



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa



División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Maestría en Biología de la Reproducción Animal

Efectos de la heparina sobre la maduración *in vitro* de ovocitos obtenidos  
de ratas obesas

T E S I S para obtener el grado de Maestro en Biología de la  
Reproducción Animal que presenta:

Alain Priego Cortés

Dra. Angélica Trujillo Hernández

Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez

Dra. Rosalina María de Lourdes Reyes Luna

Ciudad de México a 16 de octubre de 2018

## COMITÉ DE TUTORES

Dra. Angélica Trujillo Hernández

Profesor investigador

Laboratorio de Neuroendocrinología

Facultad de Ciencias Biológicas

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Correo electrónico: atrujilloh@hotmail.com

Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez

Profesor investigador

Departamento de Ciencias de la Salud

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Correo electrónico: duco@xanum.uam.mx

Dra. Rosalina María de Lourdes Reyes Luna

Profesor investigador

Laboratorio de Biología de la Reproducción

Facultad de Ciencias Biológicas

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Correo electrónico: rreyesluna@hotmail.com

## JURADO DE EXAMEN

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Departamento de Ciencias de la Salud, División Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa

Correo electrónico: bet@xanum.uam.mx

Dr. Eduardo Casas Hernández

Departamento de Ciencias de la Salud, División Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa

Correo electrónico: dino@xanum.uam.mx

Dr. Juan Carlos Flores Alonso

Laboratorio de Biología de la Reproducción

Centro de Investigación Biomédica de Oriente

Instituto Mexicano del Seguro Social

Dra. Rosalina María de Lourdes Reyes Luna

Laboratorio de Biología de la Reproducción

Facultad de Ciencias Biológicas

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Correo electrónico: rreyesluna@hotmail.com

## AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las instituciones que han hecho posible la realización de este trabajo de investigación.

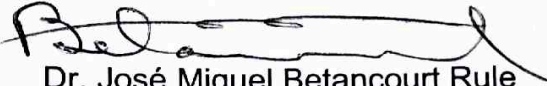
En primer lugar, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado para poder realizar mis estudios de posgrado (Becario: 616260, Registro de la MBRA ante CONACYT: 003797).

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa por permitirme cursar la Maestría en Biología de la Reproducción Animal y con ello apoyar mi crecimiento personal y académico.

También agradezco a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, en especial a los laboratorios de Neuroendocrinología y de Biología de la Reproducción por todo el apoyo recibido para la realización de este trabajo.



Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada Efectos de la heparina sobre la maduración *in vitro* de ovocitos obtenidos de ratas obesas con fecha 16 de octubre de 2018.



Dr. José Miguel Betancourt Rule

Presidente



Dr. Eduardo Casas Hernández

Secretario



Dr. Juan Carlos Flores Alonso

Vocal



Dra. Rosalina María de Lourdes Reyes Luna

Vocal

## DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mis padres por su infinito amor y apoyo incondicional, sin ellos esto no sería posible. A Karla por siempre impulsarme a ser una mejor persona y un mejor profesionalista, además de tanta paciencia y amor en este tiempo.

Un agradecimiento especial a la Dra. Angélica Trujillo, por permitirme ser parte de su laboratorio, por la confianza que me ha brindado y por ser una excelente guía durante la elaboración de este trabajo. También, quiero agradecer a la Dra. Yvonne Ducolomb por su confianza, su apoyo y sus valiosas observaciones durante la realización de este trabajo. Y agradezco a la Dra. Rosalina Reyes por su confianza y apoyo brindados en este trabajo, y sobretodo, desde la licenciatura.

Agradezco a todos los amigos que hice durante la maestría, porque me cobijaron como su hermano e hicieron que llegar a una nueva ciudad me fuera más fácil, gracias por todas esas vivencias que llevo conmigo y por su gran amistad.

Por último, agradezco a los académicos de la Maestría por compartir su experiencia y conocimiento conmigo, así como a todos aquellos que de alguna manera fueron parte de esta aventura.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>10</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
1.1 OBESIDAD Y REPRODUCCIÓN	11
1.2 OBESIDAD Y SU EFECTO EN LA MADURACIÓN DE LOS OVOCITOS	12
1.3 TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN PACIENTES OBESOS	18
1.4 GLICOSAMINOGLICANOS (GAGS) EN LA MADURACIÓN DEL OVOCITO	20
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>23</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>26</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
<b>V. HIPÓTESIS</b>	<b>27</b>
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	28
6.1.1 Grupos sin estimulación ovárica	28
6.1.2 Grupos con estimulación ovárica	29
6.2 MIV CON EXPOSICIÓN A HEPARINA	30
6.3 EVALUACIÓN DE LA MADURACIÓN	31
6.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
<b>VII. RESULTADOS</b>	<b>32</b>
7.1 PESO DE LAS RATAS Y MASA OVÁRICA	32
7.1.1 Grupos sin estimulación ovárica	32
7.1.2 Grupos con estimulación ovárica	33
7.2 RECUPERACIÓN DE OVOCITOS	36
7.2.1 Grupos sin estimulación ovárica	36
7.2.2 Grupos con estimulación ovárica	37
7.2.3 Primer resumen de resultados	38
7.3 ANÁLISIS DE MADURACIÓN	40
7.3.1 Maduración en medio TLP	40

7.3.2 Segundo resumen de resultados. -----	42
7.3.3 Maduración con diferentes concentraciones de heparina -----	43
7.3.3.1 Medio TLP adicionado con 1mg/ml de heparina -----	43
7.3.3.2 Medio TLP adicionado con 3mg/ml de heparina -----	44
7.3.3.3 Medio TLP adicionado con 6mg/ml de heparina -----	46
7.3.4 Tercer resumen de resultados-----	47
<b>VIII. DISCUSIÓN -----</b>	<b>49</b>
<b>IX. CONCLUSIONES -----</b>	<b>53</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA -----</b>	<b>53</b>

## RESUMEN

La obesidad se relaciona con problemas reproductivos, como: mayor cantidad de ovocitos apoptóticos, menor número de ovocitos recuperados, ovocitos de menor tamaño y menor número de ovocitos maduros. Por lo que las mujeres con obesidad son candidatas a técnicas de reproducción asistida. Sin embargo, estas mujeres requieren dosis mayores de gonadotropinas para lograr la estimulación ovárica y se recuperan pocos ovocitos maduros. Por lo tanto, la maduración in vitro de ovocitos es una alternativa al tratamiento de mujeres con obesidad. Se ha observado que la heparina, al incluirse en los medios, puede actuar como un factor de maduración, promoviendo la expansión del complejo cúmulo-ovocito y la ruptura de la vesícula germinal, induciendo la reanudación de la meiosis. Por esto, el objetivo de este trabajo fue analizar los efectos de la heparina sobre la maduración in vitro de ovocitos obtenidos de ratas con obesidad genética. Utilizamos ratas Long Evans (LE) como grupo control, ratas Obese Zucker Diabetic Fatty (OZDF) como modelo de obesidad y ratas Lean Zucker Diabetic Fatty (LZDF) como segundo grupo control. Los ovocitos recuperados de cada grupo se separaron aleatoriamente en cuatro tratamientos (medio TLP, TLP+1mg/ml de heparina, TLP+3mg/ml de heparina y TLP+6mg/ml de heparina) en los que se maduraron por 48 horas. Los resultados mostraron una disminución en el número de ovocitos obtenidos de ovario de ratas obesas en comparación con las ratas delgadas LE ( $17.08 \pm 5.01$  y  $29 \pm 13.16$  respectivamente). Además, la estimulación con gonadotropinas no mejoró el número de ovocitos recuperados de ovario (LE =  $20.75 \pm 9.11$  y OZDF =  $11.5 \pm 5.96$ ) y se observó una ligera disminución en el número de ovocitos recuperados de oviducto en ratas OZDF (LE =  $9.92 \pm 2.47$ ; LZDF =  $7.92 \pm 4.23$  y OZDF =  $6.17 \pm 3.24$ ). Esto demuestra que la obesidad afecta el número de ovocitos recuperados y de ovocitos maduros en las ratas. El tratamiento con 1 mg y 3 mg de heparina resultó en un aumento en el porcentaje de ovocitos madurados in vitro de ratas delgadas y obesas. Estas observaciones indican que la heparina sirve como un factor de maduración in vitro para la obtención de ovocitos de rata de animales obesos.

## ABSTRACT

Obesity is related to reproductive problems such as: higher amount of apoptotic oocytes, a lower number of recovered oocytes, oocytes of smaller size and lower number of mature oocytes. Therefore, women with obesity are candidates for assisted reproductive techniques. However, these women require higher doses of gonadotropins to achieve ovarian stimulation and only a few mature oocytes are recovered. Thus, *in vitro* oocyte maturation is an alternative to infertility problems for women with obesity. It has been observed that heparin, when is included in the media, can serve as a maturation factor, promoting the expansion of the cumulus-oocyte complex and the germinal vesicle breakdown (GVB), inducing the resumption of meiosis. Therefore, the present work aimed to analyze the effects of heparin on *in vitro* maturation of oocytes obtained from genetically obese rats. We used Long Evans (LE) rats as a control group, Obese Zucker Diabetic Fatty rats (OZDF) as an obesity model and Lean Zucker Diabetic Fatty rats (LZDF) as the second control group. Oocytes recovered from each group were randomly separated into four treatments (TLP medium, TLP+1mg/ml heparin, TLP+3mg/ml heparin and TLP+6mg/ml heparin) where the degree of maturation was observed for 48 hours. The results showed a decrease in the number of oocytes obtained from ovary of obese rats compared to lean LE rats ( $17.08 \pm 5.01$  and  $29 \pm 13.16$ , respectively). In addition, stimulation with gonadotropins did not improve the number of oocytes recovered from ovary (LE =  $20.75 \pm 9.11$  and OZDF =  $11.5 \pm 5.96$ ) and a decrease was observed in the number of oocytes recovered from oviduct in OZDF rats (LE =  $9.92 \pm 2.47$ , LZDF =  $7.92 \pm 4.23$  and OZDF =  $6.17 \pm 3.24$ ). This shows that obesity affects the number of recovered oocytes and mature oocytes in rats. The treatment with 1 mg and 3 mg of heparin resulted in an increase in the percentage of matured *in vitro* oocytes from lean and obese rats. These observations indicate that heparin serves as an *in vitro* maturation factor for rat oocytes obtain from obese animals.

## I. INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad crónica, caracterizada por un aumento patológico de grasa corporal. El índice de masa corporal (IMC) es el indicador que se utiliza para identificar el sobrepeso y la obesidad, en adultos se caracteriza el sobrepeso con un IMC entre  $25 \text{ kg/m}^2$  y  $29 \text{ kg/m}^2$ , mientras que para la obesidad el IMC es igual o superior a  $30 \text{ kg/m}^2$  (Organización Mundial de la Salud, 2016).

La obesidad es considerada la epidemia del siglo XXI, según datos de la organización mundial de la salud (OMS), en 2014 en el mundo había 1900 millones de adultos con sobrepeso, de los cuales, 600 millones eran obesos (Organización Mundial de la Salud, 2016). En México, los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 muestran que en adolescentes (personas entre 12 y 19 años de edad) el 19.6% de los hombres presentaban sobrepeso y el 14.5% eran obesos, de igual forma las mujeres en este rango de edad el 23.7% tenían sobrepeso y el 12.1% obesidad, mientras que en adultos (20 años o más de edad) el 69.4% de los hombres presentaban sobrepeso u obesidad (42.6% y 26.8% respectivamente), así como el 73% de las mujeres presentaban sobrepeso u obesidad (35.5% y 37.5% respectivamente) (Gutiérrez et al., 2012).

La obesidad tiene un origen multifactorial, reconociéndose factores genéticos, metabólicos, endocrinológicos y ambientales. La obesidad puede clasificarse en: inducida por dieta alta en grasa (HFD) e inducida por mutación genética (ob/ob) (Chu et al., 2007; Robker, 2008; Samuelsson et al., 2008; Penzias, 2012). Cualquiera que sea su origen, la obesidad es un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares, diabetes, trastornos del aparato locomotor y cánceres (OMS, 2016). Además, la obesidad genera problemas de reproducción antes y durante la gestación (Jungheim et al., 2010).

### 1.1 Obesidad y reproducción

Algunos de los problemas reproductivos con los que se asocia la obesidad son: irregularidades menstruales, trastornos ovulatorios, hirsutismo, disminución en las tasas de concepción, infertilidad, alteraciones en la implantación del embrión, abortos, desarrollo fetal afectado que tiene como resultado anomalías del feto, sobrepeso y disfunciones metabólicas en la descendencia (Chu et al., 2007; Samuelsson et al., 2008; Jungheim et al., 2010; Purcell & Moley, 2011; Penzias, 2012; Grindler & Moley, 2013; Hou et al., 2016). Además, las mujeres obesas son propensas a presentar complicaciones en el embarazo como preeclampsia, diabetes gestacional y hemorragia posparto (The ESHRE Capri Workshop Group, 2006; Catalano, 2010; Ozekinci et al., 2015). Los efectos negativos de la obesidad en la salud reproductiva de la mujer pueden separarse en diferentes niveles: nivel endócrino, teniendo un efecto en la producción de hormonas; nivel ovárico, afectando la calidad y cantidad de ovocitos y de embriones producidos; y nivel uterino, con efecto sobre las tasas de implantación del embrión (Barrios-De-Tomasi, et al., 2013).

En roedores, tanto la obesidad por mutación genética (*ob/ob*) como la obesidad inducida por dieta rica en grasa (HFD) alteran la función ovárica y se asocian con un mayor número de folículos apoptóticos, menor cantidad de ovocitos recuperados, ovocitos de menor tamaño, menor número de ovocitos maduros, infertilidad, alteraciones en la implantación del embrión, aborto, anomalías fetales congénitas, sobrepeso en las crías y disfunciones metabólicas (Chu et al., 2007; Robker, 2008; Samuelsson et al., 2008; Jungheim et al., 2010; Pallares et al., 2010; Penzias, 2012; Cabello et al., 2015; Hou et al., 2016). Además, los ovocitos de ratones con obesidad inducida por HFD presentan mayor acumulación de lípidos, estrés oxidante, disfunción mitocondrial y la metilación del DNA se encuentra alterada, provocando apoptosis temprana y bajas tasas de maduración (Hou et al., 2016).

## 1.2 Obesidad y su efecto en la maduración de los ovocitos



En la mayoría de los mamíferos, durante el desarrollo fetal los ovocitos comienzan la primera división meiótica, deteniéndose en la etapa de diploteno de la profase I, hasta antes de ser ovulados cuando, promovida por la hormona luteinizante, los ovocitos reanudan la meiosis hasta llegar a la etapa de metafase II, en esta etapa ocurre una segunda detención de la meiosis y la expulsión del primer cuerpo polar (CP). Posteriormente, la penetración del espermatozoide conduce a la conclusión de la meiosis del ovocito y la expulsión del segundo CP, proceso conocido como maduración nuclear del ovocito (Figura 1) (Sauerbrun-Cutler et al., 2015; Lonergan & Fair, 2016). El ovocito también pasa a través de una maduración citoplásmica donde diversos organelos se redistribuyen, sintetizan proteínas reguladoras del desarrollo específicas del ovocito y se modifican los sistemas de transporte de la membrana del ovocito, preparándose para la fertilización (Sauerbrun-Cutler et al., 2015; Lonergan & Fair, 2016). El entorno folicular en el que se desarrolla el ovocito es el responsable de mantenerlo detenido en la etapa de profase I, dentro de él la concentración de AMPc promueve la actividad de la cinasa A y ésta la supresión de la maduración. Posteriormente, provocada por la oleada pre-ovulatoria de gonadotropinas, se produce una disminución en las concentraciones de GMPc folicular y del ovocito, un aumento en la actividad fosfodiesterasa en los ovocitos y disminución en la concentración de AMPc, lo que conduce a la reanudación de la meiosis hasta la etapa de metafase II (Lonergan & Fair, 2016).

