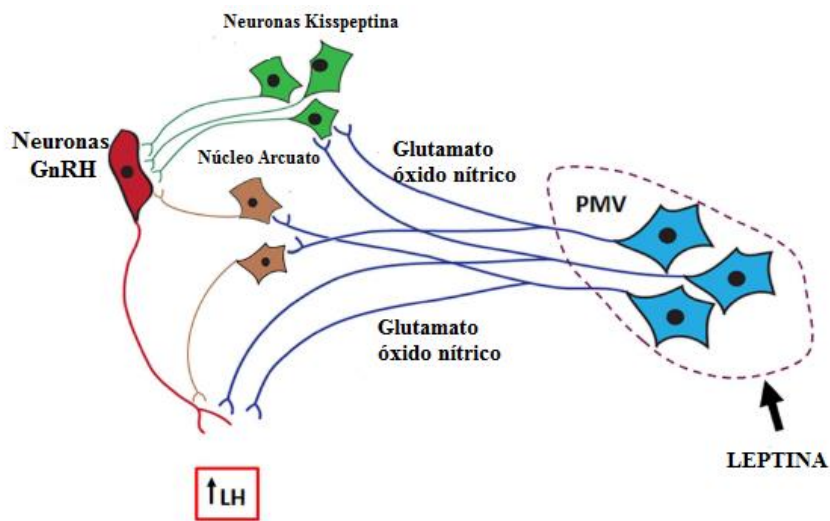


Figura 3. Posible papel del Núcleo Premamilar Ventral en la fisiología reproductiva femenina. Adaptado de Donato y cols. 2011 [48]

1.3. OBESIDAD: IMPACTO EN LA FERTILIDAD FEMENINA

El sobrepeso y la obesidad se han convertido en las últimas décadas en uno de los principales problemas de salud de la sociedad actual, con una prevalencia estimada entre el 4-28% de los hombres europeos y entre el 6-37% en las mujeres europeas, lo que significa que esta patología está alcanzando unas proporciones epidémicas [50].

Hoy en día el tejido adiposo ya no es considerado como un simple órgano de almacenamiento, sino uno de los principales órganos endocrinos del organismo, implicado en la homeostasis de la glucosa, la producción de esteroides, el sistema inmunitario, la hematopoyesis y la función reproductora [51, 52]. Ello se materializa gracias a un soporte celular compuesto por adipocitos, células endoteliales, pericitos, monocitos, macrófagos y fibroblastos, en el que se producen reacciones metabólicas y se sintetizan sustancias que actuarán tanto a nivel paracrino como endocrino. Estas sustancias son las denominadas adipocinas, que incluyen citoquinas, hormonas, factores de crecimiento o proteínas reguladoras, etc., por lo que variaciones en el tejido adiposo por exceso o por defecto son acompañados de cambios en la producción y metabolización de estas sustancias que podrían distorsionar procesos fisiológicos, entre ellos la reproducción [53, 54].

El tejido adiposo produce más de 50 adipoquinas, entre las que se encuentran la leptina, resistina, el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la interleuquina 6 y también citoquinas antiinflamatorias como la adiponectina, que tiende a disminuir en la obesidad, y la interleuquina 10, etc. [53, 55, 56].

Adipoquina	Cambio en la obesidad	Acción
Leptina	Aumenta	Disregulación en la secreción de GnRH. Alteración de la esteroidogénesis ovárica. Alteración en la foliculogénesis.
Adiponectina	Disminuye	Incrementa sensibilidad a insulina. Inhibe TNF- α Estimula la ovulación. Interfiere en la foliculogénesis. Modula secreción esteroidea.
Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1)	Aumenta	Correlación directa con el síndrome metabólico. Incrementa el riesgo de aborto
Interleuquina 6	Aumenta	Incrementa insulinoresistencia. Altera la secreción y respuesta a la LH Inhibe producción de estradiol.
Resistina	Aumenta	Aumenta producción de andrógenos en la teca. Inhibe ovulación.

Tabla 1. Principales adipoquinas del tejido adiposo, cambio en obesidad y principales mecanismos de acción en el sistema reproductivo.

La expansión del tejido adiposo asociada a la obesidad, determina una serie de alteraciones en su función metabólica y endocrina, que desencadenan el inicio de una respuesta inflamatoria crónica. Existen evidencias que indican que este estado pro-inflamatorio o inflamación de bajo grado, está implicado directamente en la resistencia a la acción de la insulina y en la fisiopatología reproductiva asociadas a la obesidad [57].

1.3.1. Inflamación de bajo grado asociada a la obesidad y subfertilidad

El tejido adiposo contiene diversas células inmunes: neutrófilos [58], células T [59, 60], células NK [61] y células dendríticas [62]; cada uno de estos tipos celulares se ve alterado, ya sea en número o en su actividad, en los individuos obesos. La infiltración de macrófagos en el tejido adiposo fue el primer cambio claramente asociado con la obesidad [63, 64] y desde entonces un gran número de estudios han

demostrado los mecanismos por los que los macrófagos son reclutados en el tejido adiposo y la forma en que contribuyen a la inflamación del tejido adiposo asociada a la obesidad [65]. Estos macrófagos serían los principales responsables de la mayor parte de la síntesis de TNF- α en el tejido adiposo [64].

1.3.1.1. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α):

TNF- α es una potente citoquina pro-inflamatoria que ejerce efectos pleiotrópicos sobre distintos tipos celulares y juega un papel crítico en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias crónicas. Es sintetizada como una molécula precursora integral transmembrana de 26-kDa, que tras su escisión proteolítica por acción del enzima convertidora del TNF- α (TACE) da lugar a una subunidad de dominio extracelular de 17 kDa que sería la forma madura y soluble de la proteína [66]. TNF- α puede inducir apoptosis o proliferación celular ejerciendo sus efectos a través de su unión a cada uno de sus receptores TNFR1 o TNFR2. La unión de TNF- α a TNFR1 induce muerte celular, mientras que la unión a TNFR2 regula al alza la expresión de genes de supervivencia / anti-apoptóticos [67].

Los niveles de TNF- α están elevados en los individuos obesos tanto en la circulación sistémica, como en su expresión por el propio tejido adiposo [68, 69]. El TNF- α derivado del tejido adiposo probablemente ejerce efectos paracrinos principalmente locales [70], aunque contribuye a los niveles circulantes en plasma.

Existen evidencias sobre la implicación de TNF- α en la fisiología reproductiva femenina. TNF- α se expresa en ovarios adultos, ovocitos, células de la granulosa y de la teca de varias especies de mamíferos [71-73]. Juega un papel importante en varios aspectos de la función ovárica, incluyendo la ovulación, esteroidogénesis, la proliferación y diferenciación celular y la regresión del cuerpo lúteo [74-77]. TNF- α y sus receptores se expresan en los cuerpos lúteos de muchas especies y, junto con las gonadotropinas, regulan la producción de progesterona [78].

Sin embargo, el exceso de TNF- α parece tener efectos negativos sobre diversos aspectos de la función reproductiva femenina:

- Se ha visto que TNF- α puede mediar la supresión, inducida por LPS, de GnRH y la consecuente inhibición en la liberación de la LH en ratas [79, 80], por lo que niveles

elevados de esta citoquina podrían actuar bloqueando el eje neuroendocrino reproductor a través de la inhibición a nivel hipotalámico.

- Recientemente ha sido publicado por Zhang y colaboradores que el factor nuclear kappaB (NF- κ B) inhibe la liberación de la GnRH (Figura 4) [81]. TNF- α estimula la señalización mediada por NF- κ B por lo que actuaría en la inhibición de la GnRH a través de la activación de este factor de transcripción.

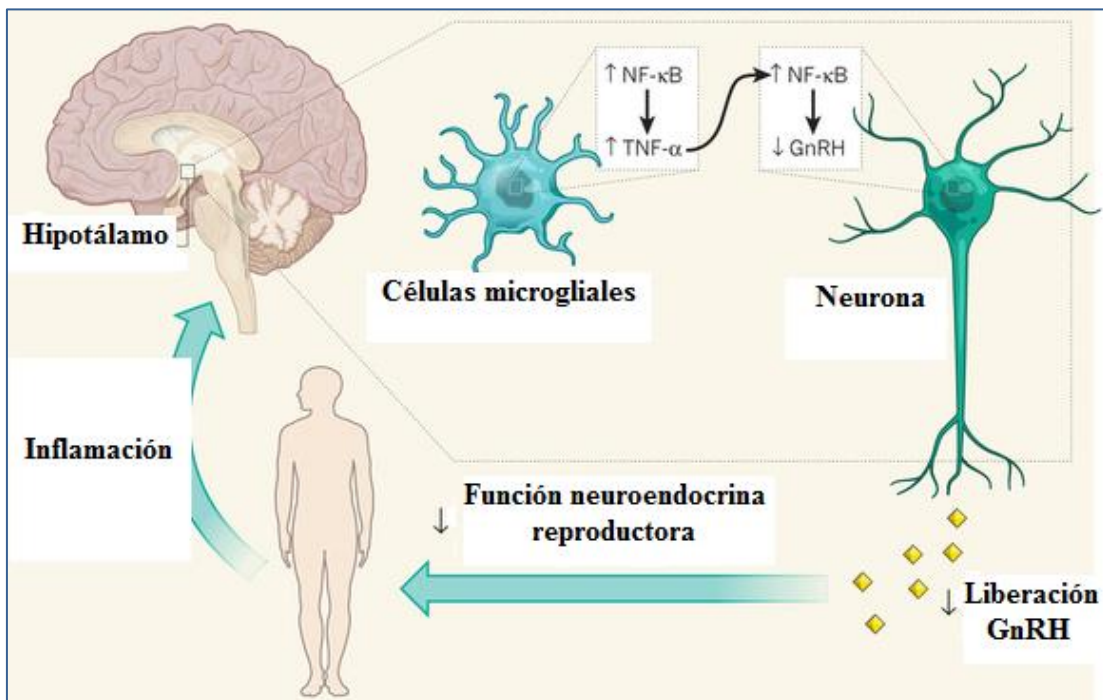


Figura 4. La inflamación conduce a la activación de la molécula de señalización de NF- κ B en el hipotálamo del cerebro. La activación de NF- κ B en las células de la microglía hipotalámicas, deriva en la producción de TNF- α que a su vez estimula la actividad de NF- κ B en las neuronas cercanas. Esta señalización resulta en la represión epigenética del gen que codifica la hormona GnRH, lo que lleva a una reducción de la liberación de GnRH de las neuronas, y sus consecuencias sobre la función neuroendocrina reproductora. Adaptado de Zhang y cols. 2013 [81].

- Como se ha descrito anteriormente, TNF- α puede inducir proliferación y apoptosis en las células de la granulosa [82] así, Evans y colaboradores, estudiaron la expresión de ARNm para TNF- α en las células de la granulosa y encontraron que ésta era superior en los folículos subordinados (no serán seleccionados para la ovulación y sufrirán atresia) que en los folículos dominantes (serán los ovulatorios), por lo que probablemente TNF- α favorezca la atresia folicular [73].

- TNF- α y su receptor se expresan en el endometrio humano [83] y ha sido implicado como un factor potencial en la pérdida del embarazo [84].

- TNF- α estimula la expresión de la aromatasa en el tejido adiposo [85], favoreciendo la aromatización de andrógenos a estrógenos, por lo tanto, la producción de estrógenos extragonadal puede aumentar en los estados donde exista un exceso de TNF- α . La exposición crónica a un ambiente hiperestrogénico podría contribuir a la disfunción ovulatoria en las mujeres obesas [86], o bien podría conllevar una inhibición del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario a través del mecanismo de retroalimentación negativa ejercido por los estrógenos.

Es importante destacar que TNF- α ha sido identificado como un factor potencial causante de la diabetes tipo 2, ya que puede provocar resistencia a la insulina mediante la estimulación de la quinasa JNK (quinasa C-Jun N-Terminal) que da lugar a la fosforilación en los residuos de serina del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1), impidiendo la interacción posterior de IRS-1 con el receptor de la insulina activado (Figura 5) [68, 87, 88].

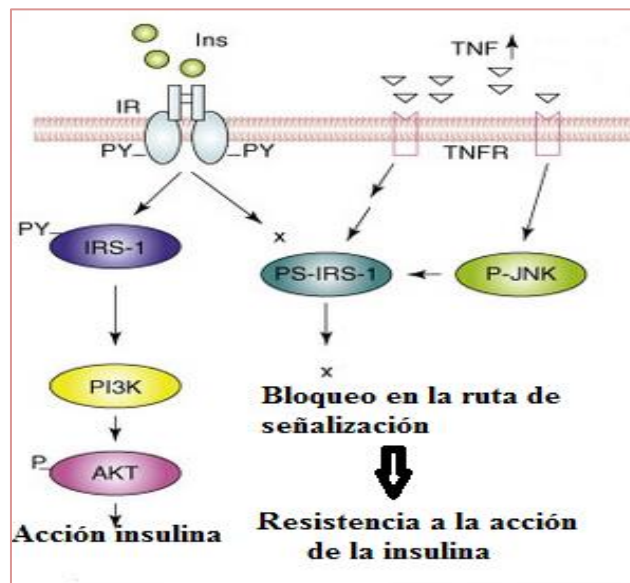


Figura 5. Mecanismo de acción de TNF- α en la cascada de señalización de la insulina.

1.3.2. Disfunción ovárica asociada a la insulinoresistencia

La insulinoresistencia es una condición asociada a múltiples patologías, entre ellas a la obesidad. La resistencia a la insulina se debe a un defecto en la cascada de

señalización de esta hormona, que impide que lleve a cabo sus acciones biológicas y conlleva un aumento compensatorio en su secreción (hiperinsulinemia) [89]. Esto implica una inadecuada captación de la glucosa por parte de los tejidos y como resultado de esta alteración los niveles de glucosa en circulación aumentan.

Los defectos en la cascada de señalización de insulina pueden darse a varios niveles por una reducción de la estimulación de la insulina de la actividad de la tirosin quinasa: por la reducción de la activación de la fosforilación de tirosina del receptor de insulina y del IRS-1, o por la disminución de la asociación de la proteína p85 y la actividad de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) con el IRS-1 [89]. Esto impide la translocación del transportador de glucosa GLUT-4 a la membrana celular y por lo tanto los tejidos no pueden captar la glucosa de manera eficiente (*Figura 6*).

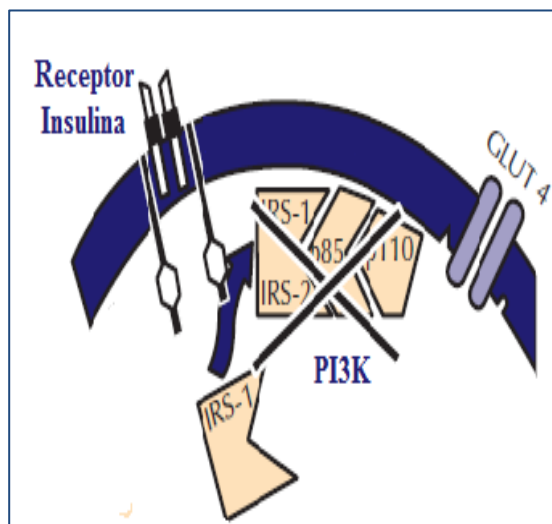


Figura 6. Esquema de la ruta de señalización del receptor de insulina.

Los mecanismos a través de los que la insulinoresistencia menoscaba la fertilidad han sido ampliamente estudiados en el síndrome de ovario poliquístico (SOP), un desorden multifactorial con diversas manifestaciones clínicas como pueden ser oligo- y/o anovulación, hiperandrogenismo, ovarios poliquísticos, obesidad y resistencia a la acción de la insulina, entre otros [90].

El 70% de las mujeres con SOP son insulinoresistentes y su consecuente hiperinsulinemia parece jugar un papel central en el desarrollo del síndrome y se considera que es la causa del hiperandrogenismo presente en esta enfermedad [91].

La insulina actúa a diversos niveles aumentando la producción endógena de andrógenos:

- Nivel ovárico: El exceso de insulina se une a su propio receptor y a receptores del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1, cuyos receptores son de estructura similar al receptor de insulina) actuando sinérgicamente con la LH en las células de la teca aumentando la síntesis androgénica [92]. Además la insulina podría activar la citocromo P450c17 alfa-hidroxilasa, que es un importante intermediario en la producción de andrógenos [93].

Estas acciones biológicas de la insulina en el ovario están mediadas por los inositol-glicanos a nivel post-receptor, y no por la cascada de tirosin-quinasa. Así es como se explica la razón por la que la resistencia a la insulina en otros tejidos no impide ésta acción de la insulina a nivel ovárico [92, 94].

- A nivel hepático: la hiperinsulinemia produce una disminución de la proteína transportadora de IGF-1 (IGFBP-1) y la proteína transportadora de hormonas sexuales (SHBG) lo que se traduce en un aumento de IGF-1 (que provoca un aumento de la producción de andrógenos ováricos a través de su efecto co-gonadotrópico) y de andrógenos libres [92].

- A nivel de la glándula suprarrenal: la insulina podría estar implicada en la producción de andrógenos por la glándula adrenal e influir en la capacidad de respuesta suprarrenal para sus hormonas tróficas [95].

El exceso de andrógenos intraováricos es responsable de la anovulación, promoviendo directamente la atresia folicular y la incapacidad de seleccionar un folículo dominante [96]. Además este estado de hiperandrogenismo podría provocar una desregulación en el mecanismo de retroalimentación entre el ovario e hipotálamo e hipófisis que conlleva una alteración en la síntesis y liberación de las gonadotropinas, provoca una hipersecreción de LH alterando el ratio LH:FSH que deriva en un inadecuado reinicio de la meiosis del ovocito y por lo tanto una alteración en su maduración.