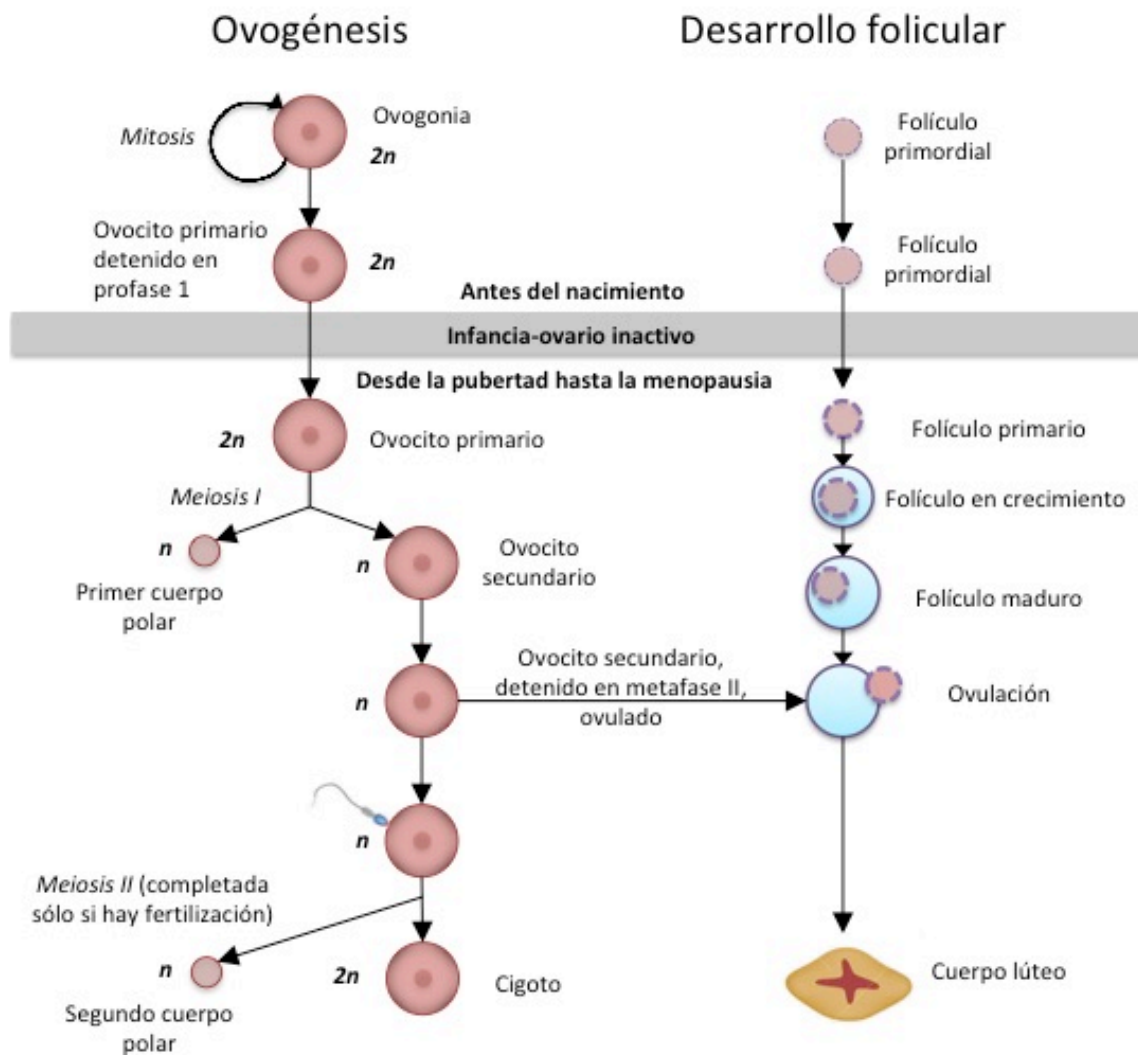


Figura 1. Ovogénesis y desarrollo folicular. Durante el desarrollo fetal, los ovocitos inician la primera división meiótica, deteniéndose en la etapa de diploteno de la profase I, a estos ovocitos se les conoce como ovocitos primarios. Posteriormente, a partir de la pubertad, los ovocitos primarios reanudan la primera división meiótica dando lugar a un cuerpo polar y a un ovocito secundario arrestado en la metafase de la segunda división meiótica. Éste ovocito va a ser ovulado y, en caso de que sea fertilizado, terminará la segunda división meiótica y se expulsará el segundo cuerpo polar. Fuente:

Imagen redibujada de <https://www.dreamstime.com/royalty-free-stock-photo-oogenesis-image27345475>.

Entre las células de la granulosa y el ovocito se da un proceso de comunicación bidireccional, juntos forman el complejo ovocito-células del cúmulo (COC) (Figura 2). La obesidad impacta dicha comunicación, afectando el metabolismo y la maduración de los ovocitos, así como su capacidad de ser fertilizado y el desarrollo del embrión. La comunicación bidireccional entre las células de la granulosa y el ovocito, y el suministro de nutrientes que proporcionan las primeras, son esenciales para la maduración y viabilidad de los ovocitos, por lo tanto, las condiciones en las que se desarrolla el ovocito tienen impacto sobre éste, si se lleva a cabo en condiciones adversas, el desarrollo del ovocito se verá afectado (Purcell & Moley, 2011).

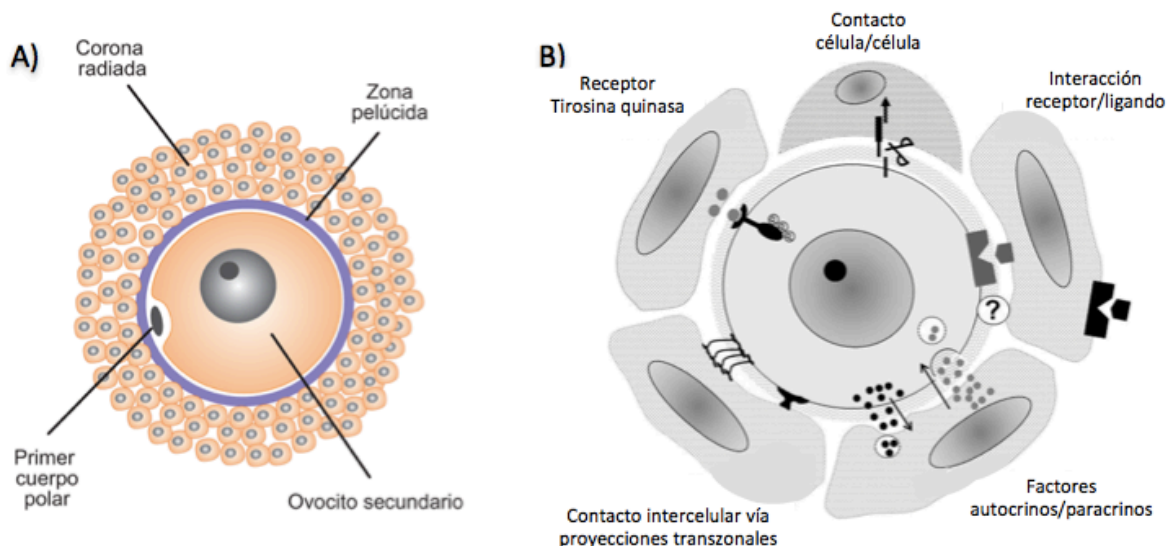


Figura 2. A) Estructura del Complejo ovocito-células del cúmulo (COC). El COC está formado por el ovocito envuelto en la zona pelúcida y las células de la granulosa que lo rodean o Corona radiada. B)

Tipos de interacciones entre el ovocito y las células de la granulosa. Las señales a través de las cuales interactúan el ovocito y las células de la granulosa son importantes para la supervivencia, metabolismo y desarrollo del ovocito. Algunas de estas interacciones son: "Contactos célula-célula que implican activación del receptor basado en escisión proteolítica, receptores tirosina quinasa como ligando c-kit, comunicación directa mediada por uniones comunicantes a través de proyecciones transzonales, modelo de comunicación paracrino que implica secreción y/o captación de ligandos, y las interacciones clásicas entre receptor y ligando expresadas en la superficie de la célula de la

granulosa pero no confirmadas para la superficie de la célula del ovocito” (Albertini, 2015). Fuente:  
Imagen A obtenida de López Serna (2012) e imagen B obtenida de Albertini (2015).

Los ácidos grasos cumplen un papel importante como reserva y fuente de energía en el ovocito, pero también cumplen funciones importantes en la biogénesis de la membrana celular y en la señalización y actúan como precursores de los esteroides y prostaglandinas. Además, son un componente importante en el microambiente del folículo ovárico, ya que se encuentran en el líquido folicular en forma esterificada (triglicéridos) (Valckx et al., 2014). Por lo tanto, la dieta materna puede afectar la composición de ácidos grasos del líquido folicular y posteriormente alterar la composición de ácidos grasos de las células de la granulosa y del ovocito, afectando directamente la función y calidad del COC (Valckx et al., 2014; Gu et al., 2015). Por lo que los ácidos grasos libres y en concentraciones elevadas influyen negativamente en la función folicular ovárica y se asocian con alteraciones en la maduración de los ovocitos, bajas tasas de fertilización y embriones de mala calidad (Jungheim et al., 2011; Dunning et al., 2014).

Los problemas para lograr un embarazo en mujeres con obesidad también pueden deberse a efectos adversos en la señalización normal de la insulina y la captación de glucosa en los folículos preovulatorios, ovocitos y el embrión (Jungheim et al., 2010). La principal fuente de energía del ovocito es el piruvato, mientras que las células de la granulosa metabolizan la glucosa para proporcionar piruvato al ovocito (Gu et al., 2015). Cuando hay altas concentraciones de glucosa circulante (hiperglucemia), no hay suficientes transportadores de glucosa, por lo tanto, disminuye su transporte y captación en las células, afectando el metabolismo y aumentando la apoptosis en células de la granulosa (Purcell & Moley, 2011). De tal manera que la glucosa en exceso también afecta la función folicular ovárica, aumentando la tasa de apoptosis en células de la granulosa, propiciando un desarrollo folicular ovárico anormal, retrasando la maduración y provocando anomalías mitocondriales en los ovocitos (Jungheim et al., 2011; Grindler & Moley, 2013).

Las concentraciones plasmáticas moderadas de insulina y leptina se asocian a un desarrollo normal del embrión, mientras que concentraciones altas o bajas alteran el desarrollo embrionario (Adamiak et al., 2005). Por lo tanto, el metabolismo energético alterado de los ovocitos, como respuesta a señales nutricionales, causa una reducción del potencial de maduración y de fertilización del ovocito y el desarrollo embrionario pre-implantatorio se ve deteriorado. Además, la acción del entorno folicular en el metabolismo de los ovocitos y los efectos deletéreos sobre las células de la granulosa interrumpen las interacciones de señalización entre las células de la granulosa y el ovocito, afectando la capacidad de éstos para ser fertilizados (competencia) (Gu et al., 2015) (Figura 3).

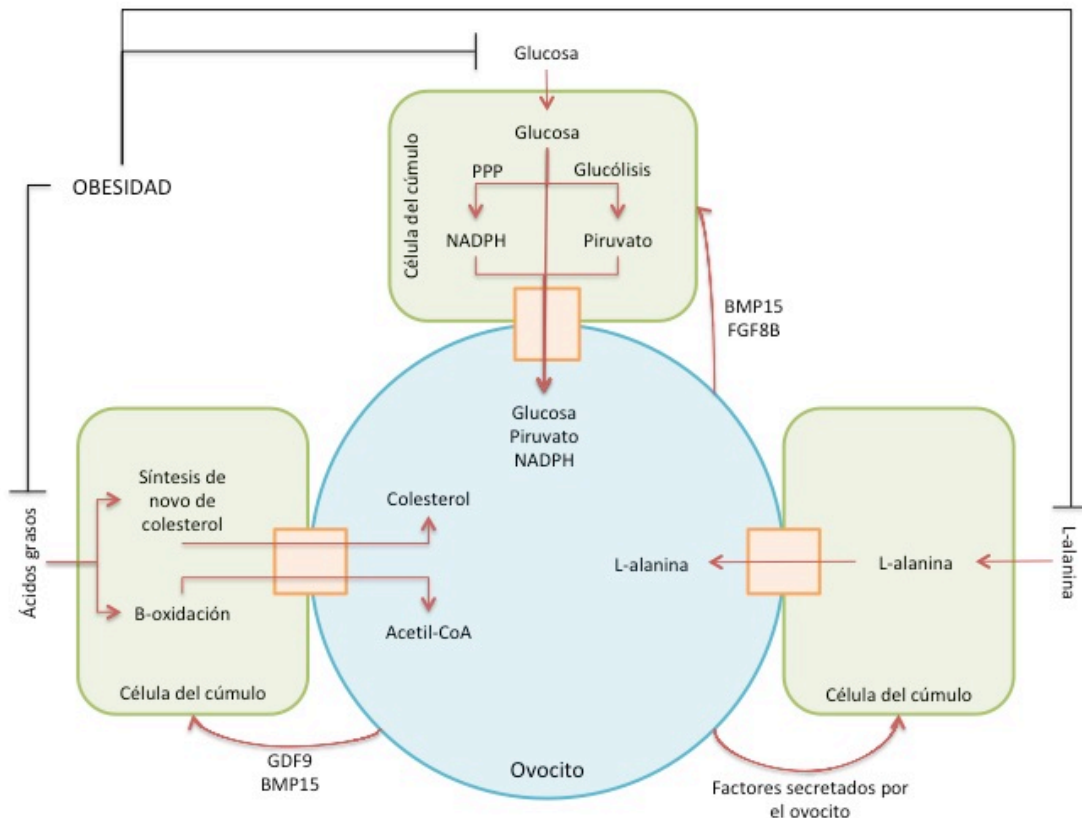


Figura 3. Señales metabólicas en el complejo ovocito-células del cúmulo (COC). La glucosa del líquido folicular es tomada por las células de la granulosa donde es convertida en piruvato a través de la

glucólisis y en NADPH a través de la vía de la pentosa fosfato, y pasan al ovocito por medio de uniones comunicantes. El piruvato es la principal fuente de energía del ovocito y el NADPH es un regulador del estado redox del ovocito. Los ácidos grasos del líquido folicular son metabolizados en las células del cúmulo por medio de la  $\beta$ -oxidación con la consecuente formación de Acetil-CoA, que es suministrada al ovocito por medio de uniones comunicantes, junto con el colesterol sintetizado de novo en las células del cúmulo. Los aminoácidos son transportados del líquido folicular al ovocito por las células del cúmulo, y en el ovocito tienen diversas funciones como fuente de energía, síntesis de glutatión y reguladores del pH y la osmolaridad. Los ovocitos pueden regular todos estos procesos a través de la secreción de factores de crecimiento (Seli et al., 2014). Sin embargo, la obesidad puede alterar las concentraciones de aminoácidos, ácidos grasos y glucosa en el líquido folicular, con efectos negativos en las células del cúmulo y la señalización entre éstas y el ovocito, alterando el metabolismo energético del ovocito y su potencial de maduración (Gu et al., 2015). Fuente: Imagen redibujada de Seli et al. (2014).

### 1.3 Técnicas de reproducción asistida en pacientes obesos

Debido a que los efectos negativos de la obesidad en la salud reproductiva de las mujeres llevan a subfertilidad, las mujeres obesas son candidatas a tratamientos con técnicas de reproducción asistida (TRA) como la fertilización *in vitro* (FIV). La FIV implica la recuperación de ovocitos madurados *in vivo* o *in vitro*, seguido de la fertilización de éstos y la transferencia de los embriones obtenidos al útero receptor (Lonergan and Fair, 2016).

En las TRA, la obesidad se relaciona con un reducido porcentaje de éxito (Purcell and Moley, 2011; Grindler and Moley, 2013). En mujeres obesas sometidas a TRA se requiere una mayor dosis de gonadotropinas para lograr la estimulación, además, la obesidad se asocia con un menor número de ovocitos recuperados, menor número de ovocitos maduros, menor tasa de embarazo, calidad del embrión reducida y mayor probabilidad de aborto espontáneo (The ESHRE Capri Workshop Group, 2006; Dall Agnoletta et al., 2011; Barrios-De-Tomasi, et al., 2013; Oliver Sánchez et al., 2014; Ozekinci et al., 2015). Otros estudios, como el de Comstock et al. (2015), han descrito un mayor número de folículos apoptóticos, tamaño más pequeño de los ovocitos y un menor número de ovocitos maduros en ratones hembra obesas

comparado con hembras de peso normal. Además, los ovocitos de ratones hembra obesas presentan lipotoxicidad, aumento del estrés oxidante y aumento de la apoptosis en el CCO (Comstock et al., 2015).