1.4. IMPORTANCIA DE LA CALIDAD OVOCITARIA

1.4.1. Crecimiento foliular

El periodo de crecimiento y maduración del folículo y del ovocito se caracteriza por una intensa síntesis proteica y almacenamiento de macromoléculas. En el folículo primordial el ovocito está rodeado por una capa unilaminar de células pregranulosa planas que se transforman en células de la granulosa cúbicas cuando forman el folículo primario. En respuesta a la FSH estas células sufren mitosis sucesivas dando lugar al folículo secundario (un folículo preantral multilaminar) y este crecimiento va acompañado de la formación de una capa de células de la teca alrededor de la membrana basal. La formación del antro es dependiente de la FSH y este está lleno de líquido folicular, que es sintetizado por las células de la granulosa. Se forman varias capas de células de la granulosa alrededor del ovocito que serán las células del cúmulo. Cuando la cavidad antral está completamente establecida este folículo recibe el nombre de folículo terciario, antral o de Graaf [97].

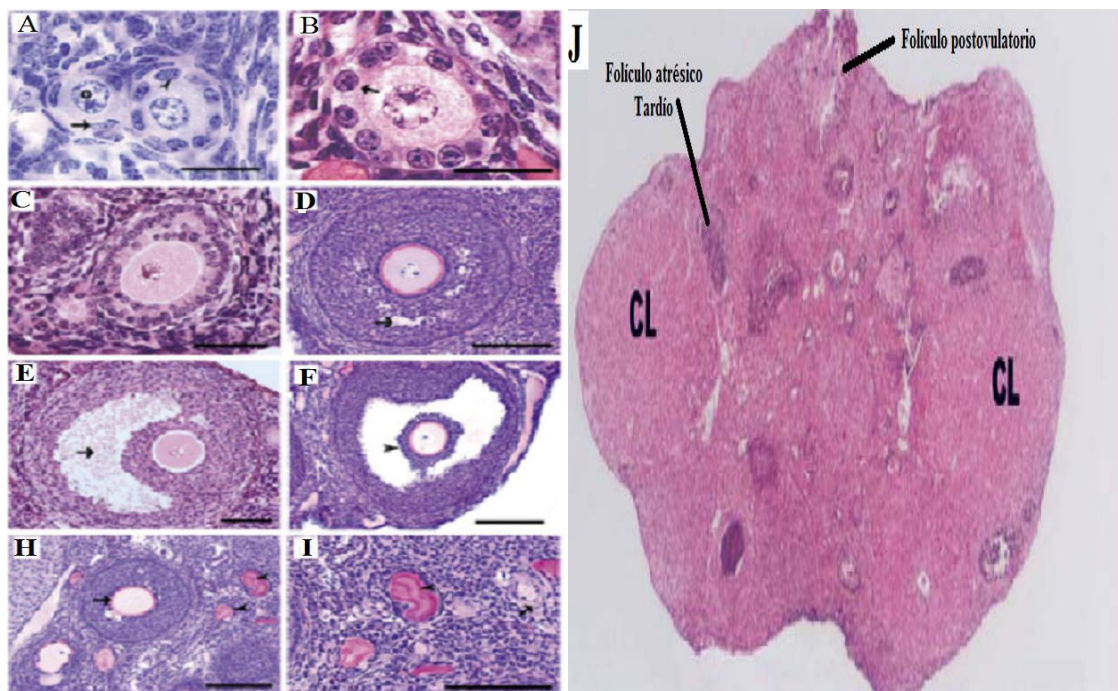


Figura 7. (A-I) Clasificación foliular en cortes histológicos de ovario de ratón C57BL/6, teñidos con hematoxilina-eosina. (A) Folículo primordial. (B) Folículo primario. (C) Folículo secundario. (D) Folículo antral temprano. (E) Folículo antral. (F) Folículo preovulatorio (H) Folículo antral temprano y folículos atrésicos (I) Folículos atrésicos. *Adaptado de Myers y cols. 2004 [98].* (J) Corte histológico de ovario de ratón C57BL/6, teñido con hematoxilina-eosina, CL: cuerpo lúteo. *Adaptado de Pallares y cols, 2010 [35].*

De entre todos los folículos antrales, se seleccionan los folículos dominantes que producirán ovocitos maduros listos para ovular en cada ciclo estral y estos serán los folículos preovulatorios. Los folículos dominantes presentan más receptores para FSH, siendo más sensibles a su acción que el resto de folículos subordinados, por lo que producirán grandes cantidades de estradiol e inhibina que, por su mecanismo de retroalimentación, regularán negativamente la secreción de FSH y los folículos subordinados que son menos sensibles a la acción de esta hormona degenerarán sufriendo atresia folicular, aunque son múltiples factores los que determinan qué folículos son seleccionados para la ovulación y aún no está bien establecido el mecanismo exacto que determina la dominancia folicular [97]. Tras la ovulación, las células de la granulosa y de la teca sufren un proceso de luteinización, dando lugar al cuerpo lúteo.

1.4.2. Maduración del ovocito en mamíferos

La calidad del ovocito influye en el éxito de la fecundación del mismo, la calidad y supervivencia del embrión, la implantación, el desarrollo fetal e incluso tiene repercusiones sobre la descendencia en su vida adulta [99]. La calidad o competencia ovocitaria se adquiere durante la foliculogénesis, con el crecimiento del ovocito y durante su período de maduración, en los que son esenciales la comunicación existente entre células de la granulosa y el ovocito (mediante uniones tipo GAP), lo que se denomina complejo cúmulo-ovocito, gracias al cual el ovocito podrá obtener las moléculas y macromoléculas esenciales para llegar a ser competente, es decir, tener la capacidad de sustentar el desarrollo temprano de embrión [99].

En el desarrollo del ovocito competente pueden distinguirse la maduración nuclear y la citoplasmática. Los ovocitos se encuentran detenidos en diplotene de la profase I (PI, en la primera división meiótica) en los folículos pre-antrales, son los ovocitos primarios. La maduración nuclear se inicia con la reanudación de la meiosis promovido por el aumento preovulatorio de los niveles de gonadotropinas, en especial de la LH, en el tránsito a folículo antral, con la rotura de la vesícula germinal (disolución de la membrana nuclear) y la consecuente llegada al estadio de metafase I (MI), donde se produce la segregación de los cromosomas homólogos, la posterior extrusión del primer corpúsculo polar, alcanzando el estadio de metafase II (MII, de la

segunda división meiótica) tras lo cual se produce la segunda detención de la meiosis [100]. Este ovocito en MII sería el ovocito secundario y maduro que es expulsado con la ruptura folicular durante la ovulación y que es el que se encuentra capacitado para ser fecundado [101].

En el ratón el pico preovulatorio de LH tiene lugar 12 horas antes de la ovulación y se liberan entre 8-12 ovocitos (en un ciclo natural), pero el proceso es asincrónico y ocurre en un periodo de 2-3 horas.

La maduración citoplasmática se consigue tras una adecuada síntesis y acúmulo de transcritos y proteínas y unos cambios en la ultra y macroestructura del ovocito, que preparan al ovocito para su activación, la formación de los pronúcleos, la fecundación y el posterior desarrollo embrionario [102].

Es importante destacar que la transcripción genética en el embrión es muy escasa, o prácticamente nula, desde el momento de la fecundación hasta el momento en el que el genoma embrionario es activado, por lo tanto, hasta esta etapa del desarrollo embrionario, el crecimiento y división del embrión dependen del ARNm y proteínas que hayan sido almacenadas por el ovocito durante su maduración [103]. En el ser humano la activación del genoma embrionario tiene lugar en el estadio de 4-8 células [104] y en el ratón es activado en el estadio de dos células [105].

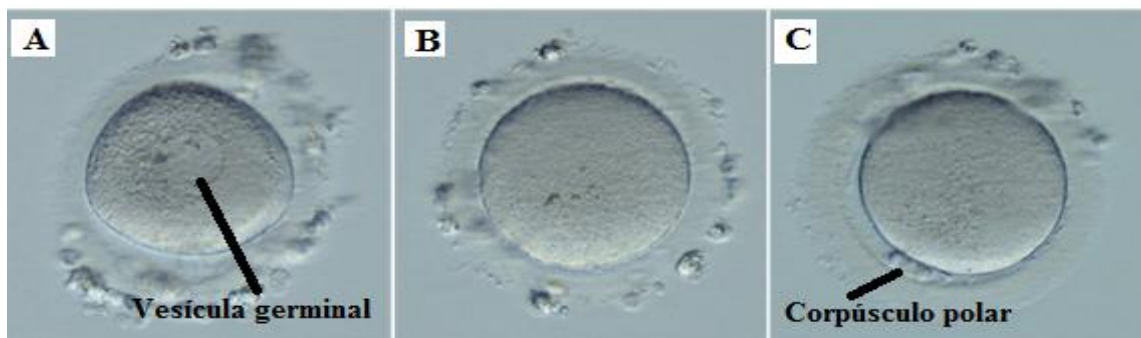


Figura 8. Estadios de maduración ovocitaria. (A) Vesícula germinal (VG) en Profase I. (B) Ovocito MI (C) Ovocito en MII con corpúsculo polar.

1.5. POTENCIAL TERAPEÚTICO DEL RESVERATROL

Los polifenoles representan un gran grupo de compuestos que tienen un anillo aromático, que se caracteriza por la presencia de uno o más grupos hidroxilo con diferentes complejidades estructurales. El resveratrol (trans-3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) es un polifenol natural de origen vegetal, sintetizado por las plantas como una fitoalexina que se activa bajo condiciones de estrés tales como la radiación ultravioleta y la infección fúngica [106]. Se puede encontrar en las bayas, frutos secos y algunas plantas medicinales, y sobre todo está presente en la piel de las uvas y por tanto en el vino tinto. El resveratrol fue identificado en 1963 como el componente activo de las raíces secas de *Polygonum cuspidatum* utilizadas desde la antigüedad en la medicina tradicional china y japonesa [107]. La estructura química del resveratrol es similar a la del estrógeno sintético dietilestilbestrol y puede ser considerado como un SERM (modulador selectivo de los receptores de estrógenos) natural [108].

Estudios previos demuestran sus acciones anti-oxidantes, anti-inflamatorias e inhibitorias de la proliferación celular, utilizando distintas líneas celulares y modelos animales [109]. Por lo tanto, el resveratrol tiene actividad en la regulación de múltiples eventos celulares y se postula que su mecanismo de acción es mediado principalmente a través de la activación de SIRT1 [110] y la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) [111].

SIRT1, el homólogo en mamíferos del Sir2 (regulador de la información silenciado 2) de las levaduras, es una sirtuina deacetilasa de histonas clase III dependiente de NAD⁺(-) (Nicoatinamida adenina dinucleótido). SIRT1 deacetila múltiples sustratos celulares incluyendo FoxO1, FoxO3, PGC- α , NF κ B, etc., y mediante la regulación de estas moléculas, entre muchas otras, funciona como un regulador principal de la homeostasis de la energía, el silenciamiento de genes, el metabolismo, la carcinogénesis, la respuesta inflamatoria, la estabilidad genómica y la supervivencia celular [112].

Se ha demostrado que SIRT1 y AMPK desempeñan muchas funciones similares, incluyendo su capacidad para responder al estrés y al estado nutricional, inducir la biogénesis mitocondrial, regular la homeostasis de la glucosa, y controlar la actividad de importantes reguladores transcripcionales [113]. Es evidente que existe una interacción dinámica entre estas dos vías. Se ha demostrado que AMPK activa a SIRT1,

probablemente a través de un incremento indirecto en los niveles celulares de NAD⁺ [114], mientras que SIRT1 deacetila la quinasa de AMPK, LKB1, lo que lleva a un aumento de la fosforilación y la activación de AMPK (Figura 9) [115].

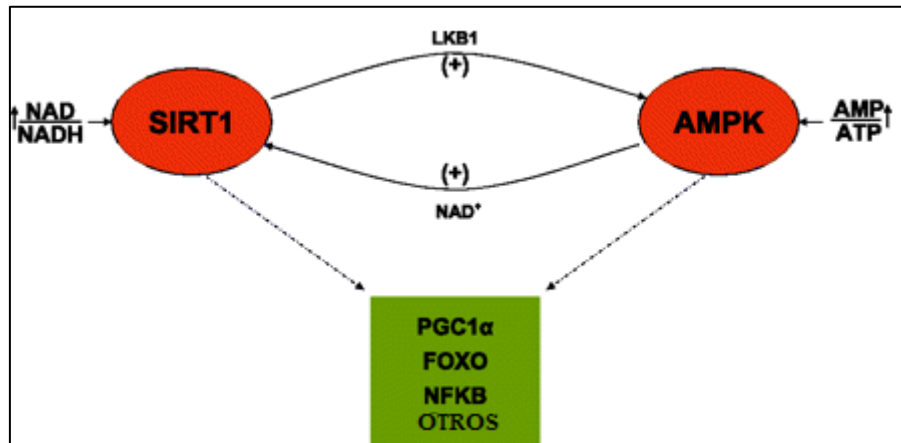


Figura 9. La interacción dinámica entre SIRT1/AMPK. Adaptado de Ruderman y cols., 2010.[116].

1.5.1. Resveratrol e inflamación

El resveratrol, a través de la activación de SIRT1, disminuye los niveles de moléculas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- α [117]. La activación de SIRT1 reduce la respuesta inflamatoria inducida por TNF- α , a través de la deacetilación de NF κ B en adipocitos que presentan resistencia a la insulina [118]. Al deacetilarse NF κ B, disminuye su unión a los promotores de genes, lo que resulta en una disminución de la expresión de genes inflamatorios regulados por NF κ B.

Por otra parte la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo es un evento clave en el desarrollo del estado pro-inflamatorio en la obesidad, y se ha demostrado que mediante la administración de resveratrol, a través de la activación de SIRT1 en los macrófagos, disminuye la secreción de TNF- α por parte éstos, lo que modula los efectos paracrinos de los macrófagos sobre los adipocitos [119].

1.5.2. Resveratrol e insulinoresistencia

La adiponectina, que incrementa la sensibilidad a la insulina, es regulada positivamente a través de SIRT1 que deacetila FoxO1 (Forkhead **box** protein O1, un factor de transcripción) [120].

SIRT1 tiene un papel positivo en la vía de señalización de la insulina mediante la represión de Ptpn1 (proteína tirosina fosfatasa N1) que induce la defosforilación del receptor de insulina y de IRS-1 y mediante la regulación de los sustratos del receptor de insulina (IRS) 1 y 2 y la activación de Akt (*Figura 10*) [112].

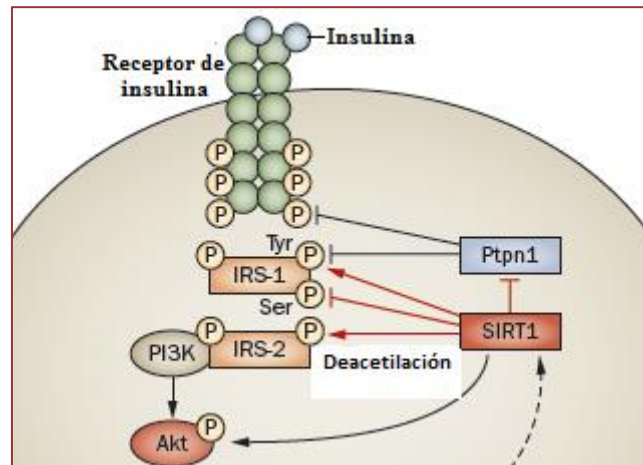


Figura 10. Papel de SIRT1 en la ruta de señalización de la insulina. *Adaptado de Liang y cols. 2009* [112].

En individuos obesos y/o con diabetes tipo 2, disminuye la capacidad oxidativa mitocondrial [121], lo que contribuye a la generación local de especies reactivas del oxígeno (ROS) y un aumento en los niveles de ROS conduce a la inhibición de la señalización de la insulina, mediante JNK y ASK1 (**Quinasa reguladora** de la señal de apoptosis 1). SIRT1 activa la actividad transcripcional de PGC1 α (Co-activador de PPAR- γ (Receptor del Peroxisoma Activado por Proliferación- γ)) que induce lipólisis y la biogénesis mitocondrial, las cuales pueden inhibir la generación de ROS en la mitocondria. Además, SIRT1 deacetila FoxO3a (Forkhead **box** protein O3), lo que conduce a la regulación positiva de la expresión de la catalasa y la posterior reducción de los niveles de ROS (*Figura 11*) [112].

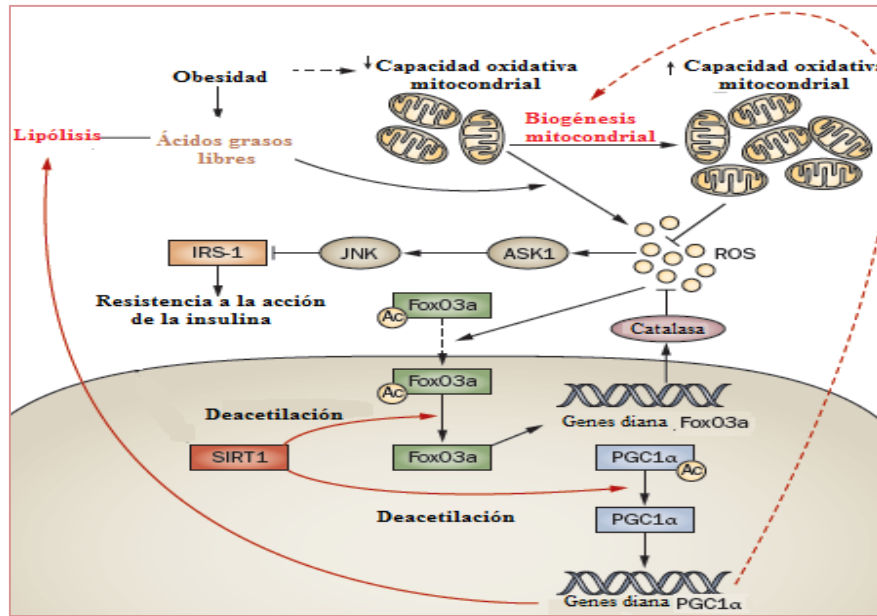


Figura 11. Papel de SIRT1 en el metabolismo mitocondrial. Adaptado de Liang y cols., 2009 [112].