La maduración ovocítica se define como el reinicio y terminación de la primera división meiótica y su progreso a la metafase II (MII) (Flores-Alonso et al., 2008; Sauerbrun-Cutler et al., 2015). Por lo tanto, al reinicio y término de la maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos en condiciones de laboratorio se le conoce como maduración *in vitro* (MIV) (Fuentes-Morales et al., 2009). La recuperación de ovocitos inmaduros y su posterior MIV es una alternativa atractiva a la FIV convencional ya que tiene distintas ventajas como evitar el riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica, tratamiento simplificado con bajo o nulo uso de gonadotropinas y reducción de los costos de tratamiento (Sauerbrun-Cutler et al., 2015).

Se han desarrollado diversos sistemas de MIV buscando mejorar las tasas de éxito, por lo que podemos encontrar MIV convencional o sin uso de gonadotropinas y MIV con uso de gonadotropinas para estimulación ovárica, en la que previo a la obtención de los ovocitos, la paciente es tratada con hormona folículo estimulante (FSH) o gonadotropina coriónica humana (hCG) (Sauerbrun-Cutler et al., 2015). El uso de gonadotropinas para estimulación ovárica antes de la MIV estimula el rompimiento de la vesícula germinal (VG) y aumenta la velocidad de la MIV, promoviendo que la maduración avance a la etapa de metafase I (Sauerbrun-Cutler et al., 2015).

La MIV en mamíferos se ve influenciada por los medios y las condiciones de cultivo usados, la adición de hormonas y factores de crecimiento (Zeng et al., 2013). El suero, las hormonas y los factores de crecimiento son factores clave en los medios de MIV; dentro de estas sustancias se encuentra la heparina, un glicosaminoglicano (GAG) que participa en el desarrollo folicular y promueve la expansión del COC (Flores-Alonso et al., 2008). Diversos estudios muestran que los GAGs, como el

ácido hialurónico, el heparán sulfato (análogo estructural de la heparina), dermatán sulfato y condroitín sulfato, se encuentran en el citoplasma del ovocito, en el COC, en el folículo ovárico y en otros tejidos (Romanato, 2003; Romanato et al., 2008; Salustri et al., 1999). Además, se ha observado que la síntesis de algunos GAGs se lleva a cabo en las células de la granulosa (Fuentes-Morales et al., 2009). La acumulación de GAGs, como el ácido hialurónico entre el COC y la capa de células de la granulosa induce la reanudación de la meiosis en los ovocitos (Watson et al., 2012).

#### 1.4 Glicosaminoglicanos (GAGs) en la maduración del ovocito

Los GAGs son polisacáridos lineales, cuyos dos tipos principales son el sulfato de heparán (SH) y el sulfato de condroitina (SC), compuestos de disacáridos de hexosamina-ácido urónico repetidos y sulfatados en grados variables (Fuentes-Morales et al., 2009; Zhang, 2010) (Figura 4, A). Los GAGs participan en una diversidad de procesos fisiológicos tales como unión, activación o inmovilización de diversos ligandos de proteínas, tales como factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, componentes de matriz extracelular, proteasas, inhibidores de proteasa y lipoproteína lipasa (Zhang, 2010). Entre las diferentes vías de señalización reguladas por los GAGs encontramos al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF/FGFR), al factor de crecimiento de hepatocitos (HGF/c-Met), al factor neurotrófico derivado de línea celular glial (GDNF/c-Ret/GFRa1), al Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF/VEGFR), al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF/PDGFR) y rutas de señalización de la proteína morfogénica ósea (BMP), entre otras (Zhang, 2010).

El fluido folicular contiene altas concentraciones de GAGs como condroitina, ácido hialurónico y compuestos similares a la heparina (Flores-Alonso et al., 2008). Además, los GAGs se encuentran en el citoplasma del ovocito, en el COC y son sintetizados por las células del COC en respuesta a las gonadotropinas (Salustri et al., 1999) (Figura 4, B); y actúan induciendo la maduración del ovocito, participan en el desarrollo folicular y promueven la expansión del COC con el AMPc como segundo



mensajero ( Ball et al., 1982; Fuentes-Morales et al., 2009) (Figura 5).

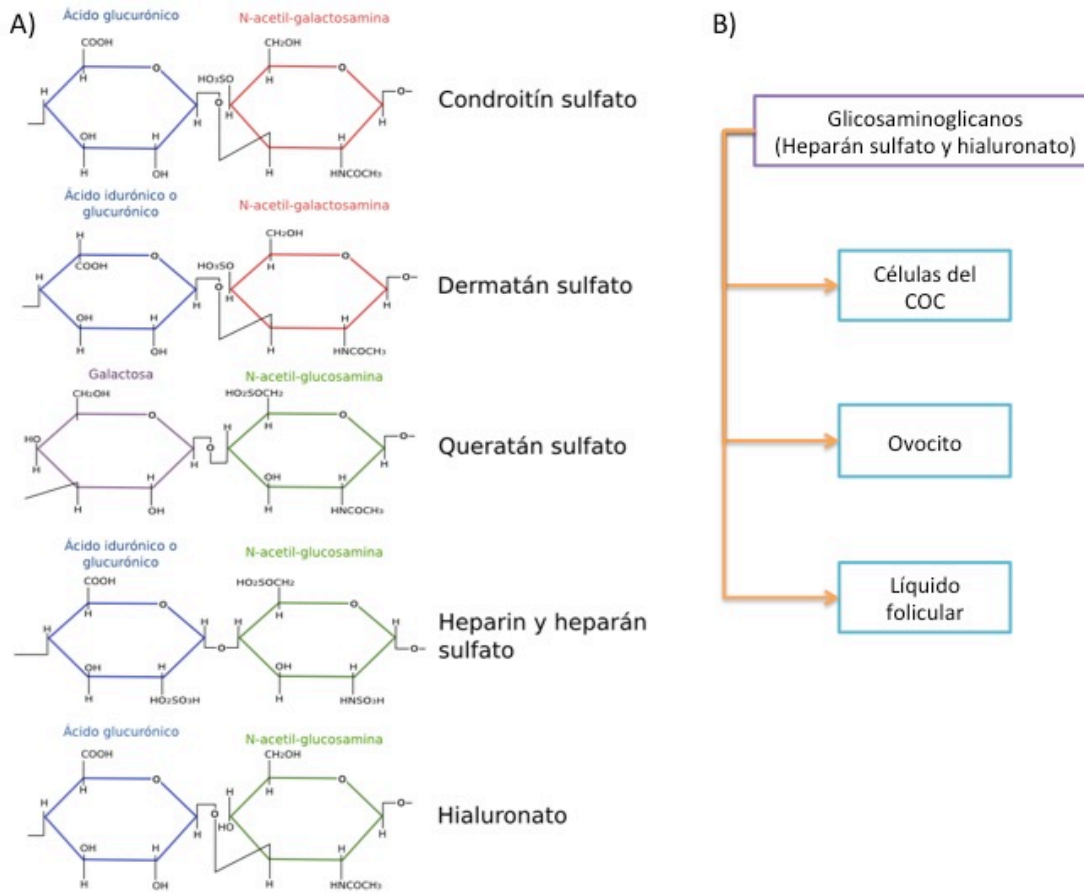


Figura 4. Estructura y localización de los Glicosaminoglicanos. A) Estructura de los GAGs más importantes. Las cadenas de glicosaminoglicanos están compuestas por unidades de disacáridos repetidas de ácido urónico (glucurónico o idurónico) y hexosamina N-acetilada (glucosamina o galactosamina), excepto el Queratán sulfato, que está compuesto de galactosa que puede modificarse (posición de sulfatación) a intervalos irregulares a lo largo de la cadena (Lamoureux et al., 2007). B)

Los GAGs, como el hialuronato, el heparán sulfato y compuestos similares a la heparina, se encuentran en el citoplasma del ovocito, en las células de la granulosa y del COC, y en el líquido folicular (Salustri et al., 1999). Fuente: La imagen A se obtuvo de [https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/2-componentes\\_glucidos.php](https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/2-componentes_glucidos.php) y está basada en Lamoureux et al. (2007).

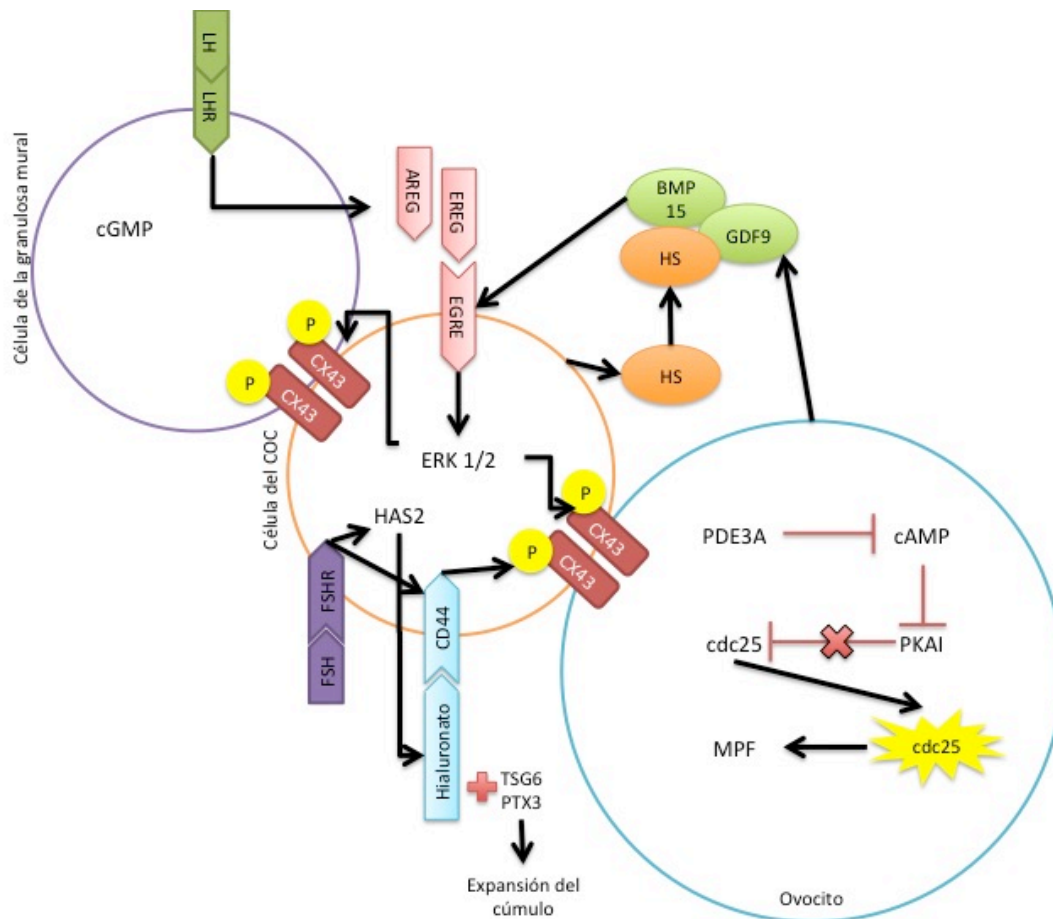


Figura 5. Acción de los GAGs en la maduración del ovocito. La oleada pre-ovulatoria de LH promueve la producción de factores similares al Factor de crecimiento epidérmico (EGF) que se unen al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en las células del cúmulo. El EGFR se expresa por el estímulo de la interacción de heparán sulfato (HS) secretado por las células del cúmulo y factores secretados por el ovocito, como el factor de crecimiento diferencial 9 (GDF9) y la proteína morfogénica ósea 15 (BMP15). El EGFR activa la vía de las MAPK, que hiper fosforilan la conexina 43 (Cx43) de las uniones comunicantes, inhibiendo la comunicación entre las células del cúmulo y el ovocito. El cGMP secretado por las células de la granulosa mural activan a la fosfodiesterasa 3A (PDE3A) en el ovocito, el cual degrada al cAMP, lo que inactiva a la proteína quinasa A-I (PKAI) y permite la activación de la fosfatasa cdc25 que se trasloca al núcleo y activa al factor promotor de la meiosis (MPF) (Nunes et al., 2015; Watson et al., 2012). Por otro lado, la FSH promueve en las células del cúmulo la síntesis de hialuronato sintasa 2 (HAS2), enzima que sintetiza ácido hialurónico o hialuronato, y CD44 (receptor del hialuronato). El hialuronato se une a CD44, el cual fosforila residuos de tirosina de la Cx43, rompiendo las uniones comunicantes, lo que evita el ingreso de cAMP al ovocito, la activación del MPF y la reanudación de la meiosis. Además, el hialuronato se une a otras

proteínas, formando una matriz rica en hialuronato que promueve la expansión del cúmulo (Yokoo and Sato, 2011). Fuente: Imagen redibujada de Nunes et al. (2015) y Yokoo & Sato (2011).

La heparina es un importante regulador de la modificación de la zona pelúcida para la fertilización, modificando su estructura y haciendo que sea más resistente a la penetración del espermatozoide (Batista et al., 2016). Se ha descrito la presencia de heparina en el citoplasma del ovocito, en el fluido folicular y en el fluido uterino, participando en la regulación de señales intracelulares durante la maduración del ovocito y en cultivos *in vitro* induce la expansión de las células del cúmulo en los COCs, promueve la producción de ácido hialurónico por los COCs, disminuye la producción de AMPc permitiendo la ruptura de la VG e induciendo la reanudación de la meiosis, actuando como un factor de maduración (Flores-Alonso et al., 2008). Por lo tanto, se ha propuesto que la heparina interviene durante la MIV de los ovocitos de ratón, modulando señales intracelulares y regulando su maduración (Watson et al., 2012). En otros trabajos se menciona que en condiciones normales de MIV, la exposición a heparina tiene efectos benéficos en la maduración de los ovocitos y en su potencial de desarrollo (Zeng et al., 2013).

## II. ANTECEDENTES

Dall et al. (2011) realizaron un estudio para determinar si el índice de masa corporal influye en el número y grado de madurez de los ovocitos obtenidos de pacientes de tratamientos de FIV bajo diferentes esquemas de estimulación ovárica. Las pacientes fueron separadas en tres grupos: peso normal (IMC 18.5-24.9 kg/m<sup>2</sup>), sobrepeso (IMC 24.9-29.9 kg/m<sup>2</sup>) y obesas (IMC > 30 kg/m<sup>2</sup>). Los resultados mostraron diferencias significativas en la maduración de los ovocitos entre los grupos, ya que a medida que aumentó el IMC se recuperaron menor número de ovocitos maduros (en etapa MII). Por lo tanto, concluyeron que el sobrepeso y la obesidad ejercen un impacto negativo en relación a la cantidad y madurez de los ovocitos.

Por su parte, Oliver et al., en el 2014, compararon los resultados reproductivos en función del IMC en pacientes sometidas a FIV y a inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI). Observaron un menor número de ovocitos recuperados, menor número de ovocitos maduros y menor número de embriones disponibles para transferencia conforme aumentó el IMC. Los investigadores concluyeron que el sobrepeso y la obesidad alteran los resultados reproductivos en tratamientos de FIV-ICSI.

Jungheim et al. (2011) analizaron la asociación entre la concentración de ácidos grasos libres o no esterificados (FFA) en el líquido folicular y la morfología de los COCs. Concluyeron que los FFA predominantes en el líquido folicular son los ácidos oleico, palmítico, esteárico y linoleico, y que elevadas concentraciones de FFA en el líquido folicular afectaron la función del folículo ovárico y se relacionaron con alteraciones en la morfología del COC y con baja calidad o maduración de los ovocitos. Además, argumentaron que dicho efecto puede ocurrir a través de efectos directos en el metabolismo de los ácidos grasos (clave para la maduración del ovocito) o inhibiendo las vías lipogénicas, importantes para la función de las células de la granulosa.

De igual forma, Dunning et al. (2014). describieron el papel de los lípidos en la maduración del ovocito. Mencionan que las lipoproteínas derivadas de la sangre son las que se encuentran principalmente en el líquido folicular y participan durante la maduración de los ovocitos al transportar triglicéridos a las células ováricas para producción de energía. Así, el metabolismo de los lípidos llevado a cabo por las células del COC es importante y benéfico durante la maduración de los ovocitos y el desarrollo posterior del embrión. Además, el tipo de ácidos grasos (saturados o insaturados) afecta la maduración de los ovocitos de diferente manera, los ácidos grasos insaturados optimizan la maduración de los ovocitos, mientras que los ácidos grasos saturados y una alta concentración de éstos perjudican la maduración de los

ovocitos.