En cuanto a la activación por la vía de AMPK, ésta quinasa aumenta la captación de glucosa en el músculo a través de un mecanismo que sigue siendo funcional en individuos resistentes a la insulina y también aumenta la expresión del transportador de glucosa GLUT4 [122]. AMPK también promueve el metabolismo de la glucosa mediante el aumento de la biogénesis mitocondrial. AMPK podría aumentar la sensibilidad a la insulina, promoviendo la oxidación de grasas y la reducción de los triglicéridos almacenados; una cantidad en exceso de triglicéridos en el músculo está asociada con resistencia a la insulina. Por último, una fuente importante de las altas concentraciones de glucosa en individuos con diabetes tipo 2, es la elevada producción de glucosa hepática, que AMPK inhibe por la regulación negativa de los genes de la gluconeogénesis [111].

1.5.3. Resveratrol y fertilidad

Recientemente, se ha sugerido que el resveratrol desempeña un papel en la biología reproductiva. Estudios *in vitro* demuestran el papel protector del resveratrol en el desarrollo folicular [123]. Otro estudio *in vivo* demuestra que el resveratrol puede inhibir el tránsito de folículo primordial a folículo en crecimiento, e inhibir la apoptosis ovocitaria, de manera que mantiene la reserva ovárica (al ser menos los folículos primordiales que empiezan a desarrollarse en cada ciclo y que luego entrarían en

atresia), alargando los ciclos del estro regulares y retrasando el climaterio en ratas con envejecimiento temprano [124]. Se ha demostrado que el resveratrol juega un papel clave en la activación de la luteinización, ejerce sus efectos mediante la estimulación de la expresión de SIRT1 y LH-R, entre otros, en las células de la granulosa y promueve la secreción de progesterona [125]. Singh y colaboradores postulan que el resveratrol puede actuar de manera antiapoptótica en el endometrio y podría favorecer el éxito del embarazo y la fertilidad [126]. Recientemente Liu y colaboradores han demostrado que el resveratrol protege contra la infertilidad asociada al envejecimiento en ratones, aumentando el número y la calidad de ovocitos obtenidos, el número de folículos y el desarrollo embrionario *in vitro* [127].

Se postula su potencial terapéutico en el tratamiento del SOP. El resveratrol podría promover la apoptosis [128], reducir la producción de andrógenos [129] o disminuir la permeabilidad vascular [130] de las células tecaes del ovario.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La administración exógena de gonadotropinas se practica de forma rutinaria en los tratamientos de reproducción asistida, donde las inyecciones repetidas de FSH son seguidas por la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG, una LH de origen coriónico) para inducir la superovulación [131], lo que se denomina estimulación ovárica controlada.

El aumento en la prevalencia del sobrepeso y la obesidad en la población general, es probable que se traduzca en un aumento del número de mujeres que acuden a los tratamientos de reproducción asistida con esta problemática, debido al consecuente impacto de esta condición en su capacidad reproductiva. Es frecuente en estas mujeres, con sobrepeso u obesidad, que presenten una mala respuesta ovárica al tratamiento de estimulación con gonadotropinas [132]. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales la obesidad menoscaba la fertilidad aún no están claramente establecidos y es necesario profundizar en su estudio para poder establecer nuevas estrategias terapéuticas en relación con el sobrepeso/obesidad en casos de infertilidad.

En los ratones ob/ob, genéticamente deficientes en la síntesis de leptina, concurren ambas condiciones: obesidad e infertilidad [16], por lo que estos ratones suponen un modelo idóneo para el estudio de los procesos a través de los cuales la obesidad y sus secuelas (estado pro-inflamatorio, resistencia a la acción de la insulina, etc.) influyen en la fisiología reproductiva. Por ello ha sido el modelo animal elegido como objeto de nuestro estudio.

Hipótesis: El potencial terapéutico del resveratrol revierte el estado proinflamatorio y la resistencia a la acción de la insulina, asociados al sobrepeso y la obesidad, mejorando la respuesta a la estimulación ovárica controlada. Por ello nos planteamos los siguientes **objetivos**:

1. Comprobar los efectos de la obesidad y del tratamiento con resveratrol, en la resistencia a la acción de la insulina y en el estado pro-inflamatorio.
2. Determinar si la obesidad y el tratamiento con resveratrol condicionan la respuesta a la estimulación ovárica, analizando parámetros relacionados con la ovulación y el desarrollo folicular, como son el número y la calidad de los ovocitos y la estimación del número de folículos y cuerpos lúteos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES

Se utilizaron ratones hembra con 6 semanas de edad: ratones obesos Ob/Ob (B6.V-LEP OB/J, n=15) y ratones no obesos C57BL/6J (n=15) procedentes de Charles River Laboratories, Francia. Se alojaron en grupos de 3-4 animales por jaula, divididos según su grupo experimental, manteniéndose durante el experimento un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (periodo de luz: 08:00-20:00 h), temperatura ambiental de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad absoluta de $65\pm 5\%$, y acceso libre a comida y bebida. El uso y la manipulación de los animales se realizó en todo momento de acuerdo con la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas del 22 de septiembre de 2010 (2010/63/UE) y legislado en nuestro país mediante el Real Decreto 53/2013 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

3.2. DISEÑO Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Los animales fueron divididos en dos grupos, obesos (O) y no obesos (NO), cada uno de los cuales se dividió al azar en 2 subgrupos experimentales en función del tratamiento al que fueron sometidos: resveratrol (R) o placebo (P).

- OR (n=8): Obesos tratados con Resveratrol.
- OP (n=7): Obesos tratados con Placebo.
- NOR (n=8): No Obesos tratados con Resveratrol.
- NOP (n=7): No Obesos tratados con Placebo.



Figura 12. A la izquierda de la imagen, Ratón Ob/Ob. A la derecha ratón C57BL/6J.

Al llegar los ratones al animalario se mantuvieron una semana en cuarentena para su adaptación al entorno. Tras este período estuvieron otra semana sin presencia de macho y a continuación, estuvieron una semana en presencia de macho para la inducción y sincronización del estro, por el efecto Whitten [133]. A partir de este momento comenzó la administración del tratamiento correspondiente.

El tratamiento consistió en la administración diaria de resveratrol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se realizó utilizando una cánula intragástrica, previa ligera anestesia con halotano, a una concentración de 3,75 mg/Kg/día, disueltos en carboximetilcelulosa acuosa al 0,5%. La elección de la dosis corresponde a una dosis equivalente en humanos a 40mg/Kg/día de acuerdo con la fórmula HED (human equivalent dose formula), la cual tiene en cuenta la superficie corporal en lugar de la extrapolación directa peso animal-peso humano [134]. El tratamiento tuvo una duración de 20 días. Se ha demostrado en humanos que tras 3 semanas de tratamiento con esta dosis, disminuyen significativamente parámetros como ROS, NFκB, TNF-α, IL-6 o JNK [135]. A los subgrupos placebo se les administró, por el mismo procedimiento, 100μl de Carboximetilcelulosa acuosa al 0,5%. Antes de comenzar el tratamiento, así como durante la duración del mismo, se anotaron los pesos de los animales y de su ingesta alimentaria diariamente. Además, se hicieron frotis vaginales cada 3 días para comprobar si los animales estaban ciclando regularmente.

Además, se realizó un tratamiento de inducción de la super-ovulación que consistió en la administración intraperitoneal de 5UI de gonadotropina sérica de yegua gestante (PMSG; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a las 20h del día 18 de tratamiento. A continuación, 48h después de la administración de PMSG (día 20 del tratamiento) se administraron intraperitonealmente 5UI de gonadotropina coriónica humana (hCG; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se pusieron a los animales en ayunas. Finalmente, 14h después de la administración de hCG, los animales fueron sacrificados con una inyección intraperitoneal de equitesina (pentobarbital sódico al 1%, en dosis 0,4ml/100g peso corporal).



Figura 13. Esquema representativo del diseño experimental.

La concentración de glucosa en sangre de los animales fue medida en la vena de la cola utilizando un monitor de glucemia (Roche Diagnostics GmbH, Alemania). Las muestras de sangre fueron obtenidas a través de la vena yugular, en tubos heparinizados y se centrifugaron a 3500 revol/min., durante 15 min a 4 °C, se extrajeron los plasmas y se almacenaron congelados a -80 °C hasta su posterior análisis. A continuación, se extrajo el aparato reproductor (ovarios y útero) y se pesó en una balanza analítica (Denver Instrument Co., Denver, CO), los oviductos fueron seccionados y procesados para estudiar el número y la calidad de los ovocitos, y distintos órganos y tejidos fueron recogidos para hacer estudios de histología (ovarios) y de proteínas (tejido adiposo periovárico). Los ovarios fueron introducidos en cassettes de histología y éstos en paraformaldehído (al 4%, pH 7,4), para posteriormente ser incluidos en bloques de parafina. El tejido adiposo visceral fue introducido en criotubos e inmediatamente inmersos en nitrógeno líquido y posteriormente fueron almacenados a -80 °C.

3.3. EVALUACIÓN DE LOS CICLOS ESTRALES

La duración de los ciclos de estro se determinó mediante inspección, cada 3 días y en el intervalo de tiempo comprendido entre las 9:00-11:00h de la mañana, de los frotis vaginales.

El procedimiento consistió en una toma de muestra utilizando una micropipeta cargada con solución salina (99,9 ml de agua destilada +0,9 g cloruro sódico), de forma que al retirar la micropipeta del animal se succionan células del epitelio vaginal que posteriormente se depositan en un porta y se observan al microscopio óptico (OLYMPUS, modelo BH-2, Japón). El patrón seguido para la identificación de cada fase del ciclo estral fue el siguiente: se considera **diestro** cuando el frotis presenta algunos leucocitos y células nucleadas (*Fig. 14*). La fase de **proestro** viene determinada por la presencia de leucocitos, con células nucleadas y muy pocas células escamadas (*proestro temprano*) o bien por la presencia única de células nucleadas (*proestro tardío*). En la fase de **estro** sólo aparecen células escamadas (*Fig. 15*). Por último, la fase de **metaestro** es identificada gracias a la abundante presencia de leucocitos que invaden el epitelio, acompañados de células escamadas

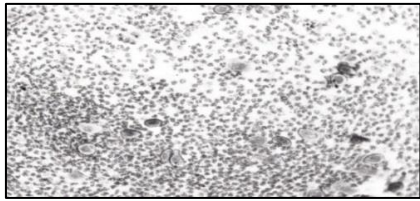


Figura 14. Células del epitelio vaginal características de la fase de *Diestro*.

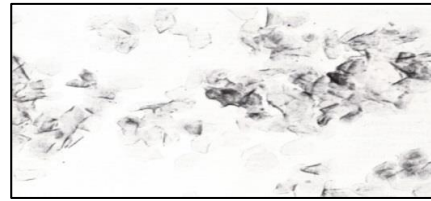


Figura 15. Células del epitelio vaginal características de la fase de *Estro*.

3.4. HISTOLOGÍA DEL OVARIO Y ANÁLISIS DE FOLÍCULOS

Tras el sacrificio, los ovarios se introdujeron en cassettes de histología que se fijaron en paraformaldehído (4%, pH=7,4) y finalmente fueron deshidratados y embebidos en parafina. Se cortaron secciones seriadas, de los dos ovarios, de cinco micrómetros cada una. En cada porta se colocaron cinco de estas secciones seriadas, y entre cada porta se despreciaron 100 micrómetros de tejido, siendo un total de cinco portas de los cuales aquellos impares (1, 3, 5) fueron teñidos con hematoxilina y eosina (los números pares fueron procesados de diferente manera para posteriores estudios de inmunohistoquímica). Para la estimación del número de folículos, se seleccionaron una de cada cinco secciones, de cada porta y se contabilizaron: los folículos en crecimiento, que se agruparon como primarios, secundarios (dentro de los cuales se incluyen los folículos antrales en diferentes estadios de maduración) y preovulatorios, los cuerpos lúteos y los folículos atrésicos (*Fig.16*). Los valores obtenidos no se multiplicaron por ningún factor de corrección, puesto que lo que interesa no es el número total de folículos y cuerpos lúteos del ovario, sino una estimación que permita ver las diferencias que existen entre grupos.

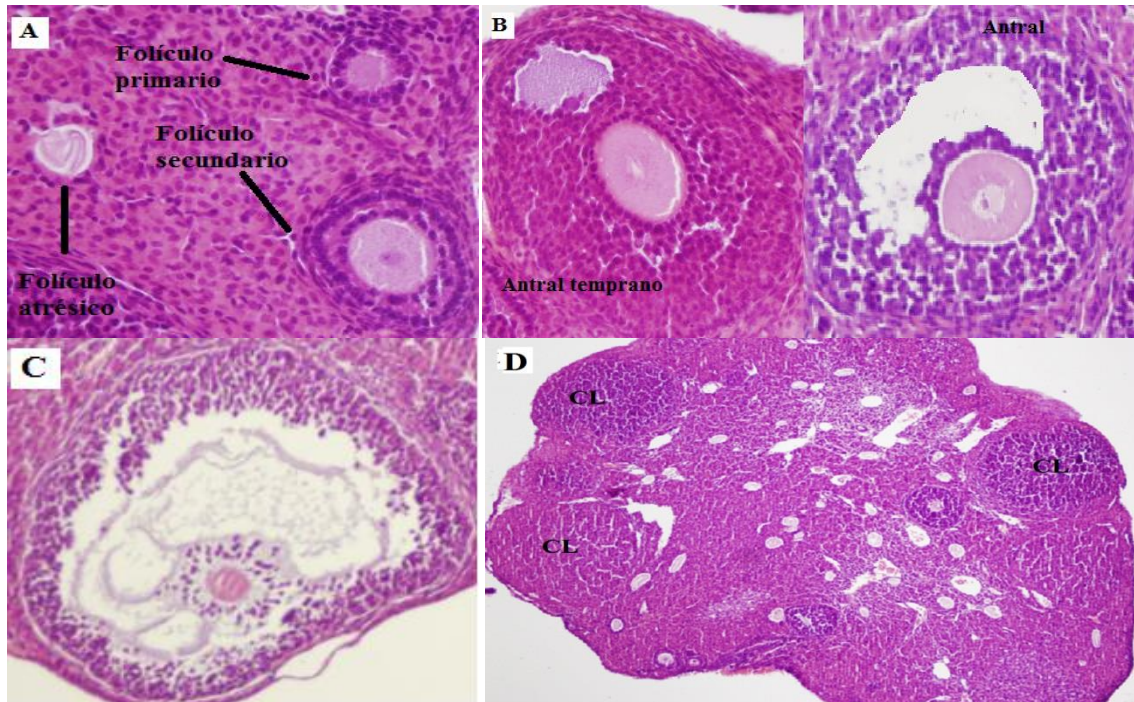


Figura 16. Fotografía original representativa de (A) folículos atrésicos, primarios y secundarios, 40X. (B) Folículo antral temprano y antral, 40X. (C) Folículo preovulatorio, 40X. (D) Corte histológico de ovario de ratón C57BL/6, con cuerpos lúteos (CL), 10X. Secciones teñidas con hematoxilina-eosina.

3.5. RESPUESTA A LA SUPEROVULACIÓN CON GONADOTROPINAS

Antes de la finalización del tratamiento, con resveratrol o placebo, se realizó el tratamiento de estimulación ovárica controlada para inducir la superovulación, el cual consistió en la administración de 5 UI de PMSG y 5 UI de hCG 48 h más tarde, sacrificándose por sobredosis de equitesina 12 horas después.

Se extraen los oviductos correspondientes a cada ovario del útero bicorne, y se colocan en microgotas de medio M2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) cubiertas por aceite mineral (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se localizan las ámpulas de los oviductos y de ellas se extraen los complejos cúmulo-ovocito (*Figura 17*).

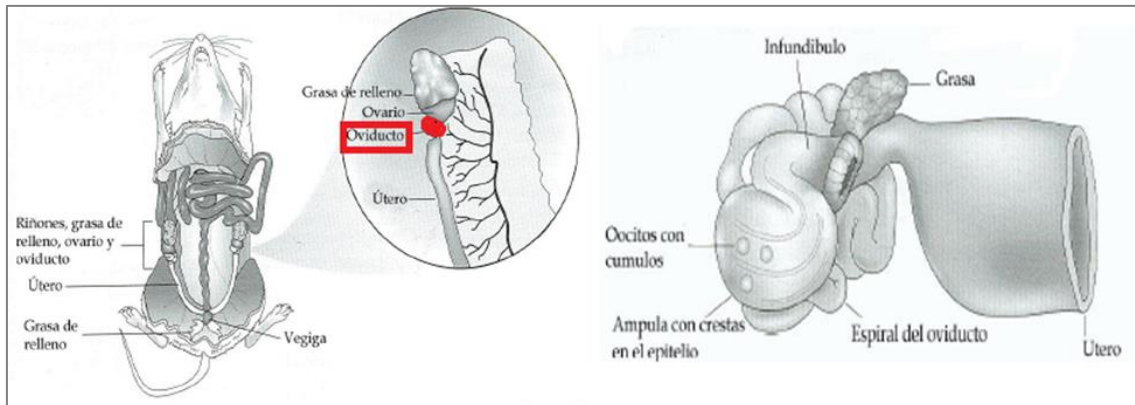


Figura 17. Representación de la localización del oviducto y de sus estructuras.

Los complejos cúmulo-ovocito se denudan (eliminación de las células del cúmulo que rodean el ovocito) con 300 mg / ml de hialuronidasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en medio M2. Los ovocitos se recuperaron en microgotas de medio M2 cubiertas por aceite mineral y su número y morfología fue cuantificada con un microscopio de contraste de fase T-2 (Nikon, Melville, NY).

La clasificación morfológica se hizo de acuerdo a las características de los ovocitos en distintos estadios de maduración y a diversos parámetros de calidad ovocitaria. Clasificación ovocitaria: Clase a: ovocito MII, con corpúsculo polar único, ligeramente aplanado y con forma esférica, zona pelúcida proporcionada bien definida y regular, espacio perivitelino en el que cabe el corpúsculo polar, oolema regular y ooplasma homogéneo. Clase b: ovocito MI, sin corpúsculo polar, pero con el resto de características morfológicas de ovocitos de clase a. Clase c: ovocitos en estadio de vesícula germinal y/o con anomalías morfológicas como corpúsculo polar fragmentado, espacio perivitelino anormal, ooplasma fragmentado, ovocito no esférico, etc. (Fig. 18).

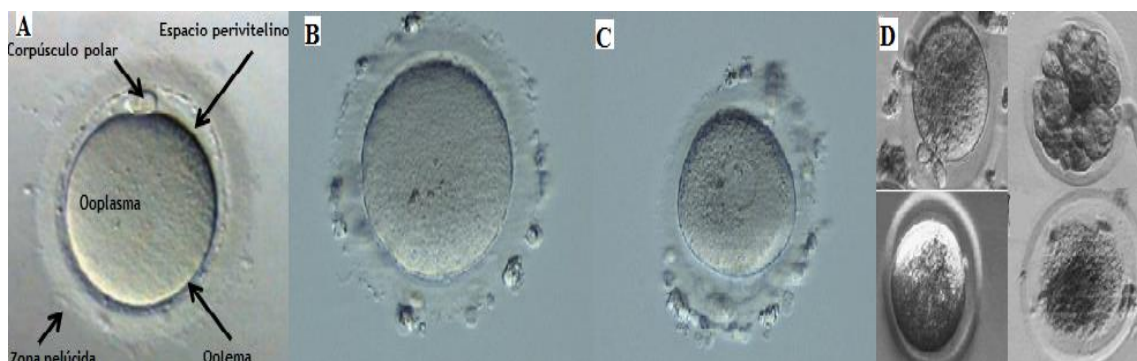


Figura 18. (A) ovocito clase a. (B) ovocito clase b. (C) ovocito en estado de vesícula germinal clase c. (D) ovocitos con distintas anomalías morfológicas de clase c.

3.6. ENSAYOS HORMONALES

La determinación cuantitativa de insulina en el plasma extraído de las muestras sanguíneas se realizó por la técnica de ELISA (Inmunoensayo enzimático) mediante el kit *Insulin (Rat) Ultrasensitive ELISA* (EIA-2943, DRG International, Inc., U.S.A.) según las instrucciones del fabricante (*Tabla 2*).

Añadir <i>calibrators</i> , controles y muestras	25µl
Añadir solución <i>enzyme conjugate</i> 1X a todos los pocillos	100 µl
Incubar	2 horas a 18-25 ° C en un agitación
Lavar la placa con <i>wash buffer</i> 1X	6 veces
Añadir <i>substrate TMB</i>	200 µl
Incubar	15 minutos
Añadir <i>Stop Solution</i>	50µl Agitar durante 5 segundos
Medición A450	Análisis de los resultados

Tabla 2. Resumen del protocolo ELISA.

3.7. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA ACCIÓN DE LA INSULINA

Se utilizó el modelo homeostático o índice HOMA-IR (Homeostasis Model Assesment- Insulin Resistance) para la determinación de la resistencia a la acción de la insulina. Fue calculada de la siguiente manera [136]:

$$HOMA - IR = \frac{Insulinemia \frac{\mu g}{ml} (ayunas) \times Glucemia \frac{mg}{dl} (ayunas)}{22,5}$$

3.8. WESTERN-BLOT

La expresión de las proteínas fue analizada por Western-blot, en el que se usaron extractos crudos de tejido adiposo periovárico que fueron obtenidos mediante homogenización con *POLYTRON*® (KINEMATICA, Suiza) en *TDLB buffer* (Triple detergent lysis buffer; 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxicolato sódico, 1mM ortovanadato sódico, 1 mM pirofosfato).

La cantidad total de proteínas de los extractos crudos, fue cuantificada por el método descrito por Bradford [137] utilizando el reactivo del mismo nombre (Sigma-Aldrich, Reino Unido). Una vez cuantificadas las muestras, a 45 µg de proteínas de cada una de ellas se le añaden 3 µl de tampón de carga para proteínas (60 mM tris HCl pH 6.8, 2% SDS, 2.5% glicerol, 2.5% β-mercaptoetanol, y 0.1% azul de bromofenol), tras lo cual las muestras son hervidas durante 5 minutos, para provocar su desnaturalización, y posteriormente separadas mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Las electroforesis se realizan en un aparato *Mini protean* (Bio-Rad, U.S.A) en geles de poliacrilamida al 13%. Finalizada la electroforesis, las muestras fueron electrotransferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF; Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore, Billerica, MA), que fueron previamente activadas con metanol, siguiendo el método descrito por Towbin y cols. [138].

Una vez realizada la transferencia, las membranas de PVDF se incuban durante dos horas a temperatura ambiente en una solución de bloqueo formada por TBST (20 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Tween 20) con 7,5% de leche en polvo desnatada, con el objetivo de minimizar las uniones inespecíficas del anticuerpo a la membrana. Pasado este tiempo, las membranas se lavan con TBST durante 5 minutos y se dejan incubando durante toda la noche a 4°C con una disolución de anticuerpo primario contra la proteína de interés. Los anticuerpos primarios usados fueron: TNF-α (LifeSpan Biosciences, Inc., Seattle, WA) a una concentración de 1:1000 en TBST con 7,5% de leche en polvo desnatada y β-actina (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A) a una concentración 1:5000 en TBST. A la mañana siguiente, se retira el anticuerpo primario y se realizan lavados de las membranas con TBST durante 40 minutos, tras los cual son incubadas durante una hora a temperatura ambiente, con un anticuerpo secundario anti-Rabbit (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A) conjugado con peroxidasa (HRP) a una concentración 1:10.000 en TBST, al 5% de leche; en el caso de la β-actina no es necesario añadir anticuerpo secundario puesto que el primario ya está conjugado con HRP. Los complejos Proteína-Anticuerpo Primario-Anticuerpo Secundario-HRP son revelados utilizando Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate (Millipore Corporation, U.S.A) siguiendo las indicaciones del fabricante y utilizando como técnica

de revelado la quimioluminiscencia mediante el ChemiDoc-It™ Imaging System (UVP, Reino Unido).

Las bandas obtenidas son valoradas por densitometría óptica utilizando el programa Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA).

En caso de que una vez concluida la primera detección de proteínas, fuese necesario reutilizar las membranas de nitrocelulosa, éstas son incubadas durante 45 minutos a 65°C con una disolución denominada *Stripping Buffer* (200 mM Glicina, 0.5% Tween 20, pH 2.5) para eliminar los restos de señal luminiscente producida por la detección anterior.

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A partir de los datos obtenidos se utilizó el programa *SigmaStat* (versión 3.5) (Systat Software, Chicago, USA) para realizar los análisis estadísticos, así como el programa *SigmaPlot* (versión 11.0) (Systat Software, Chicago, USA) para elaborar las gráficas.

Se analizaron las diferencias entre grupos mediante el test paramétrico Análisis de la Varianza o ANOVA de una vía y postanálisis de la varianza mediante un test de Bonferroni, en los casos en los que las variables seguían una distribución normal y cumplían homogeneidad de varianzas. En los casos en los que la variable no seguía una distribución normal y/o no se cumplía la igualdad de varianzas, se utilizó la prueba no paramétrica para muestras independientes Kruskal-Wallis y postanálisis de la varianza mediante el Método Dunns o el test Tukey.

Todos los datos son representados como la media \pm el error estándar de la media (ESM) de los resultados obtenidos. Se estableció un nivel de significación (α) del 5%, considerando por tanto que hay diferencias estadísticamente significativas en aquellos valores en los que el grado de significación o nivel crítico (p) sea menor a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. PESO CORPORAL E INGESTA ALIMENTARIA

4.1.1. Peso corporal

A) Peso corporal día 0 del tratamiento

El peso corporal antes de empezar el tratamiento fue significativamente superior en el grupo OP respecto a su grupo control NOP ($p < 0,001$) (*Fig.19*).

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados con resveratrol respecto a sus controles placebo.

B) Peso corporal día 20 del tratamiento

El peso corporal, al finalizar el tratamiento, fue significativamente superior en el grupo OP respecto a su grupo control NOP ($p < 0,001$) (*Fig.19*).

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados con resveratrol respecto a sus controles placebo.

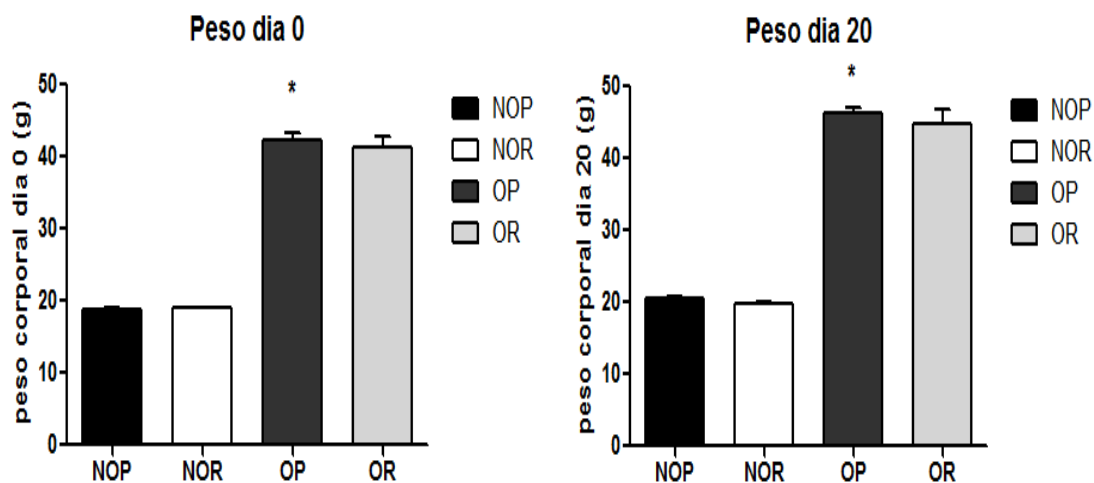


Figura 19. Peso corporal (gramos) en los días 0 y 20 del tratamiento, en los sujetos NOP, NOR, OP y OR. * $p < 0,05$ OP vs NOP (media \pm ETM).

C) Evolución del peso corporal a lo largo del tratamiento.

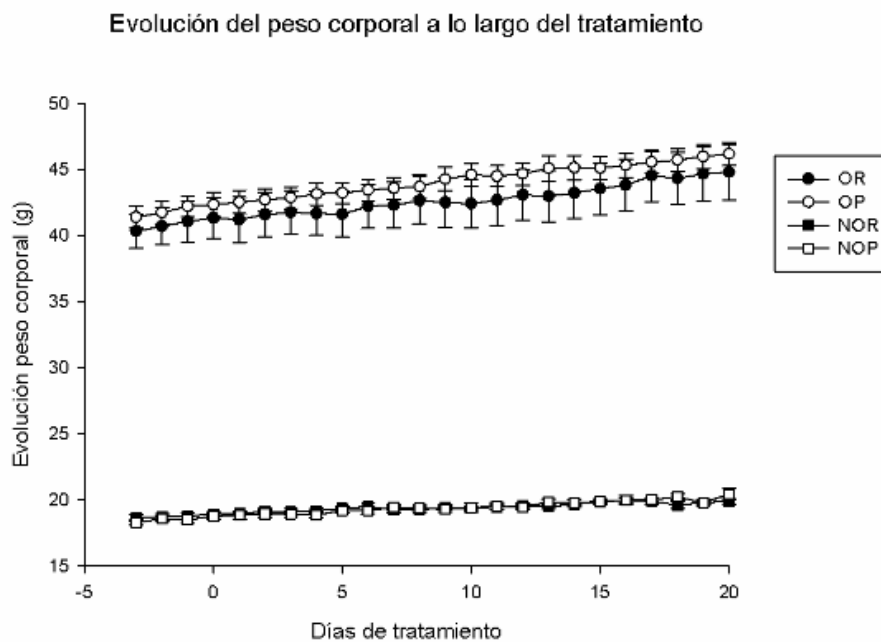


Figura 20. Evolución del peso corporal (g) a lo largo del tratamiento, en NOP, NOR, OP Y OR.

4.1.2. Ingesta alimentaria

A) Ingesta alimentaria día 0 del tratamiento

La ingesta alimentaria previa al tratamiento, fue significativamente inferior en el grupo OP respecto a su grupo control NOP ($p < 0,001$) (Fig.21).

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados con resveratrol respecto a sus controles placebo.

B) Ingesta alimentaria día 20 del tratamiento

La ingesta alimentaria, al finalizar el tratamiento, fue significativamente inferior en el grupo OP respecto a su grupo control NOP ($p = 0,003$) (Fig.21).

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados con resveratrol respecto a sus controles placebo.

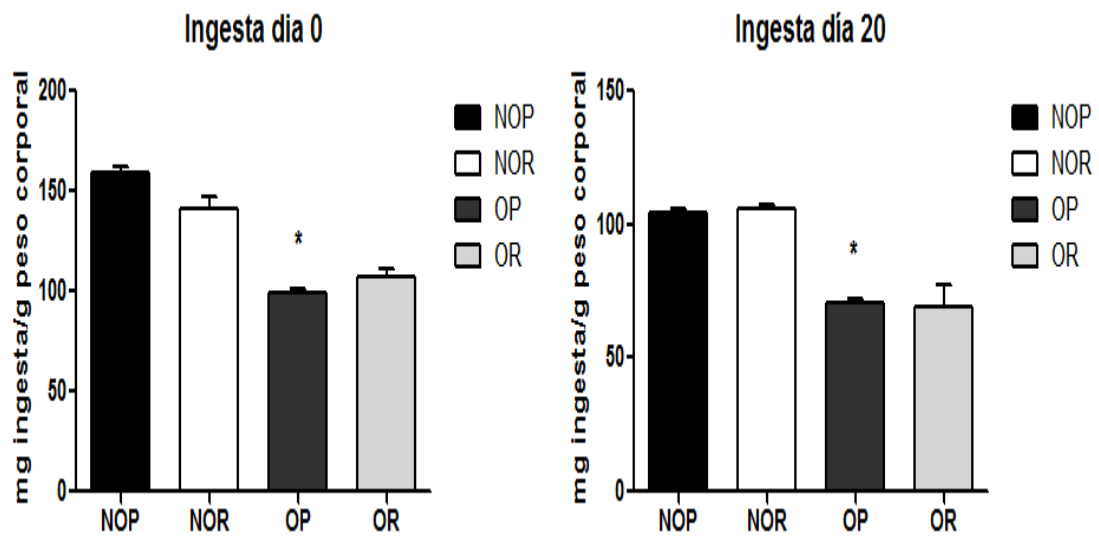


Figura 21. Ingesta alimentaria (mg/ kg peso corporal) en los días 0 y 20 del tratamiento, en los sujetos NOP, NOR, OP y OR. * $p < 0,05$ OP vs NOP (media \pm ETM).

C) Evolución de la ingesta (mg/ kg de peso corporal) a lo largo del tratamiento

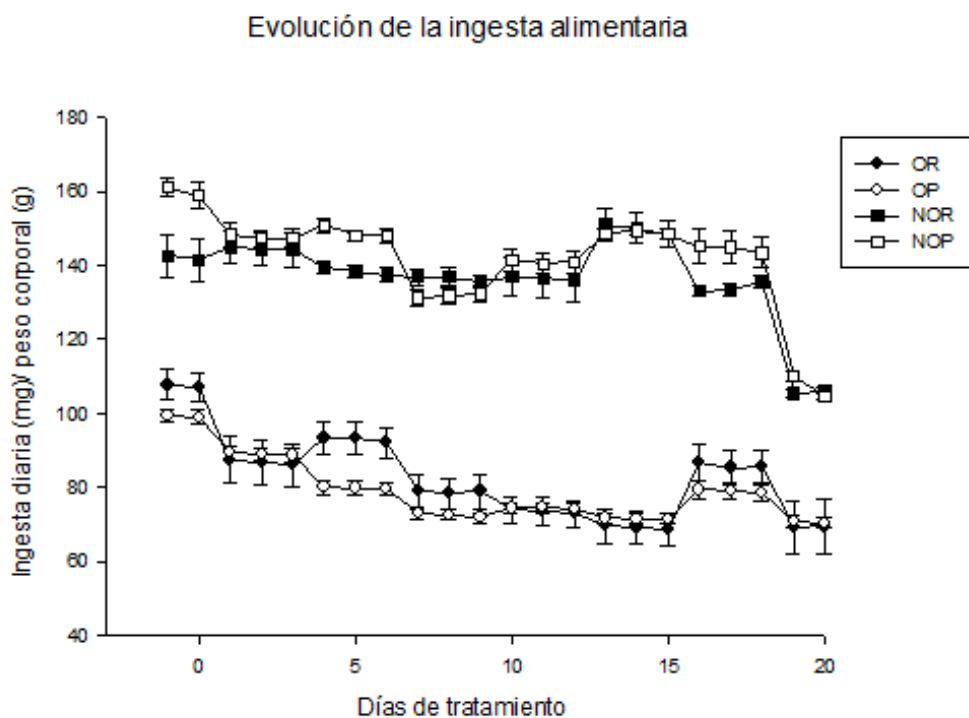


Figura 14. Evolución del ingesta alimentaria (mg/kg peso corporal) a lo largo del tratamiento, en NOP, NOR, OP Y OR.