Flores-Alonso et al., del 2008, pusieron a prueba la hipótesis de que la heparina es un componente natural del citoplasma del ovocito, del fluido folicular y del fluido uterino y que puede actuar como un factor de maduración en los ovocitos. Determinaron el tiempo de rompimiento de la VG y la formación del primer cuerpo polar al madurar ovocitos *in vitro* en medio salino (descrito por Keyhani y Storey en 1973) y TCM 199 suplementados con diferentes concentraciones de heparina. Observaron que al madurar ovocitos en medio salino con concentraciones de 1.0 y 6.5 mg/ml de heparina, el tiempo de ruptura de la VG se redujo 3 horas respecto al control, y el tiempo de formación del primer cuerpo polar se redujo de 22 a 11 horas, con un porcentaje de entre 43-64% de los ovocitos que llegaron a la etapa de MII. Al realizar la maduración en medio TCM 199 adicionado con 6.5 mg/ml de heparina, se redujo significativamente el tiempo de formación del cuerpo polar respecto al control. Por lo tanto, concluyeron que en ambos medios de cultivo las concentraciones de 1.0 y 6.5 mg/ml de heparina inducen la ruptura de la VG, la expulsión del primer cuerpo polar y el progreso del ovocito a la MII, lo cual indica que la heparina actúa como un factor que promueve la MIV, posiblemente, al incrementar la producción del ácido hialurónico y reducir la producción de AMPc por las células del COC, lo que induce la ruptura de la VG y la reanudación de la meiosis en los ovocitos.

Zeng et al. (2013) evaluaron los efectos de la interacción entre la heparina y el AMPc en la MIV de ovocitos de ratones y de humanos. Determinaron que entre la heparina y el AMPc hubo una interacción con efectos negativos en la maduración. Sin embargo, cuando los ovocitos se expusieron únicamente a heparina, entre un 55 y 65% de ovocitos alcanzaron la etapa de MII. Por lo que concluyeron que la exposición únicamente a heparina durante la MIV tiene efectos positivos en la maduración y en el potencial de desarrollo del ovocito.

### III. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que las mujeres obesas presentan problemas de salud reproductiva como irregularidades menstruales, subfertilidad e infertilidad, bajas tasas de implantación del embrión y mayores tasas de aborto, por lo que estas mujeres son candidatas a los tratamientos con TRA. Sin embargo, las mujeres obesas que se someten a estos tratamientos presentan bajas cantidades de ovocitos recuperados y ovocitos maduros y por consiguiente bajas tasas de éxito. La MIV de ovocitos y su posterior FIV puede ser un tratamiento efectivo en casos de subfertilidad. Además, la MIV tiene como ventajas evitar el síndrome de hiper-estimulación ovárica, es un tratamiento simple y no tiene un costo tan alto.

En los medios de MIV encontramos diversas sustancias, como las hormonas y los GAGs, que funcionan como factores clave para la maduración. La heparina, al incluirse en los medios de MIV, puede actuar como un factor de maduración, al participar en el desarrollo folicular, promover la expansión del COC y la ruptura de la VG e inducir la reanudación de la meiosis. De forma que, la MIV de ovocitos con medios suplementados con heparina puede ser una estrategia efectiva con la que se asegure la obtención de ovocitos maduros y el desarrollo del embrión en mujeres obesas infértiles o subfértiles.

Las ratas Zucker obesas son uno de los modelos animales de obesidad genética más utilizados. Debido a un carácter autosómico recesivo, presentan una mutación en el receptor de leptina, por lo que desarrollan alteraciones semejantes a las del síndrome metabólico en humanos como hiperfagia e hiperinsulinemia (Aleixandre y Miguel, 2008). Por lo tanto, las ratas Zucker obesas pueden ser un buen modelo para el estudio de los efectos negativos de la obesidad en la reproducción femenina.

### IV. OBJETIVOS

- GENERAL

Analizar los efectos de la heparina en la MIV de ovocitos obtenidos de ratas con obesidad genética.

- PARTICULARES

1. Comparar el número de ovocitos obtenidos de ratas con peso normal y con obesidad, con y sin estimulación con gonadotropinas exógenas.
2. Estudiar el efecto de la heparina en la MIV y viabilidad de los ovocitos obtenidos de ratas con peso normal y con obesidad genética, con y sin estimulación con gonadotropinas exógenas
3. Determinar el efecto de diferentes concentraciones de heparina en la MIV y viabilidad de los ovocitos obtenidos de ratas con peso normal y con obesidad genética, con y sin estimulación con gonadotropinas exógenas.

## V. HIPÓTESIS

Si la heparina actúa como un factor de maduración, al incrementar la producción del ácido hialurónico y reducir la producción de AMPc por las células del cúmulo, induciendo la ruptura de la VG y la reanudación de la meiosis en los ovocitos y, debido a que la obesidad provoca alteraciones en la maduración de ovocitos, entonces es posible postular que el suplemento de medios de MIV con heparina resultará ser beneficioso en el proceso de MIV en ovocitos de ratas obesas, incrementando el porcentaje de ovocitos en MII.

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras adultas (120 días de edad) de tres cepas:

- Long Evans (LE), grupo control con peso normal;

- Lean Zucker Diabetic Fatty (LZDF), ratas que no expresan la mutación en el receptor de leptina al ser heterocigotos, por lo que son delgadas;
- Obese Zucker Diabetic Fatty (OZDF) grupo de obesidad.

Todos los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de luz y oscuridad (luces encendidas de 06:00 a 18:00 horas) y temperatura de  $22 \pm 2$  °C. Todos los experimentos se llevaron a cabo en estricto apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

## 6.1 Diseño experimental

### 6.1.1 Grupos sin estimulación ovárica

Se emplearon 12 ratas hembras de las cepas LZDF y OZDF, y 11 ratas hembra de la cepa LE. Al cumplir los 120 días de edad, se llevó a cabo el sacrificio de los animales por sobredosis de barbitúricos administrados por vía intraperitoneal (Figura 6). Los ovocitos se obtuvieron directamente del ovario por disgregación (ovocitos inmaduros) y fueron colocados en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) . Se recolectaron para MIV los COCs con por lo menos 3 capas de células de la granulosa uniformes y compactas, y ovocito con zona pelúcida bien definida, con citoplasma finamente granular y uniforme.

Las variables que se midieron fueron: Peso del individuo, masa ovárica y número de ovocitos obtenidos de ovario. La masa ovárica se calculó sumando el peso de ambos ovarios en miligramos, el total se multiplicó por 100 y se dividió entre el peso total del individuo en gramos, por lo que las unidades de la masa ovárica se expresan en mg/100 gramos de peso corporal (gpc).



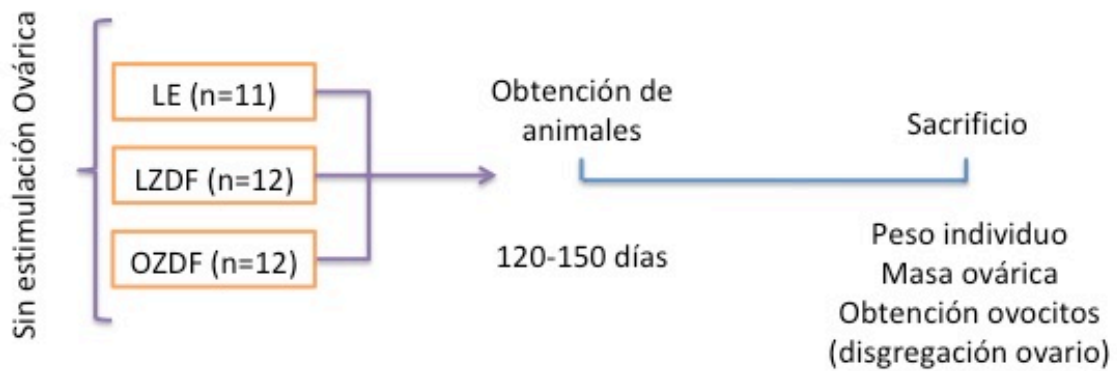


Figura 6. Diseño experimental para los grupos sin estimulación ovárica. LE=Long Evans; LZDF=Lean Zucker Diabetic Fatty; OZDF=Obese Zucker Diabetic Fatty.

### 6.1.2 Grupos con estimulación ovárica

Se emplearon 12 ratas hembras de cada cepa. Al cumplir los 120 días de edad se realizó la estimulación ovárica por medio de la administración vía intraperitoneal de 10 U.I. de gonadotropina coriónica de yegua preñada (PMSG) y posteriormente, a las 48 horas, se administró 8 U.I. de gonadotropina coriónica humana (HCG) vía intraperitoneal. El sacrificio se hizo 16 horas después de la administración de HCG, por sobredosis de barbitúricos administrados por vía intraperitoneal (Figura 7). Se obtuvieron los ovocitos del ovario (ovocitos inmaduros) y del oviducto por disgregación (ovocitos maduros) y fueron colocados en PBS. Se recolectaron para MIV los COCs obtenidos de ovario con los mismos criterios que en los grupos sin estimulación ovárica.

Las variables que se midieron fueron: Peso del individuo, masa ovárica, número de ovocitos obtenidos del ovario y número de ovocitos obtenidos del oviducto.



Figura 7. Diseño experimental para los grupos con estimulación ovárica.

## 6.2 MIV con exposición a heparina

Los ovocitos se pusieron en PBS al momento de la recuperación. Posteriormente, se seleccionaron los ovocitos que cumplieran con los criterios antes descritos y se colocaron en grupos de 1-5 ovocitos en gotas de 50  $\mu$ l de medio de maduración sumergidas en aceite mineral. Los ovocitos se incubaron para MIV durante 48 horas a 37° C en atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub>. Los ovocitos El medio utilizado para la maduración fue el medio TALP modificado, al cual no se le adicionó albúmina, por lo que se le nombró medio TLP (de Tyrode-Lactato-Piruvato): 114.06 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 8 mM Ca-Lactato-5H<sub>2</sub>O, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O, 0.35 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25.07 NaHCO<sub>3</sub>, 10 ml/L de Lactato sódico, 1.1 mM Na-Piruvato sódico, 5 mM Glucosa, 20 mg/ml de BSA y 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin.

Para analizar el efecto de la heparina en la maduración de los ovocitos, se probaron 3 concentraciones de heparina (Pisa Farmacéutica) en el medio de maduración: 1 mg/ml, 3 mg/ml y 6 mg/ml. Por lo tanto, los ovocitos obtenidos de ovario se maduraron en cuatro medios diferentes: TLP sin heparina, TLP + 1mg/ml de heparina, TLP + 3mg/ml de heparina y TLP + 6mg/ml de heparina (Figura 8).

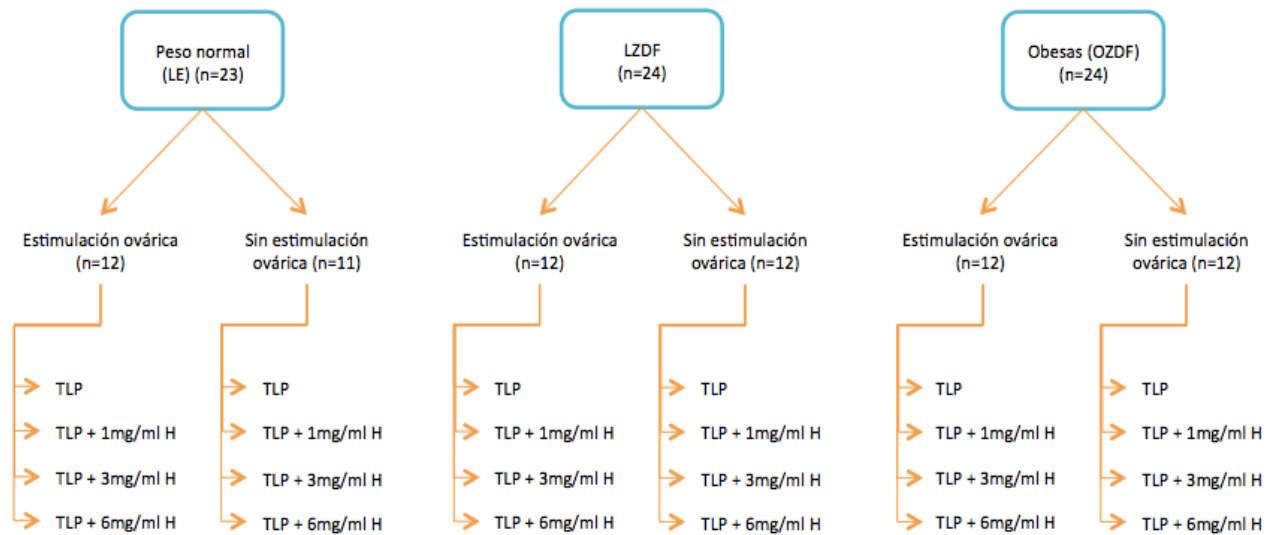


Figura 8. Esquematación del diseño experimental. LE=Long Evans; LZDF=Lean Zucker Diabetic Fatty; OZDF=Obese Zucker Diabetic Fatty; H= Heparina.

### 6.3 Evaluación de la maduración

La evaluación de la maduración se realizó a las 48 horas de cultivo en todos los grupos de acuerdo con el criterio descrito por Sprícigo et al. (2015), se consideraron como ovocitos maduros o en MII aquellos con citoplasma homogéneo, con células del cúmulo expandidas y con un cuerpo polar visible. Los ovocitos que presentaron señales de vacuolización fueron considerados como ovocitos alterados o no viables. Para corroborar la evaluación morfológica de la maduración, se realizó la tinción con diacetato de Fluoresceína (FDA) y yoduro de propidio (IP) para analizar la viabilidad de los ovocitos en un microscopio de fluorescencia. El FDA pasa a través de la membrana celular y es hidrolizado por las esterasas intracelulares liberando fluoresceína, que al acumularse induce fluorescencia verde al ser excitada con luz azul, permitiendo visualizar el citoplasma de células vivas. Mientras que el IP no puede atravesar la membrana de células vivas pero si atraviesa la membrana de células dañadas o muertas, en las que se intercala con el ADN y ARN formando un complejo fluorescente rojo brillante, permitiendo identificar células muertas.

## 6.4 Análisis estadístico

Las variables peso del individuo y masa ovárica se analizaron con la prueba de ANOVA de una vía, mientras que las variables ovocitos recuperados de ovario, ovocitos recuperados de oviducto y porcentaje de ovocitos maduros se analizaron con pruebas no paramétricas de  $X^2$  y Kruskal-Wallis. En todos los casos se consideró como diferencia estadísticamente significativa una  $p < 0.05$ .

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Peso de las ratas y masa ovárica

#### 7.1.1 Grupos sin estimulación ovárica

El peso de los individuos en los grupos sin estimulación ovárica (E.O.) fue  $210.14 \pm 13.4$  g en las ratas delgadas LE y  $188.5 \pm 28.31$  g en las ratas LZDF. Mientras que en las ratas obesas OZDF fue  $395 \pm 68.35$  g (Figura 9). Se observó una diferencia estadística en el peso de las ratas OZDF, siendo mayor que el peso de las ratas LE y LZDF (Figura 9).

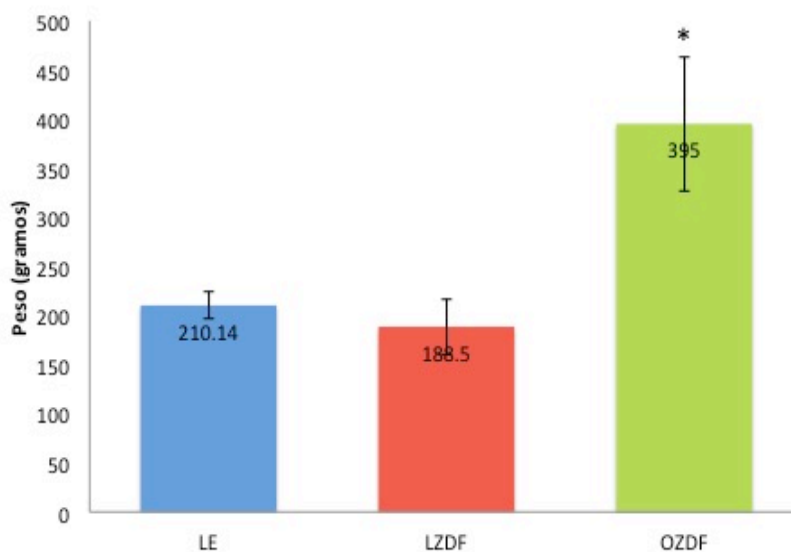


Figura 9. Media de los pesos de los individuos de cada grupo sin estimulación ovárica. \* $p < 0.05$  OZDF vs. LE y LZDF (prueba de ANOVA).