4.2. GLUCEMIA, INSULINEMIA E ÍNDICE HOMA-IR

4.2.1. Glucemia

La concentración de glucosa en sangre, fue significativamente superior en el grupo OP respecto a su grupo control NOP ($p < 0,001$) (Fig.23).

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados con resveratrol respecto a sus controles placebo.

4.2.2. Insulinemia

La concentración de insulina en sangre, fue significativamente superior en el grupo OP respecto a su grupo control NOP ($p < 0,001$) (Fig.23).

No hubo diferencias significativas entre los grupos tratados con resveratrol respecto a sus controles placebo.

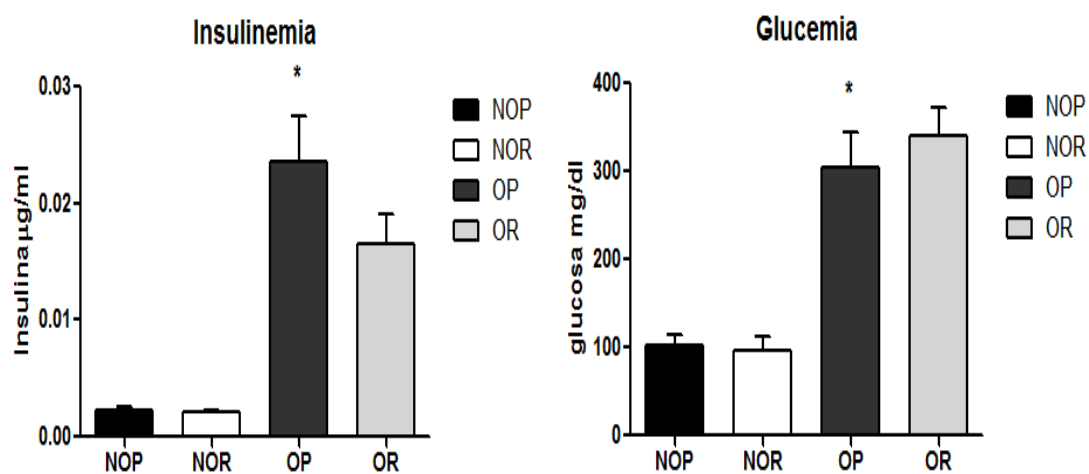


Figura 23. Glucemia (mg/dl) e insulinemia (µg/ml), en los sujetos NOP, NOR, OP y OR. * $p < 0,05$ OP vs NOP (media \pm ETM).

4.2.3. Índice HOMA-IR

El valor del índice HOMA-IR, fue significativamente superior en el grupo OP respecto a su grupo control NOP ($p < 0,001$) (*Fig.24*).

No hubo diferencias significativas en este índice cuanto al efecto del tratamiento con resveratrol respecto a los controles tratados con placebo.

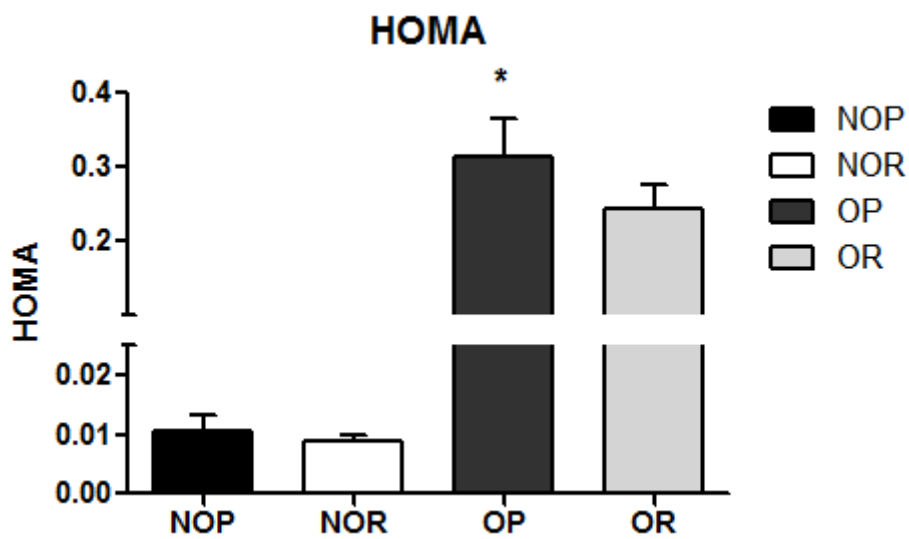


Figura 24. Valores del índice HOMA-IR, en los sujetos NOP, NOR, OP y OR. * $p < 0,05$ OP vs NOP (media \pm ETM).

4.3. NIVELES DE TNF- α

Se ha observado que la cantidad total de TNF- α en tejido adiposo periovárico fue significativamente superior en el grupo OP respecto a su grupo control NOP ($p=0,002$) (*Fig.25*).

Se observaron efectos del tratamiento con resveratrol, disminuyendo significativamente los niveles de TNF- α en el tejido adiposo periovárico de los sujetos OR respecto a sus controles placebo OP ($p=0,004$) (*Fig.25*).

No se encontraron diferencias significativas entre NOR y su grupo control NOP.

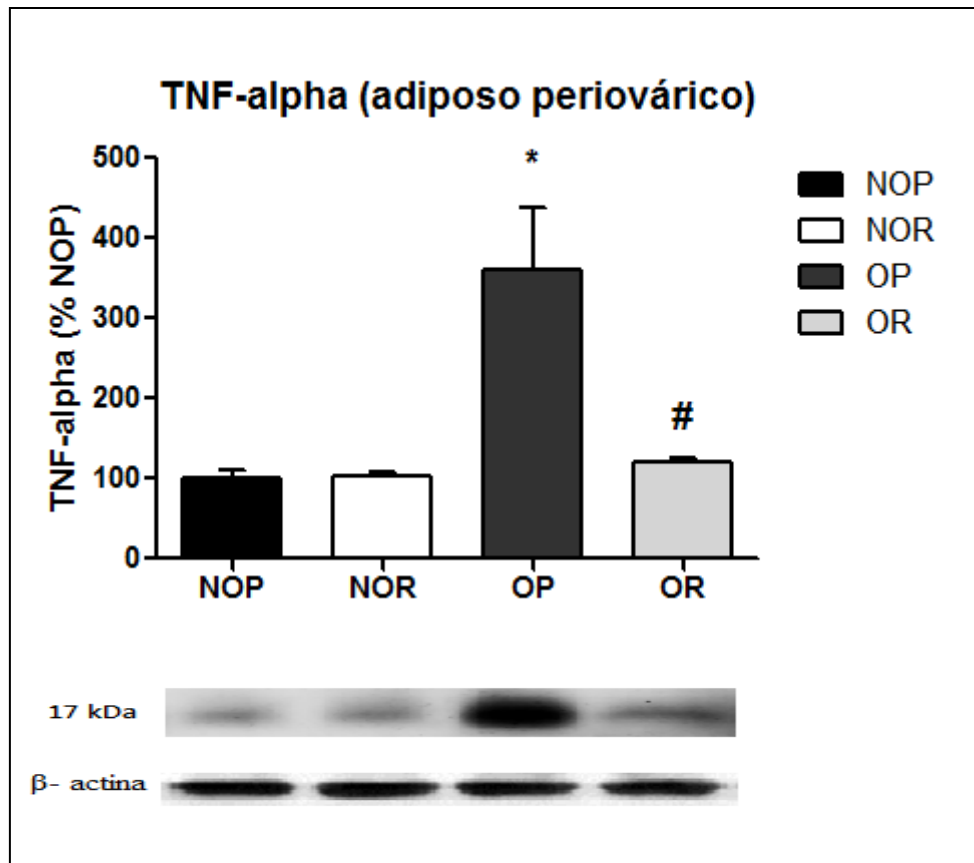


Figura 25. Western-blot correspondiente a la cuantificación de la cantidad total de TNF- α en los sujetos NOP, NOR, OP y OR. Los valores de la densitometría están relativizados respecto a los obtenidos en el control puro NOP, que corresponde al 100%, y son representados como el porcentaje de TNF- α respecto a NOP. El valor de la densitometría se relativiza respecto al control puro NOP que adquiere el valor 100%. * $p<0,05$ OP vs NOP; # $p<0,05$ OR vs OP (media \pm ETM).

4.4. PESO DEL APARATO REPRODUCTOR

El peso del aparato reproductor (ovarios más útero) respecto al peso corporal, fue significativamente superior en el grupo OP respecto a su grupo control NOP ($p < 0,001$) (Fig.26).

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados con resveratrol respecto a sus controles placebo.

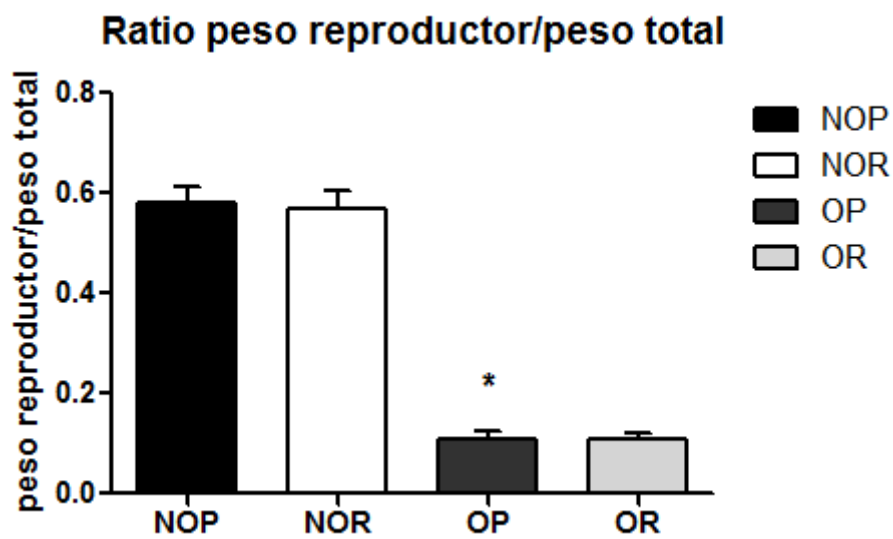


Figura 26. Ratio peso del aparato reproductor ((mg/mg peso corporal) x100) en los sujetos NOP, NOR, OP y OR. * $p < 0,05$ OP vs NOP (media \pm ETM).

4.5. NÚMERO Y CALIDAD DE LOS OVOCITOS RECOGIDOS

4.5.1. Número de ovocitos totales recogidos

El número de ovocitos totales fue significativamente inferior en el grupo OP respecto a su grupo control NOP ($p < 0,001$) (*Fig.27*).

El tratamiento con resveratrol aumentó significativamente el número de ovocitos en NOR respecto a su grupo control NOP ($p=0,007$) (*Fig.27*).

No se encontraron diferencias significativas entre OR y su grupo control OP.

4.5.2. Número de ovocitos de “calidad a”

El número de ovocitos de “calidad a” relativizado por el número total de ovocitos, fue significativamente inferior en el grupo OP respecto a su grupo control NOP ($p < 0,001$) (*Fig.27*).

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con resveratrol y los grupos placebo.

4.5.3. Número de ovocitos de “calidad a” + “calidad b”

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre OP Y NOP, ni entre los grupos tratados con resveratrol y sus controles placebo (*tabla 7*).

Grupo	Proporción ovocitos calidad a + calidad b
NOP	0,585± 0,0326
NOR	0,529± 0,0381
OP	0,348± 0,170
OR	0,457± 0,164

Tabla 3. Proporción del número de ovocitos calidad a + calidad b ((número de calidad a + número de calidad b)/ número de ovocitos totales) de los sujetos NOP, NOR, OP Y OR. (media ± ETM).

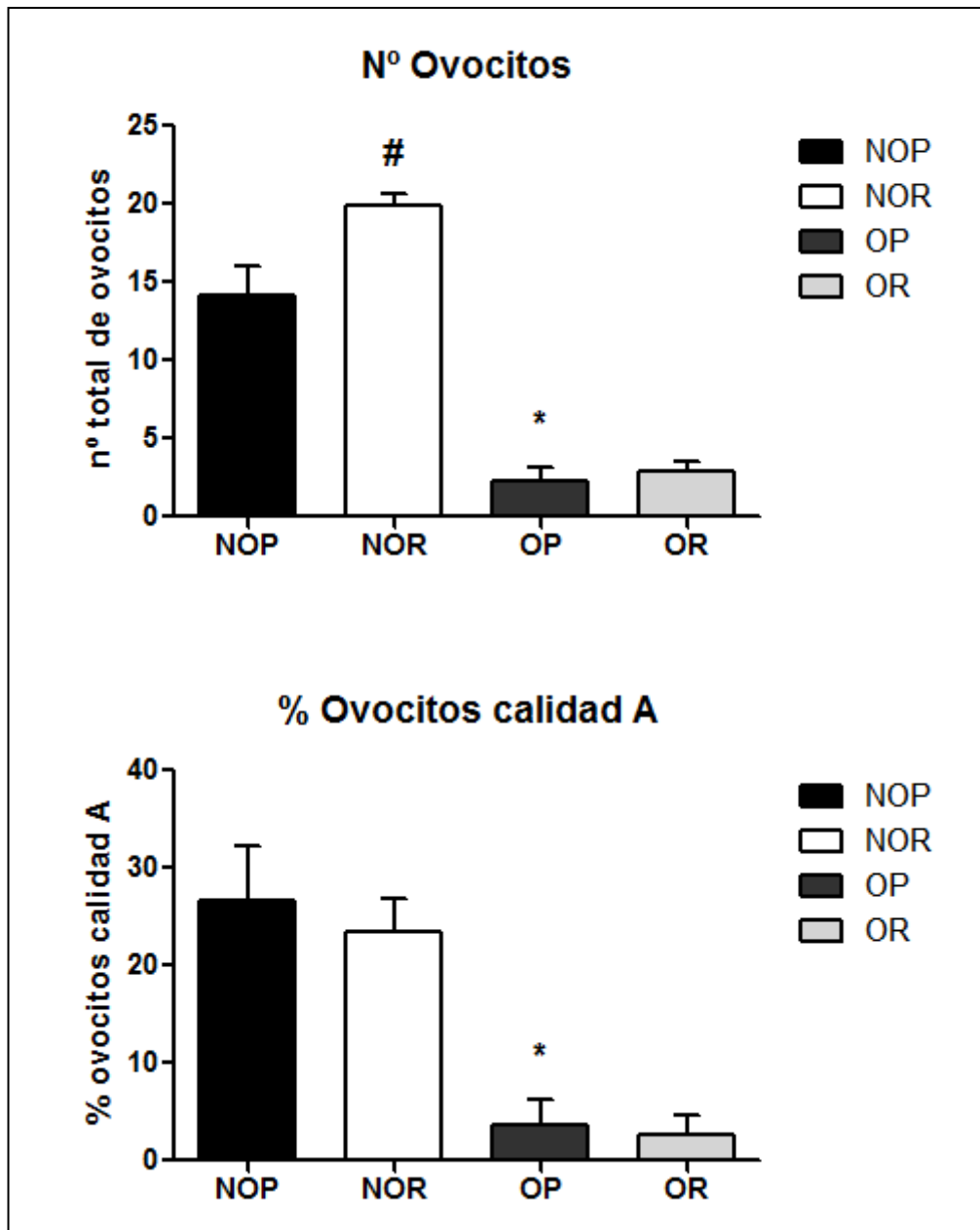


Figura 27. Número de ovocitos totales recogidos y porcentaje del número de ovocitos de calidad a ((número calidad a/número totales recogidos)x100) de los sujetos NOP, NOR, OP Y OR. *p<0,05: OP respecto a NOP (media ± ETM).

4.6. ESTIMACIÓN DE LA FOLICULOGÉNESIS

4.6.1. Folículos atrésicos

El número de folículos atrésicos fue significativamente superior en el grupo OP respecto a su grupo control NOP ($p=0,027$) (*Fig.28*).

El tratamiento con resveratrol disminuyó significativamente el número de folículos atrésicos en OR respecto a su grupo control OP ($p < 0,001$) (*Fig.28*).

No se encontraron diferencias significativas entre NOR y su grupo control NOP.

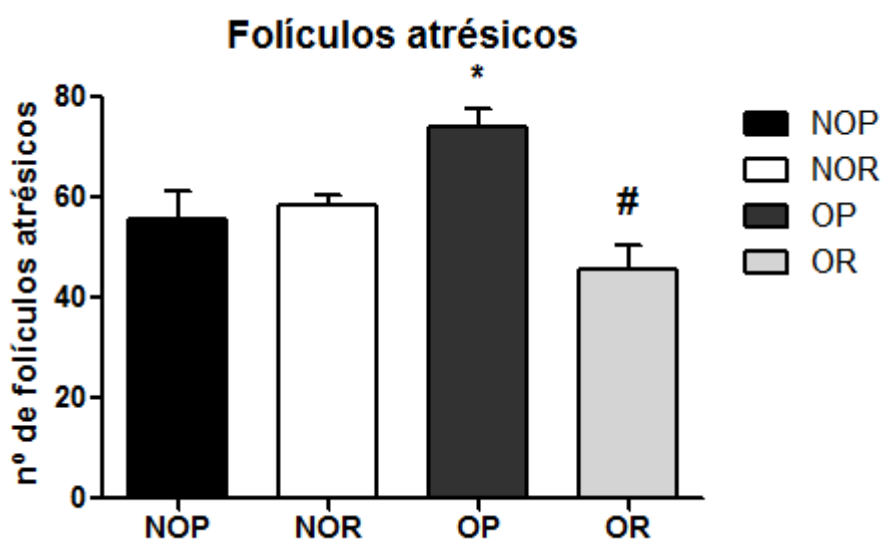


Figura 28. Número de folículos atrésicos de los sujetos NOP, NOR, OP Y OR. * $p < 0,05$: OP respecto a NOP; # $p < 0,05$: OR respecto a OP (media \pm ETM).

4.6.2. Folículos primarios

El tratamiento con resveratrol disminuyó significativamente el número de folículos primarios en OR respecto a su grupo control OP ($p=0,012$) (*Fig.29*).

No se encontraron diferencias significativas entre OP y su grupo control NOP, ni entre NOR y su grupo control NOP.

4.6.3. Folículos preovulatorios

El número de folículos preovulatorios fue significativamente superior en el grupo OP respecto a su grupo control NOP ($p < 0,001$) (*Fig.29*).

El tratamiento con resveratrol disminuyó significativamente el número de folículos preovulatorios en OR respecto a su grupo control OP ($p=0,023$) (*Fig.29*).

No se encontraron diferencias significativas entre NOR y su grupo control NOP.

4.6.4. Folículos totales en crecimiento

El tratamiento con resveratrol disminuyó significativamente el número de folículos totales en crecimiento en OR respecto a su grupo control OP ($p=0,036$) (*Fig.29*).

No se encontraron diferencias significativas entre OP y su grupo control NOP, ni entre NOR y su grupo control NOP.

4.7. Cuerpos lúteos

El número de cuerpos lúteos totales fue significativamente inferior en el grupo OP respecto a su grupo control NOP ($p < 0,001$) (*Fig.30*).

El tratamiento con resveratrol aumentó significativamente el número de cuerpos lúteos en NOR respecto a su grupo control NOP ($p < 0,01$) (*Fig.30*).

No se encontraron diferencias significativas entre OR y su grupo control OP.

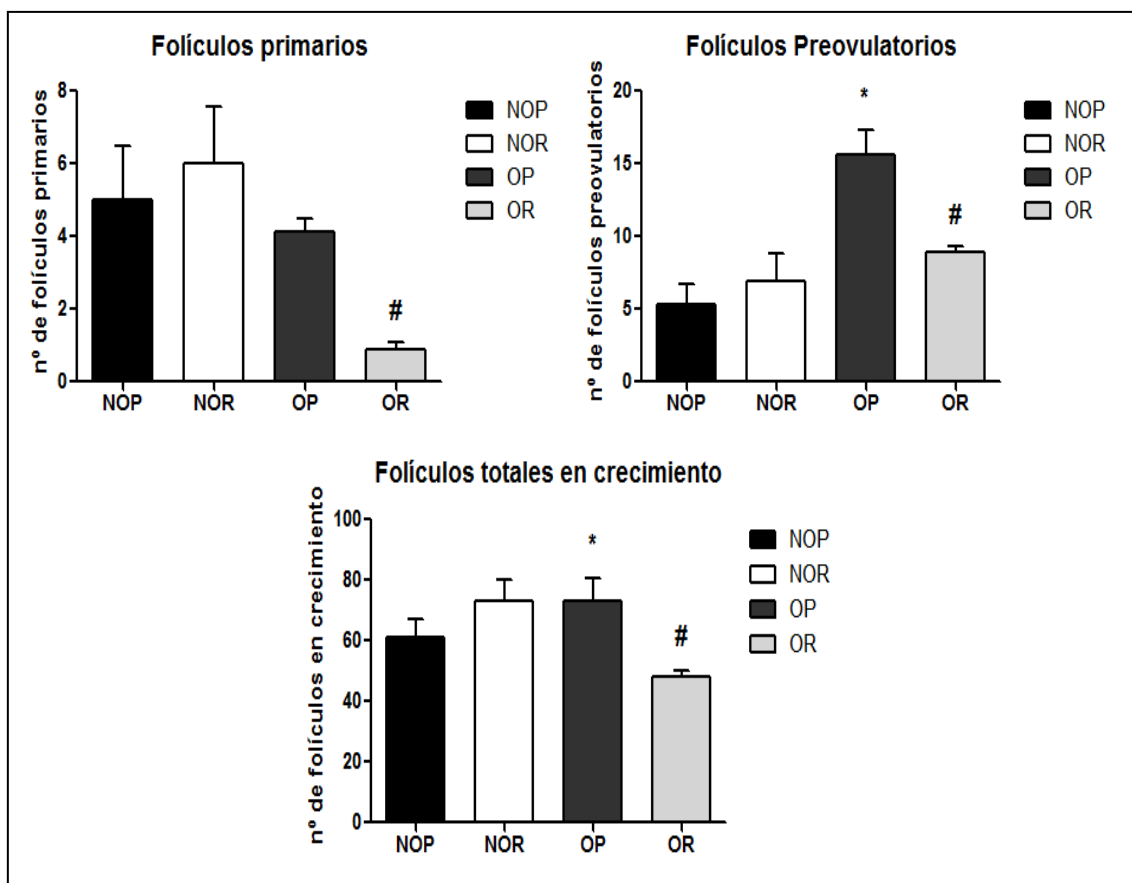


Figura 29. Número de folículos primarios, preovulatorios, y totales en crecimiento, de los sujetos NOP, NOR, OP Y OR. * $p < 0,05$: OP respecto a NOP; # $p < 0,05$: OR respecto a OP (media \pm ETM).

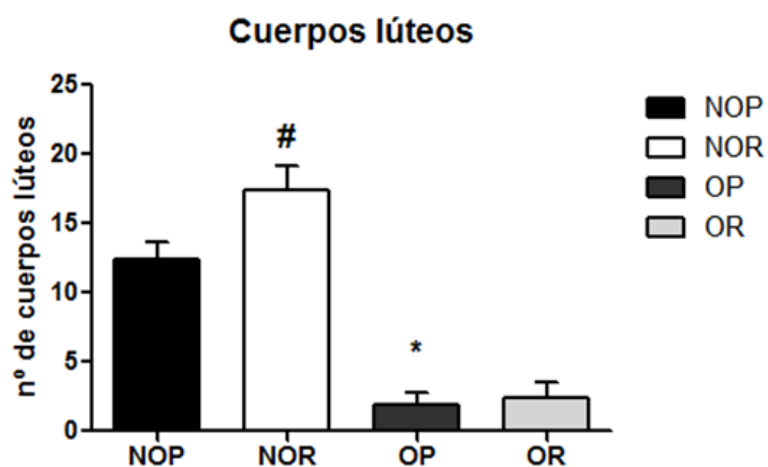


Figura 30. Número de cuerpos lúteos de los sujetos NOP, NOR, OP Y OR. * $p < 0,05$: OP respecto a NOP; # $p < 0,05$: NOR respecto a NOP; (media \pm ETM).

5. DISCUSIÓN

En la obesidad concurren una serie de circunstancias, como la resistencia a la acción de la insulina y el estado pro-inflamatorio, que perjudican de forma importante la capacidad reproductiva de los individuos que presentan esta condición, Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales el sobrepeso y la obesidad menoscaban la fertilidad aún no están completamente dilucidados y es necesario que sean establecidos pudiendo identificar dianas terapéuticas para abordar esta problemática. Han sido demostradas las propiedades anti-inflamatorias del resveratrol, así como sus acciones en la cascada de señalización de la insulina, e incluso que este polifenol de origen vegetal desempeña un papel directo a nivel de la fisiología reproductiva.

Por ello comprobamos los efectos de la obesidad y del posible potencial terapéutico del resveratrol en ratones ob/ob, deficientes en la síntesis de leptina, comparándolos con sus controles libres de la mutación (ratones C57BL/6J) en cuanto a parámetros morfológicos como el peso corporal y del aparato reproductor, su conducta alimentaria (ingesta), valores referentes a la condición de insulinoresistencia como concentración de glucosa e insulina y el índice HOMA-IR, en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α y en parámetros reproductivos como el número y la calidad de ovocitos y la estimación del número de folículos y cuerpos lúteos en cortes histológicos de los ovarios.

Los resultados del presente estudio confirman que los ratones ob/ob, deficientes en la síntesis de leptina, presentan obesidad, siendo su peso el doble respecto al control libre de la mutación, tanto antes de comenzar el tratamiento (día cero) como al finalizarlo (día 20) (*Fig. 19*). Ninguno de los grupos a los que se les administró el tratamiento con resveratrol, obesos y no obesos, presentan diferencias significativas en cuanto a su peso a los 20 días de tratamiento respecto a sus controles placebo, por lo que el tratamiento no parece tener efectos, al menos en la dosis y el tiempo empleados, en cuanto a la ganancia/pérdida de peso, lo que se corresponde con los resultados obtenidos por Vendula y cols [139] en una línea no consanguínea de ratones de la cepa CD1, y a los resultados obtenidos por Sharma y cols. [140], cuyo diseño experimental fue llevado a cabo en nuestro mismo modelo murino de obesidad (ob/ob). La restricción calórica, que causa pérdida de peso corporal, también provoca la activación de SIRT1 [141], y por tanto podría ser que la activación de ésta molécula fuese la clave en este

proceso. El resveratrol, que actúa a través de SIRT1, podría desencadenar eventos similares a la restricción calórica en cuanto a la disminución del peso corporal a través de esta deacetilasa, pero a la vista de los resultados, parece lógico pensar que sólo la activación de SIRT1, mediante el tratamiento con resveratrol, no sea suficiente para desencadenar los procesos que implican la reducción de peso, puesto que la restricción calórica implica muchos más cambios metabólicos y fisiológicos que la simple activación de ésta molécula.

En cuanto a su conducta alimentaria, paradójicamente los ratones deficientes en leptina no parecen presentar una conducta hiperfágica (*Fig. 21*), siendo su ingesta relativa a su peso corporal significativamente menor a la de sus controles delgados, lo que más bien resulta en una conducta hipofágica. Esta ingesta alimentaria no parece tener sentido desde que la leptina se conoce como un regulador del balance energético que inhibe la ingesta de alimentos y aumenta el gasto de energía a través de sus receptores específicos localizados en el hipotálamo [142]. Por tanto, en este modelo animal deficiente en ésta hormona debería presentar como mecanismo compensatorio la hiperfagia en ausencia de esa “señal metabólica” que supone la leptina. Muchos son los autores que han definido a estos ratones ob/ob como hiperfágicos [16], sin embargo esto se refiere a la ingesta total y no relativizada a su peso corporal, siendo este valor relativo más preciso y fiel a la realidad de los datos obtenidos. Esta hipofagia podría explicarse por los altos niveles de TNF- α , que además de ser una citoquina pro-inflamatoria, es una caquexina con potentes efectos anorexigénicos, que actúa a nivel hipotalámico inhibiendo el apetito [143]. Por lo tanto, puede ser que la ganancia de peso en estos ratones ob sea debido a su deficiente metabolismo y a una disminución del gasto energético, más que por su conducta alimentaria. El mecanismo de la adipotaxia, en los ratones ob/ob, también podría explicar su aumento de peso progresivo. Se entiende por adipotaxia la migración o reclutamiento de precursores mesenquimáticos al tejido adiposo, que una vez establecidos se diferencian en adipocitos y permiten la expansión de este tejido. Los altos niveles de TNF- α , presentes en el tejido adiposo de estos ratones ob, son los responsables en gran medida de este mecanismo de adipotaxia [144].

Se observa un marcado hipogonadismo en los ratones ob, con un valor significativamente inferior, respecto a los controles, del peso de su aparato reproductor

(útero y ovarios) (*Fig. 26*). Esto se corresponde con los resultados de Hamm y cols. [21] que indicaban pesos uterinos reducidos en estos ratones ob, y se observaba un estado de hipogonadismo-hipogonadotrófico característico de un estadio prepuberal, aunque no presentaban una disminución significativa en el peso de los ovarios. Este desarrollo deficiente del aparato reproductor, se debe principalmente a los bajos niveles de gonadotropinas, aunque no se puede descartar que además sea debido al déficit de leptina, puesto que tanto ovarios como útero presentan receptores para esta hormona [8] y al igual que la leptina tiene funciones a nivel endometrial en el proceso de implantación [145], podría ser que fuese necesaria para su desarrollo normal. Garris y cols. [146] relacionan la involución del tracto uterino-ovárico con el estado de hiperlipidemia que presentan los ratones db/db (ratones deficientes en la expresión del receptor de la leptina, de características similares a los ratones ob/ob).

Por otro lado, cabe destacar que estos ratones ob/ob, además de un modelo de obesidad y diabetes mellitus tipo 2, han sido definidos como un modelo murino de síndrome de ovario poliquístico (SOP) [147, 148]. Para el diagnóstico del SOP deben cumplirse dos de “Los tres Criterios de Rotterdam” [90] anovulación, hiperandrogenismo e imagen ecográfica de ovarios poliquísticos, de los cuales los dos primeros están presentes en estos ratones ob/ob, además de otras manifestaciones clínicas estrechamente ligadas al SOP, como son la obesidad y la resistencia a la acción de la insulina. Teniendo en cuenta este concepto, se ha observado que en mujeres con SOP, obesas y diabéticas tipo 2, la expresión del transportador de glucosa GLUT-4 en el endometrio se ve disminuida [149], por lo que esta misma circunstancia podría darse en el útero de estos ratones ob, que al no poder incorporar glucosa de manera eficiente derivaría en la involución del mismo.

El tratamiento con resveratrol no produjo cambios en los pesos de los aparatos reproductores en ninguno de los grupos (*Fig. 26*), lo que se contradice con lo demostrado por otros autores que encuentran un aumento de los pesos uterinos y ováricos [150, 151] y otros en los que por el contrario observaron una disminución significativa del peso de los ovarios en ratones [139] y del útero en ratas [152], aunque estas diferencias pueden deberse a las dosis, vías de administración, tiempo experimental y especies diferentes utilizadas.

Nuestros resultados referentes a las glucemias, insulinemias, e índices de insulinoresistencia (HOMA-IR) son significativamente mayores en los ratones obesos respecto a sus controles delgados (*Figs. 23 y 24*), confirmando la condición de un estado hiperglucémico, hiperinsulinémico e insulinoresistente en los ratones ob, descrito por otros autores [16]. La ausencia de leptina es el principal desencadenante de esta condición, puesto que esta hormona desempeña un importante papel en la translocación de los transportadores de glucosa a la membrana, a través de la vía de AMPK y de la cascada de señalización de la insulina en la que participa como un agente sensibilizante de su acción [153]. Además nuestros datos indican un claro estado pro-inflamatorio en estos ratones obesos, en cuanto a que presentan niveles muy elevados de TNF- α en el tejido adiposo periovárico (*Fig. 25*) (tejido adiposo blanco, de la misma naturaleza metabólica que el tejido adiposo blanco visceral), y está claramente establecido que TNF- α tiene un importante papel en el desarrollo de la insulinoresistencia [87].

En los ratones obesos tratados con resveratrol se observa una disminución, aunque no significativa, en sus índices de insulinoresistencia (*Fig. 24*), respecto a sus controles placebo, lo que se correlaciona con la disminución de la expresión de TNF- α en este mismo grupo experimental, que en este caso sí resulta significativa (*Fig. 25*). Por lo que nuestros datos indican que el resveratrol actúa disminuyendo la resistencia a la acción de la insulina a través de la disminución de esta citoquina pro-inflamatoria, lo cual se corresponde con los trabajos de otros autores [118, 119] los que además demuestran que esta inhibición en la expresión de TNF- α tiene lugar a través de la activación de SIRT1, aunque en nuestro caso no podemos descartar la posible intervención de AMPK, otra molécula diana del resveratrol. Sería interesante determinar a través de qué mecanismos actúa el resveratrol, para disminuir los niveles de TNF- α en este modelo murino deficiente en leptina.

Por otro lado, el resveratrol puede disminuir la resistencia a la acción de la insulina no sólo a través de la disminución de moléculas pro-inflamatorias como TNF- α , sino también mediante el aumento de la síntesis de adiponectina [120], modulando determinados substratos de la cascada de señalización de la insulina y aumentando la eficiencia del metabolismo mitocondrial [112]. Es necesario el estudio de estos parámetros en trabajos futuros relativos a este diseño experimental.

Paradójicamente la concentración de glucosa en sangre es mayor, aunque no de forma significativa, en los ratones obesos tratados con resveratrol (*Fig. 23*), por lo que la disminución del estado de insulinoresistencia se debe a la disminución de la concentración de insulina (*Fig. 23*), lo que puede explicarse mediante la regulación de la gluconeogénesis en el hígado por parte de las dos moléculas a través de las cuáles actúa el resveratrol. Niveles elevados de SIRT1 aumentan la producción de glucosa hepática [154] mientras que AMPK inhibe la producción de glucosa en el hígado mediante la regulación negativa de los genes de la gluconeogénesis [111], por lo que podemos presuponer que el efecto del resveratrol sea debido más a una activación de SIRT1 que a través de AMPK.

Se observa una mala respuesta a la inducción de la súper-ovulación con gonadotropinas por parte de estos ratones ob/ob en cuanto a que no se produce la ovulación de forma efectiva, siendo significativamente inferiores el número de ovocitos recolectados y el número de cuerpos lúteos, además de la tasa de ovocitos MII (*Figs. 26 y 30*). También hay un menor porcentaje de ovocitos válidos para ser fecundados (clase a más clase b, puesto que los MI pueden evolucionar de forma espontánea a MII) aunque sin ser estadísticamente significativo. Estos resultados indican un deficiente mecanismo de la ovulación y una baja calidad o competencia ovocitaria en estos ratones obesos.