La masa ovárica de las ratas OZDF sin E.O. fue  $17.73 \pm 2.34$  mg/100 gpc, la cual resultó ser menor en comparación con la masa ovárica de las ratas delgadas LE y LZDF ( $28.57 \pm 4.25$  mg/100 gpc y  $31.48 \pm 4.92$  mg/100 gpc, respectivamente)(Figura 10).

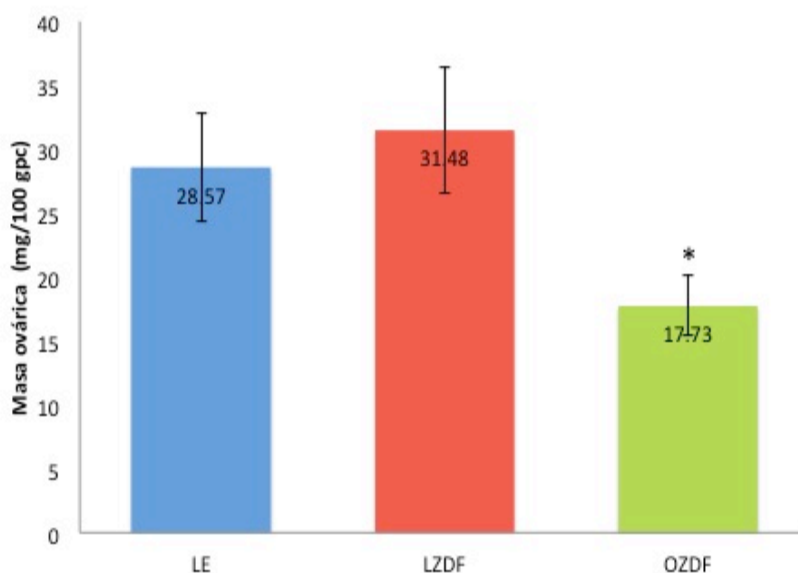


Figura 10. Media de la masas ováricas de cada grupo sin estimulación ovárica. \* $p < 0.05$  OZDF vs. LE y LZDF (prueba de ANOVA).

### 7.1.2 Grupos con estimulación ovárica

En los grupos con E.O., el peso de las ratas con peso normal (LE y LZ) fue  $179.5 \pm 16.81$  g y  $181.25 \pm 17.25$  g, respectivamente. Mientras que el peso de las ratas obesas OZDF fue  $301.17 \pm 31.72$  g (Figura 11). El peso de las ratas OZDF fue estadísticamente mayor que el peso de las ratas LE y LZDF (Figura 11).

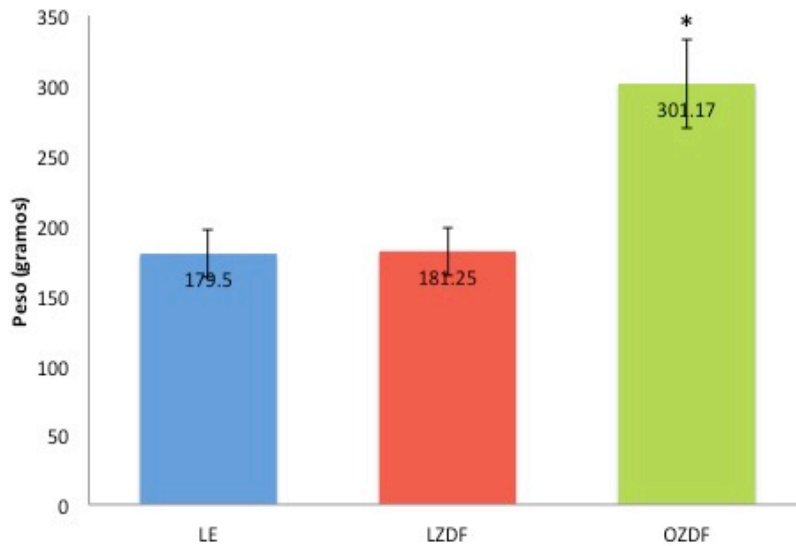


Figura 11. Media de los pesos de los individuos de cada grupo con estimulación ovárica. \* $p < 0.05$  OZDF vs. LE y LZDF (prueba de ANOVA).

Respecto a las masas ováricas en los grupos con E.O., en las ratas LE y LZDF fue  $44.23 \pm 7.9$  mg/100 gpc y  $42.89 \pm 6.93$  mg/100 gpc, respectivamente (Figura 12). La masa ovárica de las ratas OZDF fue  $26.82 \pm 5.02$  mg/100 gpc, y resultó estadísticamente menor en comparación con las masas ováricas de las ratas delgadas LE y LZDF (Figura 12).

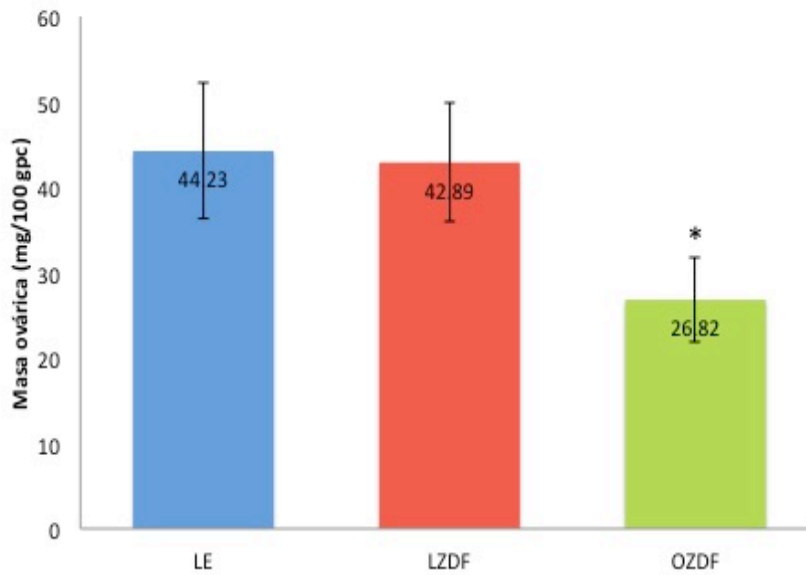


Figura 12. Media de la masas ováricas de cada grupo con estimulación ovárica. \* $p < 0.05$  OZDF vs. LE y LZDF (prueba de ANOVA).

Al comparar las masas ováricas entre grupos sin E.O. y grupos con E.O., se observó que las masas ováricas de los grupos con E.O. fueron mayores que las de los grupos sin E.O. (Figura 13). Siendo las masas ováricas de las ratas LE y LZDF con E.O. ( $44.23 \pm 7.9$  mg/100 gpc y  $42.89 \pm 6.93$  mg/100 gpc, respectivamente) estadísticamente mayores respecto al resto de los grupos. Mientras que la masa ovárica de las ratas OZDF sin E.O. ( $17.73 \pm 2.34$  mg/100 gpc) fue la más baja entre todos los grupos (Figura 13).

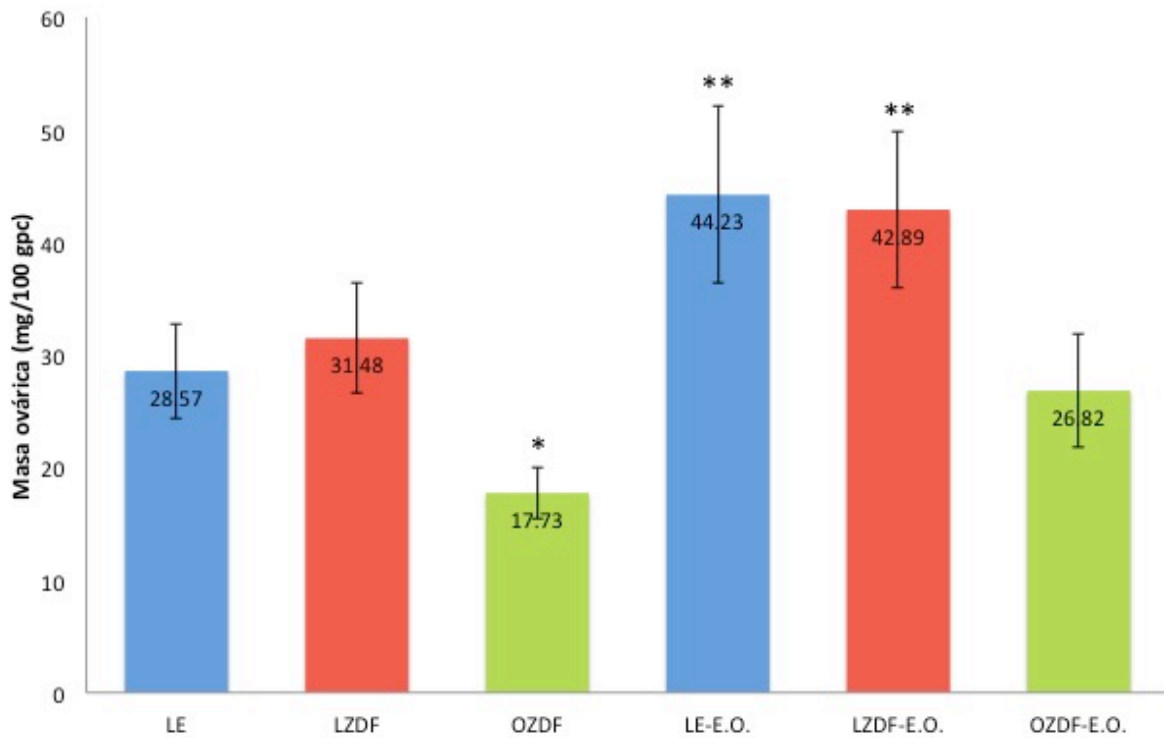


Figura 13. Media de las masas ováricas en todos los grupos. \* $p < 0.05$  OZDF vs. LE, LZDF, LE-E.O., LZDF-E.O. y OZDF-E.O. (prueba de ANOVA); \*\* $p < 0.05$  LE-E.O. y LZDF-E.O. vs. LE, LZDF y OZDF-E.O. (prueba de ANOVA).

## 7.2 Recuperación de ovocitos

### 7.2.1 Grupos sin estimulación ovárica

Las ratas se sacrificaron al cumplir 120 días de edad y se obtuvieron los ovarios para la recuperación de ovocitos. Se recuperaron en total 319 ovocitos de 11 ratas con peso normal (LE) ( $29 \pm 13.16$ ), 278 de 12 ratas LZDF ( $23.17 \pm 6.85$ ) y 205 de 12 ratas obesas (OZDF) ( $17.08 \pm 5.02$ ) (Figura 14). Se observó una disminución en el número de ovocitos recuperados de ratas obesas OZDF comparado con las ratas delgadas LE sin E.O. ( $17.08 \pm 5.02$  y  $29 \pm 13.16$ , respectivamente) (Figura 14).



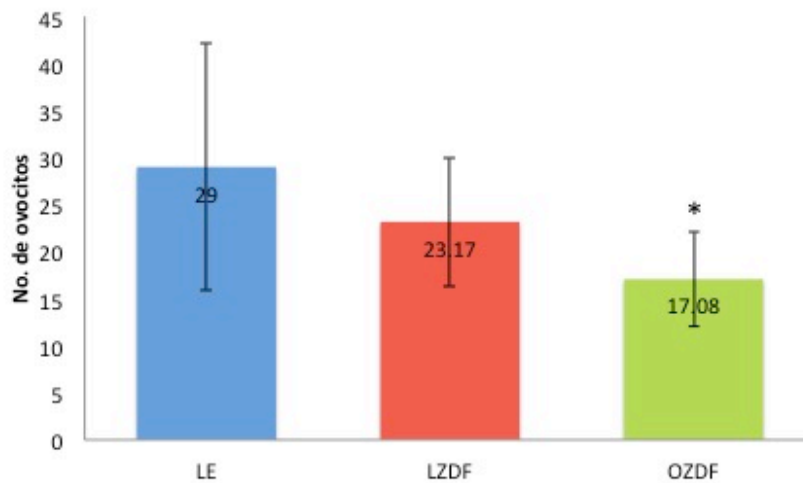


Figura 14. Media de ovocitos recuperados de ovario de ratas sin estimulación ovárica. \* $p < 0.05$  OZDF vs. LE (prueba de Kruskal-Wallis).

### 7.2.2 Grupos con estimulación ovárica

En el caso de los animales con E.O., se recuperaron en total 249 ovocitos de 12 ratas LE ( $20.75 \pm 9.11$ ), 203 de 12 ratas LZDF ( $16.92 \pm 7.98$ ) y 138 de 12 ratas OZDF ( $11.5 \pm 5.96$ ) (Figura 15). De igual forma, se observó una disminución en el número de ovocitos recuperados de ratas OZDF comparado con las ratas LE ( $11.5 \pm 5.96$  y  $20.75 \pm 9.11$ , respectivamente) (Figura 15).

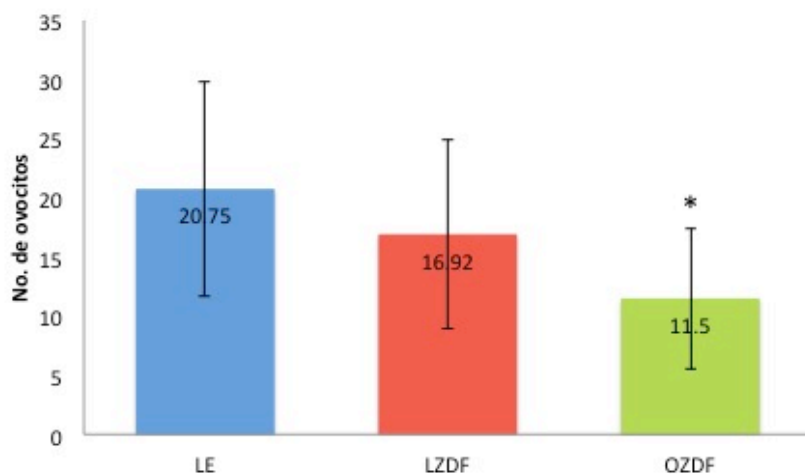


Figura 15. Media de ovocitos recuperados de ovario de ratas con estimulación ovárica. \* $p < 0.05$  OZDF vs. LE (prueba de Kruskal-Wallis).

En los grupos de animales con E.O. también se obtuvieron los ovocitos directamente del oviducto, con un total de 119 ovocitos recuperados de 12 ratas LE ( $9.92 \pm 2.47$ ), 95 de 12 ratas LZDF ( $7.92 \pm 4.23$ ) y 74 de 12 ratas OZDF ( $6.17 \pm 3.24$ ) (Figura 16). Se observó una disminución en el número de ovocitos recuperados de oviducto de ratas obesas ( $6.17 \pm 3.24$ ) comparado con las ratas delgadas LE ( $9.92 \pm 2.47$ ) (Figura 16).

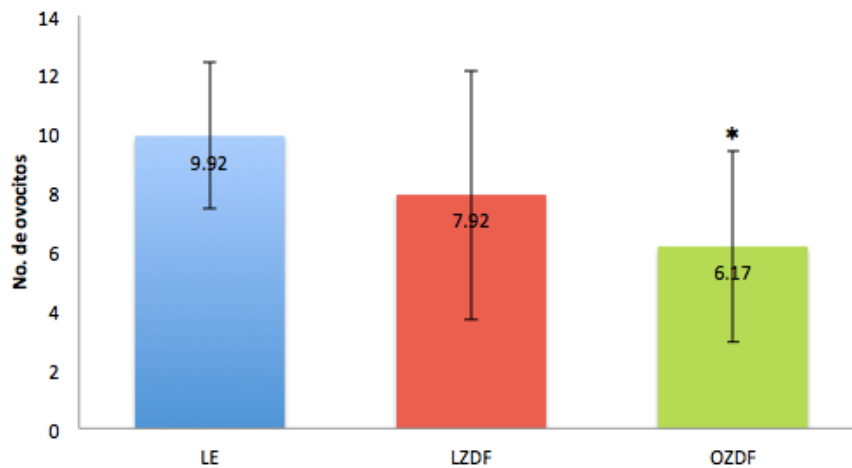


Figura 16. Media de ovocitos recuperados directamente de oviducto en cada uno de los grupos con estimulación ovárica. \* $p < 0.05$  OZDF vs. LE (prueba de Kruskal-Wallis).

### 7.2.3 Primer resumen de resultados

El peso de las ratas obesas OZDF sin y con E.O. fue mucho mayor que el peso de las ratas delgadas (LE y LZDF), consideradas ratas con peso normal (Tabla 1). Se observó que la masa ovárica de las ratas obesas sin E.O. disminuye drásticamente en comparación con las ratas delgadas (Tabla 1). Al realizar la estimulación ovárica con gonadotropinas, la masa ovárica de las ratas delgadas aumenta considerablemente. En las ratas OZDF, hay una recuperación en la masa ovárica con la estimulación ovárica, llegando a ser similar a la masa ovárica de las ratas

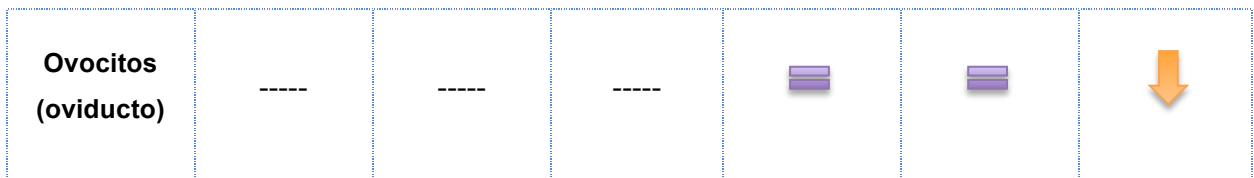
delgadas sin E.O. (Tabla 1).

Respecto a la recuperación de ovocitos, de las ratas obesas se recuperaron menor número de ovocitos de ovario en comparación con las ratas delgadas, tanto en los grupos sin E.O. como en los grupos con E.O. (Tabla 1). Al analizar la cantidad de ovocitos recuperados de oviducto después de la estimulación ovárica, se observó una disminución en el número de ovocitos recuperados de ratas obesas comparado con las ratas delgadas (Tabla 1).

Tabla 1. Relación entre el grupo, peso corporal, masa ovárica, ovocitos recuperados de ovario y ovocitos recuperados de oviducto. El signo igual morado representa que no hubo diferencias entre los grupos, la flecha azul hacia arriba indica que hubo un aumento comparado con los demás grupos y la flecha naranja hacia abajo indica que hubo una disminución comparado con los demás grupos.



Variable	Sin estimulación ovárica			Con estimulación ovárica		
<b>Peso corporal</b>	=	=	↑	=	=	↑
<b>Masa ovárica</b>	=	=	↓ ↓	↑	↑	=
<b>Ovocitos (ovario)</b>	=	=	↓	=	=	↓



### 7.3 Análisis de maduración

La evaluación de la maduración se realizó a las 48 horas de MIV en todos los grupos. Aquellos ovocitos con citoplasma homogéneo, con un cuerpo polar visible y/o con células del cúmulo expandidas fueron considerados como ovocitos maduros (Figura 17-A). Para corroborar la evaluación morfológica de la maduración y analizar la viabilidad de los ovocitos, se realizó la tinción con FDA y IP, los ovocitos cuya fluorescencia fue de color verde fueron considerados maduros y viables (Figura 17-B).

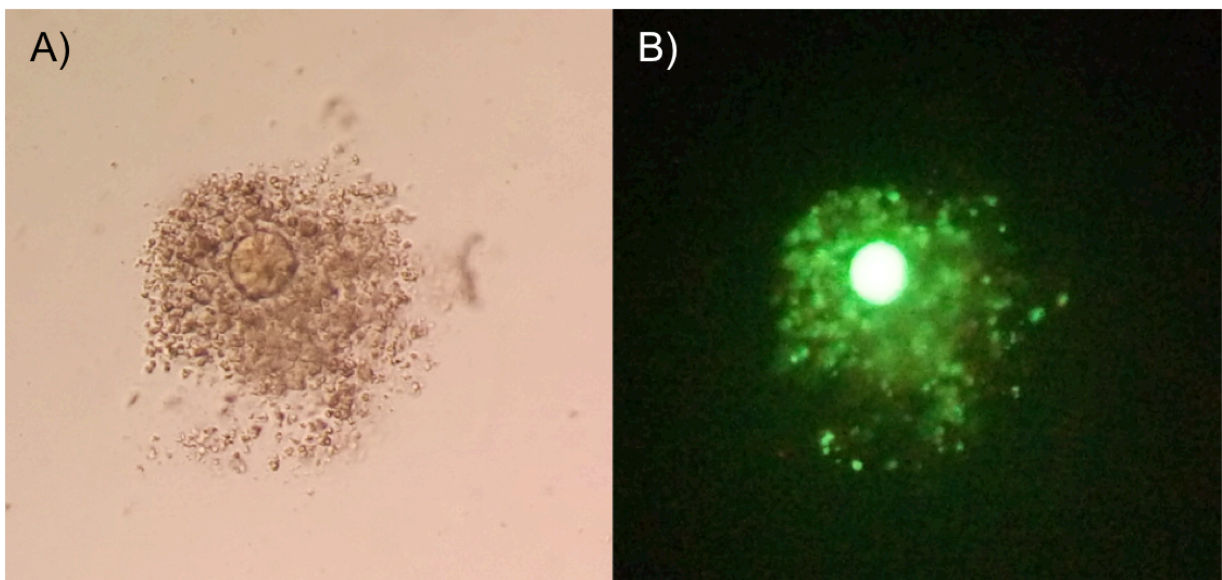


Figura 17. A) Ovocito maduro con citoplasma homogéneo y células del cúmulo expandidas; B) El mismo ovocito maduro viable analizado con la prueba de FDA y IP. Aumento a 40x.

#### 7.3.1 Maduración en medio TLP

Para los grupos LE, LZDF y OZDF sin estimulación ovárica, el porcentaje de ovocitos que maduraron después de 48 horas de cultivo en el medio TLP fue 68.92% (n=51), 68.18% (n=45) y 72.55% (n=37) (Figura 18). No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células que maduraron en medio TLP entre grupos.

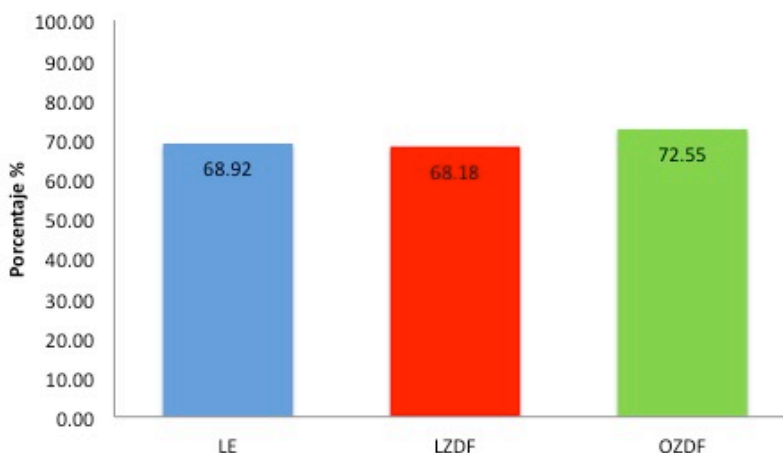


Figura 18. Porcentaje de ovocitos madurados *in vitro* de ratas sin estimulación ovárica en medio TLP.

Por otro lado, los porcentajes de ovocitos que alcanzaron la madurez de ratas con estimulación ovárica (E.O.) después de 48 horas de cultivo en medio TLP fueron: LE=53.7% (n=29), LZDF=62.22% (n=28) y OZDF=56.67% (n=17) (Figura 19). No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células que maduraron en medio TLP entre grupos.

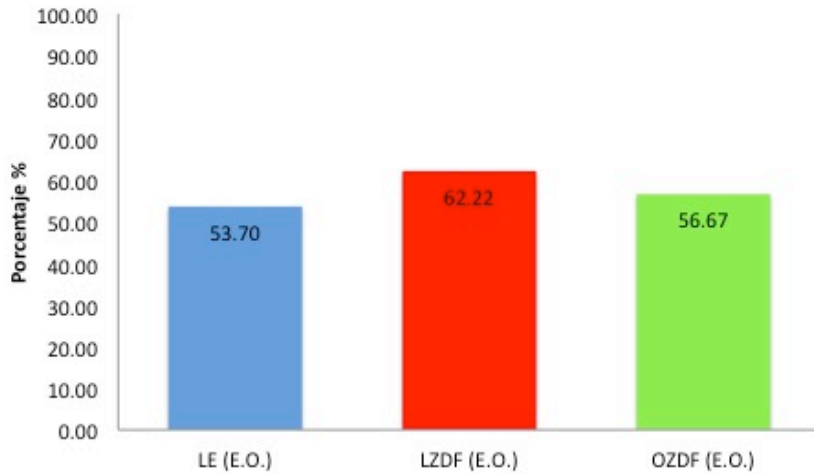








Figura 19. Porcentaje de ovocitos madurados *in vitro* de ratas con estimulación ovárica en medio TLP.

### 7.3.2 Segundo resumen de resultados.

Después de 48 horas de MIV en medio TLP, no hubo diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos que alcanzaron la madurez entre las ratas delgadas y las ratas obesas sin E.O. (Tabla 2). En los grupos con estimulación ovárica se observa una ligera disminución en el porcentaje de células que maduraron respecto a los grupos sin E.O., sin embargo, tampoco se observan diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos maduros entre las ratas delgadas y las ratas obesas con E.O. (Tabla 2).

Tabla 2. Relación entre el grupo y el porcentaje de ovocitos madurados *in vitro* en medio TLP. Las flechas naranjas representan una disminución en el porcentaje de maduración respecto a los grupos sin estimulación ovárica (disminución no significativa).

	(LE)	(LZDF)	(OZDF)	(LE)	(LZDF)	(OZDF)
% de maduración	Sin estimulación ovárica			Con estimulación ovárica		

TLP	 68.92%	 68.18%	 72.55%	 53.7%	 62.22%	 56.67%
-----	---	---	---	--	---	---

### 7.3.3 Maduración con diferentes concentraciones de heparina

#### 7.3.3.1 Medio TLP adicionado con 1mg/ml de heparina

En el medio TLP+1mg/ml de heparina los porcentajes de ovocitos maduros para los grupos sin estimulación ovárica fueron: LE= 79.71% (n=55), LZDF 67.16% (n=45) y OZDF 65.13% (n=32) (Figura 20); se observó un aumento en el porcentaje de células que maduraron en el grupo LE (79.71%) respecto a los grupos LZDF y OZDF ( $\chi^2$ ,  $p<0.05$ ). Al analizar cada cepa por separado, no se encuentran diferencias entre el medio TLP+1mg/ml de heparina y el medio control (TLP) en el porcentaje de ovocitos madurados *in vitro* de las ratas delgadas LE y LZDF, así como en las ratas obesas OZDF sin E.O. Sin embargo, en las ratas delgadas LE se observa un ligero aumento en el porcentaje de ovocitos que alcanzaron la madurez, aunque esta diferencia no es significativa (Figura 20).

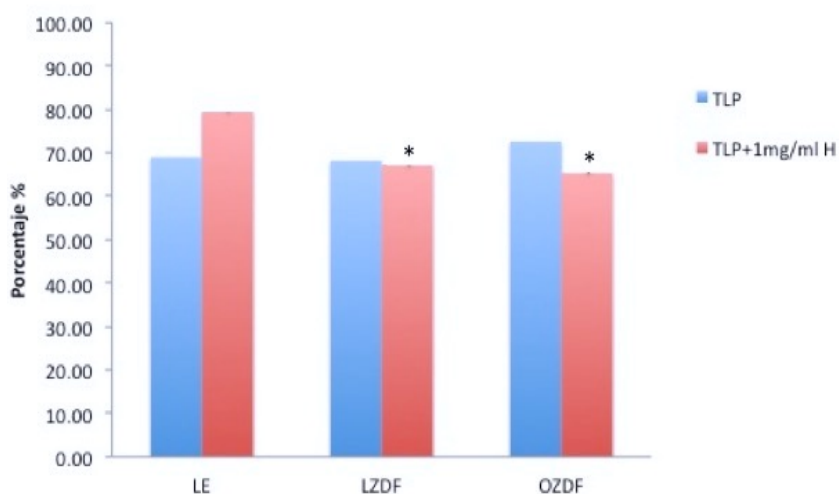


Figura 20. Porcentaje de ovocitos madurados *in vitro* de ratas LE, LZDF y OZDF sin estimulación

ovárica en el medio TLP+1mg/ml en comparación con el grupo control (TLP). \* $p < 0.05$  LZDF y OZDF vs. LE (prueba de  $\chi^2$ ).

Para los grupos con E.O., el 72.22% (n=39) de ovocitos LE, el 62.22% (n=28) de ovocitos LZDF y el 66.67% (n=20) de ovocitos OZDF alcanzaron la maduración después de 48 horas de cultivo en el medio TLP+1mg/ml de heparina (Figura 21). Al analizar los grupos con E.O. por separado, no se encuentran diferencias entre el medio TLP+1mg/ml de heparina y el medio control (TLP) en el porcentaje de ovocitos que alcanzaron la madurez de ratas delgadas LZDF ni en las ratas obesas OZDF, aunque en las ratas OZDF se observa un ligero aumento en el porcentaje de células que maduraron, sin que este aumento sea significativo. En cambio, en las ratas delgadas LE se observa un aumento significativo en el porcentaje de ovocitos que maduraron en el medio TLP+1mg/ml de heparina respecto al medio control ( $\chi^2$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 21).

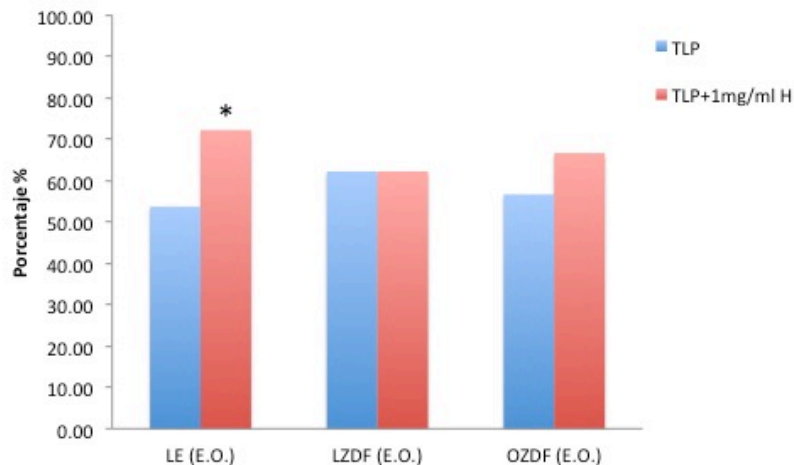


Figura 21. Porcentaje de ovocitos madurados *in vitro* de ratas LE, LZDF y OZDF con estimulación ovárica en el medio TLP+1mg/ml de heparina en comparación con el grupo control (TLP). \* $p < 0.05$  LE-TLP+1mg/ml de heparina vs. LE-TLP (prueba de  $\chi^2$ ).

### 7.3.3.2 Medio TLP adicionado con 3mg/ml de heparina



En el medio TLP+3mg/ml de heparina el 77.78% (n=56) de ovocitos de ratas LE sin E.O., el 73.91% (n=51) de ovocitos de ratas LZDF sin E.O. y el 78% (n=39) de ovocitos de ratas OZDF sin E.O. alcanzaron la maduración después de 48 horas de cultivo (Figura 22). Al analizar cada cepa por separado, no se encuentran diferencias entre el medio TLP+3mg/ml de heparina y el medio control (TLP) en el porcentaje de ovocitos maduros de ratas LE, LZDF y OZDF sin E.O. Sin embargo, en los tres grupos de ratas se observa un ligero aumento en el porcentaje de células que maduraron respecto al medio TLP, sin que este aumento sea significativo (Figura 22).