La baja respuesta a la estimulación ovárica controlada en estos ratones ob/ob se corresponde con los resultados publicados por Pallares y cols. [35] que determinaron que la leptina ejerce efectos locales a nivel ovárico en el mecanismo de la ovulación y no sólo efectos a nivel hipotálamico-hipofisario, y que la administración de esta hormona en estos ratones consigue restaurar su tasa de ovulación siendo equivalente a la de los ratones libres de la mutación. Por lo tanto, el fallo en el mecanismo de la ovulación es debido principalmente al déficit en leptina que presentan estos animales. Sin embargo, Pallares y cols. observan, en ese mismo diseño experimental, una tasa de fertilización de los ovocitos significativamente inferior. Una baja tasa de fertilización está asociada a una baja calidad o competencia ovocitaria, por lo que podemos suponer que ésta pobre calidad de los ovocitos no estaría asociada al déficit de leptina, puesto que había sido administrado de forma exógena, sino a la obesidad y sus secuelas.

Niveles elevados de TNF- α en el líquido folicular producen efectos deletéreos en la calidad ovocitaria [155], por lo que los altos niveles de esta citoquina presentes en estos individuos (*Fig. 25*) podrían tener impacto a este nivel.

Para la síntesis de andrógenos, la insulina utiliza la vía de los inositol-glicanos [92] y aumenta la translocación de GLUT-4 a través de la cascada de señalización de las tirosin-quinazas. Los ratones obesos presentan resistencia a la acción de la insulina en la cascada de señalización del transportador de glucosa en diferentes tejidos, pero no se ha estudiado si en la obesidad existe una resistencia a la acción de la insulina a nivel ovárico que conllevara una baja eficiencia en la translocación de GLUT-4 a membrana (principal transportador de glucosa), por ejemplo en las células de la granulosa que forman el cúmulo y rodean al ovocito. Las células de la granulosa juegan un papel fundamental en la obtención de la glucosa por parte del ovocito, así, mientras en la superficie del ovocito sólo encontramos las isoformas del transportador de glucosa GLUT-1, 3 y 8 [156], las células del cúmulo sí expresan GLUT-4 [157], por lo que si en estas células se diese una resistencia a la acción de la insulina, habría una deficiente captación de glucosa por parte del ovocito, lo que influiría en su capacidad para obtener la energía necesaria para conseguir la competencia ovocitaria [158]. Cómo puede afectar la resistencia a la insulina en los ovocitos y células del cúmulo es aún desconocido.

Si no existiese esta resistencia a la acción de la insulina en el ovario, podría darse el caso contrario y con la hiperglucemia que presentan estos animales obesos, aumentar la cantidad de glucosa intraovárica, puesto que niveles altos de glucosa en sangre se corresponden con un aumento de los transportadores de glucosa a nivel ovárico [159]. Altos niveles de glucosa durante el desarrollo del embrión preimplantacional de ratón, causan anomalías metabólicas, lo que resulta en la disminución de las reservas de ATP, el aumento de especies reactivas del oxígeno, y la expresión génica alterada, lo que lleva a la apoptosis y malformaciones potenciales en el feto resultante. La exposición de los ovocitos a concentraciones elevadas de glucosa durante el periodo de maduración, pueden causar efectos nocivos similares [99].

El tratamiento con resveratrol aumentó significativamente el número de ovocitos recogidos y el correspondiente número de cuerpos lúteos en los ratones no obesos (*Figs. 27 y 30*), lo que confirma los resultados observados por Liu y cols. [127]. Sin embargo,

estos autores databan una mayor calidad ovocitaria tras el tratamiento, lo que no se corresponde con nuestros datos. Ésta diferencia puede deberse, por un lado a que la dosis de resveratrol diaria utilizada en el trabajo de Liu y cols. era el doble de la usada en nuestro procedimiento experimental, y por otro lado a que se trataba de un tratamiento crónico, por lo tanto es posible que aumentando la dosis y el tiempo de tratamiento se consiguiesen efectos parecidos. Se ha demostrado que el resveratrol mediante la activación de SIRT1 aumenta los receptores de LH (LH-R) en las células de la granulosa [125], y puesto que la LH es la principal hormona desencadenante de la ovulación, podría ser que el resveratrol indujera un aumento en la tasa ovulatoria a través de este mecanismo. Por lo tanto, sería necesario estudiar si existe un aumento tanto en la activación de SIRT1 como en el número de receptores de LH-R en el ovario de estos ratones no obesos tratados con resveratrol, respecto a sus controles placebo. Por otro lado, Singh y cols. [126] demostraron que el resveratrol se une con mayor afinidad al receptor de estrógenos beta ($ER-\beta$) que a $ER-\alpha$, y se cree que las acciones llevadas a cabo a través de la interacción con $ER-\beta$ estimulan la ovulación y luteinización [160].

En cambio el resveratrol no parece tener efectos significativos en la tasa de ovulación de los ratones ob, lo que puede ser debido a que, aunque se consiga una mejoría del estado pro-inflamatorio mediante la disminución significativa de los niveles de $TNF-\alpha$, otras citoquinas pro-inflamatorias podrían seguir siendo elevadas y la resistencia a la acción de la insulina sigue presente. Además no podemos descartar que sean necesarios niveles basales de leptina para que SIRT1 ejerza sus efectos a nivel ovárico, puesto que no existen estudios al respecto.

El aumento significativo del número de folículos atrésicos en los ratones ob respecto a sus controles no obesos (*Fig. 28*), puede explicarse desde que este modelo murino de obesidad también se considera como un modelo de SOP [147, 148] siendo la atresia folicular un evento predominante en los ovarios de los individuos que presentan dicho síndrome [92] y a que existe un aumento en la apoptosis de las células de la granulosa de estos ratones [21]. Otra hipótesis sería que se diera una resistencia a la acción de la insulina a nivel ovárico, lo que derivaría en una reducción de los niveles de GLUT-4 y al disminuir la captación de glucosa por parte de las células éstas entrarían en apoptosis y la consecuente atresia folicular. Acorde al trabajo llevado a cabo por Evans y cols. [73], los niveles elevados de $TNF-\alpha$ pueden desencadenar la atresia folicular, lo

que explicaría la disminución significativa de folículos atrésicos en los obesos tratados con resveratrol, los cuales también presentan una disminución en los niveles de esta citoquina pro-inflamatoria de manera significativa (*Figs. 25 y 28*). La actividad pro-apoptótica de TNF- α a nivel ovárico ha sido demostrada por otros autores [161] y puede favorecer la apoptosis del ovocito y de las células de la granulosa derivando en atresia folicular.

En los ratones obesos tratados con resveratrol la disminución de la atresia folicular se corresponde con una disminución significativa del número de folículos en crecimiento, de folículos primarios y de folículos preovulatorios (*Figs. 28 y 29*). Pese a que estos resultados referentes al desarrollo folicular pueden ser interpretados a priori como una deficiente respuesta a la hiperestimulación ovárica, en realidad confirman el potencial terapéutico del resveratrol en el mantenimiento de la reserva ovárica. Los folículos primordiales son mantenidos en un estado latente mediante la acción de varias moléculas inhibitorias para preservar la reserva ovárica, como el factor de transcripción FOXO3a [97]. El resveratrol, a través de la activación de SIRT1 [162], puede inhibir tanto el tránsito de folículo primordial a folículo primario como la apoptosis, preservando la reserva de células germinales, y esto podría ser debido a un aumento de la transcripción de FOXO3a. Por lo tanto, es necesario el estudio de FOXO3a y SIRT1, para conocer si éste es el mecanismo a través del cual el resveratrol ejerce sus acciones en el ovario, en este modelo murino de obesidad y el estudio de qué factores determinan que el resveratrol ejerza efectos sobre la reserva ovárica en los ratones ob/ob, pero no en sus controles delgados.

La situación ideal para un ciclo hormonal natural sería que se mantuviera intacta la tasa de ovulación pero que iniciaran el desarrollo el menor número de folículos posible, puesto que todos aquellos folículos en crecimiento, que no lleguen a participar en la ovulación, sufrirán atresia lo que supone la disminución progresiva de la reserva ovárica. Los datos de nuestro trabajo muestran que el resveratrol disminuye el número de folículos en crecimiento sin que la tasa de ovulación se vea afectada respecto a sus controles placebo, e incluso se aprecia un ligero aumento, aunque no significativo, de la ovulación. Pero este efecto positivo del resveratrol, en la preservación de la reserva ovárica, debe ser interpretado con cautela en cuanto a que en los tratamientos de estimulación ovárica controlada la obtención de los ovocitos se lleva a cabo mediante la

punción de los folículos preovulatorios, y una disminución en el número de éstos derivaría en una disminución de los ovocitos recogidos.

En los cortes histológicos de los ovarios de ratones ob/ob se aprecian muchos folículos preovulatorios y de gran tamaño que junto con la baja tasa ovulatoria de estos individuos, demuestra que existe un adecuado desarrollo folicular en respuesta a las gonadotropinas exógenas, pero un deficiente mecanismo de la ovulación (*Figs. 27, 29 y 30*). El déficit en la síntesis de leptina podría ser la causa principal del fallo en la ovulación, puesto que esta hormona ejerce un efecto sinérgico con la LH, principal gonadotropina responsable de la ovulación, y puede aumentar su número de receptores en el ovario [163], además de que puede ejercer un efecto local a nivel ovárico e independiente de la LH en el mecanismo de la ovulación [36].

6. CONCLUSIONES

En base a los objetivos planteados y a los resultados obtenidos podemos establecer las siguientes conclusiones:

Primera: el tratamiento con resveratrol en los ratones ob/ob, mejora el estado pro-inflamatorio, como corrobora la disminución en la expresión de la citoquina TNF- α . Éstos resultados invitan a seguir estudiando el potencial antiinflamatorio del resveratrol en casos de obesidad.

Segunda: el tratamiento con resveratrol en ratones C57BL/6J bajo estimulación ovárica controlada, favorece la inducción de la super-ovulación, lo que deriva en un aumento del número de ovocitos recolectados. Esto supone el posible uso de este polifenol, cuando no concurra obesidad, como potenciador del efecto de las gonadotropinas exógenas en los tratamientos de reproducción asistida.

Tercera: el tratamiento con resveratrol en los ratones ob/ob disminuye el número de folículos atrésicos, pudiendo ampliar su uso a la clínica para el tratamiento del SOP, como un inhibidor de la atresia folicular que resulta el evento predominante en el ovario de las mujeres que padecen este síndrome.

Cuarta: el tratamiento con resveratrol en los ratones ob/ob inhibe el paso de folículo primordial a folículo en desarrollo, sin alterar la tasa ovulatoria. De manera que, no sería recomendable como potenciador de la estimulación ovárica, pero sería interesante su uso en la clínica del SOP como preservador de la reserva ovárica durante los ciclos hormonales naturales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Guillemin, R., *Hypothalamic control of the secretion of adenohipophysial hormones*. Adv Metab Disord, 1971. **5**: p. 1-51.
2. Amsterdam, A. and S. Rotmensch, *Structure-function relationships during granulosa cell differentiation*. Endocr Rev, 1987. **8**(3): p. 309-37.
3. Zhu, N., et al., *[Measuring the estrus cycle and its effect on superovulation in mice]*. Dongwuxue Yanjiu, 2012. **33**(3): p. 276-82.
4. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
5. Margetic, S., et al., *Leptin: a review of its peripheral actions and interactions*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2002. **26**(11): p. 1407-33.
6. Tartaglia, L.A., et al., *Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R*. Cell, 1995. **83**(7): p. 1263-71.
7. Lee, G.H., et al., *Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice*. Nature, 1996. **379**(6566): p. 632-5.
8. Zamorano, P.L., et al., *Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat*. Neuroendocrinology, 1997. **65**(3): p. 223-8.
9. Considine, R.V., et al., *Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans*. N Engl J Med, 1996. **334**(5): p. 292-5.
10. Ahima, R.S., et al., *Leptin regulation of neuroendocrine systems*. Front Neuroendocrinol, 2000. **21**(3): p. 263-307.
11. Casanueva, F.F. and C. Dieguez, *Neuroendocrine regulation and actions of leptin*. Front Neuroendocrinol, 1999. **20**(4): p. 317-63.
12. Ahima, R.S., *Adipose tissue as an endocrine organ*. Obesity (Silver Spring), 2006. **14 Suppl 5**: p. 242S-249S.
13. Hausman, G.J., C.R. Barb, and C.A. Lents, *Leptin and reproductive function*. Biochimie, 2012. **94**(10): p. 2075-81.
14. Moschos, S., J.L. Chan, and C.S. Mantzoros, *Leptin and reproduction: a review*. Fertil Steril, 2002. **77**(3): p. 433-44.
15. Ingalls, A.M., M.M. Dickie, and G.D. Snell, *Obese, a new mutation in the house mouse*. J Hered, 1950. **41**(12): p. 317-8.

16. Lindstrom, P., *The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]*. ScientificWorldJournal, 2007. **7**: p. 666-85.
17. Coleman, D.L., *Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice*. Diabetologia, 1978. **14**(3): p. 141-8.
18. Barash, I.A., et al., *Leptin is a metabolic signal to the reproductive system*. Endocrinology, 1996. **137**(7): p. 3144-7.
19. Chehab, F.F., M.E. Lim, and R. Lu, *Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin*. Nat Genet, 1996. **12**(3): p. 318-20.
20. Mounzih, K., R. Lu, and F.F. Chehab, *Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males*. Endocrinology, 1997. **138**(3): p. 1190-3.
21. Hamm, M.L., et al., *Folliculogenesis is impaired and granulosa cell apoptosis is increased in leptin-deficient mice*. Biol Reprod, 2004. **71**(1): p. 66-72.
22. Chun, S.Y., et al., *Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I*. Endocrinology, 1994. **135**(5): p. 1845-53.
23. Kaipia, A. and A.J. Hsueh, *Regulation of ovarian follicle atresia*. Annu Rev Physiol, 1997. **59**: p. 349-63.
24. Batt, R.A., et al., *Investigation into the hypogonadism of the obese mouse (genotype ob/ob)*. J Reprod Fertil, 1982. **64**(2): p. 363-71.
25. Drasher ML, D.M., Lane PW, *Physiological differences in uteri of obese stock mice*. journal of heredity, 1955. **46**: p. 209–212.
26. Lane, P.W., *The pituitary-gonad response of genetically obese mice in parabiosis with thin and obese siblings*. Endocrinology, 1959. **65**: p. 863-8.
27. KP, H., *Transplantation of ovaries of the obese mouse*. Anat Rec (Hoboken), 1957: p. 128:569.
28. Wojcik-Gladysz, A., et al., *Effect of intracerebroventricular infusion of leptin on the secretory activity of the GnRH/LH axis in fasted prepubertal lambs*. Anim Reprod Sci, 2009. **114**(4): p. 370-83.
29. Yu, W.H., et al., *Role of leptin in hypothalamic-pituitary function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(3): p. 1023-8.

30. Watanobe, H., *Leptin directly acts within the hypothalamus to stimulate gonadotropin-releasing hormone secretion in vivo in rats*. J Physiol, 2002. **545**(Pt 1): p. 255-68.
31. Cioffi, J.A., et al., *The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles*. Mol Hum Reprod, 1997. **3**(6): p. 467-72.
32. Karlsson, C., et al., *Expression of functional leptin receptors in the human ovary*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(12): p. 4144-8.
33. Duggal, P.S., et al., *Expression of the long (OB-RB) and short (OB-RA) forms of the leptin receptor throughout the oestrous cycle in the mature rat ovary*. Reproduction, 2002. **123**(6): p. 899-905.
34. Ryan, N.K., et al., *Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation of oocyte maturation*. Biol Reprod, 2002. **66**(5): p. 1548-54.
35. Pallares, P., et al., *Substantiation of ovarian effects of leptin by challenging a mouse model of obesity/type 2 diabetes*. Theriogenology, 2010. **73**(8): p. 1088-95.
36. Barkan, D., et al., *Leptin induces ovulation in GnRH-deficient mice*. FASEB J, 2005. **19**(1): p. 133-5.
37. Garris, D.R., *Ovarian hypercyt lipidemia induced by obese (ob/ob) and diabetes (db/db) mutations: basis of female reproductive tract involution II*. Tissue Cell, 2004. **36**(3): p. 157-69.
38. Donato, J., Jr., et al., *Hypothalamic sites of leptin action linking metabolism and reproduction*. Neuroendocrinology, 2011. **93**(1): p. 9-18.
39. Louis, G.W., et al., *Molecular mapping of the neural pathways linking leptin to the neuroendocrine reproductive axis*. Endocrinology, 2011. **152**(6): p. 2302-10.
40. Quennell, J.H., et al., *Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function*. Endocrinology, 2009. **150**(6): p. 2805-12.
41. Hill, J.W., J.K. Elmquist, and C.F. Elias, *Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **294**(5): p. E827-32.

42. de Roux, N., et al., *Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10972-6.
43. Seminara, S.B., et al., *The GPR54 gene as a regulator of puberty*. N Engl J Med, 2003. **349**(17): p. 1614-27.
44. Gottsch, M.L., et al., *A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse*. Endocrinology, 2004. **145**(9): p. 4073-7.
45. Irwig, M.S., et al., *Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat*. Neuroendocrinology, 2004. **80**(4): p. 264-72.
46. Shahab, M., et al., *Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(6): p. 2129-34.
47. Thompson, E.L., et al., *Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis*. J Neuroendocrinol, 2004. **16**(10): p. 850-8.
48. Donato, J., Jr. and C.F. Elias, *The ventral premammillary nucleus links metabolic cues and reproduction*. Front Endocrinol (Lausanne), 2011. **2**: p. 57.
49. Donato, J., Jr., et al., *The ventral premammillary nucleus links fasting-induced changes in leptin levels and coordinated luteinizing hormone secretion*. J Neurosci, 2009. **29**(16): p. 5240-50.
50. Berghofer, A., et al., *Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review*. BMC Public Health, 2008. **8**: p. 200.
51. Kershaw, E.E. and J.S. Flier, *Adipose tissue as an endocrine organ*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2548-56.
52. Rajala, M.W. and P.E. Scherer, *Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis*. Endocrinology, 2003. **144**(9): p. 3765-73.
53. Maury, E. and S.M. Brichard, *Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **314**(1): p. 1-16.