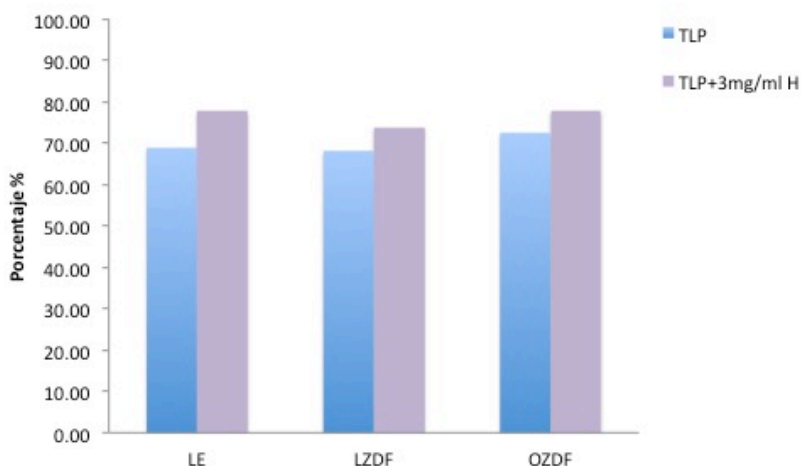


Figura 22. Porcentaje de ovocitos madurados *in vitro* de ratas LE, LZDF y OZDF sin estimulación ovárica en el medio TLP+3mg/ml en comparación con el grupo control (TLP).

Mientras tanto, para los grupos LE, LZDF y OZDF con E.O. los porcentajes de ovocitos que alcanzaron la maduración en el medio TLP+3mg/ml de heparina fueron 59.26% (n=32), 68.89% (n=31) y 56.67% (n=17), respectivamente (Figura 23). Al analizar los grupos con E.O. por separado, no se encuentran diferencias entre el medio TLP+3mg/ml de heparina y el medio TLP en el porcentaje de ovocitos maduros de las ratas LE, LZDF y OZDF (Figura 23).

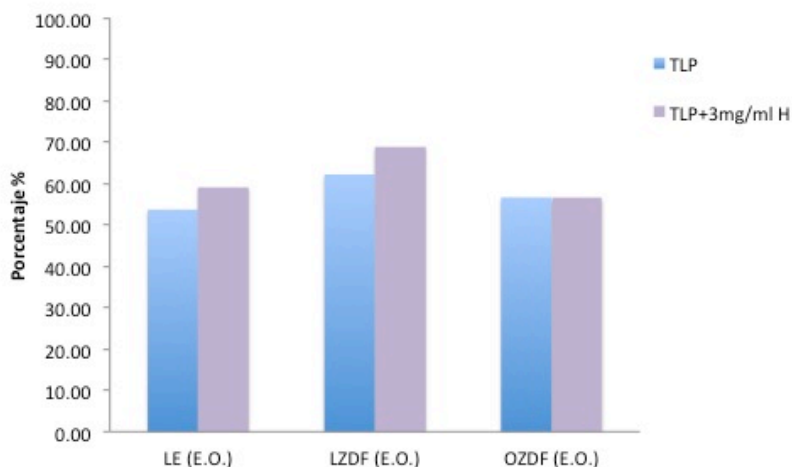


Figura 23. Porcentaje de ovocitos madurados *in vitro* de ratas LE, LZDF y OZDF con estimulación ovárica en el medio TLP+3mg/ml de heparina en comparación con el grupo control (TLP).

### 7.3.3.3 Medio TLP adicionado con 6mg/ml de heparina

En el medio TLP+6mg/ml de heparina, el porcentaje de ovocitos que alcanzaron la madurez para los grupos LE, LZDF y OZDF sin E.O. fueron 72% (n=54), 72.58% (n=45) y 68.75% (n=33), respectivamente (Figura 24). Al analizar los grupos sin E.O. por separado, no se encuentran diferencias entre el medio TLP+6mg/ml de heparina y el medio TLP en el porcentaje de células que maduraron de las ratas de los tres grupos (Figura 24).

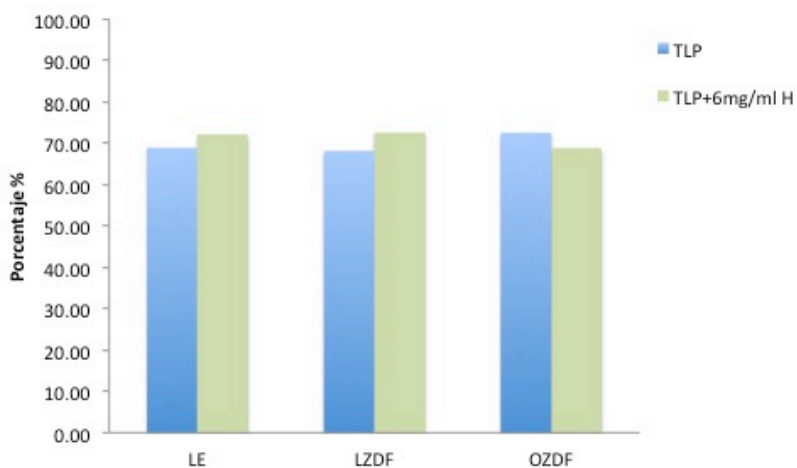


Figura 24. Porcentaje de ovocitos madurados *in vitro* de ratas LE, LZDF y OZDF sin estimulación

ovárica en el medio TLP+6mg/ml en comparación con el grupo control (TLP).

Por último, los porcentajes de ovocitos que maduraron en el medio TLP+6mg/ml de heparina para los grupos con E.O. fueron: LE=57.41% (n=31), LZDF=57.78% (n=26) y OZDF=56.67% (n=17) (Figura 25). Al analizar cada cepa por separado, no se encuentran diferencias entre el medio TLP+6mg/ml de heparina y el medio TLP en el porcentaje de ovocitos maduros de las ratas de los tres grupos con E.O. (Figura 25).

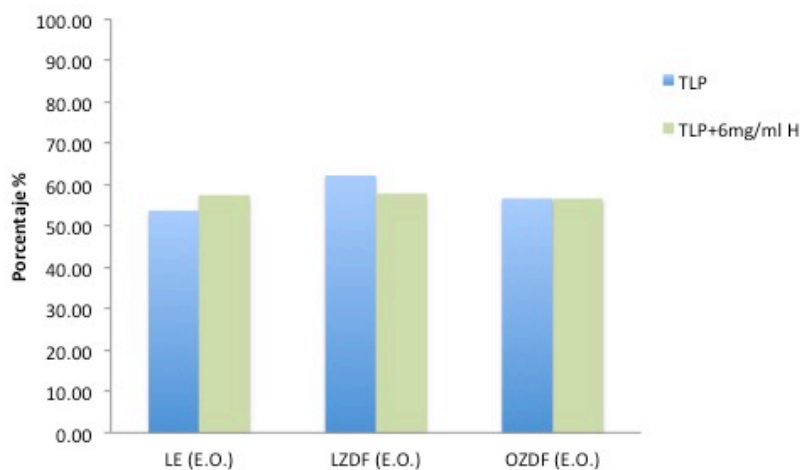


Figura 25. Porcentaje de ovocitos madurados *in vitro* de ratas LE, LZDF y OZDF con estimulación ovárica en el medio TLP+6mg/ml de heparina en comparación con el grupo control (TLP).

#### 7.3.4 Tercer resumen de resultados

Se observó un aumento en el porcentaje de ovocitos madurados *in vitro* de ratas LE sin E.O. (vs LZDF y OZDF) en el medio TLP+1mg/ml de heparina (Tabla 3). Al comparar el porcentaje de ovocitos que maduraron en los medios con las diferentes concentraciones de heparina y el medio control (TLP) no se encuentran diferencias significativas en los grupos sin E.O. Sin embargo, en las ratas delgadas LE se observa un ligero aumento en el porcentaje de ovocitos que maduraron en los medios TLP+1mg/ml de heparina y TLP+3mg/ml de heparina (aumento no significativo); y en las ratas obesas se observa un ligero aumento en el porcentaje de células que maduraron en el medio TLP+3mg/ml de heparina (aumento no

significativo) (Tabla 3).

En los grupos con E.O., al comparar el porcentaje de ovocitos que maduraron en los medios con las diferentes concentraciones de heparina y el medio control (TLP) no se encuentran diferencias significativas, excepto en las ratas delgadas LE, donde se observa un aumento significativo en el porcentaje de células que maduraron en el medio TLP+1mg/ml de heparina (Tabla 3). En las ratas obesas se observa un ligero aumento en el porcentaje de ovocitos madurados en el medio TLP+1mg/ml de heparina, aunque este aumento no es significativo (Tabla 3).

Tabla 3. Relación entre el grupo y el porcentaje de ovocitos madurados *in vitro* en los medios TLP, TLP+1mg/ml de heparina, TLP+3mg/ml de heparina y TLP+6mg/ml de heparina. \* $p < 0.05$  LZDF y OZDF vs. LE (prueba de  $X^2$ ); \*\* $p < 0.05$  LE (E.O.)-TLP+1mg/ml de heparina vs. LE (E.O.)-TLP (prueba de  $X^2$ ).



% de maduración	Sin estimulación ovárica			Con estimulación ovárica		
	(LE)	(LZDF)	(OZDF)	(LE)	(LZDF)	(OZDF)
TLP	68.92%	68.18%	72.55%	53.7%**	62.22%	56.67%
TLP+1mg/ml de heparina	79.71%*	67.16%*	65.13%*	72.22%**	62.22%	66.67%
TLP+3mg/ml de heparina	77.78%	73.91%	78%	59.26%	68.89%	56.67%
TLP+6mg/ml de heparina	72%	72.58%	68.75%	57.41%	57.78%	56.67%

## VIII. DISCUSIÓN

La obesidad se relaciona con diversos problemas reproductivos, entre los que se encuentran alteraciones en el metabolismo y maduración del ovocito. Dall et al. (2011) y Oliver et al. (2014) describieron una disminución en el número de ovocitos recuperados y en el número de ovocitos maduros conforme aumenta el IMC de mujeres sometidas a FIV, siendo las mujeres con obesidad las que tuvieron menor cantidad de ovocitos y de ovocitos maduros. En el presente trabajo, de las ratas OZDF se obtuvieron en promedio  $17.08 \pm 5.02$  ovocitos recuperados de ovario o inmaduros y  $6.17 \pm 3.24$  ovocitos maduros o recuperados de oviducto, lo cual fue estadísticamente menor a la cantidad de ovocitos recuperados de ovario ( $29 \pm 13.16$ ) y de oviducto ( $9.92 \pm 2.47$ ) de ratas delgadas LE. Nuestros datos concuerdan con lo reportado por Dall et al. (2011) y Oliver et al. (2014).

La estimulación ovárica por administración de gonadotropinas no revirtió el efecto de la obesidad en la cantidad de ovocitos recuperados de ratas OZDF (LE=  $20.75 \pm 9.11$  y OZDF=  $11.5 \pm 5.96$ ). Esto puede deberse a que en todos los grupos se utilizó la misma dosis de gonadotropinas. Diversos estudios mencionan que las mujeres obesas sometidas a TRA requieren dosis más grandes y más días de tratamiento para lograr una estimulación ovárica similar a la mujeres con un IMC entre  $20 \text{ kg/m}^2$  y  $25 \text{ kg/m}^2$  (The ESHRE Capri Workshop Group, 2006; Dall Agnoletta et al., 2011; Barrios-De-Tomasi, et al., 2013; Oliver Sánchez et al., 2014; Ozekinci et al., 2015). Además, la obesidad puede alterar señales metabólicas maternas, las cuales modifican el ambiente folicular, afectando, consecuentemente, el metabolismo y maduración de los ovocitos. Esto quiere decir que las condiciones en las que se desarrolla el ovocito afectan su metabolismo y maduración, por lo tanto, si el desarrollo del ovocito se lleva a cabo en condiciones adversas, la maduración del ovocito se verá afectada (Purcell and Moley, 2011). La concentración de ácidos

grasos del líquido folicular se modifica por la dieta materna, una concentración elevada de ácidos grasos libres en el líquido folicular afecta negativamente la función folicular y se asocia con alteraciones en la maduración de los ovocitos (Jungheim et al., 2011; Dunning et al., 2014; Valckx et al., 2014; Gu et al., 2015). Además, la señalización alterada de insulina y altas concentraciones de glucosa circulante afectan la función folicular ovárica, aumentando la tasas de apoptosis en células de la granulosa y provocando anomalías mitocondriales en los ovocitos, alterando la maduración (Jungheim et al., 2010; Jungheim et al., 2011; Purcell and Moley, 2011; Grindler and Moley, 2013). Además, se ha reportado en ratones, una asociación entre la obesidad y una mayor generación de EROs, estrés oxidativo, alteraciones mitocondriales y apoptosis temprana de los folículos ováricos, provocando una disminución en las tasas de maduración de ovocitos *in vivo* (Hou et al., 2016). El metabolismo energético alterado de los ovocitos, como respuesta a señales nutricionales maternas, puede explicar el hecho de que se recuperen menor cantidad de ovocitos maduros de ratas obesas y que la estimulación ovárica con gonadotropinas no mejore este parámetro.

En nuestro estudio, el porcentaje de ovocitos madurados *in vitro* obtenidos de ratas sin estimulación ovárica en los cuatro tratamientos osciló entre 65% y 80%, mientras que el porcentaje de ovocitos madurados *in vitro* obtenidos de ratas con estimulación ovárica osciló entre 53% y 72%. Estos datos concuerdan con los reportados por Flores-Alonso et al. (2008) y por Zeng et al. (2013) quienes mencionan entre 43-64% y 55-65%, respectivamente, de ovocitos que alcanzaron la etapa de MII.

En las ratas delgadas LE, con y sin estimulación ovárica, el porcentaje de ovocitos que maduraron en el medio TLP adicionado con 1mg/ml de heparina aumentó ligeramente en comparación con el resto de los medios y fue significativamente mayor en comparación con el resto de los medios de maduración, así como en comparación con las ratas LZDF y OZDF. Lo que concuerda con lo reportado por Flores-Alonso et al. en el 2008, quienes mencionan que la concentración de heparina

más efectiva para la maduración de ovocitos bovinos fue de 1mg/ml de heparina, siendo esta concentración en la que obtuvieron entre 43% y 64% de ovocitos que alcanzaron la etapa de MII. También, Zeng et al. en el 2013 reportó que la adición de heparina en los procesos de pre-MIV y MIV promueven la maduración de ovocitos de ratón de 55 a 65%. Sin embargo, para las ratas obesas OZDF sin estimulación ovárica, el medio TLP adicionado con 3 mg/ml de heparina fue el más efectivo para la MIV, siendo el porcentaje de ovocitos que maduraron en este medio mayor respecto a los demás medios de maduración y siendo similar al porcentaje de maduración de ratas LE. La concentración de 6 mg de heparina no tuvo efecto en la MIV de ovocitos de ratas delgadas ni de ovocitos de ratas obesas. Flores-Alonso et al. (2008) mencionan que conforme aumenta la concentración de heparina en el medio de maduración, aumenta el porcentaje de ovocitos con fragmentación del ADN, esto puede explicar por qué la concentración de 6 mg de heparina no tuvo efecto en la MIV.

Se ha descrito la presencia de heparina en el fluido folicular y en el citoplasma del ovocito, donde regula señales intracelulares, promoviendo la producción de ácido hialurónico (Flores-Alonso et al., 2008), lo que provoca una disminución en la producción de AMPc, permitiendo la expansión de las células de la granulosa y la activación del factor promotor de la maduración (Ball et al., 1982). Además, se ha propuesto que la heparina puede actuar de forma similar al heparán sulfato, reduciendo la generación de EROs y estrés oxidativo, regulando la función mitocondrial y participando en señales intracelulares para la correcta maduración de los ovocitos, su fertilización y el posterior desarrollo embrionario (Kim et al., 2018). Por lo tanto, una posible explicación al efecto promotor de la maduración de la heparina en la MIV de ovocitos de ratas LE, LZDF y OZDF es que la heparina actúa en la maduración del ovocito de forma similar al ácido hialurónico (uniéndose a CD44) y/o al heparán sulfato (interactuando con factores secretados por el ovocito) (Figura 26).

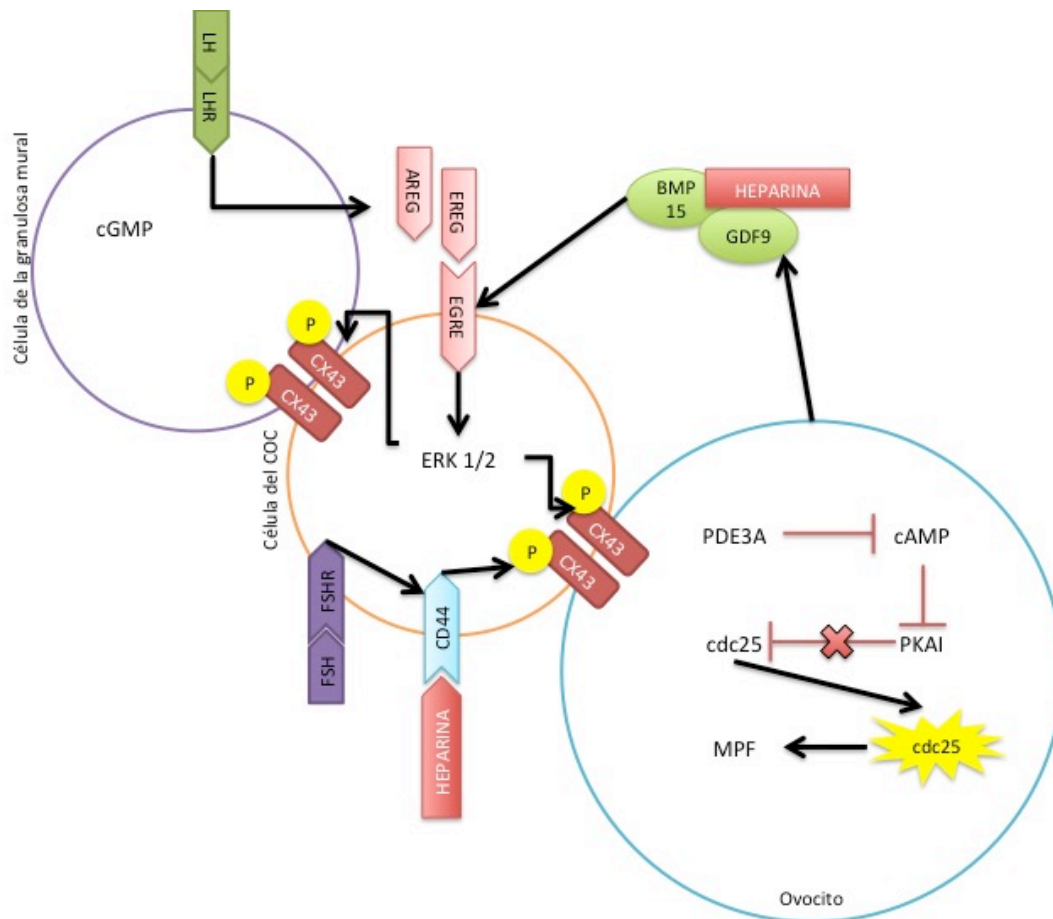


Figura 26. Posibles mecanismos de acción de la heparina en la maduración del ovocito. La heparina puede actuar de forma similar al ácido hialurónico o hialuronato, uniéndose a CD44, el cual fosforila residuos de tirosina de la conexina 43 (Cx43), rompiendo las uniones comunicantes, lo que evita el ingreso de cAMP al ovocito. La disminución de cAMP inactiva a la PKAI y permite la activación de la fosfatasa cdc25 que se trasloca al núcleo y activa al factor promotor de la meiosis (MPF) y la reanudación de la meiosis. Por otro lado, la heparina puede actuar de forma similar al heparán sulfato, interactuando con factores secretados por el ovocito como GDF9 y BMP15, y en conjunto, promoviendo la expresión de EGFR y la unión con sus ligandos (factores similares a EGF). Una vez activado por el ligando, EGFR activa MAPK, que hiperfosforila a Cx43, rompiendo uniones comunicantes, inhibiendo la comunicación entre las células del cúmulo y el ovocito, y promoviendo la reanudación de la meiosis. Fuente: Imagen redibujada y modificada de Nunes et al. (2015) y Yokoo & Sato (2011).



## IX. CONCLUSIONES

La obesidad se relaciona con una disminución en el número de ovocitos recuperados tanto de ovario (ovocitos inmaduros) como de oviducto (maduros) de ratas adultas. Además, la estimulación ovárica con gonadotropinas no revierte el efecto negativo de la obesidad en la cantidad de ovocitos recuperados de ratas adultas. Por lo que la obesidad afecta directamente en los mecanismos intraováricos responsables del metabolismo y maduración de los ovocitos.

La heparina en concentraciones de 1mg/ml y 3 mg/ml promueve la maduración de los ovocitos tanto de ratas delgadas como de ratas obesas. Por lo tanto, la heparina actúa como un factor de maduración en los medio de MIV.

## X. BIBLIOGRAFÍA

Adamiak, S.J., Mackie, K., Watt, R.G., Webb, R., and Sinclair, K.D. (2005). Impact of Nutrition on Oocyte Quality: Cumulative Effects of Body Composition and Diet Leading to Hyperinsulinemia in Cattle<sup>1</sup>. *Biol. Reprod.* 73, 918–926.

Albertini, D.F. (2015). The Mammalian Oocyte. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, (Elsevier), pp. 59–97.

Aleixandre, A., and Miguel, M. (2008). Ratas Zucker como modelo experimental para el estudio de diferentes enfermedades. *Endocrinol. Nutr.* 55, 217–222.

Barrios-De-Tomasi, J., Barrios-De-Tomasi, E., and Vergara-Galicia, J. (2013). Efecto de la obesidad en la reproducción femenina. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 44, 8–18.

Batista, R.I.T.P., Moro, L.N., Corbin, E., Alminana, C., Souza-Fabjan, J.M.G., de

Figueirêdo Freitas, V.J., and Mermillod, P. (2016). Combination of oviduct fluid and heparin to improve monospermic zygotes production during porcine in vitro fertilization. *Theriogenology* 86, 495–502.

Cabello, E., Garrido, P., Morán, J., González del Rey, C., Llana, P., Llana-Suárez, D., Alonso, A., and González, C. (2015). Effects of resveratrol on ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation in ob/ob mice. *Fertil. Steril.* 103, 570–579.e1.

Catalano, P.M. (2010). Obesity, insulin resistance, and pregnancy outcome. *Reproduction* 140, 365–371.

Chu, S.Y., Kim, S.Y., Lau, J., Schmid, C.H., Dietz, P.M., Callaghan, W.M., and Curtis, K.M. (2007). Maternal obesity and risk of stillbirth: a metaanalysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 197, 223–228.

Comstock, I.A., Kim, S., Behr, B., and Lathi, R.B. (2015). Increased body mass index negatively impacts blastocyst formation rate in normal responders undergoing in vitro fertilization. *J. Assist. Reprod. Genet.* 32, 1299–1304.

Dall Agnoletta, I.A., Martin, V.B., Lange, D., and Martin Gomez, E. (2011). Relación entre el índice de masa corporal y el número y grado de madurez de los ovocitos obtenidos en tratamientos de fertilidad de alta complejidad. *IntraMed J.* 2, 1–11.

Dunning, K.R., Russell, D.L., and Robker, R.L. (2014). Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and  $\beta$ -oxidation. *Reprod. Camb. Engl.* 148, R15-27.

Flores-Alonso, J.C., Lezama-Monfil, L., Sánchez-Vázquez, M.L., Reyes, R., and Delgado, N.M. (2008). Heparin effect on in vitro nuclear maturation of bovine oocytes.

Zygote 16, 1–8.

Fuentes-Morales, M., Reyes, R., Sánchez-Vázquez, M., and Flores-Alonso, J. (2009). Evaluación de la síntesis de heparina en el complejo ovocito-células de la granulosa de bovino. 2º Congreso Internacional en Ciencias Veterinarias y Zootecnia (Puebla, México).

Grindler, N.M., and Moley, K.H. (2013). Maternal obesity, infertility and mitochondrial dysfunction: potential mechanisms emerging from mouse model systems. *Mol. Hum. Reprod.* 19, 486–494.

Gu, L., Liu, H., Gu, X., Boots, C., Moley, K.H., and Wang, Q. (2015). Metabolic control of oocyte development: linking maternal nutrition and reproductive outcomes. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 251–271.

Gutiérrez, J., Rivera-Dommarco, J., T Shamah-Levy, Villalpando-Hernández, S., Franco, A., Cuevas-Nasu, L., Romero-Martínez, M., and Hernández-Ávila, M. (2012). Encuesta nacional de salud y nutrición 2012: resultados nacionales (Cuernavaca, Morelos, México: Instituto Nacional de Salud Pública : Secretaría de Salud).

Hou, Y.-J., Zhu, C.-C., Duan, X., Liu, H.-L., Wang, Q., and Sun, S.-C. (2016). Both diet and gene mutation induced obesity affect oocyte quality in mice. *Sci. Rep.* 6, 1–10.

Jungheim, E.S., Schoeller, E.L., Marquard, K.L., Loudon, E.D., Schaffer, J.E., and Moley, K.H. (2010). Diet-Induced Obesity Model: Abnormal Oocytes and Persistent Growth Abnormalities in the Offspring. *Endocrinology* 151, 4039–4046.

Jungheim, E.S., Macones, G.A., Odem, R.R., Patterson, B.W., Lanzendorf, S.E., Ratts, V.S., and Moley, K.H. (2011). Associations between free fatty acids, cumulus

oocyte complex morphology and ovarian function during in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* **95**, 1970–1974.

Keyhani, E., and Storey, B.T. (1973). Energy conservation capacity and morphological integrity of mitochondria in hypotonically treated rabbit epididymal spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta* **305**, 557–569.

Kim, K.-H., Kim, E.-Y., Lee, S.-Y., Ko, J.-J., and Lee, K.-A. (2018). Oocyte Cytoplasmic Gas6 and Heparan Sulfate (HS) are Required to Establish the Open Chromatin State in Nuclei During Remodeling and Reprogramming. *Cell. Physiol. Biochem.* **45**, 37–53.

Lamoureux, F., Baud'huin, M., Duplomb, L., Heymann, D., and Rédini, F. (2007). Proteoglycans: key partners in bone cell biology. *BioEssays* **29**, 758–771.

Loneragan, P., and Fair, T. (2016). Maturation of Oocytes in Vitro. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **4**, 255–268.

López Serna, N. (2012). *Biología del desarrollo: cuaderno de trabajo*. McGraw-Hill Interamericana Editores. México.

Nunes, C., Silva, J.V., Silva, V., Torgal, I., and Fardilha, M. (2015). Signalling pathways involved in oocyte growth, acquisition of competence and activation. *Hum. Fertil.* **18**, 149–155.

Oliver Sánchez, C., Matallín Evangelio, P., Eleno Buendicho, I., Oliva García, A.B., Delgado García, S.I., Cremades, N., and Martínez Escoriza, J.C. (2014). Obesidad como factor pronóstico reproductivo en ciclos de fecundación in vitro-inyección espermática intracitoplasmática. *Prog. Obstet. Ginecol.* **57**, 393–399.

Organización Mundial de la Salud (2016). *Obesidad y sobrepeso. Nota descriptiva*

N°311.

Ozekinci, M., Seven, A., Olgan, S., Sakinci, M., Keskin, U., Akar, M.E., Ceyhan, S.T., and Ergun, A. (2015). Does obesity have detrimental effects on IVF treatment outcomes? *BMC Womens Health* 15.

Pallares, P., Garcia-Fernandez, R.A., Criado, L.M., Letelier, C.A., Fernandez-Toro, J.M., Esteban, D., Flores, J.M., and Gonzalez-Bulnes, A. (2010). Substantiation of Ovarian Effects of Leptin by Challenging a Mouse Model of Obesity/ Type 2 Diabetes. *Theriogenology* 73, 1088–1095.

Penzias, A.S. (2012). Recurrent IVF failure: other factors. *Fertil. Steril.* 97, 1033–1038.

Purcell, S.H., and Moley, K.H. (2011). The impact of obesity on egg quality. *J. Assist. Reprod. Genet.* 28, 517–524.

Robker, R.L. (2008). Evidence that obesity alters the quality of oocytes and embryos. *Pathophysiology* 15, 115–121.

Romanato, M. (2003). Heparan sulphate: a putative decondensing agent for human spermatozoa in vivo. *Hum. Reprod.* 18, 1868–1873.

Romanato, M., Julianelli, V., Zappi, M., Calvo, L., and Calvo, J.C. (2008). The presence of heparan sulfate in the mammalian oocyte provides a clue to human sperm nuclear decondensation in vivo. *Hum. Reprod.* 23, 1145–1150.

Salustri, A., Camaioni, A., Di Giacomo, M., Fulop, C., and Hascall, V.C. (1999). Hyaluronan and proteoglycans in ovarian follicles. *Hum. Reprod. Update* 5, 293–301.

Samuelsson, A.-M., Matthews, P.A., M. Argenton, Christie, M.R., McConnell, J.M., Jansen, E.H.J.M., Piersma, A.H., Ozanne, S.E., Twinn, D.F., Remacle, C., et al. (2008). Diet-Induced Obesity in Female Mice Leads to Offspring Hyperphagia, Adiposity, Hypertension, and Insulin Resistance: A Novel Murine Model of Developmental Programming. *Hypertension* 51, 383–392.

Sauerbrun-Cutler, M.-T., Vega, M., Keltz, M., and McGovern, P.G. (2015). In Vitro Maturation and Its Role in Clinical Assisted Reproductive Technology: *Obstet. Gynecol. Surv.* 70, 45–57.

Seli, E., Babayev, E., Collins, S.C., Nemeth, G., and Horvath, T.L. (2014). Minireview: Metabolism of Female Reproduction: Regulatory Mechanisms and Clinical Implications. *Mol. Endocrinol.* 28, 790–804.

Sprícigo, J.F.W., Diógenes, M.N., Leme, L.O., Guimarães, A.L., Muterlle, C.V., Silva, B.D.M., Solà-Oriol, D., Pivato, I., Silva, L.P., and Dode, M.A.N. (2015). Effects of Different Maturation Systems on Bovine Oocyte Quality, Plasma Membrane Phospholipid Composition and Resistance to Vitrification and Warming. *PLOS ONE* 10, e0130164.

The ESHRE Capri Workshop Group (2006). Nutrition and reproduction in women. *Hum. Reprod. Update* 12, 193–207.

Valckx, S.D.M., Arias-Alvarez, M., De Pauw, I., Fievez, V., Vlaeminck, B., Fransen, E., Bols, P.E.J., and Leroy, J.L.M.R. (2014). Fatty acid composition of the follicular fluid of normal weight, overweight and obese women undergoing assisted reproductive treatment: a descriptive cross-sectional study. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 12, 13.

Watson, L.N., Mottershead, D.G., Dunning, K.R., Robker, R.L., Gilchrist, R.B., and

Russell, D.L. (2012). Heparan Sulfate Proteoglycans Regulate Responses to Oocyte Paracrine Signals in Ovarian Follicle Morphogenesis. *Endocrinology* 153, 4544–4555.

Yokoo, M., and Sato, E. (2011). Physiological function of hyaluronan in mammalian oocyte maturation. *Reprod. Med. Biol.* 10, 221–229.

Zeng, H. -t., Ren, Z., Guzman, L., Wang, X., Sutton-McDowall, M.L., Ritter, L.J., De Vos, M., Smitz, J., Thompson, J.G., and Gilchrist, R.B. (2013). Heparin and cAMP modulators interact during pre-in vitro maturation to affect mouse and human oocyte meiosis and developmental competence. *Hum. Reprod.* 28, 1536–1545.

Zhang, L. (2010). Glycosaminoglycan (GAG) Biosynthesis and GAG-Binding Proteins. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, (Elsevier), pp. 1–17.





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00059

Matrícula: 2163801798

EFFECTOS DE LA HEPARINA SOBRE LA MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS OBTENIDOS DE RATAS OBESAS.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD

18 OCT 2018

COORDINACIÓN DE SISTEMAS ESCOLARES

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 16 del mes de octubre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE
- DR. JUAN CARLOS FLORES ALONSO
- DRA. ROSALINA MARIA DE LOURDES REYES LUNA
- DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: ALAIN PRIEGO CORTES



ALAIN PRIEGO CORTES  
ALUMNO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICARDE

PRESIDENTE

DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE

VOCAL

DR. JUAN CARLOS FLORES ALONSO

VOCAL

DRA. ROSALINA MARIA DE LOURDES REYES LUNA

SECRETARIO

DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