54. Gosman, G.G., H.I. Katcher, and R.S. Legro, *Obesity and the role of gut and adipose hormones in female reproduction*. Hum Reprod Update, 2006. **12**(5): p. 585-601.
55. Lago, F., et al., *The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses*. Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(3-4): p. 313-325.
56. Fantuzzi, G., *Adipose tissue, adipokines, and inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(5): p. 911-9; quiz 920.
57. Robker, R.L., L.L. Wu, and X. Yang, *Inflammatory pathways linking obesity and ovarian dysfunction*. J Reprod Immunol, 2011. **88**(2): p. 142-8.
58. Elgazar-Carmon, V., et al., *Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding*. J Lipid Res, 2008. **49**(9): p. 1894-903.
59. Robker, R.L., et al., *Leukocyte migration in adipose tissue of mice null for ICAM-1 and Mac-1 adhesion receptors*. Obes Res, 2004. **12**(6): p. 936-40.
60. Kintscher, U., et al., *T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(7): p. 1304-10.
61. Ohmura, K., et al., *Natural killer T cells are involved in adipose tissues inflammation and glucose intolerance in diet-induced obese mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(2): p. 193-9.
62. Brake, D.K., et al., *ICAM-1 expression in adipose tissue: effects of diet-induced obesity in mice*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **291**(6): p. C1232-9.
63. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
64. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
65. Suganami, T. and Y. Ogawa, *Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(1): p. 33-9.

66. Horiuchi, T., et al., *Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents*. Rheumatology (Oxford), 2010. **49**(7): p. 1215-28.
67. Baud, V. and M. Karin, *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(9): p. 372-7.
68. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
69. Bruun, J.M., et al., *Opposite regulation of interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha by weight loss*. Obes Res, 2002. **10**(6): p. 499-506.
70. Lofgren, P., et al., *Secretion of tumor necrosis factor-alpha shows a strong relationship to insulin-stimulated glucose transport in human adipose tissue*. Diabetes, 2000. **49**(5): p. 688-92.
71. Nakayama, M., et al., *Changes in the expression of tumor necrosis factor (TNF) alpha, TNFalpha receptor (TNFR) 2, and TNFR-associated factor 2 in granulosa cells during atresia in pig ovaries*. Biol Reprod, 2003. **68**(2): p. 530-5.
72. Chen, H.L., et al., *Tumor necrosis factor-alpha gene expression in mouse oocytes and follicular cells*. Biol Reprod, 1993. **48**(4): p. 707-14.
73. Evans, A.C., et al., *Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle*. Biol Reprod, 2004. **70**(5): p. 1475-84.
74. Terranova, P.F., et al., *Tumor necrosis factor-alpha in the female reproductive tract*. Proc Soc Exp Biol Med, 1995. **209**(4): p. 325-42.
75. Terranova, P.F., *Potential roles of tumor necrosis factor-alpha in follicular development, ovulation, and the life span of the corpus luteum*. Domest Anim Endocrinol, 1997. **14**(1): p. 1-15.
76. Wood, J.R. and J.F. Strauss, 3rd, *Multiple signal transduction pathways regulate ovarian steroidogenesis*. Rev Endocr Metab Disord, 2002. **3**(1): p. 33-46.
77. Murdoch, W.J., D.C. Colgin, and J.A. Ellis, *Role of tumor necrosis factor-alpha in the ovulatory mechanism of ewes*. J Anim Sci, 1997. **75**(6): p. 1601-5.

78. Okuda, K. and R. Sakumoto, *Multiple roles of TNF super family members in corpus luteum function*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003. **1**: p. 95.
79. Watanobe, H. and Y. Hayakawa, *Hypothalamic interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, mediate the endotoxin-induced suppression of the reproductive axis in rats*. *Endocrinology*, 2003. **144**(11): p. 4868-75.
80. Rivier, C. and W. Vale, *Cytokines act within the brain to inhibit luteinizing hormone secretion and ovulation in the rat*. *Endocrinology*, 1990. **127**(2): p. 849-56.
81. Zhang, G., et al., *Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK-beta, NF-kappaB and GnRH*. *Nature*, 2013.
82. Prange-Kiel, J., et al., *Role of tumor necrosis factor in preovulatory follicles of swine*. *Biol Reprod*, 2001. **65**(3): p. 928-35.
83. Tabibzadeh, S., et al., *Site and menstrual cycle-dependent expression of proteins of the tumour necrosis factor (TNF) receptor family, and BCL-2 oncoprotein and phase-specific production of TNF alpha in human endometrium*. *Hum Reprod*, 1995. **10**(2): p. 277-86.
84. Berman, J., G. Girardi, and J.E. Salmon, *TNF-alpha is a critical effector and a target for therapy in antiphospholipid antibody-induced pregnancy loss*. *J Immunol*, 2005. **174**(1): p. 485-90.
85. Zhao, Y., et al., *Tumor necrosis factor-alpha stimulates aromatase gene expression in human adipose stromal cells through use of an activating protein-1 binding site upstream of promoter 1.4*. *Mol Endocrinol*, 1996. **10**(11): p. 1350-7.
86. Gambineri, A., et al., *Obesity and the polycystic ovary syndrome*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2002. **26**(7): p. 883-96.
87. Kanety, H., et al., *Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(40): p. 23780-4.
88. Pirola, L., A.M. Johnston, and E. Van Obberghen, *Modulation of insulin action*. *Diabetologia*, 2004. **47**(2): p. 170-84.

89. Kashyap, S.R. and R.A. Defronzo, *The insulin resistance syndrome: physiological considerations*. Diab Vasc Dis Res, 2007. **4**(1): p. 13-9.
90. *Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome*. Fertil Steril, 2004. **81**(1): p. 19-25.
91. Farrell, K. and M.H. Antoni, *Insulin resistance, obesity, inflammation, and depression in polycystic ovary syndrome: biobehavioral mechanisms and interventions*. Fertil Steril, 2010. **94**(5): p. 1565-74.
92. Fica, S., et al., *Insulin resistance and fertility in polycystic ovary syndrome*. J Med Life, 2008. **1**(4): p. 415-22.
93. Nestler, J.E. and D.J. Jakubowicz, *Lean women with polycystic ovary syndrome respond to insulin reduction with decreases in ovarian P450c17 alpha activity and serum androgens*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(12): p. 4075-9.
94. Nestler, J.E., et al., *Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(6): p. 2001-5.
95. Lanzone, A., et al., *Differential androgen response to adrenocorticotrophic hormone stimulation in polycystic ovarian syndrome: relationship with insulin secretion*. Fertil Steril, 1992. **58**(2): p. 296-301.
96. Ovalle, F. and R. Azziz, *Insulin resistance, polycystic ovary syndrome, and type 2 diabetes mellitus*. Fertil Steril, 2002. **77**(6): p. 1095-105.
97. Oktem, O. and B. Urman, *Understanding follicle growth in vivo*. Hum Reprod, 2010. **25**(12): p. 2944-54.
98. Myers, M., et al., *Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary*. Reproduction, 2004. **127**(5): p. 569-80.
99. Krisher, R.L., *The effect of oocyte quality on development*. J Anim Sci, 2004. **82** **E-Suppl**: p. E14-23.
100. Palma, G.A., et al., *Biology and biotechnology of follicle development*. ScientificWorldJournal, 2012. **2012**: p. 938138.
101. Beall, S., C. Brenner, and J. Segars, *Oocyte maturation failure: a syndrome of bad eggs*. Fertil Steril, 2010. **94**(7): p. 2507-13.

102. Abeydeera, L.R., *In vitro production of embryos in swine*. Theriogenology, 2002. **57**(1): p. 256-73.
103. Schultz, R.M., *From egg to embryo: a peripatetic journey*. Reproduction, 2005. **130**(6): p. 825-8.
104. Dobson, A.T., et al., *The unique transcriptome through day 3 of human preimplantation development*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(14): p. 1461-70.
105. Latham, K.E. and R.M. Schultz, *Embryonic genome activation*. Front Biosci, 2001. **6**: p. D748-59.
106. Langcake, P. and R.J. Pryce, *The production of resveratrol by Vitis vinifera and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury*. Physiological Plant Pathology, 1976. **9**(1): p. 77-86.
107. Nonomura, S., H. Kanagawa, and A. Makimoto, *[Chemical Constituents of Polygonaceous Plants. I. Studies on the Components of Ko-J O-Kon. (Polygonum Cuspidatum Sieb. Et Zucc.)]*. Yakugaku Zasshi, 1963. **83**: p. 988-90.
108. Gehm, B.D., et al., *Estrogenic effects of resveratrol in breast cancer cells expressing mutant and wild-type estrogen receptors: role of AF-1 and AF-2*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004. **88**(3): p. 223-34.
109. Gusman, J., H. Malonne, and G. Atassi, *A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol*. Carcinogenesis, 2001. **22**(8): p. 1111-7.
110. Howitz, K.T., et al., *Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan*. Nature, 2003. **425**(6954): p. 191-6.
111. Hardie, D.G., *Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase*. Am J Clin Nutr, 2011. **93**(4): p. 891S-6.
112. Liang, F., S. Kume, and D. Koya, *SIRT1 and insulin resistance*. Nat Rev Endocrinol, 2009. **5**(7): p. 367-73.
113. Fulco, M. and V. Sartorelli, *Comparing and contrasting the roles of AMPK and SIRT1 in metabolic tissues*. Cell Cycle, 2008. **7**(23): p. 3669-79.
114. Canto, C., et al., *AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity*. Nature, 2009. **458**(7241): p. 1056-60.

115. Lan, F., et al., *SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation.* J Biol Chem, 2008. **283**(41): p. 27628-35.
116. Ruderman, N.B., et al., *AMPK and SIRT1: a long-standing partnership?* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(4): p. E751-60.
117. Csiszar, A., et al., *Vasoprotective effects of resveratrol and SIRT1: attenuation of cigarette smoke-induced oxidative stress and proinflammatory phenotypic alterations.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(6): p. H2721-35.
118. Yoshizaki, T., et al., *SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes.* Mol Cell Biol, 2009. **29**(5): p. 1363-74.
119. Yoshizaki, T., et al., *SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(3): p. E419-28.
120. Qiao, L. and J. Shao, *SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex.* J Biol Chem, 2006. **281**(52): p. 39915-24.
121. Lowell, B.B. and G.I. Shulman, *Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes.* Science, 2005. **307**(5708): p. 384-7.
122. Zheng, D., et al., *Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase.* J Appl Physiol, 2001. **91**(3): p. 1073-83.
123. Neal, M.S., et al., *Aryl hydrocarbon receptor antagonists attenuate the deleterious effects of benzo[a]pyrene on isolated rat follicle development.* Reprod Biomed Online, 2010. **21**(1): p. 100-8.
124. Kong, X.X., et al., *Resveratrol, an effective regulator of ovarian development and oocyte apoptosis.* J Endocrinol Invest, 2011. **34**(11): p. e374-81.
125. Morita, Y., et al., *Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary.* Reprod Biol Endocrinol, 2012. **10**: p. 14.
126. Singh, M., et al., *Resveratrol modulates the expression of PTGS2 and cellular proliferation in the normal rat endometrium in an AKT-dependent manner.* Biol Reprod, 2011. **84**(5): p. 1045-52.

127. Liu, M., et al., *Resveratrol protects against age-associated infertility in mice*. Hum Reprod, 2013. **28**(3): p. 707-17.
128. Wong, D.H., et al., *Effects of resveratrol on proliferation and apoptosis in rat ovarian theca-interstitial cells*. Mol Hum Reprod, 2010. **16**(4): p. 251-9.
129. Ortega, I., et al., *Resveratrol reduces steroidogenesis in rat ovarian theca-interstitial cells: the role of inhibition of Akt/PKB signaling pathway*. Endocrinology, 2012. **153**(8): p. 4019-29.
130. Ortega, I., et al., *Effects of resveratrol on growth and function of rat ovarian granulosa cells*. Fertil Steril, 2012. **98**(6): p. 1563-73.
131. Burgues, S., *The effectiveness and safety of recombinant human LH to support follicular development induced by recombinant human FSH in WHO group I anovulation: evidence from a multicentre study in Spain*. Hum Reprod, 2001. **16**(12): p. 2525-32.
132. Crosignani, P.G., et al., *Anthropometric indicators and response to gonadotrophin for ovulation induction*. Hum Reprod, 1994. **9**(3): p. 420-3.
133. Whitten, W.K., *Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male; changes in the oestrous cycle determined by vaginal smears*. J Endocrinol, 1958. **17**(3): p. 307-13.
134. Reagan-Shaw, S., M. Nihal, and N. Ahmad, *Dose translation from animal to human studies revisited*. FASEB J, 2008. **22**(3): p. 659-61.
135. Ghanim, H., et al., *An antiinflammatory and reactive oxygen species suppressive effects of an extract of Polygonum cuspidatum containing resveratrol*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(9): p. E1-8.
136. Jung, U.J., et al., *Supplementation of persimmon leaf ameliorates hyperglycemia, dyslipidemia and hepatic fat accumulation in type 2 diabetic mice*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49030.
137. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
138. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.

139. Kyselova, V., et al., *Effects of p-nonylphenol and resveratrol on body and organ weight and in vivo fertility of outbred CD-1 mice*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003. **1**: p. 30.
140. Sharma, S., et al., *Antidiabetic activity of resveratrol, a known SIRT1 activator in a genetic model for type-2 diabetes*. *Phytother Res*, 2011. **25**(1): p. 67-73.
141. Boily, G., et al., *Sirt1 regulates energy metabolism and response to caloric restriction in mice*. *PLoS One*, 2008. **3**(3): p. e1759.
142. Meister, B., *Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus*. *Vitam Horm*, 2000. **59**: p. 265-304.
143. Romanatto, T., et al., *TNF-alpha acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient--effects on leptin and insulin signaling pathways*. *Peptides*, 2007. **28**(5): p. 1050-8.
144. Gálvez, B.G., N. San Martín, and C. Rodríguez, *TNF-alpha Is Required for the Attraction of Mesenchymal Precursors to White Adipose Tissue in Ob/ob Mice*. *PLoS One*, 2009. **4**(2): p. e4444.
145. Altmae, S., et al., *Research resource: interactome of human embryo implantation: identification of gene expression pathways, regulation, and integrated regulatory networks*. *Mol Endocrinol*, 2012. **26**(1): p. 203-17.
146. Garris, D.R. and B.L. Garris, *Diabetes (db/db) mutation-induced female reproductive tract hypercyt lipidemia: estrogenic restoration of utero-ovarian indices*. *Reprod Toxicol*, 2004. **18**(5): p. 641-51.
147. Walters, K.A., C.M. Allan, and D.J. Handelsman, *Rodent models for human polycystic ovary syndrome*. *Biol Reprod*, 2012. **86**(5): p. 149, 1-12.
148. Sabatini, M.E., et al., *Metformin therapy in a hyperandrogenic anovulatory mutant murine model with polycystic ovarian syndrome characteristics improves oocyte maturity during superovulation*. *J Ovarian Res*, 2011. **4**(1): p. 8.
149. Mioni, R., et al., *Evidence for the presence of glucose transporter 4 in the endometrium and its regulation in polycystic ovary syndrome patients*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(8): p. 4089-96.
150. Turner, R.T., et al., *Is resveratrol an estrogen agonist in growing rats?* *Endocrinology*, 1999. **140**(1): p. 50-4.

151. Henry, L.A. and D.M. Witt, *Resveratrol: phytoestrogen effects on reproductive physiology and behavior in female rats*. *Horm Behav*, 2002. **41**(2): p. 220-8.
152. Freyberger, A., et al., *Differential response of immature rat uterine tissue to ethinylestradiol and the red wine constituent resveratrol*. *Arch Toxicol*, 2001. **74**(11): p. 709-15.
153. Mantzoros, C.S., et al., *Leptin in human physiology and pathophysiology*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011. **301**(4): p. E567-84.
154. Rodgers, J.T., et al., *Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1*. *Nature*, 2005. **434**(7029): p. 113-8.
155. Qiao, J. and H.L. Feng, *Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence*. *Hum Reprod Update*, 2011. **17**(1): p. 17-33.
156. Purcell, S.H. and K.H. Moley, *The impact of obesity on egg quality*. *J Assist Reprod Genet*, 2011. **28**(6): p. 517-24.
157. Dan-Goor, M., et al., *Expression of glucose transporter and glucose uptake in human oocytes and preimplantation embryos*. *Hum Reprod*, 1997. **12**(11): p. 2508-10.
158. Saito, T., M. Hiroi, and T. Kato, *Development of glucose utilization studied in single oocytes and preimplantation embryos from mice*. *Biol Reprod*, 1994. **50**(2): p. 266-70.
159. Zhang, C., et al., *The effect of gonadotropin on glucose transport and apoptosis in rat ovary*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e42406.
160. Su, E.J., H. Xin, and D. Monsivais, *The emerging role of estrogen receptor-beta in human reproduction*. *Semin Reprod Med*, 2012. **30**(1): p. 62-70.
161. Matsuda, F., et al., *Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells*. *J Reprod Dev*, 2012. **58**(1): p. 44-50.
162. Luo, L.L., et al., *The effects of caloric restriction and a high-fat diet on ovarian lifespan and the expression of SIRT1 and SIRT6 proteins in rats*. *Aging Clin Exp Res*, 2012. **24**(2): p. 125-33.

163. Olatinwo, M.O., et al., *Impact of gonadotropin administration on folliculogenesis in prepubertal ob/ob mice*. Mol Cell Endocrinol, 2005. **245**(1-2): p. 121-7.